

A melanóma progresszióját befolyásoló endokrin tényezők

Doktori értekezés

Dobos Judit

Semmelweis Egyetem
Patológiai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Ladányi Andrea PhD

Hivatalos bírálók: Dr. Vincze Borbála,
a biológiai tudományok kandidátusa
Dr. Buday László egyetemi docens,
az orvostudományok doktora

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kerényi Tibor egyetemi tanár,
az orvostudományok doktora
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Somlai Beáta egyetemi docens,
az orvostudományok kandidátusa
Dr. Réz Gábor egyetemi docens,
a biológiai tudományok kandidátusa

Budapest
2007

TARTALOMJEGYZÉK

1	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
2	BEVEZETÉS.....	7
2.1	Klasszikusan hormonfüggő daganatok.....	7
2.2	Nemi különbségek egyéb tumorok esetén – klinikai és kísérletes vizsgálatok	9
2.3	A nem szerepe melanómában.....	11
2.3.1	Klinikai vizsgálatok.....	11
2.3.2	Állatmodellek és in vitro kísérletek.....	13
2.3.3	Nemihormon-receptorok expressziója melanómában	14
2.4	A szteroidhormonok hatásának mechanizmusa, nemihormon-receptorok.....	15
2.5	Glükokortikoid-receptor	19
2.6	2-metoxi-ösztadiol.....	20
3	CÉLKITŰZÉSEK	22
4	MÓDSZEREK	23
4.1	Beteganyag	23
4.2	Sejtvonalak	23
4.3	Antigénkimutatási módszerek	24
4.3.1	Áramlási citometria	24
4.3.2	Immuncitokémia.....	24
4.3.3	Immunhisztokémia	25
4.4	Szteroidhormon-receptorok expressziójának kimutatása nested RT-PCR-rel illetve kvantitatív PCR-rel	26
4.5	In vitro tesztek	28
4.5.1	Proliferációs teszt	28
4.5.2	Mátrix-adherencia.....	28
4.5.3	Migráció	29
4.5.4	Áramlási citométeres apoptózis- és sejtciklus-meghatározás.....	29
4.5.5	Kaspázaktivitás mérése.....	29
4.5.6	Mitokondriummembrán-potenciál mérése	29
4.6	In vivo vizsgálatok	30

4.6.1	2ME ₂ hatásának vizsgálata tumornövekedésre és májáttétképzésre melanómasejtek lépbe történő oltását követően	30
4.6.2	Májáttétképzés kinetikájának vizsgálata	30
4.6.3	Tüdőkolonizációs vizsgálat	31
4.6.4	Intrakardiális oltás	31
4.7	Statisztikai módszerek	31
5	EREDMÉNYEK	32
5.1	Nemihormon-receptorok expressziója és a hormonok <i>in vitro</i> hatása emberi melanómasejtekre	32
5.1.1	Receptorexpresszió vizsgálata	32
5.1.2	Nemihormonok hatásának vizsgálata emberi melanómasejtek proliferációjára	34
5.1.3	Ösztrogén hatásának vizsgálata emberi melanómasejtek adherenciájára.....	37
5.2	Glükokortikoid-receptor expressziója és <i>in vitro</i> hormonhatások emberi melanómasejteken.....	39
5.2.1	Glükokortikoid-receptor kimutatása humán melanóma-sejtvonalakon és tumormintákon	39
5.2.2	Dexametazon hatásának vizsgálata emberi melanómasejtek proliferációjára....	42
5.2.3	Dexametazon hatásának vizsgálata emberi melanómasejtek adherenciájára és migrációjára	44
5.3	Nemi különbségek a melanóma áttétképzésében - <i>in vivo</i> kísérletek	46
5.3.1	Az áttétképzés kinetikájának vizsgálata lép-máj metasztázis modellben.....	46
5.3.2	A melanómasejtek kolonizációja nemi preferenciájának szervspecifitása.....	48
5.4	2-metoxi-ösztradiol <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i> hatásai melanómasejteken.....	51
5.4.1	2ME ₂ hatása emberi melanómasejtek proliferációjára, a sejtciklus fázisaira és az apoptózisra.....	51
5.4.2	A megfigyelt apoptózis mechanizmusának feltérképezése	52
5.4.3	A 2-metoxi-ösztradiol hatása a mikrotubulusokra	54
5.4.4	A 2-metoxi-ösztradiol hatása a tumornövekedésre, az áttétképzésre és az áttétekben a melanómasejtek apoptózisára.....	55
6	MEGBESZÉLÉS	58
7	KÖVETKEZTETÉSEK	64
8	ÖSSZEFOGLALÁS	65

9	IRODALOMJEGYZÉK.....	66
10	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	81
11	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	84

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2ME₂	2-metoxi-ösztradiol
AEC	3-amino-9-etilkarbazol
AIB1	amplified in breast cancer-1
AR	androgénreceptor
ARE	androgén reszponzív elem
bFGF	bázikus fibroblaszt növekedési faktor
BSA	marha szérum albumin, bovine serum albumin
DEX	dexametazon
DEPC	dietil-pirokarbonát
DHT	5 α -dihidrotesztoszteron
E	ösztrogének
E₂	17- β -ösztradiol
EBS	ösztrogénkötő hely, estrogen binding site
EGF	epidermális növekedési faktor
EGFR	EGF-receptor
ER	ösztrogénreceptor
ERE	ösztrogén reszponzív elem
FCS	borjúsavó, fetal calf serum
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
GC	glükokortikoid
GCR	glükokortikoid-receptor
LHRH	luteinizáló hormon-releasing hormon
Mab	monoklonális antitest
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MMP	mátrix metalloproteináz
NSCLC	nem-kissejtes tüdőrák, non-small cell lung cancer
P	progeszteron
PBS	fiziológiás sóoldat foszfát-pufferrel, phosphate buffered saline
PHR	fenolvörös, phenol red
PR	progeszteronreceptor

SCLC	kissejtes tüdőrák, small cell lung cancer
SERM	szelektív ösztrogénreceptor-modulátorok
T	tesztoszteron
TAE	tris-acetát-EDTA
VEGF	vaszkuláris endotheliális növekedési faktor
Wt	vad típusú, wild type

2 BEVEZETÉS

A hagyományosan hormondependens tumorok mellett (emlő-, endometrium- vagy prosztaták) egyre több daganattípusról derül ki, hogy eltérő módon viselkedik férfiakban és nőkben, arra utalva, hogy az endokrin tényezőknek szerepe lehet a betegség lefolyásában. Férfiakban gyakoribbak a fej-nyaki, nyelőcső-, és májtumorok, nőkben a pajzsmirigy és a hólyag daganatos betegségei (Bray 2002). A nők körében általában jobb prognózis figyelhető meg, elsősorban a fiatalabb korcsoportban (Micheli 1998). Férfiakban a pajzsmirigy-tumor, a máj-, a kolorektális és a nyelőcsődaganat, a kissejtes tüdőrák (small cell lung cancer, SCLC) és a nem kissejtes tüdőrák (non-small cell lung cancer, NSCLC) mellett a malignus melanóma is rosszabb prognózisú (Miller és Mac Neil 1997, Bray 2002).

2.1 Klasszikusan hormonfüggő daganatok

Az emlőrák kialakulásában és progressziójában az ösztrogén központi szerepet játszik. E tumorok közel 70%-a kifejez ösztrogénreceptort (ER) és/vagy progeszteronreceptort (PR). Az utóbbi évtizedekben az endokrin terápia főszereplője a tamoxifen volt, egy szelektív ösztrogénreceptor-modulátor (SERM), ami javította a túlélést a korai stádiumban, és az életminőséget áttétes betegségben (Massarweh 2006). Ma újabb és újabb generációs SERM-eket fejlesztenek ki, melyek ösztrogénszerű hatást fejtenek ki például a csontokban (oszteoporózis-gátlás) és a koleszterinszintre, de antiösztrogén-hatásuk van az emlőkben és a méhben (tumorgátlás; Jensen 2003). A szelektív ösztrogénreceptor-downregulátorok (SERD, pl. fulvestrant) az ösztrogénreceptorhoz kötődve megátolják a dimerizációt, majd a receptor leépítését indukálják. Így a fulvestrant csökkenti mind az ER, mind a PR szintjét a sejtekben, és egyáltalán nincs agonista aktivitása („tisztá” antiösztrogén; Robertson 2005). Az ösztrogén-bioszintézis kulcsenzime az aromataz (3. ábra, ld. 19. o.), amely az androgéneket ösztrogénekké alakítja. Premenopauzában az ösztrogénszintézis elsősorban a petefészkekben zajlik. Menopauza után a petefészkek androgéneket, a mellékvese kis mennyiségű ösztrogént és androgén-prekurzorokat termel. Az ösztrogénszintézis (aromatizáció) a perifériára tolódik, főként a zsír-, a bőr- és az

izomszövetben, valamint a májban zajlik. Aromatázgátlók (pl. anastrozol) alkalmazásával a ligand kialakulása gátolható (Dank 2005). Mindezek ellenére az ER+ vagy PR+ tumorról rendelkező betegeknek egy része nem reagál a kevésbé toxikus endokrin terápiára, illetve a kezelés során is kialakulhat rezisztencia. Ezt különböző növekedési faktorok, pl. az EGF (epidermális növekedési faktor) jelátviteli útvonalaival való interakcióval magyarázzák (Massarweh 2006).

Az endometriumráknak legalább két típusa létezik. Az I. típusra jellemző az ösztrogéntúlsúly, nagy mennyiségben fejez ki ER-t és PR-t, reagál az endokrin terápiára, és jó a prognózisa. A II. típus alig expresszálja a hormonreceptorokat, nem reagál endokrin terápiára és sokkal agresszívabb (Emons 2000). Az ER két izotípusa közül az ER α jelenléte mind emlő-, mind endometriumrákban kevésbé agresszív fenotípussal társul. Az ER α /ER β arány mindkét tumortípusban emelkedett a normális szövetekhez viszonyítva. A progeszteronreceptor izotípusai közül emlőrákban a PRA, míg endometriumkarcinómában a PRB fordul elő gyakrabban. A normális endometriumhoz képest az expressziós szint alacsonyabb. Emlőrákban a PRA magas, míg endometriumrákban az alacsony koncentrációja van kapcsolatban a rosszabb prognózissal. Az intratumorális ösztrogénszintézisért és -metabolizmusért felelős enzimek is különböznek a két tumortípusban (Ito 2007).

Az epitheliális ováriumkarcinómák hormonfüggését epidemiológiai, receptor- és *in vitro* vizsgálatok is igazolják (Makar 2000). A patogenezisben szerepet játszik az emelkedett ösztrogén- és androgénszint, illetve a csökkent progeszteronszint, de a szérumszintnél fontosabb lehet a lokális koncentráció (Lukanova 2005). ER-, PR- és AR-expressziót kimutattak normális és malignus petefészek-epithelsejteken is. A daganatsejtekben megváltozott az ER α expressziós szintje, a PR és az AR szintje lecsökkent, míg az ER β -é változatlan maradt (Lau 1999). A receptorexpresszió alacsonyabb, mint emlő- és endometriumrákban. A hormonkezelés hatásfoka alacsony, és nem jósolható meg a receptorstátusz alapján (Makar 2000). Aromatázinhibitor terápiára azok az ER+ betegek reagáltak, akikben alacsony volt a HER-2 expressziós szintje (Smyth 2007).

Ellentmondásos az androgének szerepe prosztatacarcinómában. A receptorral rendelkező, hormonreszponzív daganatok reagálhatnak növekedéssel és apoptózissal is a tesztoszteronra attól függően például, hogy ösztradiollá vagy dihidrotesztoszteronná

konvertálódik a metabolizmus során (Friedman 2005). Az androgén-megvonásnak számos eszköze van, pl. kasztrálás, ösztrogének, LHRH-analógok vagy antiandrogének bevétele. A hatás elmaradásának oka lehet a receptor mutációja, amplifikációja, keresztreakciója növekedésifaktor-útvonalakkal (Klotz 2000), vagy a koregulátorok mutációja (Heinlein 2004).

2.2 Nemi különbségek egyéb tumorok esetén – klinikai és kísérletes vizsgálatok

A nők körében a dohányzás terjedésével a tüdőrák előfordulása meredeken emelkedik. A betegség biológiája különbözik a két nemből. A nők érzékenyebbek a dohányfüst karcinogénjeire (Zang 1996), több DNS-addukt keletkezik és alacsonyabb a DNS-javító enzimek kapacitása (Wei 2000). Mivel ER-t detektáltak a tüdőtumorkban, felmerült az ösztrogén biológiai szerepe a betegség kialakulásában (Patel 2004). NSCLC-s betegekben ER α -t a citoplazmában, ER β -t a sejtmagban mutattak ki, előbbi jelenléte és utóbbi hiánya rosszabb prognózissal párosult (Kawai 2005). NSCLC sejtvonalon és tüdő-eredetű fibroblasztokon mindkét receptornak megtalálhatóak voltak a vad típusú és alternatív splicing útján létrejövő variánsai is. Az ösztradiol serkentette a szaporodásukat *in vivo* és *in vitro* is (Stabile 2002). Férfiakból ill. nőkből származó adenokarcinóma-sejtvonalakon vizsgálva az ösztrogénreceptorokat, nem találtak különbséget az ER α és az ER β expressziós szintje vagy E₂-kötése között, de az ösztrogénkezelésnek csak a nőkből származó sejtvonalakon volt funkcionális hatása (proliferáció és PR-expresszió serkentése; Dougherty 2006). mRNS szinten vizsgálva az ER-expressziót azt találták, hogy nőkben sokkal nagyobb arányban fordul elő az ER α , mint férfiakban, az ER β ezzel szemben nem mutatott nemi különbséget. Nőkben mindkét receptor gyakrabban jelenik meg tumoros szövetben, mint egészségesben (Fasco 2002). Mindezek ellenére a prognózis és a túlélés a nők körében jobb (Moore 2004, Visbal 2004, Båtevik 2005). SCLC esetén a nőknek hosszabb a túlélése, de ez az előny eltűnik 60 év fölött (Wolf 1991).

Vastagbél tumor esetén a nők körében a betegségmentes- és a teljes túlélés hosszabb volt (Wichmann 2001, McArdle 2003), a beteg neme szignifikáns független prognosztikai faktornak adódott (Wolters 1996). Az ösztrogének szerepére utal az is, hogy a két nemből különbözik a lokalizáció, és hogy a hormonpótló terápiában

részesülő posztmenopauzális nőkben kisebb a rizikója a tumor kialakulásának (Di Leo 2001). A normális bélhamban kimutatható ER β expressziós szintje lecsökkent vastagbél-tumorokban (Campbell-Thompson 2001). Szelektív ER-modulátorok gátolták vastagbél-tumor-sejtvonalak proliferációját *in vitro* (Picariello 2003). Karcinogénnel indukált colontumor incidenciája kétszeres volt hím patkányokban nőstényekhez képest, és a túlélésük is szignifikánsan rövidebb volt (Di Leo 2001). Az ösztradiol mitogén hatást fejtett ki vastagbél-tumor-sejtvonalra *in vivo* (Singh 1993). Vastagbél-adenokarcinóma sejtek patkányok portális keringésébe injektálása nagy számban eredményez májjáttéteket, de csak hímegekben (Panis 1990).

Hepatocelluláris karcinóma főleg férfiakban fordul elő, a túlélés is szignifikánsan rövidebb a körükben rosszabb patológiai jellemzők következtében (Tangkijvanich 2004). Kimutatták mind ER, mind AR és PR jelenlétét, ez utóbbi előnyös prognosztikai faktornak bizonyult (Vizoso 2007). Az ösztradiol gátolta egy hepatocelluláris karcinóma-sejtvonal szaporodását, blokkolta a sejtciklust és apoptózist indukált (Huang 2006). Egerekben ösztrogénkezelés csökkenti a Kupffer-sejtek által termelt IL-6 mennyiségét, és így gátolja kémiai karcinogénnel indukált tumor kialakulását (Naugler 2007).

A pajzsmirigy daganatainak biológiai viselkedése is különbözik a két nemből. Bár a nőkben gyakoribbak (leginkább a 40-60 éves korosztályban; Vincze 2004), a férfiakban rosszabb a prognózis (Paloyan 1982). A túlélési adatok premenopauzális nők körében a legjobbak. Ebben a csoportban immunhisztokémiai módszerrel szignifikánsan több ER-t tudtak kimutatni, mint menopauza utáni nőkben, vagy férfiakban (Diaz 1991). A sporadikus tumorok átmérője nagyobb, és a nyirokcsomóáttétek száma magasabb férfiakban (Machens 2006). Besugárzás hatására hím patkányokban kétszer annyi folliculáris karcinóma alakult ki, mint nőstényekben, amit az ivartalanítás a felére csökkentett (Paloyan 1982).

A fej-nyaki és nyelőcsőtumorok férfiak körében tapasztalható nagyobb gyakorisága ugyan összefügg fokozottabb alkoholfogyasztásukkal és dohányzásukkal (La Vecchia 2004), de a nemi hormonok szerepét is vizsgálatok bizonyítják. Orális tumorban szenvedő nők között sokkal magasabb arányban vannak a posztmenopauzában lévők, mint az azonos korú kontrollcsoportban (Suba 2007). Munkacsoportunk vizsgálatai szerint a laringeális és a hipofaringeális régióban

megjelenő tumorok 50%-ban expresszálják az ER-eket és a PR-t. Az ER α túlsúlyban van az ER β -hoz képest, összességében az ER-expresszió a rosszabb túléléssel korrelál (Lukits 2007).

Nyelőcsőtumorok esetén a hosszú távú túlélés jobb a nők körében (Hidaka 2007). AR kimutatható normális nyelőcsőepithelből és adenokarcinómákból is (Awan 2007). ER α -t (citoplazmában) és ER β -t (magi reakció) is találtak e betegségtípusban, az ER α + és ER β - státusz rossz prognózist jelent (Nozoe 2007). Az ösztrogénkezelés gátolta egy ER+ nyelőcsőkarcinóma-sejtvonal növekedését *in vitro* (Utsumi 1991) és *in vivo*, míg az ER- vonalra nem volt hatással (Ueo 1990). Xenograft modellben nyelőcsőkarcinóma-sejtvonal hím egerekben gyorsabban nőtt, mint nőstényekben (Awan 2007).

2.3 A nem szerepe melanómában

2.3.1 Klinikai vizsgálatok

Az epidemiológiai adatok azt mutatják, hogy az elmúlt pár évtizedben a világ minden táján nőtt a melanóma incidenciája, elsősorban az európai populációban. Vékony léziókat gyakrabban diagnosztizálnak fiatalabbakban, míg idősekben a vastagabb tumor és a noduláris melanóma gyakoribb. A férfiak körében szintén nagyobb a noduláris típus előfordulási valószínűsége. A lokalizáció is különböző a két nemből, nőknél inkább a végtagokon, míg férfiakon a fejen, nyakon és háton fordul elő többször. Mindkét tényező hozzájárul a férfi betegek körében tapasztalható rosszabb prognózishoz. A mortalitási ráta a nők körében változatlan, a férfiak között azonban nő (Tamir 1996, Ulmer 2003, Lasithiotakis 2006, MacKie 2007). Az alapvető prognosztikai faktorok tehát, úgymint vastagság, lokalizáció és nem, összefüggést mutatnak: nőknél vékonyabb léziók jelennek meg, és inkább a végtagokon, mindkét tényező javítja az életkilátásokat. Ebben minden tanulmány egyetért. Abban már ellentmondás van, hogy előrehaladottabb, III. stádiumú betegségben is túlélési előnye van-e a nőknek. Az életkor prognosztikai szerepe sem egyértelmű, annyi azonban leszögezhető, hogy menopauza után a nők túlélése romlik (Rampen 1984, Jatoi 1993, Miller és Mac Neil 1997, Kemeny 1998). Egy vizsgálat jelentős különbséget talált a

koreloszlásban abban a stádiumban, amikor regionális nyirokcsomóáttétek jelennek meg. 50 éves kort tekintve a klimax hozzávetőleges időpontjának, eddig az életkorig kétszer annyi férfiban alakul ki ez az állapot, mint nőben. Tehát a melanóma progressziója ebbe a stádiumba férfiakban gyorsabb (hasonló módon menopauza után nőkben is; Richardson 1999). Más megfigyelések szerint az ötéves túlélési ráta a nőknél addig jobb, amíg lokalizált tumorról van szó, de eltűnik ez a különbség, ha már nyirokcsomóáttétek is vannak (Shaw 1982). Távoli áttétek megjelenése után nem találtak különbséget a pre- ill. posztmenopauzában lévő nők túlélése között sem (Rampen 1984, Jatoi 1993). A tumornövekedés kinetikájában is különbözik a két nem. A melanóma agresszivitása, metasztatikus potenciálja férfiakban kifejezettebb, bennük a tüdőáttétek megkettőződési ideje rövidebb (Rampen 1984). A túlélést jelentősen befolyásolja az áttétképzés mintázata is. Nőkben az áttétképzésben inkább a bőr és a nyirokcsomók, míg férfiakban inkább a zsigerek érintettek, ez utóbbi jár együtt rosszabb prognózissal (Rampen 1984).

A bőrben jelentős mennyiségű intrakrin vagy parakrin hatású nemi hormon szintetizálódik, elsősorban a faggyúmirigyben és az izzadságmirigyben. Az androgének a faggyúmirigyek növekedésére és differenciálódására, a szőrnövekedésre és a sebgyógyulásra hatnak elsősorban, míg az ösztrogéneknek a bőr öregedésében, pigmentációjában és a szőrnövekedésben van szerepük (Zouboulis 2007). Receptoraik szteroidkezelésre reagálnak, akár tumort is indukálhatnak EGFR vagy protoonkogének aktiválásával, az apoptózis gátlásával. Mindezek ellenére nem találtak szignifikáns növekedést a bőrtumorok, elsősorban melanóma incidenciája és az ösztrogénkezelés között (Leslie 2005). Orális fogamzásgátlót alkalmazó, vagy hormonpótló terápiában részesülő nőknél vékonyabb léziókat találtak, amelyek viszont nagyobb valószínűséggel fordultak elő a törzsön, így ez a túlélési rátát összességében nem befolyásolta (Jatoi 1993, Lederman 1985).

Az irodalom igen ellentmondásos tekintetben, hogy a terhesség milyen módon hat a melanóma klinikai lefolyására. Jelenleg nincs bizonyíték arra, hogy hátrányosan befolyásolná a betegek teljes túlélését (Leachman 2007). Vékony léziók esetén (stádium I-II, lokalizált tumor) a terhesség nem befolyásolja a 10 éves tumormentes- ill. teljes túlélést, a betegek nem jelentkeztek eltérő lokalizációjú, stádiumú vagy nyirokcsomó-érintettségű tumorokkal (Daryanani 2003, O'Meara 2005).

Az 1970-80-as években próbálkoztak endokrin terápiával az áttétes melanóma kezelésében. A tamoxifent alkalmazták előbb monoterápiában, később citotoxikus szerekkel kombinációban alkalmazva, de nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket. Sem a dakarbazin, sem a ciszplatin hatékonyságát nem növelte (Rusthoven 1996, Falkson 1998, Agarwala 1999).

2.3.2 Állatmodellek és in vitro kísérletek

Az epidemiológiai megfigyeléseknek a kísérletes alátámasztása igen ellentmondó eredményeket hozott. Az ER expressziójára nézve heterogén B16 egér melanómavonal a különböző tanulmányok szerint gyorsabban (Proctor 1976, Proctor 1981), lassabban (Lopez 1978), vagy épp ugyanolyan ütemben (Simon 1985) nőtt hím ill. nőtény egerekben. A vemhesség nem befolyásolta a tumornövekedést (Proctor 1976). A hím egerek kasztrációja növelte a tumortömeget (Simon 1985), míg más kísérletekben hatástalan volt (Proctor 1976). Ösztradiol-kezelés növelte a B16 tumor növekedését mindkét nemben (Lopez 1978), és serkentette a tüdőáttét-képződést (Proctor 1981). Hörcsög melanómavonalak általában a nőtényekben nőnek gyorsabban (Lipkin 1970, Schleicher 1987), viszont az ösztradiol-kezelés egy ER+ vonal növekedését gátolta (Schleicher 1987).

Specifikus ösztrogénköti helyvel rendelkező humán melanóma-sejtvonalak hím egerekben gyorsabban nőttek, mint nőtényekben (Walker 1980, Feucht 1988). Kasztrálás hatására nőtt a tumortömeg (Feucht 1988). Ösztradiol-kezeléssel ER+ humán melanómavonal növekedését gátolni lehetett ép hím egerekben (Walker 1980), vagy ivartalanított hím és nőtény állatokban (Feucht 1988). Tímusz-irtott egerekben az ER+ emberi melanómák nőtényekben lassabban nőttek, mint hímeekben. Hímeekben nem volt különbség az ER+ ill. az ER- sejtvonal növekedésében, míg nőtényekben az ER- vonal gyorsabban nőtt (Neifeld 1980).

Munkacsoportunk két, ösztradiol-, progeszteron- és tesztoszteronköti helyekkel is rendelkező humán melanóma-sejtvonalat (HT168, HT199) vizsgált lép-máj metasztatizálás modellben. A primer tumor méretében nem volt különbség a két nemből, de hím állatokban sokkal hatékonyabb volt a metasztatizálás a májba (Ladányi 1995).

In vitro kísérletekben ösztadiol-kezeléssel gátolták 2 ER+ melanómavonal timidinfelvételét, míg az ER- vonalat nem befolyásolta. A hatás indirekt volt, az IL-8-termelés gátlására vezették vissza (Kanda 2001). Három tanulmány is arról számol be, hogy ösztadiol- vagy ösztron-kezeléssel nem tudták befolyásolni sem ER+, sem ER-humán melanóma-sejtvonal proliferációját (Feucht 1988, Lopes 1991, Richardson 1999). Mások ellentmondó eredményeket kaptak (dózisfüggetlen gátlás egy, stimulálás két ösztrogénkötő sejtvonalon; Chaudhuri 1979), vagy csak nagy dózisú ösztadiol (10^{-5} M) volt hatékony (Lama 1998). Leírták az E₂ inváziót gátló hatását (Dewhurst 1997, Richardson 1999). Rágcsáló sejtvonalakon hasonló eredményekről számoltak be. Egér melanómavonal növekedését nem befolyásolta az ösztadiol (Cobb 1974). Egy amelanotikus hörcsög vonal növekedését enyhén gátolta, míg a melanotikus sejtekre nem volt hatással (Lipkin 1970).

2.3.3 Nemihormon-receptorok expressziója melanómában

A humán melanómák jelentős részében biokémiai módszerekkel általában ki lehet mutatni ösztrogénkötődést. I. és II. típusú ösztrogénkötő helyet (estrogen binding site, EBS) különböztetnek meg (Piantelli 1995, Dewhurst 1997, Lama 1998). A melanómasejtek szteroidhormon-kötő képességét vizsgálva ösztrogénkötődést találtak az esetek 45%-ában, progeszteronkötődést 22%-ban, androgénkötődést 17%-ban és glükokortikoidkötődést 19%-ban (Fisher 1976, Neifeld 1980, Kokoschka 1982). Az arányokban nem mutatkozott különbség a nemek között. A primer tumorok 2/3-ában, a nyirokcsomó-áttétek felében, a bőrátétek 1/3-ában és a zsigeri áttéteknek szintén a felében találtak ösztrogénkötődést (Fisher 1976). A kötőhely specificitása hasonló volt az emlőrákban kimutatotthoz, de a kötődés kapacitása általában alacsonyabb volt. Az ösztadiolkötődés képessége nem korrelált sem a nemmel, sem a tumor helyével vagy előrehaladottságával (Neifeld 1980, Rümke 1980). A progeszteron-, androgén- vagy glükokortikoid-kötődést vizsgálva is elmondható, hogy az emlőrákban, vagy más, receptort tartalmazó hormonreszponzív szövetekben mért adatokhoz képest a kapacitás igen kicsi, de a disszociációs állandók hasonlóak (Neifeld 1980). Nem egyértelmű a kapcsolat az ösztrogén-, progeszteron- vagy tesztoszteronkötő fehérjék expressziója és a melanómás betegek túlélése között (Rampen 1984). Az ösztrogénkötő fehérje

mennyiségében nem találtak szignifikáns különbséget nők és férfiak között (50 vs. 38,7%), viszont a nők között azoknak a tumormentes időszaka bizonyult hosszabbnak, akikben ez a fehérje kimutatható volt (Walker 1987). Ez a túlélésben tapasztalható előny nem volt visszavezethető hisztopatológiai tényezőkre, az ösztrogénkötődés független volt a tumorvastagságtól, az invázió mértékétől, az osztódások számától, a fekélyesedéstől, az erezettségtől vagy nekrozis megjelenésétől (Walker 1991).

A hormonkötődést kimutató vizsgálatokkal szemben a hormonreceptorokra specifikus ellenanyagokat és immuncitokémiai módszereket alkalmazó tanulmányok negatív eredményről (McCarty 1986, Delarue 1987, Lecavalier 1990, Duncan 1994, Miller és Mac Neil 1997) vagy gyenge pozitivitásról számolnak be (Cohen 1990, Miller 1997). Egy esetben, enzim immunoassay-t használva közöltek pozitív eredményeket (Fernö 1987).

Vizsgálták ER jelenlétét melanóma-sejtvonalakon is, de a legtöbb tanulmány negatív eredményről számol be. Valószínűleg a humán melanómák egy része expresszálja a funkcióképes receptort, csak olyan kis koncentrációban, ami immunhisztokémiai módszerekkel nehezen detektálható (Feucht 1988). ER β -expressziót találtak különböző jó- és rosszindulatú melanociták léziókban, melynek szintje konzekvensen változott a tumor környezetével és az invázió előrehaladottságával, ami alapján prognosztikai markernek javasolják (Schmidt 2006).

PR melanómákban és naevusokban biokémiai módszerrel kis koncentrációban szintén kimutatható volt (Avril 1985), de immunhisztokémiával nem sikerült a jelenlétét alátámasztani sem in situ, sem metasztatikus melanómákban (Duncan 1994).

AR jelenlétét mind sejtvonalakon, mind metasztatikus melanómákban biokémiai és immuncitokémiai módszerekkel is igazolták. A receptor magi lokalizációban volt megfigyelhető, a hormonkötődési vizsgálatok atipikus specifitást mutattak (androgének mellett ösztradiol és progeszteron is; Morvillo 2002).

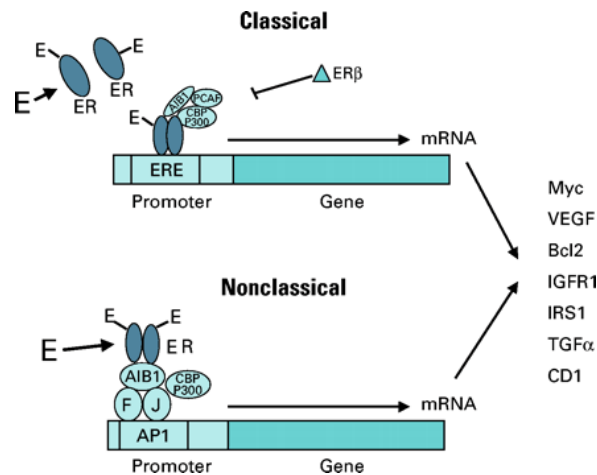
2.4 A szteroidhormonok hatásának mechanizmusa, nemihormon-receptorok

Az ösztrogénreceptorok a magi hormonreceptorok családjába tartoznak. Ezek a receptorok a specifikus ligandjuk megkötése után transzkripciós faktorként működnek. Az ER α és az ER β hasonló, de nem azonos szerkezettel rendelkezik. Előbbi tartalmaz

egy DNS-kötő domént, egy ligandkötő, egy dimerizációs és számos transzkripciós aktiváló domént. A ligand kötése után a receptor foszforilálódás útján aktiválódik, leválik a chaperon fehérjéről (hsp90), és megváltozik a konformációja. Dimerként kötődik az ösztrogén-reszponzív gének promóterének specifikus DNS-szakaszaihoz (ERE, estrogen responsive elements), és egyéb regulátor fehérjékkel (steroid receptor coactivator-ok pl. AIB1, amplified in breast cancer, vagy korepresszorok pl. N-CoR, nuclear receptor co-repressor) komplexet képezve fejt ki serkentő vagy gátló hatását a transzkripcióra. Az ösztrogén által stimulált gének között nem egy proliferációt és inváziót serkentőt vagy apoptózist gátlót találunk (pl. IGFR1, TGF α , Bcl2).

Az ER β -t 1996-ban fedezték fel keringési betegségek vizsgálata során, amikor észrevették, hogy az ösztrogén védő hatása ER knock out egerekben is érvényesül (Lewin 1997). Emberben a két ösztrogénreceptor között 95%-os a homológia a DNS-kötő régióban, 53%-os a C-terminális ligandkötő régióban, de nem mutatnak hasonlóságot az N-terminális szakaszon (Herynk 2004). A két receptor nem splicevariáns, génjeik különböző kromoszómákon találhatóak, de mindkettő dimer formában aktív. A különböző szövetekben eltérő arányban expresszálódnak, de azokon a helyeken, ahol mindkét típus megjelenik, heterodimereket is képezhetnek. A bőrhámot enyhén ER β -pozitívnak találták (Lewin 1997). Az ER β funkciója kevésbé ismert, de úgy tűnik, az ER α -val ellentétes, pl. a tamoxifen inkább az ER β -hoz kötődik, és így fejt ki tumorgátló hatását (Piantelli 1995, Dewhurst 1997, Lama 1998).

Mindez az ösztrogén genomikus hatásának (nuclear-initiated steroid signaling) klasszikus útvonalához tartozik. Más módja is van azonban a transzkripció regulációjának. A nem-klasszikus útvonalon nem az ER kötődik a promóterekhez, hanem más transzkripciós faktorokat toboroz, pl. c-jun, c-fos, ebben az esetben inkább mint koaktivátor fehérje van jelen, ami a komplexet stabilizálja. Ilyen módon szabályozza pl. a D1 ciklin vagy a myc transzkripcióját (**1. ábra**).

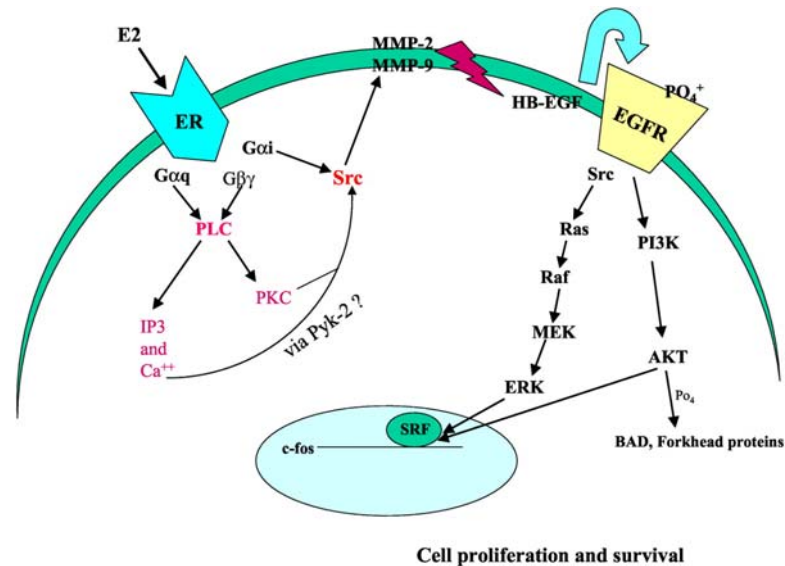


1. ábra

Az ösztrogén genomai hatásának klasszikus és nem-klasszikus útvonala (Osborne 2005)

Az említett hatásmechanizmusok mellett a szteroidoknak nem-genomi hatása is van, amely gyorsabb annál, mintha a transzkripció szabályozásán keresztül menne végbe. Ebben az esetben az ösztrogén a membránban található receptorokhoz kötődik, és másodlagos hírvivőkön, pl cAMP-n vagy Ca^{2+} -n keresztül hat (membrane-initiated steroid signaling; Osborne 2005, Levin 2005). Ezek a receptorok lehetnek vad típusú (Razandi 2004) vagy alternatív splicing útján létrejövő csonkolt ER-ek, esetleg más, nem klasszikus receptorok. Pl. a GPR30, egy G-fehérje kapcsolt receptor, ami szerkezetében nem, de ligandkötésében az ER-ekkel rokon (Morley 1992, Revankar 2005). (Mások ezt a receptort nem is plazmamembrán-, hanem intracelluláris transzmembrán receptorként írják le, ami az endoplazmás retikulumban illetve a Golgi-rendszerben található; Thomas 2005). E_2 jelenlétében a membránkötött ER-ek is homodimer formában aktívak (Razandi 2004). Ilyen módon aktiválódnak növekedésfaktor-receptorok, tirozinkinázok, a MAPK, PI3K, Akt (Pedram 2002). Az ER-ek a membránban számos molekulával kerülhetnek kapcsolatba, az Shc adapter fehérje pl. keresztül köti növekedési faktor receptor tirozinkinázokkal (RTK). Az EGFR-rel való kapcsolatát sokan tanulmányozták (**2. ábra**). Ebben az esetben a membrán-ER atípusos G-fehérje-kötött receptorként viselkedik, Src-n keresztül egy MMP-t aktivál. Ez a heparin-kötött EGF-et lehasítja a membránról, ami azután autokrin vagy parakrin módon EGFR-hez köt és beindítja a downstream kinázok aktivációs kaszkádját (Evinger 2005). Ezek pozitív visszacsatolással foszforilálják az ER-t is, tovább fokozva

aktivitásukat. Számos kináz képes foszforilálni az ER-t, pl. ERK1, MAPK, CDK2, Src, Akt, ezáltal az ER ligandfüggetlen módon is képes működni. A koaktivátorok és korepresszorok foszforilációja legalább ilyen fontos az ER-dependens transzkripció szabályozásában (Revankar 2005).



2. ábra

Az ER és az EGFR kapcsolata (Levin 2003)

A progeszteronreceptorok két alapvető típusa, a teljes hosszúságú B és a trunkált A szintén transzkripciós faktorként működik a PRE-khez (progesterone responsive elements) kötődve. A két izoforma azonos génről de különböző promóterrel íródik át. Rendelkeznek egy ligandkötő doménnel, egy DNS-kötő doménnel, egy hinge régióval és az A forma 2, a B pedig 3 transzkripciós aktiváló doménnel (AF: activation function; Lange 2004). Különböző gének átírását szabályozzák (Ito 2007). Ligandkötés után elsősorban a MAPK foszforilálja (Qiu 2003). A nem klasszikus útvonalon Sp1 transzkripciós faktorhoz kötődve indukál génátírást. A PR-nek is megfigyelték membránkötött, G-fehérje-kapcsolt változatát, ami transzkripció aktiválása nélkül, kináz-kaszkádon keresztül fejt ki hatását (Lange 2004). Az EGF jelátviteli útjához több szinten kapcsolódik, az EGFR stimulálja a PR foszforilációját hormon jelenléte nélkül is, a kulcsszereplő a MAPK (Daniel 2007).

Az androgénreceptorok is hasonlóképpen működnek, tesztoszteron vagy dihidrotesztoszteron (DHT) kötése után a magba jutva androgén-reszponzív elemhez

(ARE) kötődnek és számos gén transzkripcióját aktiválják. Az AR-t a MAPK foszforilálja, akár ligand-dependens, akár –independens aktiválódásról van szó (Slominski 2004). Az AR nem-genomi hatása elsősorban az Src-kináz aktiválásán keresztül valósul meg (Heinlein 2005).

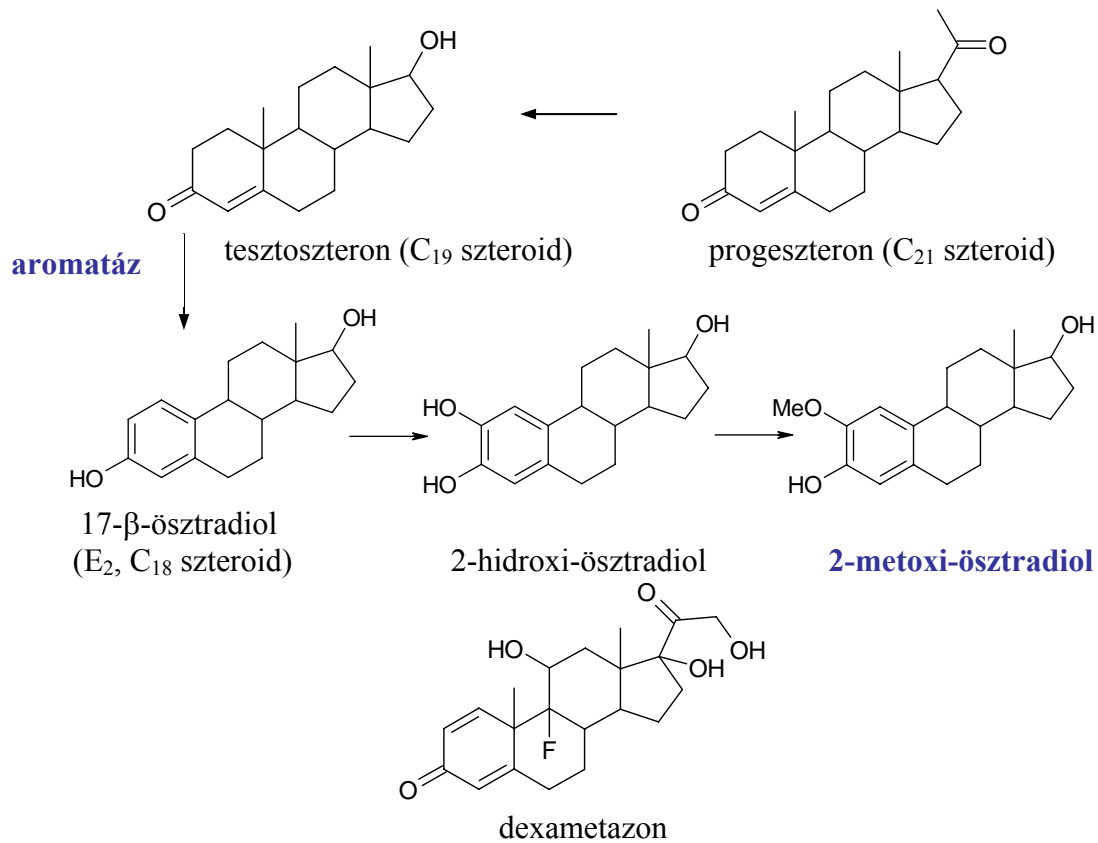
2.5 Glükokortikoid-receptor

A glükokortikoidok különböző útvonalakon indukálhatnak apoptózist, pl. Fas-on keresztül az extrinsic útvonalat aktiválva (Schmidt 2004, Kogianni 2004), a proapoptotikus Bim-en keresztül (Wang 2003, Abrams 2004) vagy indirekt sejtroncsolással (Oshima 2004). Rezisztencia alakulhat ki, ha túlnyomó részben inaktív vagy negatívan szabályozó GCR-izomformák vannak jelen a sejtben, ha az ABC-transzporter család tagjai overexpresszáltak, vagy ha az apoptotikus útvonalak gátoltak (pl. Bcl-2-overexpresszió; Schmidt 2004). A glükokortikoid-receptornak két izomformája van, melyek alternatív splicing mechanizmussal keletkeznek. A „klasszikus” GCR α a többi szteroidhormon-receptorokhoz hasonlóan dimer formában aktív, transzkripciós hatását más transzkripciós faktorokkal (pl. AP-1) kölcsönhatásban fejti ki. A GCR β hormont nem köt és transzkripciós aktivitása sincs, a glükokortikoid-hatás negatív szabályozójaként működik (Beato 2000) a koaktivátorok bekötődésének gátlásával (Charmandari 2005). A glükokortikoid-receptornak ezeken kívül legalább öt ismert variánsa és számos funkcióvesztéses mutációja van, melyek a GC-rezisztencia kialakulásában szerepet játszhatnak (Schmidt 2004). Melanómák glükokortikoid-kezelése során ellentmondó eredmények születtek. A dexametazon μM -os koncentrációban növelte hörcsög melanómasejtek populációjának megkettőződési idejét (Horn 1981), gátolta humán melanómasejtek kolónia-formáló képességét vagy blokkolta a sejtciklust a G₁/S fázisban (Osman 1985). Máshol a Dex-kezelt humán melanómasejtek nagy részét rezisztensnek találták (Bregman 1983), vagy nem tudtak különbséget kimutatni Dex-szenzitív ill. -rezisztens melanóma-sejtvonalak GC-receptorainak specifikálásában ill. affinitásában (Hawkins 1982).

2.6 2-metoxi-ösztadiol

A melanóma nemek között megfigyelt túlélési különbségének hátterében egy lehetséges mechanizmusként áll a 2-metoxi-ösztadiol (2ME₂) tumornövekedést gátló hatása, melyet az ösztrogénreceptoroktól függetlenül fejt ki. A 2ME₂ az ösztrogének lebontási folyamatai során keletkezik a 2-es pozíció hidroxilezésével majd metilálásával, elsősorban a májban, és a kiválasztó szervrendszeren keresztül ürül ki (**3. ábra**; Zhu 1998, Pribluda 2000, Schumacher 2001). Ez az ösztadiol egyetlen metabolitja, melynek nincs ösztrogén-szerű aktivitása *in vivo*, és nincs ismert fiziológiai hatása. Affinitása az ER α -hoz 500-szor, az ER β -hoz 3200-szor kisebb, mint az ösztadiolé, és az aktivitása független a receptorok jelenlététől (LaVallee 2002).

A 2ME₂ antiangiogén és antitumor hatásáról ismert. *In vitro* gátolja az endothelsejtek bFGF-indukált proliferációját és tubulusképzését, valamint *in vivo* csirke chorioallantois-membrán és egér kornea micropocket tesztben a bFGF- és VEGF-indukált neoangienezist (Fotsis 1994, Klauber 1997, Yue 1997, Pribluda 2000, Schumacher 2001). Számos sejtvonalon mutatták ki *in vitro* a G₂/M fázisban bekövetkező sejtciklusgátló és apoptózis-indukáló hatását (Schumacher 1999, Pribluda 2000, Qadan 2001, Qanungo 2002, Dingli 2002). Gátolja primer tumorok kialakulását illetve beereződését, valamint tüdőkolóniák képződését egér vagy humán eredetű tumorsejtekkel beoltott egerekben (Fotsis 1994, Klauber 1997, Kataoka 1998, Schumacher 1999, Pribluda 2000, Schumacher 2001, Qadan 2001, Dingli 2002).



3. ábra

A dolgozatban előforduló szteroidhormonok képlete, az ösztradiol bioszintézisének klasszikus útvonala és a 2ME₂ kialakulása

Többféle mechanizmus is szóba jött, amelyen keresztül a 2ME₂ kifejtheti hatását. Antiproliferatív hatását annak tulajdonították, hogy gátolja a mikrotubulusok funkcióját a tubulin polimerizációjának, depolimerizációjának, illetve a mikrotubulusok stabilitásának befolyásolásával (D'Amato 1994, Attalla 1996, Attalla 1998, Mabweesh 2003). Az apoptózis-indukcióban felmerült a kaspázok, a death receptor 5 vagy a p53 aktivációja, a Bcl-2 foszforilációja és inaktivációja, illetve a megnövekedett szuperoxid-produkció (Yue 1997, Mukhopadhyay 1997, Attalla 1998, Huang 2000, Pribluda 2000, Schumacher 2001, LaVallee 2003, Ghosh 2003).

3 CÉLKITŰZÉSEK

Munkánkban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy mely tényezők lehetnek a malignus melanóma nemekben megfigyelt eltérő viselkedésének a hátterében. A vizsgálatok sora az alábbi menetrendet követte:

1. Nemihormonreceptor-expresszió vizsgálata fehérje- és mRNS-szinten humán melanóma-sejtvonalakon
2. Nemi hormonok hatásának vizsgálata emberi melanóma-sejtvonalakon *in vitro*
3. Glükokortikoid-receptor expressziójának és funkciójának vizsgálata humán melanóma-sejtvonalakon *in vitro*
4. Humán melanómasejtek szervi áttétképzésének vizsgálata SCID egérben a gazdaszervezet nemének függvényében
5. Egy ösztrogénmetabolit, a 2-metoxi-ösztradiol biológiai hatásainak vizsgálata emberi melanómasejteken *in vitro* és *in vivo*

4 MÓDSZEREK

4.1 Beteganyag

A glükokortikoid-receptor expresszióját az Országos Onkológiai Intézetben kezelt betegek műtétielt eltávolított daganatain vizsgáltuk. 10 fagyasztott melanóma mintán, ugyanezen betegekből származó normális hámszöveten ill. három esetben naevuson végeztük a molekuláris biológiai vizsgálatot.

4.2 Sejtvonalak

A HT168 és HT168-M1 sejtvonalak (Ladányi 1990) az A2058 humán melanómavonal származékai, melyet L. A. Liotta biztosított számunkra (NCI, Bethesda, MD). A HT199 vonalat munkacsoportunk alakította ki. A WM35, WM983A és WM983B sejtvonalak M. Herlyn ajándékai (Wistar Institute, Philadelphia, PA). Az M24met sejtvonalat B. M. Mueller bocsátotta rendelkezésünkre (Scripps Research Institute, La Jolla, CA). A proliferációs tesztekben kontrollként humán embrionális fibroblasztokat használtunk. A melanóma-sejtvonalakat 37°C-on, 5% CO₂-ot tartalmazó atmoszférában, RPMI 1640 tápfolyadékban tartottuk fenn (Sigma), ami 5% főtális borjúsavót (FCS; Sigma) és 50 µg/ml gentamycint tartalmazott. A fibroblasztokat Medium 199-ben (Sigma) tartottuk, kiegészítve 10% FCS-sel és antibiotikumokkal. A hormonreceptor-expressziós vizsgálatokhoz a következő humán eredetű sejtvonalakat használtuk kontrollnak: MCF7 (ER+ emlőrák), OVCAR (ER+ ováriumkarcinóma), MDA-MB-231 (ER- emlőrák), LNCaP (AR+ prosztatákarcinóma) és DU145 (AR- prosztatákarcinóma). Ezek a vonalak az ATCC-től (American Type Culture Collection) származnak. A tenyésztés körülményei megegyeztek a melanómavonalakéval.

4.3 Antigénkimutatási módszerek

4.3.1 Áramlási citometria

Az intracelluláris antigének vizsgálatához 10^6 sejtet fixáltunk 15 percig 4%-os pufferolt paraformaldehid-oldatban, majd permeabilizáltunk 5 percig 0,02%-os szaponinnal. A nem specifikus kötőhelyeket 1% BSA-val blokkoltuk (PBS-ben hígítva). A sejteket 1 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten az elsődleges ellenanyagokkal, egér monoklonális anti-humán ER α -val (Novocastra, 1:40) vagy egér monoklonális anti-humán AR-rel (Novocastra, 1:40). A másodlagos antitestekkel szintén 1 órát inkubáltuk a sejteket: anti-egér IgG-FITC (Vector, 1:100) illetve biotinált anti-nyúl IgG (Dako, 1:400). Ez utóbbi esetén harmadik lépésben streptavidin-PE-Cy5 (Dako, 1:15) antitesttel inkubáltunk szintén 1 órát. Minden lépést kétszeri PBS-es mosás követett. A sejteket végül 0,5 ml PBS-ben mértük Partec FlowMax készüléken.

4.3.2 Immuncitokémia

A szteroidhormon-receptorok immuncitokémiai kimutatásához tárgylemezre (Multitest Slide, ICN Biomedicals) 10^4 sejtet tettünk ki szérumot is tartalmazó tápfolyadékban. Másnap 4%-os pufferolt formalinban fixáltuk, majd 0,02%-os szaponinnal permeabilizáltuk őket. A nem specifikus kötőhelyeket Image-iT FX signal enhancer-rel (Molecular Probes) blokkoltuk. Primer antitestként a következőket használtuk: egér monoklonális anti-humán ER (Biogenex, hígítás nélkül, 30 perc), egér monoklonális anti-humán ER α (Novocastra, 1:40, 1 óra), egér monoklonális anti-humán ER β (Novocastra, 1:50, éjszakán át), egér monoklonális anti-humán PR (Novocastra, 1:50, éjszakán át), egér monoklonális anti-humán AR (Novocastra, Biogenex, 1:50, 1 óra), nyúl monoklonális anti-humán ER és PR (Lab Vision, hígítás nélkül, 1 óra), egér monoklonális anti-humán GCR (5E4, 1:50, 2 óra, Németh P. [Pécsi Orvostudományi Egyetem Immunológiai és Biotechnológiai Intézet] ajándéka; Berki 1998). Egész éjszakán át 4°C-on, ½-2 órán át pedig 37°C-on inkubáltuk a sejteket. Másodlagos antitestként anti-egér vagy anti-nyúl IgG-FITC-et alkalmaztunk (Vector, 1:100), propidium-jodiddal jelöltük a sejtmagokat és Prolong Gold antifade reagenssel

(Invitrogen) fedtük a lemezeket. A preparátumokat Nikon EX600 fluoreszcens, és BioRad MRC konfokális lézer scanning mikroszkóppal vizsgáltuk.

Az α -tubulin fluoreszcens kimutatásához a sejteket 24 lyukú szövettenyésztő edénybe helyezhető üveglemezekre növesztettük. 24 óra után kezeltük őket 1-5 μ M koncentrációjú 2ME₂-vel 1 órán át, vagy Taxollal 10 percig (Bristol-Myers Squibb). A kezelést követően a sejteket permeabilizáltuk 0,01% Triton-X100-zal 5 percig, majd fixáltuk -20°C-os metanolban 20 percig. A nem specifikus fehérjekötődést PBS-ben 1:10 arányban hígított lószérummal gátoltuk. A specifikus jelölést α -tubulin elleni egér monoklonális antitesttel végeztük (Sigma, 1:700, 1 óra). A kötődött primer antitestet biotinilált anti-egér IgG-vel (Vector, 1:100, 60 perc), majd Streptavidin-FITC-cel (Amersham, 1:100, 30 perc) detektáltuk. A mintákat minden lépést követően háromszor mostuk Mg-ot és Ca-ot tartalmazó PBS-sel. A magokat propidium-jodiddal festettük, majd az üveglemezeket tárgylemezre tettük és Vectashield-del fedtük (Vector). A lemezeket BioRad MRC 1024 konfokális mikroszkóppal analizáltuk.

4.3.3 Immunhisztokémia

A szteroidhormon-receptorok immunhisztokémiai kimutatásához 5 μ m-es fagyasztott metszeteket metanolban fixáltunk, 3%-os BSA-oldattal blokkoltunk. A következő elsődleges antitesteket és inkubációs időket alkalmaztuk: egér monoklonális anti-humán ER (Biogenex, hígítás nélkül, 30 perc), egér monoklonális anti-humán ER α (Novocastra, 1:40, 1 óra), egér monoklonális anti-humán ER β (Novocastra, 1:50, éjszakán át), egér monoklonális anti-humán PR (Novocastra, 1:50, éjszakán át), egér monoklonális anti-humán GCR (5E4, 1:50, 2 óra). Egész éjszakán át 4°C-on, ½-2 órán át pedig 37°C-on inkubáltuk a sejteket. Az előhívás megegyezik az előző fejezetben bemutatottal.

A Ki-67 antigént kifejező emberi melanómasejtek egér májban történő detektálásához a formalinban fixált, paraffinba ágyazott minták 2 μ m-es metszeteit először deparaffináltuk (xilol 2x15 perc, etanol 2x15 perc), majd az endogén peroxidázokat blokkoltuk 3%-os metanolos H₂O₂-oldattal. Ezt mikrohullámú antigénfeltárás követte pH 6-os citrát-pufferben (15 perc). Primer antitestként anti-humán Ki-67 Mab szerepelt (Dako, 1:50, éjszakán át), másodlagos antitestként jelölt

polimer-tormaperoxidáz (Dako, 1 óra), a detektálás AEC-vel (Vector), a magfestés hematoxilinnal történt.

4.4 Szteroidhormon-receptorok expressziójának kimutatása nested RT-PCR-rel illetve kvantitatív PCR-rel

Konfluens sejtenyészetekből vagy fagyasztott szövetmintákból össz-RNS-t izoláltunk Tri-Reagenssel (Sigma), és a maradék DNS-tartalmat DNáz-kezeléssel távolítottuk el (DNA-freeTM, Ambion). Az RNS-mintákból reverz transzkripcióval cDNS-t készítettünk az alábbi reakcióeleggyel: dNTP (mindegyikre nézve 0,5 mM koncentráció), random primer és oligo-dT keveréke (3 µM végkoncentráció), RNasin ribonukleáz-inhibitor (Promega, 20 U/reakció), reverz transzkripció puffer (500 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 30 mM MgCl₂ és 50 mM ditiotritol), M-MLV reverz transzkriptáz (Sigma, 200 U/reakció) és DEPC-kezelt víz. 20 µl mintát inkubáltunk 50 percig 37°C-on, majd 10 percig 85°C-on. Az átírás eredményét és az RNS-minták tisztaságát β-aktin amplifikálásával ellenőriztük (primerek: 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CCA-3' és 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3').

A GCR meghatározásához nested PCR-t alkalmaztunk (**1. táblázat**). A PCR-reakcióelegy 2,5 µl 10x-es PCR-puffert (DyNazymeTM), 2 µl dNTP-mixet (egyenként 2,5 mM koncentráció), 0,4 µl DNS-polimerázt (DyNazymeTM, 2 U/µl), 2,5-2,5 µl primert és 2 µl cDNS-t tartalmazott, és 25 µl-re egészítettük ki DEPC-kezelt vízzel. A reakció 30 ciklusból állt, a következő hőmérsékletekkel: 1 percig 94°C, 1 percig 55°C és 1 percig 72°C. A PCR-termékeket 2%-os agaróz gélen futtattuk, és ethidium-bromidos festést követően Gel Doc 2000 (Bio-Rad) rendszerrel detektáltuk. Az azonosításához a gélből visszaizoláltuk a terméket (MEGA-spin Agarose Gel Extraction Kit, Intron) és szekvenáltattuk (Laborigo).

1. táblázat

Szteroidhormon-receptorok amplifikálásához alkalmazott primer-párok

Nested PCR

GCR outer	5'-GGC TGG AAT GAA CCT GGA AG-3' 5'-CAT AAG ATA CCT GAA GCC TGT GT-3'	
GCR nested	5'-GCC ACT ACA GGA GTC TCA CA-3' 5'-GGT CAT CCA GGT GTA AGT TCC-3'	269 bp

Kvantitatív PCR

ER α	5'-ATG ACT ATG CTT CAG GCT ACC A-3' 5'-TTG GCA GCT CTC ATG TCT CC-3'	304 bp
ER β	5'-GCC CAA GAG AAG TGG CGG CCA CG-3' 5'-AAA CCT TGA AGT AGT TGC CAG GAG C-3'	429 bp
PR	5'-GCT CTT GGT GCC TGT TTG G-3' 5'-AGA GCC ATC CTC CTC CTC AA-3'	269 bp
AR	5'-CCC GAG AGA GGT TGC GTC-3' 5'-ATA CTG CTT CCT GCT GCT GT-3'	229 bp
GCR	5'-CCC AAG AGT TCA GCA TCC ACT G-3' 5'-AAC TCG AAT GAG GAC TGC AAG C-3'	324 bp

Valós idejű PCR során a keresett géneket β -aktin mellett amplifikáltuk (primerei: 5'-TCT GGC ACC ACA CCT TCT AC-3' és 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'). A szteroidhormon-receptorokra készült primerek szekvenciája és a PCR-termékek mérete az **1. táblázatban** látható. A kvantitatív PCR reakcióelegye iQTM SYBR[®] Green Supermix-et (100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8,4, 0,4 nM dNTP, 6 mM MgCl₂, 50 U/ml iTaq DNS-polimeráz, SYBR Green I és 20 nM fluorescein), a primer-párokat (200 nM) és 2 μ l cDNS-t tartalmazott. A reakciót iCycler iQTM (Bio-Rad) készüléken futtattuk a következő programmal: 95°C (10 perc), 50 ciklusban 95°C (30 mp), 64°C (30 mp) and 72°C (1 perc). A kiindulási mRNS relatív mennyiségét egy standard hígítási sorhoz viszonyítva állapítottuk meg, és a β -aktin mRNS-szintekre normalizáltuk.

4.5 In vitro tesztek

4.5.1 Sejtproliferációs teszt

Négyezer sejtet raktunk ki 96 lyukú szövettenyésztő edényekbe RPMI/FCS-ben, majd 24 óra után FCS jelenlétében vagy anélkül kezeltük őket szteroidokkal a következő koncentrációkban: ösztadiol, progeszteron és tesztoszteron (Sigma, kontroll a vivőanyag, ciklodextrin): 1, 10, 100 és 1000 nM, dexametazon (Sigma, kontroll 0,4% EtOH): 10, 20, 40 és 80 μ M, 2-metoxi-ösztadiol (Sigma, kontroll 0,2% DMSO): 0,1, 0,5 és 1 μ M. A sejteket 2-3 napon át inkubáltuk, majd kolorimetriásan meghatároztuk a relatív sejtdenzitást. Lyukanként 0,5 mg/ml tetrazólium-festéket (MTT, Sigma) adtunk a sejtekhez, majd 4 óra 37°C-on történő inkubálást követően óvatosan leöntöttük, és az élő sejtekben keletkezett formazán-kristályokat DMSO-ban oldottuk (Martin 1993). 570 nm-en mértük az abszorbanciát Bio-Rad microplate-leolvasóval.

4.5.2 Mátrix-adherencia

96 lyukú plate-et bevontunk a vizsgálandó mátrixkomponenssel (fibronektin, I-III típusú kollagén), minden lyukba 50 μ l, 50 μ g/ml koncentrációjú oldat került (az oldószer PBS volt). Egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk, másnap PBS-sel mostuk. A kísérletek egy részében a sejteket a letapadási teszt előtt kezeltük a vizsgálandó szteroidokkal 24 órán át 24 lyukú plate-en a következő koncentrációkban: ösztadiol 10, 100 és 1000 nM, dexametazon 20 és 40 μ M. 10^4 sejtet FCS-mentes tápfolyadékban tettünk ki a plate-re, egyidejű kezelés esetén a kezelőszert médiummal a kívánt koncentrációra hígítva adtuk hozzá. Az adherálásra 1 órát hagytunk, végül a le nem tapadt sejteket lemostuk. 10%-os végkoncentrációjú ecetsavval fixáltuk a fehérjéket 1 órán át 4°C-on, majd csapvizes mosást követően 4%-os SRB-vel festettük 20-25 percig. A festék feleslegét 1%-os ecetsavval mostuk ki, a megfestődött fehérjéket 10 mM-os TRIS-oldatban vettük fel (Martin 1993). 570 nm-en mértük az abszorbanciát Bio-Rad microplate-leolvasóval.

4.5.3 Migráció

Boyden-kamra felső térrészébe 10^4 sejtet tettünk kezelőszerrel vagy anélkül, az alsó térrészbe került a kemoattraktáns (100 $\mu\text{g/ml}$ fibronektin). Az alkalmazott filter pórusmérete 8 μm . A sejteket 6 órát inkubáltuk 37°C -on, majd a nem migrált sejteket a filter felső oldaláról lemostuk, a migráltakat a filter alsó oldalán metanolban fixáltuk, toluidinkékkel festettük és fénymikroszkópban 40x-es nagyítással számoltuk le.

4.5.4 Áramlási citométeres apoptózis- és sejtciklus-meghatározás

5×10^5 sejtet raktunk ki 6 lyukú szövettenyésztő edénybe, majd letapadásukat követően 2-metoxi-ösztadiol megfelelő koncentrációival kezeltük őket. 24 óra után a sejteket 0,02% EDTA-val (Sigma) leartattuk és 70%-os etanolban -20°C -on fixáltuk. A fixálást követően a sejteket 0,2 mg/ml RNáz-t tartalmazó, 0,2 M citrát-foszfát pufferben (pH 7,8) inkubáltuk 30 percig, majd a DNS-t 25 $\mu\text{g/ml}$ propidium-jodiddal megfestettük és FACStar áramlási citométeren mértük (Becton Dickinson; Gong 1994, Mihalik 1996). Az apoptotikus sejtek arányára a szub- G_1 tartományban megjelenő események számából következtettünk.

4.5.5 Kaszpázaktivitás mérése

Hogy meghatározzuk a kaszpázok szerepét a 2ME_2 által kiváltott apoptózisban, 30 perccel a 2ME_2 -kezelés előtt z-VAD-fmk-t (szélesspektrumú kaszpázinhibitor, 50 μM ; ICN Biomedicals), z-IETD-fmk-t (kaspáz-8-inhibitor, 10 μM ; ICN) illetve z-LEVD-fmk-t (kaspáz-9-inhibitor, 10 μM ; ICN) adtunk a sejtekhez, majd 24 órás kezelés után az előzőekben ismertetett módszerrel határoztuk meg az apoptózisba került sejtek arányát.

4.5.6 Mitokondriummembrán-potenciál mérése

A mitokondriummembrán 2ME_2 -kezelést követő depolarizációjának meghatározásához 5×10^5 sejtet inkubáltunk 20 percig 37°C -on DiOC₆-tal (3,3'-dihexil-

oxakarbocianin-jodid, 10 nM; Sigma). Ezt követően a sejteket learattuk, a sejtmagokat megfestettük propidium-joddal, és a fluoreszcencia változását áramlási citométerrel detektáltuk (Zamzami 1995).

4.6 In vivo vizsgálatok

4.6.1 2ME₂ hatásának vizsgálata a tumornövekedésre és májkolónia-képzésre melanómasejtek lépbe történő oltását követően

Egysejtszuspenziót készítettünk 0,02%-os EDTA-val kezelt HT168-M1 sejtekből, majd Medium 199 tápfolyadékban mostuk őket, és beállítottuk a kívánt koncentrációt. Csoportonként 6-8 SCID egérnek fecskedeztünk a lépébe 10^4 tumorsejtet 50 μ l térfogatban (Kopper 1982). A 2ME₂-t 2% DMSO-t tartalmazó olívaolajban oldottuk. A beoltást követő második naptól a kezelt csoportok 7,5 vagy 75 mg/kg 2ME₂-t kaptak *per os* 12 napon át, míg a kontroll csoport csak a vivőanyagot. A kísérleteket a beoltás után 28 nappal termináltuk, és a májkolóniák számát, illetve a lép és a máj tömegét állapítottuk meg. A májattétekben található apoptotikus sejtek számát hematoxilín-eozinnal festett metszeteken határoztuk meg 40x-es nagyításnál. Mivel az apoptotikus sejtek megoszlása a tumorban heterogén volt, minden esetben a tumor teljes területét értékeltük (a nekrotikus részek kivételével), és az apoptotikus sejtek sűrűségét mm²-re kiszámolva adtuk meg.

4.6.2 Májkolonizáció kinetikájának vizsgálata

SCID egerek lépébe 5×10^5 HT168-M1 melanómasejtet injektáltunk. Az oltást követően 1 óra, 1 nap illetve 1 hét után időpontonként 3 hím és 3 nőstény egér máját formalinban fixáltuk és a májlebenyeken szövettani feldolgozást követően leszámoltuk az osztódásban lévő, aktív melanómasejteket a Ki-67 antigén immunhisztokémiai kimutatása segítségével (ld. 4.3.3 fejezet). A számolást 20x-os nagyítással végeztük, a melanómasejtek számát 1mm² területre vonatkoztatva adtuk meg.

4.6.3 Tüdőkolonizációs vizsgálat

A kísérleti állatok farokvénájába 10^6 melanómasejtet oltottunk, majd az oltást követő 6. héten az állatokat túlaltattuk, és az eltávolított tüdejüket formalinban fixáltuk. A szövettani feldolgozás előtt sztereomikroszkóp segítségével meghatároztuk a tüdőlebenyekben látható kolóniák számát.

4.6.4 Intrakardiális oltás

10^6 tumorsejtet 50 μ l térfogatban injektáltunk különböző nemű SCID egerek bal szívkamrájába (Paku 1989). A csoportok 6-10 egerből álltak, az injektálás 60%-ban volt sikeres. Egyes kísérletekben ivartalanítást végeztünk, a kontroll „álműtött” állatok hasfalát az ivarmirigyek eltávolítása nélkül zártuk össze. Ekkor 2-4 héttel a műtétet követően történt a tumorsejtek oltása. Az intrakardiális oltást követő 3-4. héten állítottuk le a kísérletet, és az állatok máját, agyát, szívét, tüdejét, veséit, mellékveséit és combcsontját 4%-os formalinban fixáltuk. A májkolóniák számát sztereomikroszkóp alatt, míg a többi szervben keletkezett kolóniák számát fénymikroszkóp alatt határoztuk meg.

4.7 Statisztikai módszerek

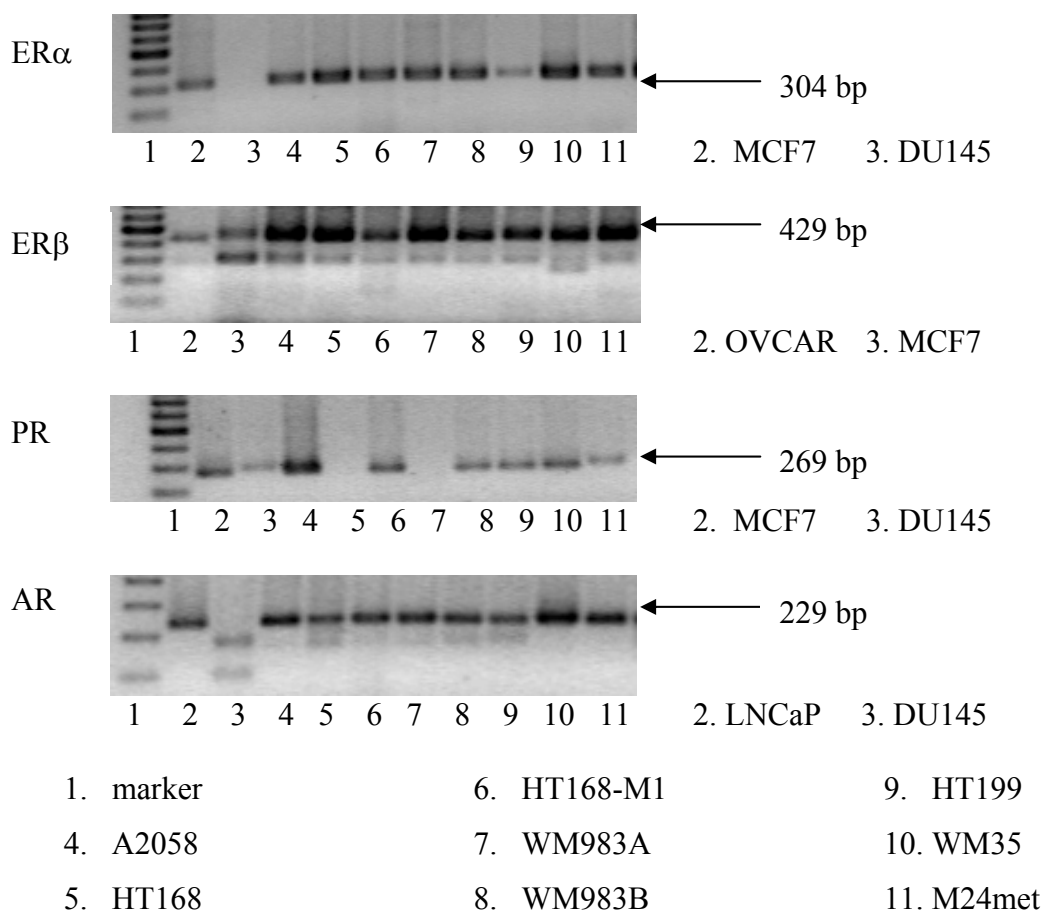
Az adatok kiértékelése során Student t-próbát, Mann-Whitney U-tesztet illetve χ^2 analízist végeztünk.

5 EREDMÉNYEK

5.1 Nemihormon-receptorok expressziója és a hormonok *in vitro* hatása emberi melanómasejtekre

5.1.1 A receptorexpresszió vizsgálata

A meghatározást kvantitatív PCR-rel végeztük. A termékeket megfuttatva látható, hogy melanóma-sejtvonalakban autentikus ER, PR és AR expresszálódik (**4. ábra**).



4. ábra

Nemihormon-receptorok kvalitatív kimutatása valós idejű PCR után

A mennyiségi viszonyokat a **2. táblázatban** tüntettem fel. ER α -expresszióban nagyságrendbeli különbségeket mutattak a vonalaink, leginkább a WM983A, a WM983B és a WM35 vonalak fejezték ki, de sokkal kisebb mértékben, mint a pozitív kontrollnak használt MCF7 emlőrákvonal. Ugyanez volt a helyzet a PR-rel az A2058, a HT168-M1, az M24met, a WM983B és a WM35 vonalak esetében. Az ER β -t a WM35 kivételével mindegyik melanómavonal kifejezte, bár az ER α -nak a pozitív kontrollban mutatott expressziójához képest igen alacsony szinten. Az AR a pozitív kontroll LNCaP prosztatacarcinóma-vonalhoz képest több nagyságrenddel kisebb mértékben fejeződött ki a melanómasejtekben.

2. táblázat

Nemihormon-receptorok kvantitatív meghatározása valós idejű PCR-rel (relatív expresszió standard hígítási sorhoz viszonyítva és β -aktinra normálva)

	ER α	ER β	PR	AR
kontrollok				
MCF7 (ER +)	990,6	2,1	4274	2,5
MDA-MB-231 (ER-)	3×10^{-2}	4,5	5,4	5×10^{-4}
LNCaP (AR +)				123
DU145 (AR -)	0	3,8	0	4×10^{-5}
emberi melanómák				
A2058	2×10^{-3}	4,3	535	10^{-2}
HT168	3×10^{-3}	1,3	0	7×10^{-5}
HT168-M1	2×10^{-3}	1,1	897	2×10^{-3}
HT199	10^{-2}	1,0	0,6	10^{-4}
M24met	10^{-1}	7,8	283	10^{-1}
WM983A	21,3	23,0	0	10^{-1}
WM983B	156,0	13,6	854	9×10^{-3}
WM35	3,7	0,5	36	8×10^{-1}

Áramlási citometriás mérésekkel határoztuk meg a nemihormon-receptorproteinek expressziós szintjét humán melanóma-sejtvonalainkon. Fehérjeszinten AR-t nem, ER α -t csak kis százalékban találtunk a vizsgált vonalakban (**3. táblázat**). Ez az arány 1 napos 1 μ M koncentrációjú ösztradiol-kezelés után sem változott. Immuncitokémiai módszerrel mindegyik antitesttel nagyon gyenge volt a jelölődés, mind a sejtvonalakon, mind lépbe oltást követően a fagyasztott tumorszövetekben.

3. táblázat

Nemihormon-receptorproteinek kimutatása áramlási citométerrel (a negatív kontrollok 1%-os küszöbre kapuzva)

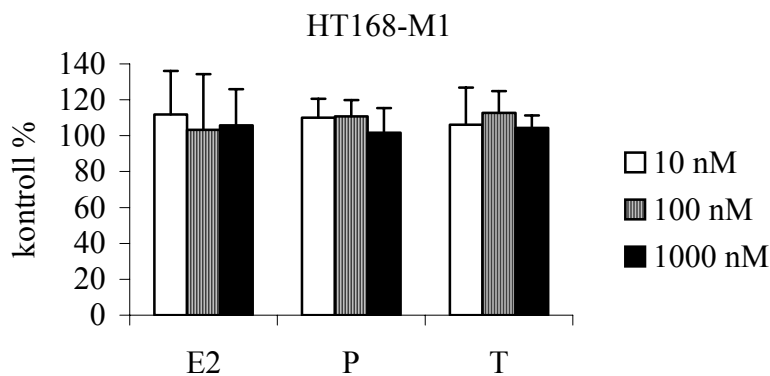
	ER α	AR
kontrollok		
MCF7 (ER +)	61%	
LNCaP (AR +)		36%
DU145 (AR -)		0%
emberi melanómák		
A2058	1%	
HT168	1%	
HT168-M1	2%	0%
HT199	0%	0%
M24met	4%	
WM983A	0%	
WM983B	0%	
WM35	0%	

5.1.2 Nemi hormonok hatásának vizsgálata emberi melanómasejtek proliferációjára

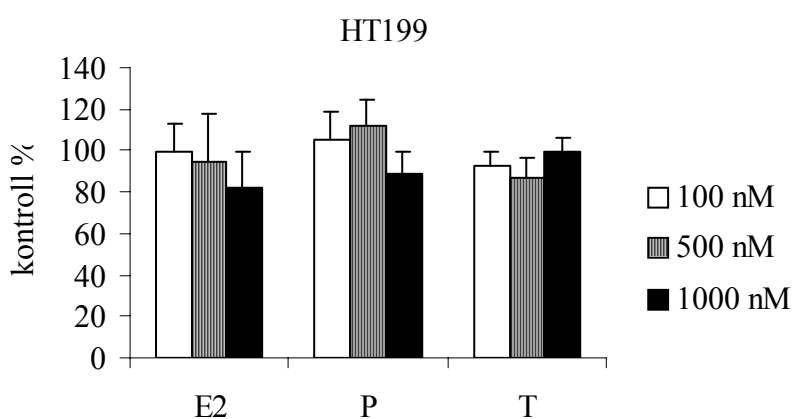
Először is proliferációs tesztekben vizsgáltuk, hogy a nemi hormonoknak van-e valamilyen hatása humán melanómasejtek szaporodására. A hormonokat 1-1000 nM-os

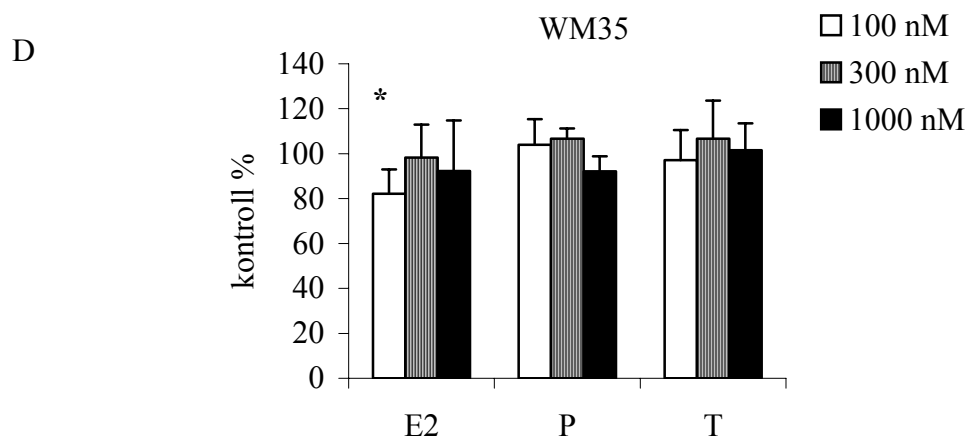
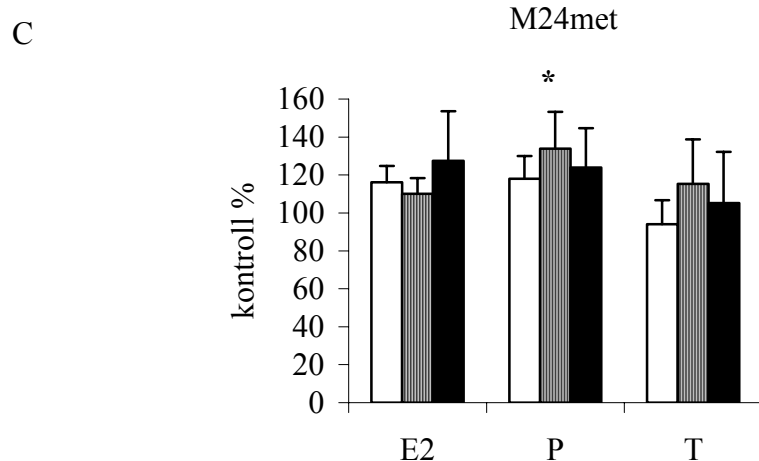
koncentrációtartományban alkalmaztuk 2-3 napon át. A vizsgálatokat HT168-M1, HT199, WM35 és M24met sejtvonalakon végeztük (**5. ábra**). Az ösztrogénkezeléshez pozitív kontrollként MCF7 ER+ humán emlőráksejtvonalat használtunk, amelynek az osztódását az ösztrogén 10 nM-os koncentrációban enyhén serkentette, míg a negatív kontrollként használt ER- MDA-MB-231 emlőrákvonalra nem volt hatással. Az irodalmi adatok szerint a fenolvörösnek a tápfolyadékban található koncentrációban gyenge ösztrogénszerű aktivitása van (Kemeny 1998), ezért a sejteket fenolvörösmentes ill. fenolvöröst is tartalmazó médiumban is kezeltük a hormonokkal, de nem tapasztaltunk különbséget. A tápfolyadékban jelen lévő 5% FCS minimális mennyiségű szteroidot tartalmaz (1,3 pM E₂, 5 pM P, 10 pM T). A kezelő dózisokhoz képest ez elhanyagolható. A hormonokat 2-hidroxi-propil- β -ciklodextrin adalékkal tették vízoldhatóvá, ezért a kontrollcsoportokhoz ezt az anyagot adtuk önmagában. Jelentős különbséget egyik kísérleti összeállításban sem tapasztaltunk. M24met esetében a 300 nM-os progeszteron dózis 30%-kal serkentette, WM35 esetén pedig 100 nM-os ösztradiol-kezelés 20%-kal gátolta a sejtosztódást, aminek nem tulajdonítunk biológiai jelentőséget.

A



B



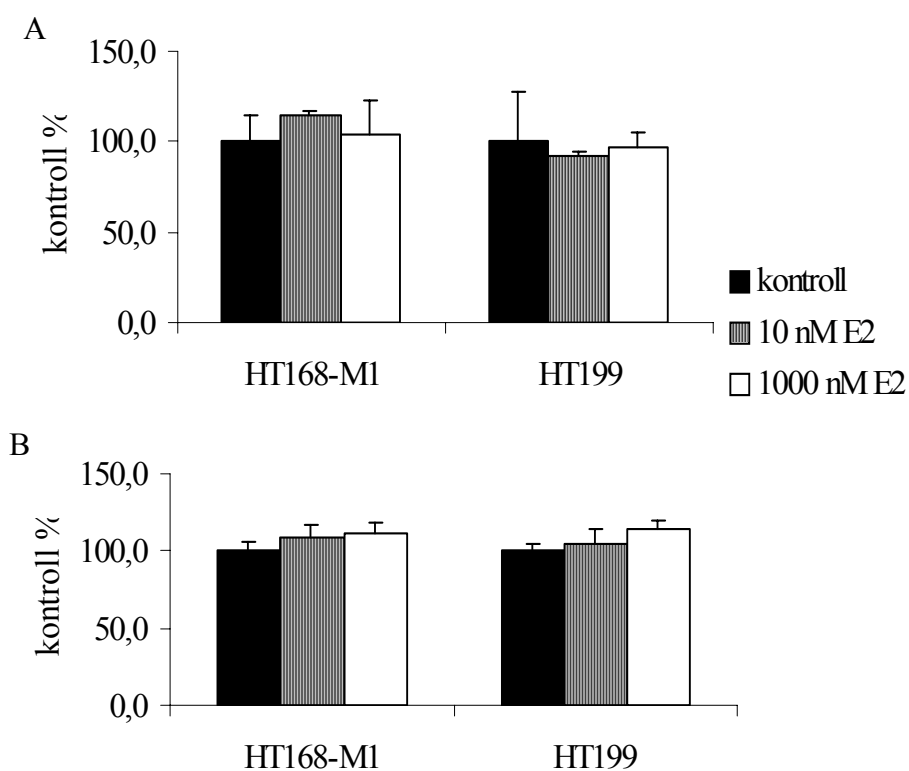


5. ábra

Nemi hormonok hatása humán melanómasejtek szaporodására. **A:** HT168-M1, 72 órás kezelés (három kísérlet, 4 párhuzamos minta), **B:** HT199, 72 órás kezelés (4 párhuzamos minta), **C:** M24met, 48 órás kezelés (* $p < 0,02$) és **D:** WM35, 48 órás kezelés (* $p < 0,05$) (C, D: 6 párhuzamos minta, A, B, C, D: átlag \pm SD, a kontroll %-ában)

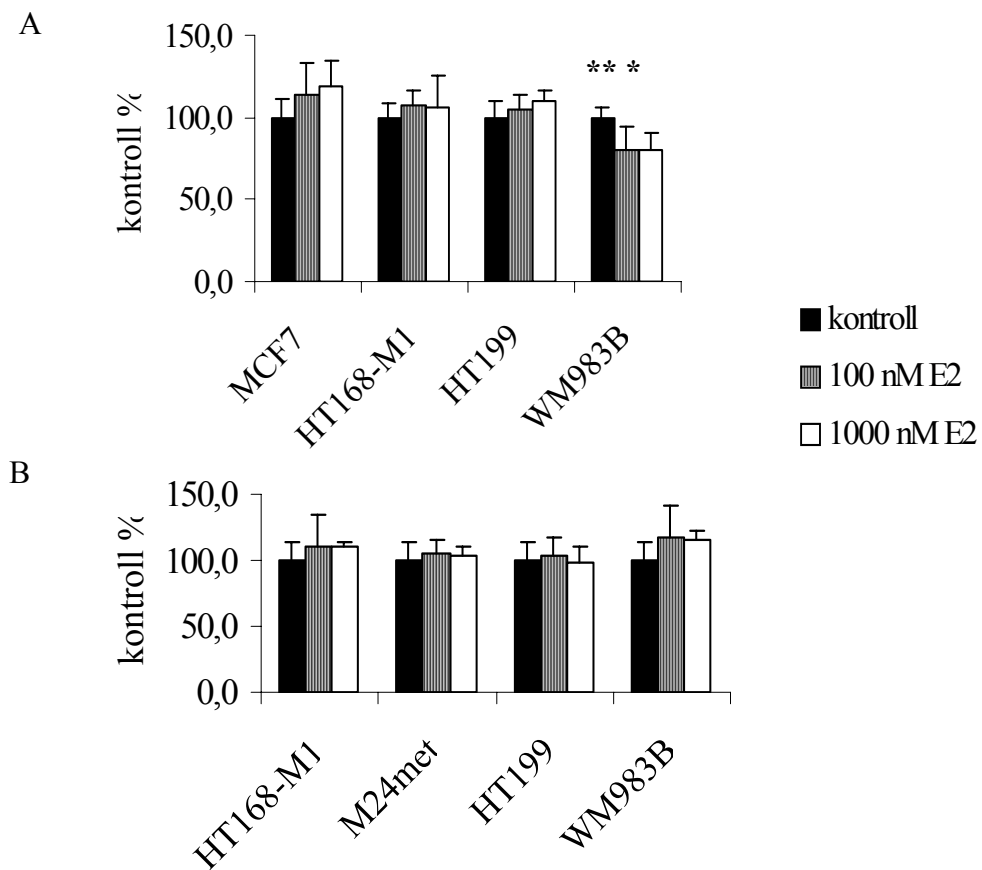
5.1.3 Ösztrogén hatásának vizsgálata emberi melanómasejtek mátrix-adherenciájára

Vizsgáltuk a sejtek letapadását fibronectinhez és I-III. típusú kollagénhez. Ösztradiollal 10, 100 vagy 1000 nM-os koncentrációban vagy a teszt során, vagy előtte egy nappal kezeltük a sejteket (6., 7. ábra). Szignifikáns eltérést csak egy esetben, a WM983B vonal fibronectinhez történő letapadása során, 1000 nM-os 24 órás ösztradiol-kezelés után tudtunk elérni, aminek nem tulajdonítunk biológiai jelentőséget.



6. ábra

Melanómasejtek letapadása **A:** fibronectinhez, **B:** I-III. típusú kollagénhez ösztrogénkezelés mellett (4 párhuzamos minta, átlag \pm SD, a kontroll %-ában)



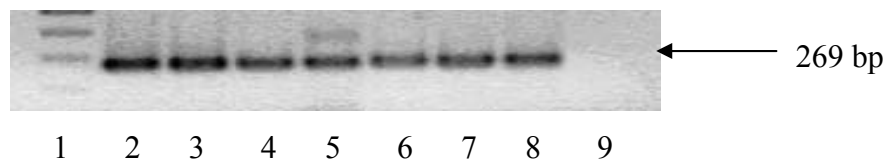
7. ábra

Melanómasejtek letapadása **A**: fibronektinhez (* $p < 0,02$, ** $p < 0,05$), **B**: I-III. típusú kollagénhez 24 órás ösztrogénkezelést követően (4 párhuzamos minta, átlag \pm SD, a kontroll %-ában)

5.2 Glükokortikoid-receptor expressziója és *in vitro* hormonhatások emberi melanómasejteken

5.2.1 Glükokortikoid-receptor kimutatása humán melanóma-sejtvonalakon és tumormintákon

Vizsgáltuk, hogy a glükokortikoid-receptor (GCR), ami szintén a nukleáris receptorok családjába tartozik, jelen van-e emberi melanómavonalakon illetve humán tumormintákon. RNS-izolálást majd reverz transzkripciót követően nested PCR-rel a sejtvonalakból kimutatható volt a GCR (**8. ábra**).

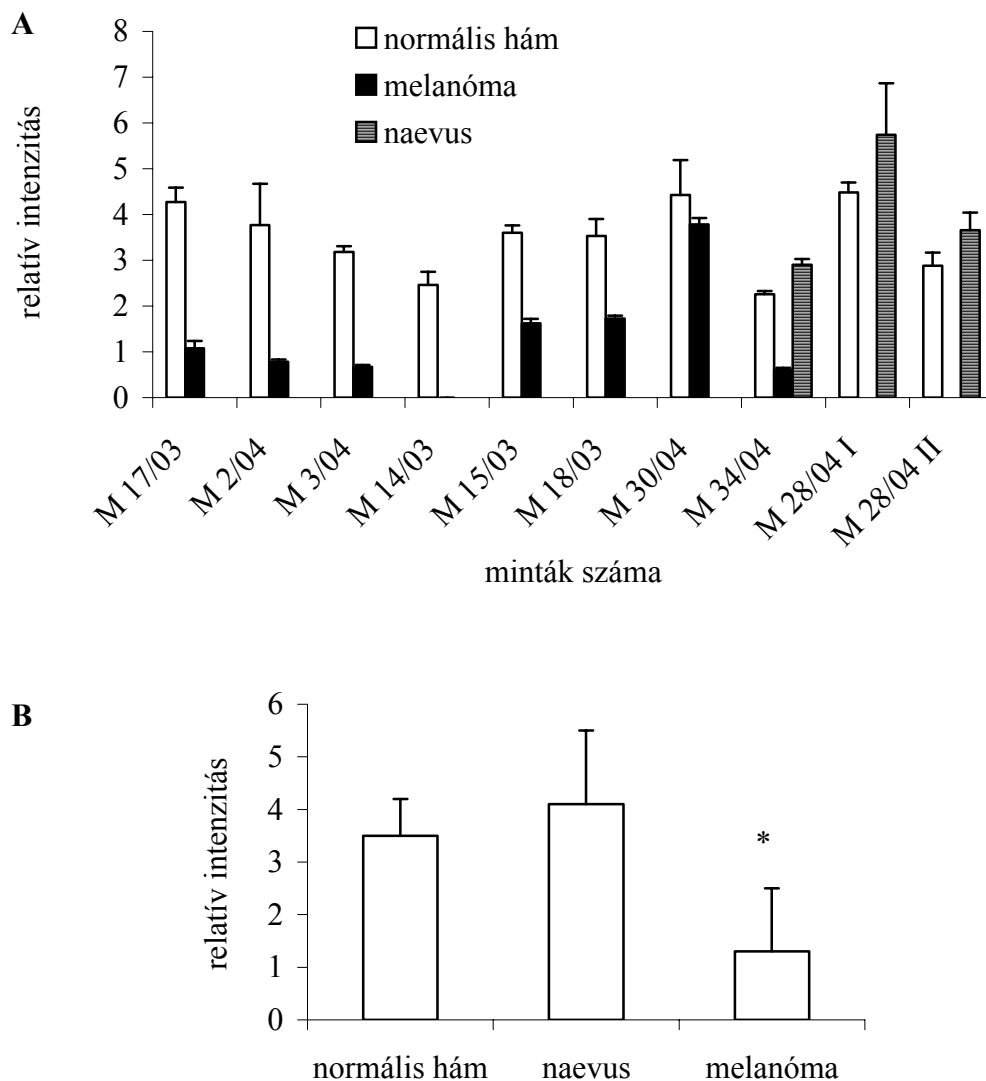


- | | | |
|-------------|-----------|--------------------|
| 1. marker | 5. HT199 | 9. neg. kontroll |
| 2. HT168-M1 | 6. M24met | (H ₂ O) |
| 3. HT168 | 7. WM983A | |
| 4. A2058 | 8. WM983B | |

8. ábra

GCR mRNS kimutatása nested PCR-rel emberi melanómavonalakból

Kvantitatív (real-time) PCR-rel vizsgáltuk 10, az Intézetben műtétre kerülő melanómás betegből származó tumorszövet, naevus illetve normális hámszövet GCR-expresszióját. Átlagosan negyedannyi GCR mRNS-t tudtunk kimutatni a melanómákból, mint normális hámból illetve naevusokból (**9. ábra**).

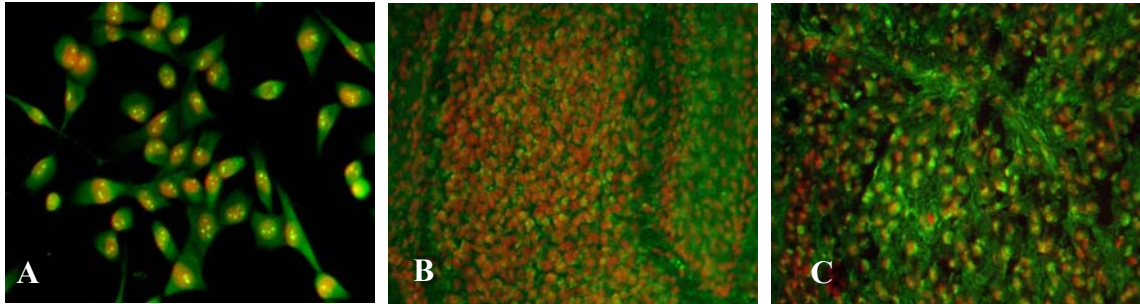


9. ábra

GCR mRNS relatív mennyisége melanómákban, naevusokban és normális hámszövetben (A) a vizsgált minták ill. (B) átlaguk alapján (átlag \pm SD, * $p < 0,001$ a normális hámszövethez viszonyítva)

Immuncitokémiai módszerekkel nyolc humán melanóma-sejtvonalon mutattunk ki GCR-proteint anti-humán GCR antitesttel. Mind sejtmagi, mind diffúz citoplazmás jelet detektáltunk (10. ábra). Megtaláltuk a receptort humán naevus- ill. melanómamintákban is, de a festődés intenzitásában az mRNS-szinten tapasztalt

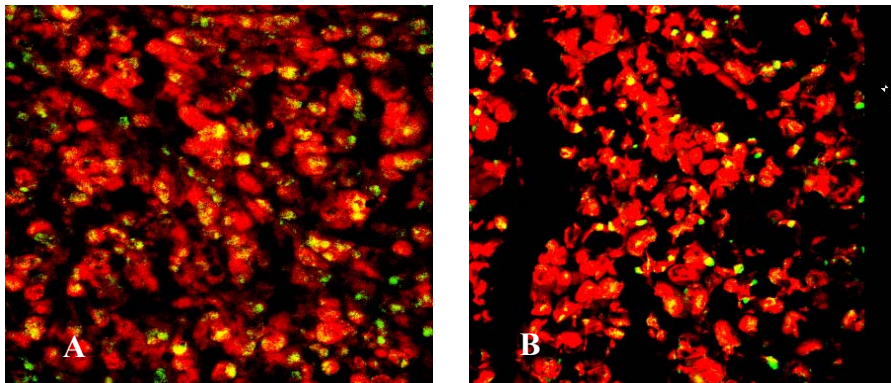
különbséget nem detektáltuk. HT168-M1 sejtek SCID egerek lépébe oltása után a GCR immunhisztokémiai módszerrel kimutatható volt a fagyasztott tumorszövetben mind a primer tumor, mind a májmetasztázisok esetében (**11. ábra**).



10. ábra

GCR protein immunfluoreszcens kimutatása 5E4 antitesttel HT199 humán melanóma-sejtvonalon (**A**), naevusban (**B**) ill. melanómában (**C**)

GCR (FITC, zöld), sejtmag (PI, piros), fluoreszcens mikroszkóp, eredeti nagyítás: 400x



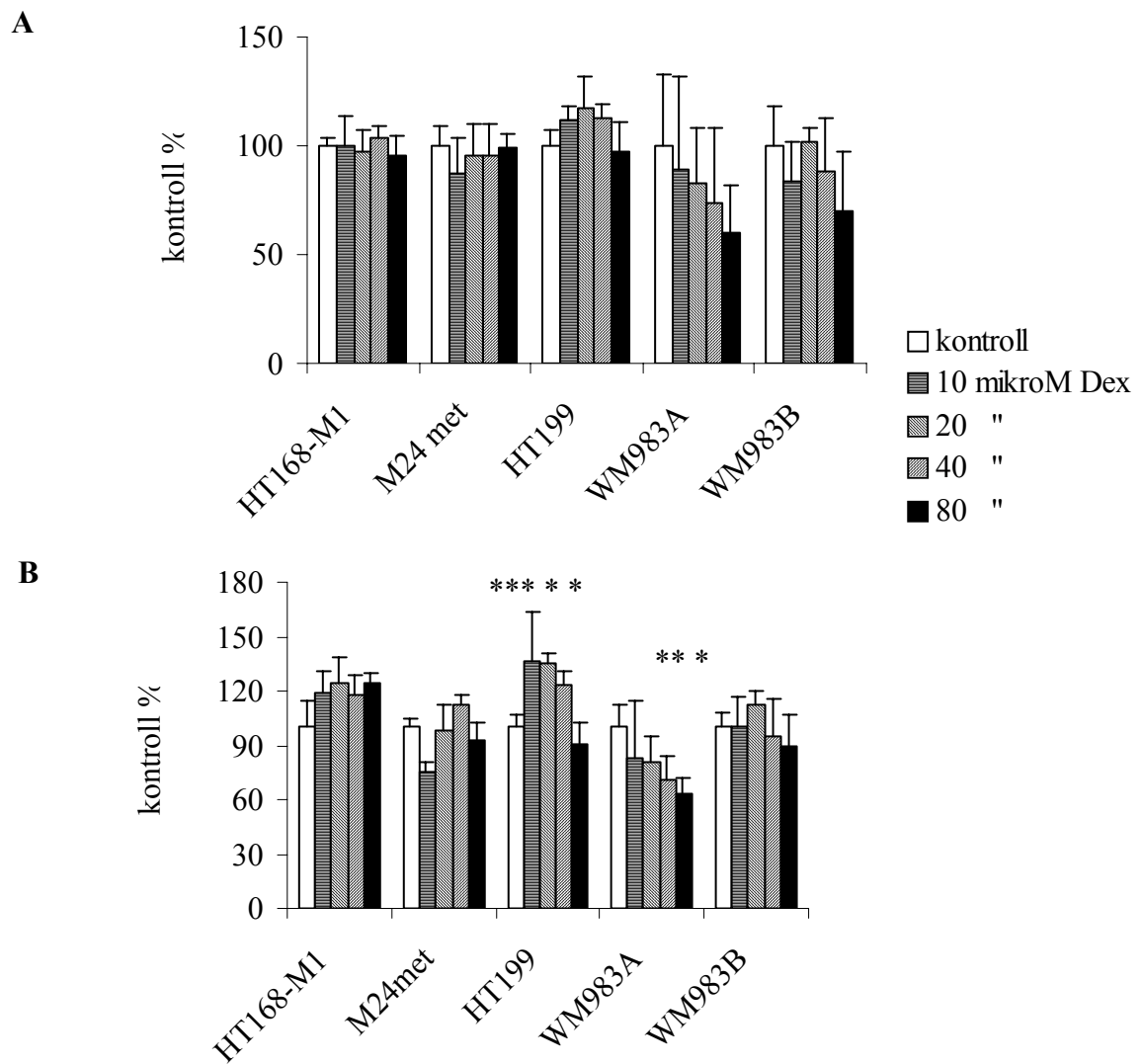
11. ábra

GCR kimutatása HT168-M1 humán melanómasejtek egér lépbe történő oltása után a primer tumorban (**A**) és májáltétben (**B**). GCR (FITC), sejtmag (PI), konfokális mikroszkóp, 1000x-es nagyítás

5.2.2 Dexametazon hatásának vizsgálata emberi melanómasejtek proliferációjára

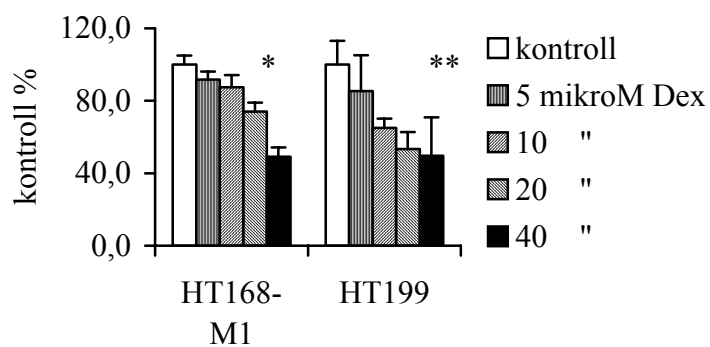
A receptor detektálása után vizsgáltuk, hogy van-e valamilyen biológiai szerepe, ezért *in vitro* tesztekben egy glükokortikoid-származékkal, a dexametazonnal kezeltünk humán melanóma-sejtvonalakat. Proliferációs tesztekben két napos kezelés csak az igen nagy, 80 μ M koncentrációjú dexametazonnal (a legmagasabb, ízületi gyulladáshoz alkalmazott humán dózis kb. kétszeresének felel meg, szteroidszenszítív limfociták *in vitro* kezelése során alkalmazott dózishoz pedig mintegy 8000-szerese), egyetlen sejtvonal esetén eredményezett 40%-os gátlást, akár szérumban (FCS) jelenlétében, akár annak hiányában végeztük a vizsgálatokat (**12. ábra**). Szignifikáns gátlás a WM983A vonal esetén adódott, ha szérumban kezeltük a sejteket, ugyanakkor a HT199 vonalra serkentően hatott ugyanez a kezelés.

Huzamosabb kezeléssel (4-5 nap, 40 μ M Dex, 5% FCS) két sejtvonal esetében hasonló hatást értünk el (**13. ábra**).



12. ábra

Két napos dexametazon-kezelés hatása humán melanómasejtek proliferációjára **A**: FCS jelenlétében illetve **B**: FCS hiányában (6 párhuzamos minta, átlag ± SD, a kontroll %-ában, * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,02$)



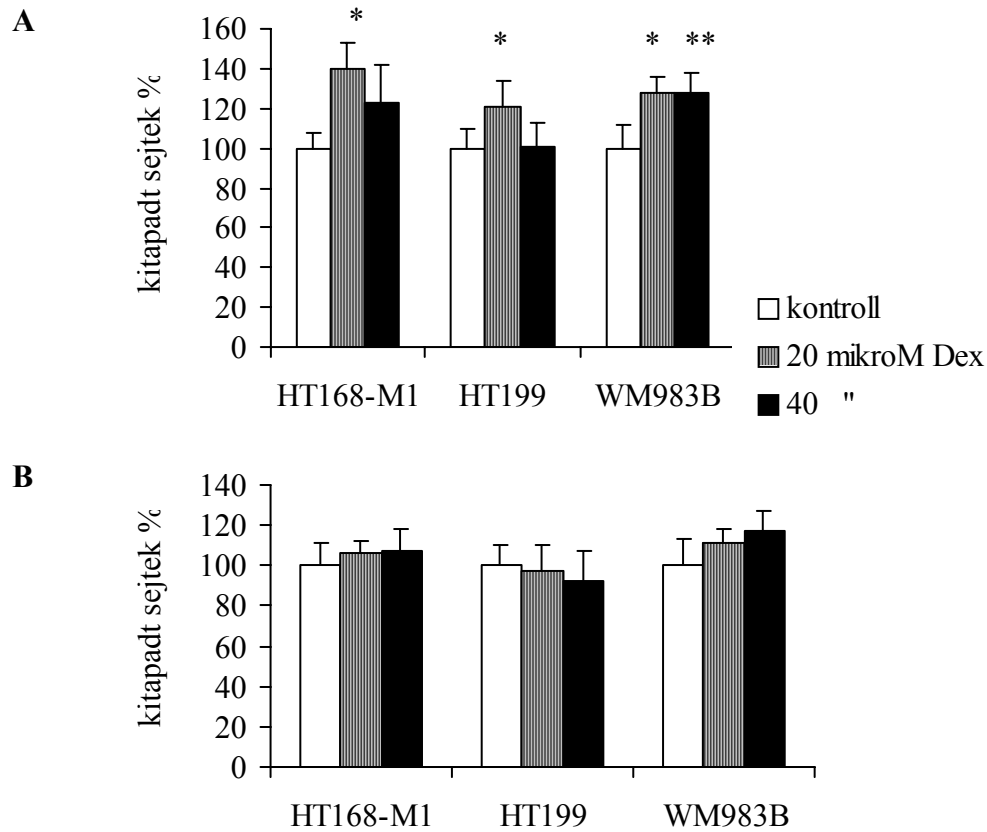
13. ábra

Hosszabb időtartamú dexametazon-kezelés hatása humán melanómasejtek proliferációjára FCS jelenlétében (6 párhuzamos minta, átlag \pm SD, a kontroll %-ában, * $p < 0,001$, ** $p < 0,002$)

5.2.3 Dexametazon hatásának vizsgálata emberi melanómasejtek adherenciájára és migrációjára

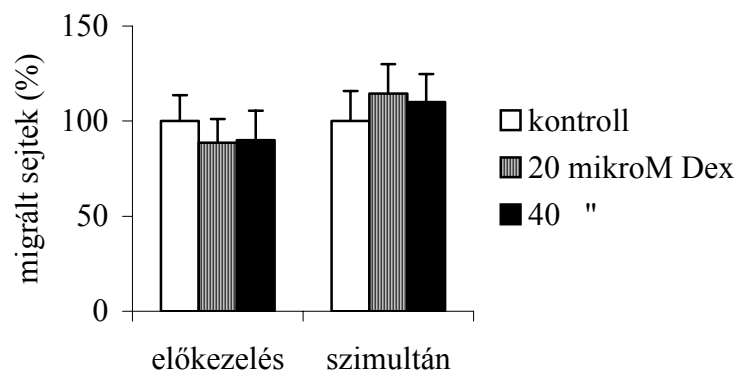
Megvizsgáltuk a dexametazon-kezelés hatását humán melanómasejtek fibronectinhez illetve I-III. típusú kollagénhez való letapadására. Két napos előkezelés 20 ill. 40 μ M koncentrációjú dexametazonnal sejtvonaltól függően 20-40%-kal növelte a fibronectinhez letapadt sejtek mennyiségét, a kollagénhez való letapadást nem befolyásolta (**14. ábra**).

Boyden-kamra használatával teszteltük a dexametazon hatását a melanómasejtek migrációjára. A sejtváándorlás ideje alatt (6 óra) a HT168-M1 melanómasejtekhez adott 20 ill. 40 μ M koncentrációjú kezelőszer nem befolyásolta hatékonyan a sejtek migrációs képességét (**15. ábra**).



14. ábra

Melanómasejtek letapadása **A**: fibronectinhez, **B**: I-III. típusú kollagénhez 2 napos dexametazon-kezelést követően (4 párhuzamos minta, átlag ± SD, a kontroll %-ában, * $p < 0,01$, ** $p < 0,02$)



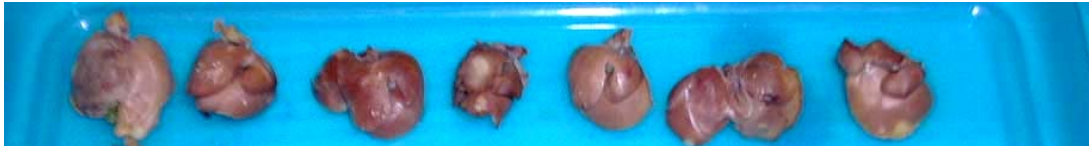
15. ábra

Dexametazon hatása HT168-M1 melanómasejtek migrációjára (6 párhuzamos minta, átlag ± SD, a kontroll %-ában)

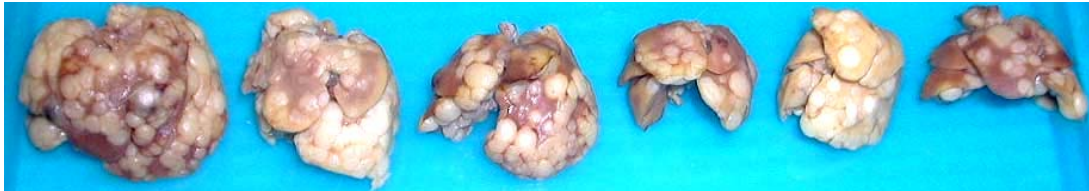
5.3 Nemi különbségek a melanóma áttétképzésében - *in vivo* kísérletek

5.3.1 Az áttétképzés kinetikájának vizsgálata lép-máj metasztázis modellben

Annak ellenére, hogy *in vitro* körülmények között a nemi hormonoknak nem tudtuk kimutatni a melanómasejtek tulajdonságait befolyásoló szignifikáns hatását, korábbi eredményeink azt mutatták, hogy SCID egerekben lép-máj modellben nagyságrendbeli különbség alakul ki a melanómasejtek lépbe oltását követően a májáttétek számában a két nem között (Ladányi 1995). Mindhárom vizsgált sejtvonal esetében (HT168, HT168-M1, HT199) a májáttétek száma hím egerekben szignifikánsan nagyobb volt, mint nőstényekben (**16. ábra**). Kíváncsiak voltunk a különbség kialakulásának kinetikájára, ezért hím és nőstény SCID egerek lépébe 5×10^5 melanómasejtet injektáltunk, és vizsgáltuk a májakat 1 órával, 1 nappal illetve 1 héttel a beoltást követően. Kiderült, hogy a nemek közötti különbség már a beoltást követő első napon kialakul. Míg az injekció utáni 1 órás időpontban csak átlagosan 27%-kal több melanómasejtet detektáltunk a hím egerek májában a nőstényekhez viszonyítva, 1 nap múlva a különbség már 3,6-szoros volt. Ezt a változást az idézte elő, hogy a két időpont közötti időszakban a hímekben megfigyelhető sejtszám harmadrészére csökkent, míg a nőstényekben nyolcadára. Ez az arány a következő vizsgált időpontig lényegében már nem változott, az 1 nap után talált melanómasejtek számával megközelítően egyező számú melanómasejt-csoportot találtunk a 7. napon. A májlebenyekből készített metszeteket a Ki-67 proliferációs antigén immunhisztokémiai kimutatását követően fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk, és kvantitatívan értékeltük a Ki-67+, ciklusban lévő, aktív tumorsejtek számát (**17. ábra**).



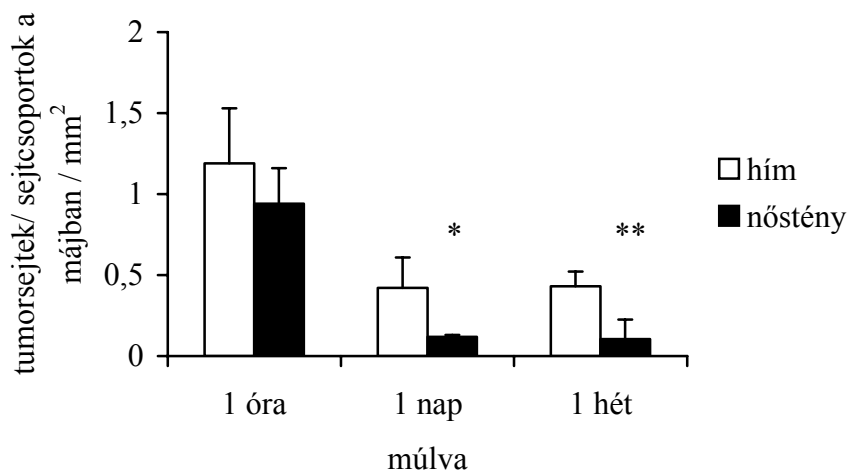
nőstény



hím

16. ábra

HT168-M1 melanómasejtek egérlépbe oltását követően létrejövő májjáttétek számának különbsége hím és nőstény SCID egerekben

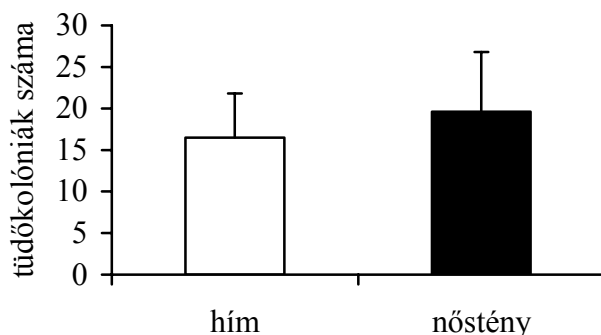


17. ábra

Ki-67+ HT168-M1 melanómasejtek (1 óra, 1 nap) és -sejtcsoportok (1 hét) száma a májban hím és nőstény SCID egerekben különböző időpontokban a lépbe oltást követően (átlag ± SD, n=3, *p<0,05, **p<0,03)

5.3.2 A melanómasejtek kolonizációja nemi preferenciájának szervspecifitása

Megvizsgáltuk, hogy más kísérleti összeállításban illetve más szervek esetén is kialakul-e ez a különbség hím és nőstény SCID egerek között. Először is 10^6 HT168-M1 melanómasejtet injektáltunk az állatok farokvénájába, és a tüdőkolonizáló képességet hasonlítottuk össze a két nemben. Szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk (18. ábra).



18. ábra

Tüdőkolóniák száma HT168-M1 sejtek (10^6 /egér) farokvénába oltását követően a két nemben (átlag \pm SEM)

A két nem közti különbség szélesebb szervi spektrumú vizsgálatához két sejtvonalt (HT168-M1, HT199) sejtjeit (10^6) különböző nemű SCID egerek bal szívkamrájába injektáltuk. A mellékvesékben, vesékben, csontokban, agyban és szívben a kolóniák kialakulásának gyakoriságában nem találtunk különbséget a nemek között. Az egerek ivartalanítása nem volt hatással a kolóniák számára egyik nemben sem (4. táblázat). A kolóniák számát mikroszkópos metszetekben agy és vese esetén határoztuk meg, de nem volt következetes különbség a nemek között egyik sejtvonalt esetén sem.

A májat vizsgálva a HT199 vonal esetében minden kísérleti csoportban 100%-os volt a kolonizáció, a HT168-M1 esetén azonban hímekekben nagyobb volt az incidencia (5. táblázat). Mindkét sejtvonalt több kolóniát képezett intakt hím állatokban, mint nőstényekben illetve kasztrált hímekekben, és a HT199 sejtvonalt esetében az ovariectomizált és intakt nőstények között is szignifikáns különbség mutatkozott (19. ábra).

4. táblázat

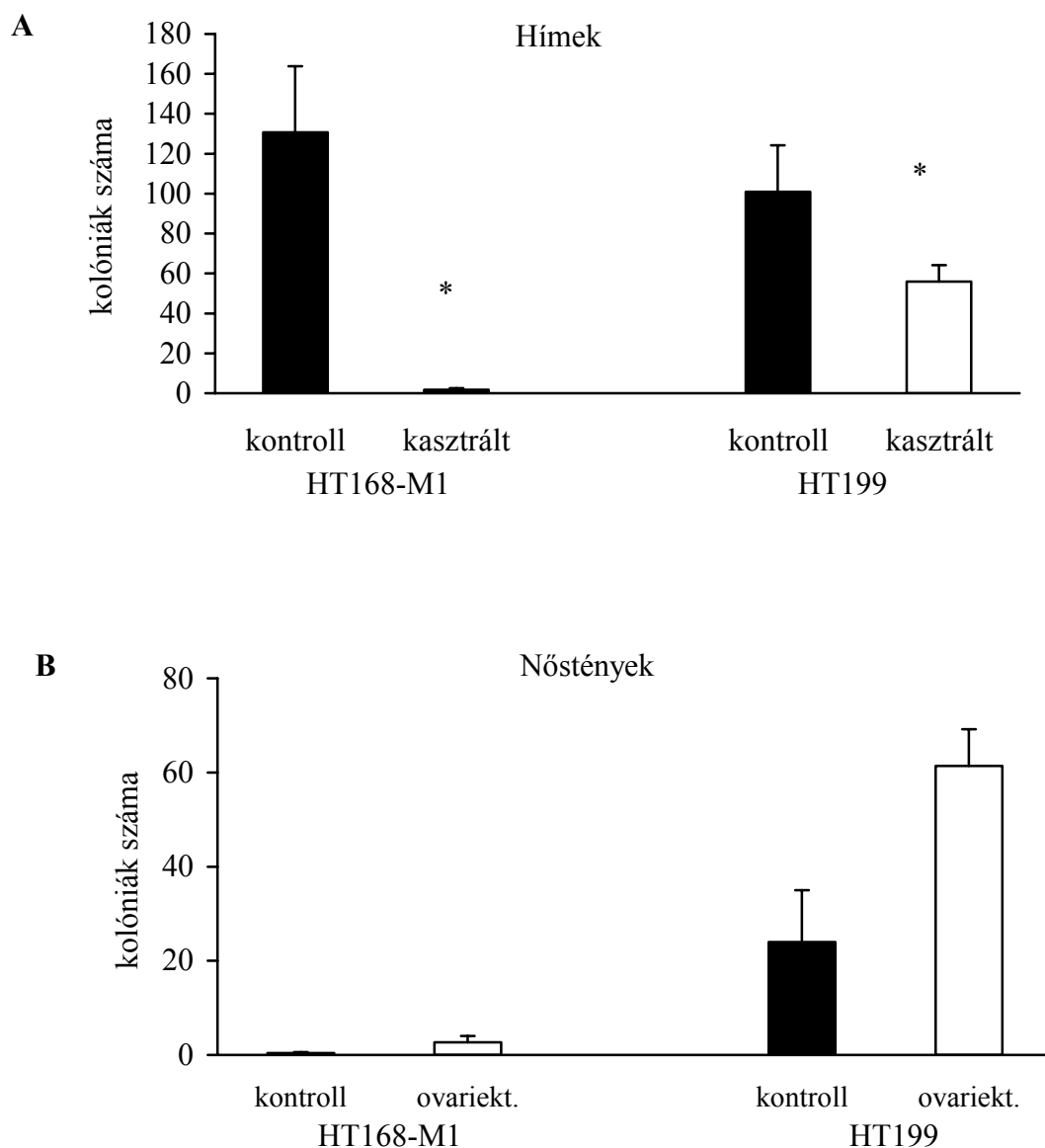
Különböző szervekben kialakuló kolóniák incidenciája melanómasejtek intrakardiális oltását követően (n.a.: nincs adat)

HT168-M1	mellékvese	vese	agy	csont	szív
♂ kontroll	5/5	4/5	5/5	5/5	n.a.
♂ orchiekt.	3/3	3/3	3/3	3/3	n.a.
♀ kontroll	6/6	6/6	6/6	6/6	n.a.
♀ ovariekt.	7/7	6/7	7/7	7/7	n.a.
HT199					
♂ kontroll	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
♂ orchiekt.	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3
♀ kontroll	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
♀ ovariekt.	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5

5. táblázat

Melanómasejtek májkolonizációja intrakardiális oltást követően ivartalanított és álműtött állatokban (*vs. ♂ kontroll)

	Incidencia (%)	Szign. (χ^2 -teszt)
HT168-M1		
♂ kontroll	9/9 (100)	
♂ orchiekt.	2/3 (67)	n.s.
♀ kontroll	3/8 (37)	P<0.01*
♀ ovariekt.	7/10 (70)	n.s.
HT199		
♂ kontroll	6/6 (100)	
♂ orchiekt.	3/3 (100)	n.s.
♀ kontroll	3/3 (100)	n.s.
♀ ovariekt.	5/5 (100)	n.s.



19. ábra

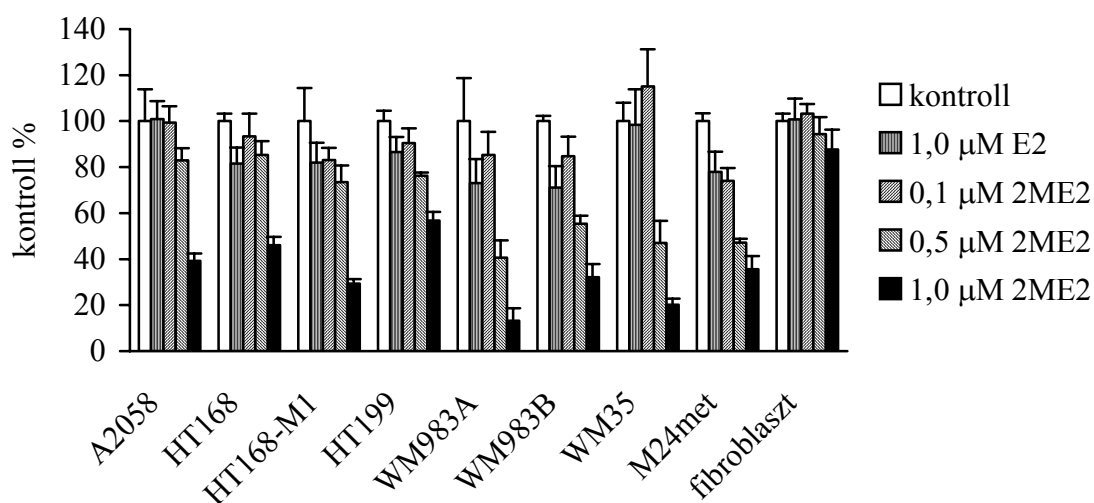
Májkolóniák száma **A**: hím és **B**: nőstény SCID egerekben melanómasejtek intrakardiális oltását követően (átlag \pm SD, * $p < 0,05$)

Megállapítható tehát, hogy a megfigyelt jelenség a májra specifikusnak tekinthető, csak a májkolóniák számában alakul ki számottevő különbség a nemek között. Ezért felvetődött a 2-metoxi-ösztadiol szerepe a nemi preferencia kialakulásában. A 2ME₂ az ösztadiol egy endogén metabolitja, elsősorban a májban keletkezik, és már ismert tumorelles hatásától.

5.4 2-metoxi-ösztadiol in vitro és in vivo hatásai melanómasejteken

5.4.1 2ME₂ hatása emberi melanómasejtek proliferációjára, a sejtciklus fázisaira és az apoptózisra

Nyolc emberi melanóma-sejtvonalon vizsgáltuk a 2ME₂ hatását a proliferációra 0,1-1 μ M koncentrációtartományban. Minden sejtvonalon dóziszfüggő hatást tapasztaltunk, 1 μ M koncentrációjú, 72 órás 2ME₂-kezeléssel átlagosan 66%-os (tartomány: 43-87%) proliferációgátlást értünk el, és a 0,5 μ M-os kezelés is átlagosan 36%-kal (tartomány: 15-59%) csökkentette a sejtszámot. A normális humán fibroblasztok nem voltak érzékenyek. Az ösztradiolnak nem volt hatása (**20. ábra**).

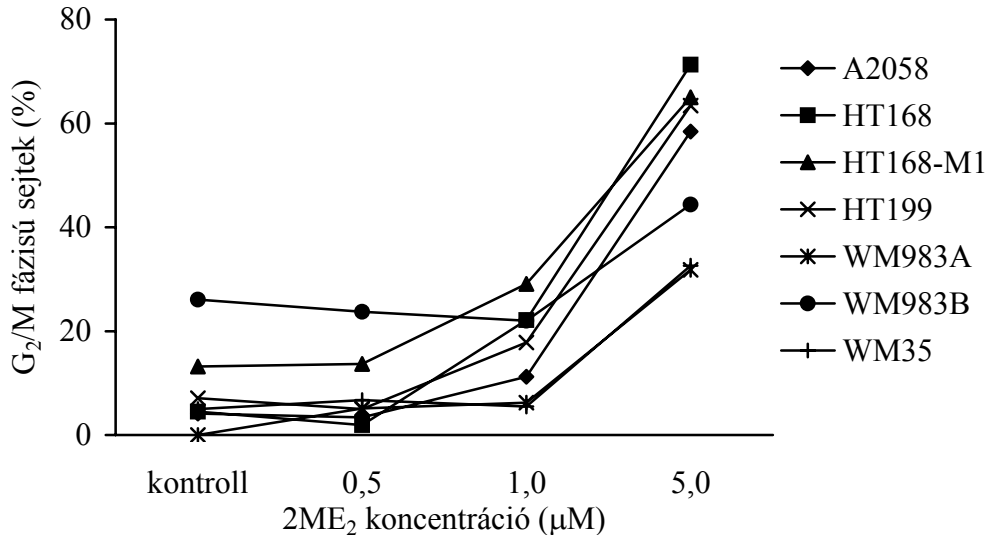


20. ábra

Melanómasejtek szaporodásának gátlása 2ME₂-kezeléssel (2 kísérlet, 4 párhuzamos minta, átlag \pm SD, a kontroll %-ában)

Áramlási citométerrel vizsgáltuk a 2ME₂-nek a sejtciklus egyes fázisaiban lévő sejtek arányára gyakorolt hatását. A melanómasejteket letapadásukat követően 2-metoxi-ösztadiol 0,5-5 μ M-os koncentrációival kezeltük, majd etanolos fixálás után a DNS-tartalmat propidium-jodiddal megfestettük. 24 órás inkubáció 1 μ M 2ME₂-vel a 7 tesztelt vonalból ötben 2-6-szorosára növelte a sejtciklus G₂/M fázisában található sejtek

arányát. 5 μM -os 2ME_2 -kezelés mindegyik vonalon sejtciklus-gátlást eredményezett (2-32-szeresére nőtt a G_2/M fázisú sejtek aránya; **21. ábra**).



21. ábra

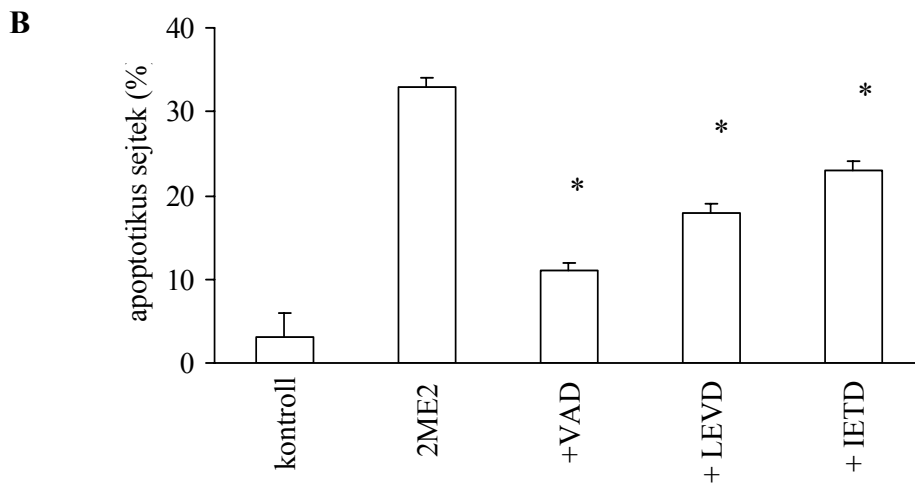
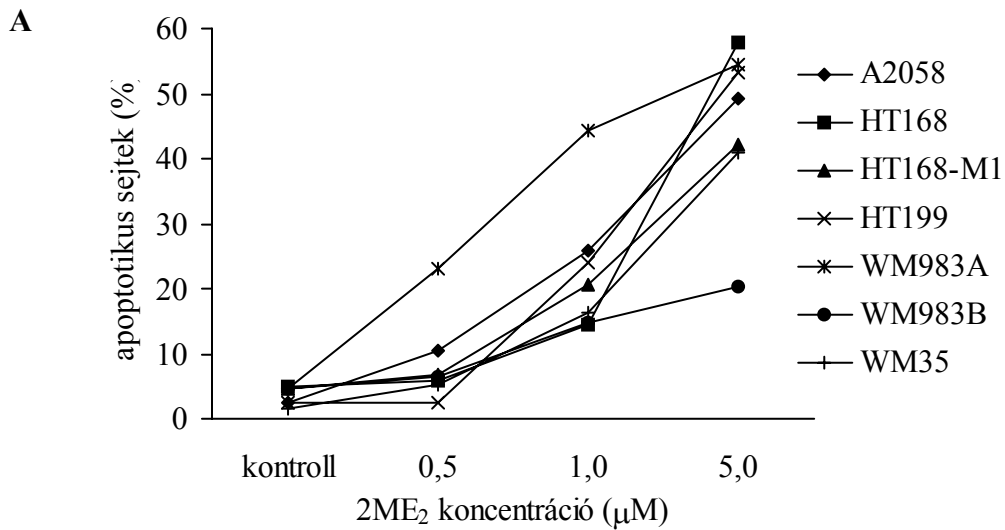
A G_2/M fázisban található melanómasejtek aránya 2ME_2 -kezelést követően

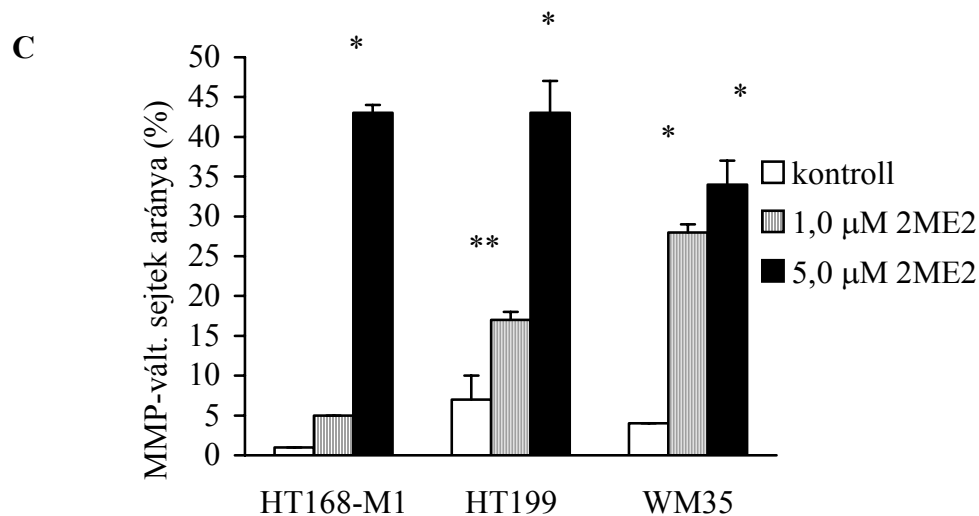
A kezelés dóziszfüggő módon megnövelte az apoptotikus sejtek arányát is, a kontrollban mérhető 1-5%-ról 1 μM -os 2ME_2 -kezelés 15-44%-ra, 5 μM koncentrációjú kezelés után pedig a legérzékenyebb sejtvonalakban ez az arány elérte az 50%-ot (tartomány: 20-58%; **22. A ábra**). Az ösztradiol ebben a koncentrációtartományban nem befolyásolta sem az apoptotikus, sem a G_2/M fázisban található sejtek arányát.

5.4.2 A megfigyelt apoptózis mechanizmusának feltérképezése

Annak megállapításához, hogy a 2ME_2 -indukálta apoptózisban szerepet játszanak-e a kaspázok, a 2ME_2 -kezelést megelőzően kaspáz-inhibitorokat adtunk a HT168-M1 sejtekhez. z-VAD-fmk (szélesspektrumú kaspáz-inhibitor) illetve z-IETD-fmk (kaspáz-9-inhibitor) hozzáadása 67 illetve 46%-kal csökkentette az apoptózis mértékét, míg a z-LEVD-fmk (kaspáz-8-inhibitor) kevésbé volt hatékony (31% gátlás; **22. B ábra**).

A mitokondriumok szerepét a mitokondiummembrán-potenciál változásának mérésével 3 sejtvonalon vizsgáltuk (HT168-M1, HT199 és WM35). Egy napos 1 μM koncentrációjú 2ME₂-kezelés a mitokondiummembrán depolarizációját okozta a vizsgált sejtek 5-30%-ában, míg az 5 μM -os kezelés 34-43%-ban (22. C ábra).





22. ábra

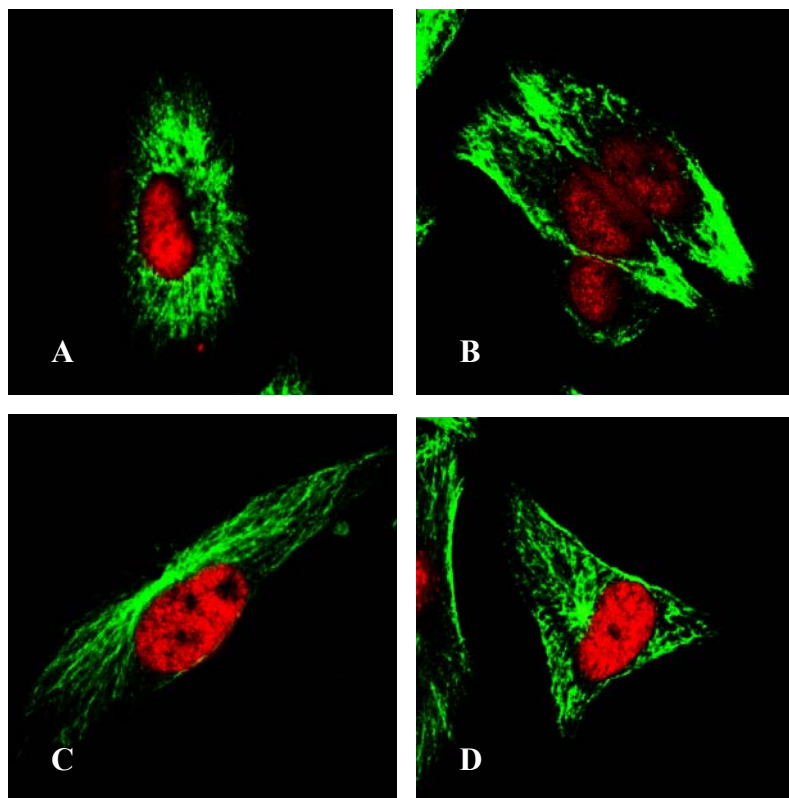
A: A 2ME₂ hatása az apoptotikus sejtek arányára.

B: Kaszpázgátlók hatása HT168-M1 sejtek 2ME₂-indukált apoptózisára (két kísérlet átlaga ± SD, *p<0,001).

C: Mitokondriummembrán-potenciál (MMP) változása melanómasejtek 2ME₂-kezelése során (két független kísérlet, átlag ± SD, *p<0,001, **p<0,02).

5.4.3 A 2-metoxi-ösztadiol hatása a mikrotubulusokra

A 2ME₂ mikrotubulusokra gyakorolt hatását az α-tubulin immuncitokémiai kimutatásával vizsgáltuk. Kontrollként Taxolt alkalmaztunk, ami ismert mikrotubulus-stabilizáló szer. Az interfázisban lévő HT168-M1 sejtek a Taxol-kezelésre (100 nM, 10 perc) a mikrotubulusaik erőteljes aggregációjával válaszoltak. Egy órás kezelés 5 μM 2ME₂-vel hasonló aggregációt eredményezett, a legfeltűnőbbet a centriolumok körül, illetve a plazmamembrán alatt (**23. ábra**). Kisebb koncentrációnál (1 μM) kevésbé volt megfigyelhető ez a jelenség.



23. ábra

A 2-metoxi-ösztadiol hatása a mikrotubulusok (FITC) elrendeződésére (sejtmag: PI).

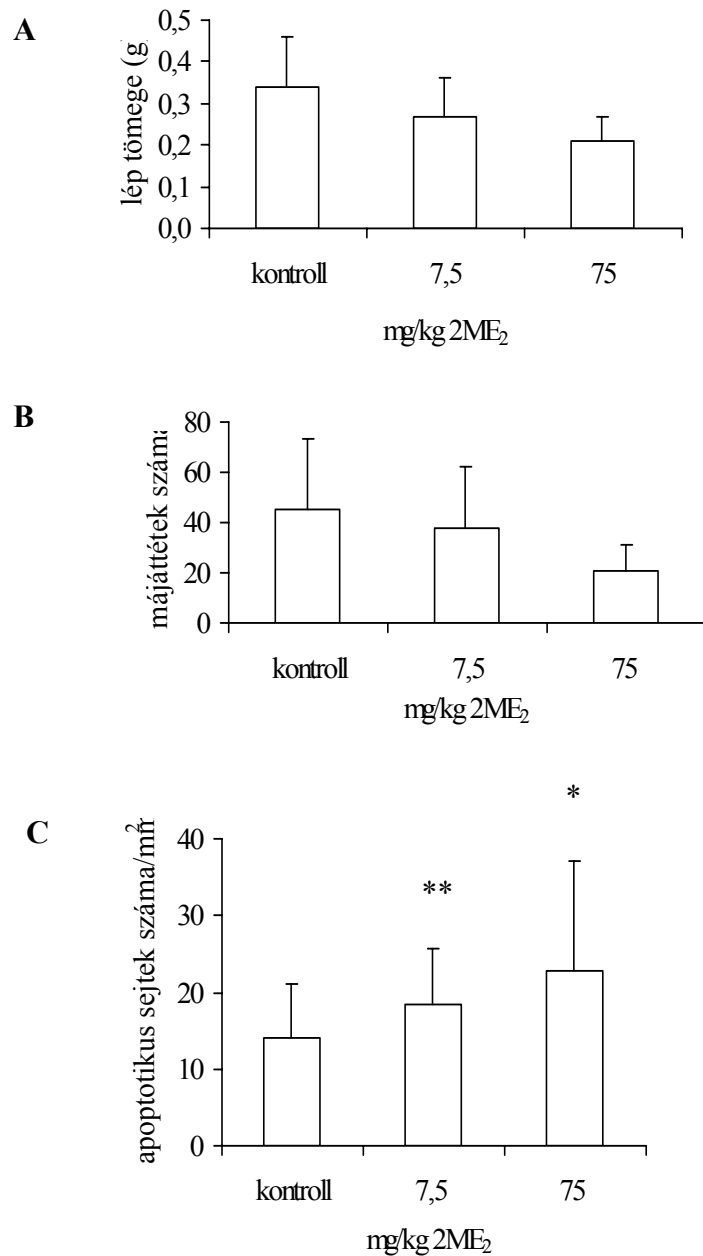
Konfokális mikroszkóp, 1000x-es nagyítás

A: kontroll, B: Taxollal kezelt sejtek, C, D: 2ME₂-kezelés hatása

5.4.4 A 2-metoxi-ösztadiol hatása a tumornövekedésre, az áttétképzésre és az áttétekben a melanómasejtek apoptózisára

A 2ME₂ hatását a HT168-M1 sejtek áttétképző hajlamára hím SCID egerekben vizsgáltuk. Ez a sejtvonal igen nagy májkolónia-képző potenciállal rendelkezik. Mindössze 10⁴ sejt lépbe injektálásával számos kolónia hozható létre hím egerek májában. A lép tömegét (primer tumor) és a májáttétek számát 28 nappal a tumorsejtek beinjektálása után határoztuk meg csoportonként 6-8 egérben. 12 napig orálisan adott 2ME₂ csökkentette mind a primer tumor (**24. A ábra**), mind a máj tömegét; 75 mg/kg 2ME₂ a májkolóniák számának átlagát mintegy 50%-kal csökkentette (tartomány: 6-33)

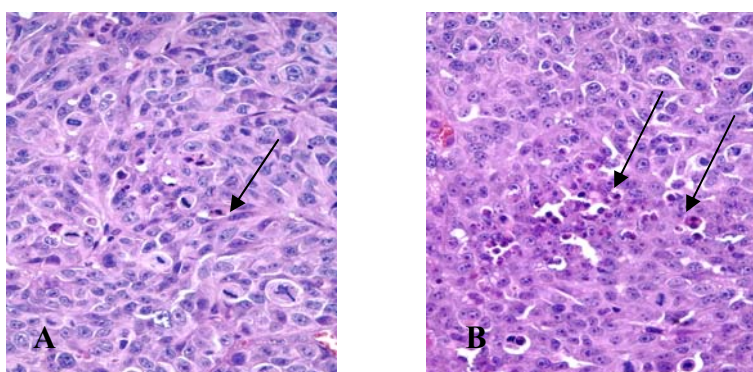
a kontrollhoz képest (tartomány: 20-107), míg 7,5 mg/kg 2ME₂ 20%-os csökkenést okozott (tartomány: 12-86; **24. B ábra**).



24. ábra

2ME₂ hatása in vivo. Lép-máj metasztázis-modellben csökkenti a primer tumor méretét (A), a májkolóniák számát (B), és növeli az apoptotikus sejtek számát az áttétekben (C) (átlag ± SD, *p<0,02, **p<0,03)

A májkolóniákban hematoxin-eozin-festett metszeteken meghatároztuk az apoptotikus sejtek számát. 7,5 illetve 75 mg/kg 2ME₂-kezelés az apoptotikus sejtek átlagos denzitását 14,0-ról 18,4/mm²-re illetve 22,8/mm²-re növelte (**24. C ábra**). A kontroll állatok májáltéteiben elszórva találhatóak apoptotikus sejtek (piknotikus mag, eozinofil, kondenzált citoplazma; **25. A ábra**). A nagyobb koncentrációjú (75 mg/kg) 2ME₂-kezelés hatására bizonyos kolóniákban a szétszórt, illetve esetenként csoportosan megjelenő apoptotikus sejtek száma megnőtt (**25. B ábra**).



25. ábra

2ME₂ hatására a kontrollhoz (A) képest megnőtt az apoptotikus sejtek (nyilakkal jelölve) száma a májáltétekben (B)

6 MEGBESZÉLÉS

Humán melanóma-sejtvonalainkban fehérjeszinten ER α expressziót csak igen kis százalékban találtunk, AR-t pedig nem tudtunk kimutatni a vizsgált sejtvonalakban. mRNS-szinten az ER α -expresszióban nagyságrendbeli különbségeket mutattak a vonalaink, a leginkább expresszáló 3 vonal is sokkal kisebb mértékben fejezte ki, mint a pozitív kontrollnak használt MCF7 emlőrákvonal. Ugyanez volt a helyzet a PR-rel 5 vonal esetében. Az ER β -t szinte mindegyik melanómavonal kifejezte, bár az ER α -nak a pozitív kontrollban mutatott expressziójához képest igen alacsony szinten. Az AR a pozitív kontroll LNCaP prosztatacarcinóma-vonalhoz képest több nagyságrenddel kisebb mértékben fejeződött ki a melanómasejtekben. A nemi hormonok a sejtek *in vitro* tulajdonságait nem, vagy csak igen kismértékben befolyásolták. Vizsgálataink azokat az irodalmi adatokat támasztják alá, ahol ösztradiol- vagy ösztrom-kezeléssel nem tudták befolyásolni sem ER+, sem ER- humán melanóma-sejtvonalak proliferációját (Feucht 1988, Lopes 1991, Richardson 1999).

Vizsgáltuk, hogy a glükokortikoid-receptor, ami szintén a nukleáris receptorok családjába tartozik, jelen van-e a melanómavonalakon illetve humán tumormintákon. Immuncitokémiával és nested PCR-rel sejtvonalak, kvantitatív PCR-rel tumorszövet, naevus illetve normális hámszövet GCR-expresszióját vizsgáltuk. A GCR kimutatható volt a melanómavonalakban, humán tumormintákban és xenograftokban egyaránt, mind mRNS-, mind fehérjeszinten. Emberi melanómavonalakon immuncitokémiával még nem igazolták a GCR jelenlétét, bár egér melanómasejtekben (B16) már leírták (Maksymowych 1993). Átlagosan negyedannyi GCR mRNS-t tudtunk kimutatni a melanómákból, mint normális hámból illetve naevusokból. A dexametazon a kimutatható GCR-expresszió ellenére az emberi melanómasejtek *in vitro* tulajdonságait (proliferáció, adherencia, migráció) csak nagy koncentrációban, huzamosabb ideig alkalmazva befolyásolta. A glükokortikoid-receptornak két izoformája van, melyek alternatív splicing mechanizmussal keletkeznek. A „klasszikus” GCR α a többi szteroidhormon-receptorokhoz hasonlóan dimer formában aktív, transzkripciós hatását más transzkripciós faktorokkal (pl. AP-1) kölcsönhatásban fejti ki. A GCR β hormont nem köt és transzkripciós aktivitása sincs, a glükokortikoid-hatás negatív szabályozójaként működik (Beato 2000). A GCR-nek ezen kívül számos

funkcióvesztéses mutációja is ismert (Schmidt 2004). A dexametazon-kezelés sem hozott egyértelmű eredményeket korábbi vizsgálatokban. DEX-kezelt humán melanómasejtek nagy részét rezisztensnek találták (Bregman 1983), vagy nem tudtak különbséget kimutatni DEX-szenzitív ill. -rezisztens melanóma-sejtvonalak GC-receptorainak specifikálásában ill. affinitásában (Hawkins 1982).

Annak ellenére, hogy *in vitro* körülmények között a nemi hormonoknak nem tudtuk kimutatni a melanómasejtek tulajdonságait befolyásoló szignifikáns hatását, korábbi eredményeink azt mutatták, hogy SCID egerekben lép-máj modellben nagyságrendbeli különbség alakul ki a melanómasejtek lépbe oltását követően a májajttétek számában a két nem között (Ladányi 1995). Hasonlóképpen, ösztrogénköti hellyel rendelkező humán melanóma-sejtvonalak hím egerekben gyorsabban nőttek, mint nőstényekben (Walker 1980, Feucht 1988). Kasztrálás hatására nőtt a tumortömeg (Feucht 1988). Farokvénába oltás után a tüdőkolonizáló képesség nem különbözött a két nemből. Humán melanómasejteket SCID egerek szívébe oltva több szervben kaptunk kolóniákat (mellékvesék, vesék, agy, csontok, szív és máj), de csak a máj esetén figyeltünk meg nemi különbséget. Hímekben több kolóniát találtunk, mint nőstényekben, és az ivartalanítás hímekben csökkentette, míg nőstényekben növelte ezek számát.

Ennek alapján úgy tűnik, hogy a nemi különbség szervspecifikus és a májra korlátozódik, ezért kezdtük vizsgálni a $2ME_2$ endogén ösztrogén-metabolitot, ami elsősorban a májban termelődik, tumorelles hatása ismert, de hatását nem a szteroidreceptorokon keresztül fejt ki. Hím egerekben a kasztrálás hatására bekövetkező áttéttség-csökkenés azonban valószínűleg nem magyarázható csupán a $2ME_2$ lokális hatásával.

A $2ME_2$ -nek már számos tumorsejtvonalon illetve endothelsejteken mutatták ki *in vitro* antiproliferációs, és *in vivo* tumorelles hatását. Az *in vivo* hatás lehetséges mechanizmusaként szóba jött proliferációgátlás, apoptózisindukció, és az érképződés gátlása is (Fotsis 1994, Klauber 1997, Bu 2002, Chauhan 2002, Mabeesh 2003). A $2ME_2$ humán melanómasejtekre gyakorolt hatásáról viszonylag kevés adat áll rendelkezésre. A közelmúltban egy melanómavonalon mutatták ki apoptózisindukciót (Ghosh 2003). A mi vizsgálatainkban a $2ME_2$ mind a nyolc, hat különböző genetikai háttérrel rendelkező humán melanóma-sejtvonalon sejtciklusgátlást és apoptózist idézett

elő, ami arra utal, hogy a melanómasejtekre általánosan jellemző az érzékenység erre az ösztadiol-metabolitra. Ennek a megfigyelésnek annak fényében van jelentősége, hogy a melanómák köztudottan rezisztensek a kémiai ágensek által kiváltott apoptózisra (Soengas 2003, Helmbach 2003). Számos tanulmány számol be a 2ME₂ hatásáról apoptózis-regulátor fehérjékre (pl. p53, Bcl-2; Yue 1997, Mukhopadhyay 1997, Attalla 1998, Ghosh 2003, Bu 2002, Shimada 2003), ami azt jelenti, hogy a 2ME₂ áttörheti a melanómasejtek apoptózis-rezisztenciáját.

A 2ME₂ proliferációt gátló hatását annak tulajdonították, hogy kötődni tud a tubulin kolhicin-kötő helyéhez, és így megváltoztatja a mikrotubulusok polimerizációjának mechanizmusát, ezáltal gátolva a metafázis-anafázis átmenetet, és apoptózist indukálva. Több tanulmány azt mutatta ki, hogy a 2ME₂ a tubulinpolimerizációt gátolja (D'Amato 1994, Mabjeesh 2003), de általában nagyobb koncentrációban, mint ami a növekedésgátláshoz szükséges (Attalla 1996). Mások a mikrotubulusok stabilizációját mutatták ki, hasonlóan például a Taxol hatásához (Attalla 1996, Attalla 1998). Mi is aggregálódott mikrotubulusokat figyeltünk meg 2ME₂-kezelést követően, ugyanabban a koncentrációtartományban, ami a proliferációgátláshoz szükséges volt.

A 2ME₂-indukált apoptózis mechanizmusában mind az extrinsic, mind az intrinsic útvonal szerepet játszik a különböző sejtípusokban. Leukémiában, hasnyálmirigy-tumorban, Ewing-szarkómában és mielómasejtekben a mitokondriumfüggő útvonal szerepét igazolták (Huang 2000, Qanungo 2002, Chauhan 2002, Djavaheer-Mergny 2003), míg emlőkarcinómában például az extrinsic útvonal működik (LaVallee 2003). Melanómasejteken azt találtuk, hogy – néhány egyéb tumortípushoz hasonlóan – a mitokondriumok, a kaszpáz-9, és kisebb mértékben a kaszpáz-8 is része a 2ME₂-indukált apoptózis folyamatának. Sőt mi több, kaszpázgátlókkal nem lehetett teljesen blokkolni az apoptózist, ami felveti más, kaszpázfüggetlen útvonalak létezésének lehetőségét is. Úgy tűnik, a 2ME₂ hatása több faktortól függ, és különböző mechanizmusok működhetnek a különböző sejtípusokban.

Ezeknek a megfigyeléseknek *in vivo* is jelentősége van, mivel a 2ME₂ a tumorsejtek lépbe oltása után alkalmazva csökkentette a primer tumor méretét, a májmetasztázisok számát, és növelte az apoptotikus alakok számát az áttétekben. Korábbi tanulmányok az antimetasztatikus hatást tüdőkolonizációs kísérletekben

vizsgálták (Kataoka 1998, Schumacher 1999, Pribluda 2000, Schumacher 2001), és csak egyben tanulmányozták a májmetasztázisokra gyakorolt hatást (Li 2002) annak ellenére, hogy emberben számos tumorféleség, így a melanóma áttétképzésének egyik leggyakrabban érintett szerve a máj.

Az a tény, hogy a nemi hormonoknak nincs jelentős közvetlen hatása a melanómasejtekre, felvetette a gazdaszervezetre gyakorolt hatások szerepét a májkolóniák számában észlelt nemi különbségek kialakulásában. Két számításba jövő területet vizsgáltunk, a beereződést és a természetes immunrendszer szerepét. Az ösztrogénnek ismert az az érendothelre illetve az angiogenezisre gyakorolt hatása. Mind az endothelsejteken, mind a simaizomsejtekben jelen van a klasszikus ösztrogénreceptor, melyen keresztül az ösztradiol proliferációt és migrációt serkentő hatást fejt ki, valószínűleg a VEGF expressziójának növelése által (Losordo 2001), mivel a VEGF promóterében ösztrogén-reszponzív elemet azonosítottak (Dabrosin 2005). Közvetlen hatása is van az endothelsejtekre, az adhéziós molekulák expresszióját szabályozza (Dabrosin 2005). Az ER β -t is megtalálták endothelsejteken, de ennek funkciója még nem ismert (Losordo 2001). Az ösztrogén gyors, nem genomi hatásai közé tartozik a nitrogén-oxidok produkciójának növelése, a vazodilatátor hatás, a vérnyomás csökkentése (Mendelsohn 2005). A bFGF, ami az endometriumban nemi hormonok szabályozása alatt áll, szintén részt vesz a tumor erezettségének kialakításában (Dabrosin 2005). Megjelenése vizsgálataink szerint összefüggést mutat az α I**Ib** β 3 (megakariocita-specifikus) integrin illegitim expressziójával (Döme 2005), amit emberi melanómákban munkacsoportunk bizonyított (Triakha 2002).

Eddig néhány egéren elvégzett előzetes vizsgálataink azonban azt mutatták, hogy lép-máj metasztázis modellben sem a primer tumor, sem a májáttétek érhalózatának denzitásában nincs szignifikáns különbség a hím és nőstény egerek között (anti-egér CD31 jelölés fagyasztott metszeten).

A lép-máj metasztázis modellben tapasztalt nemek közötti különbség már az injekciót követő napon kialakul. Míg az injekció után 1 órával csak átlagosan 27%-kal több melanómasejtet detektáltunk a hím egerek májában a nőstényekhez viszonyítva, 1 nap múlva a különbség már 3,6-szoros volt. Ezt a változást az idézte elő, hogy a két időpont közötti időszakban a hímekben megfigyelhető sejtszám harmadrészére csökkent, míg a nőstényekben nyolcadára. Ez az arány az idő múlásával lényegében

nem változott tovább. Az általunk használt sejtvonalat, a HT168-M1-et a minél hatékonyabb májkolonizáló képességre szelektálták (Ladányi 1990). Egy szintén nagy metasztatikus potenciállal rendelkező egér tumorsejtvonal esetén, melynek fő áttétképző helye a máj, kimutatták, hogy lépbe injektálást követően már 24 órával eltűnnek a tumorsejtek a májszinuszoidokból, az extravazáció teljes mértékben lejátszódott (Paku 2001). A tumorsejtek számának az első nap alatt végbemenő drámai csökkenésében a gazdaszervezet immunsejtjei is szerepet játszhatnak.

A természetes immunrendszer elemei SCID egerekben is megtalálhatók. A máj makrofágjai, a Kupffer-sejtek különböző stresszhelyzetekre (fertőzés, sérülés, karcinogénnel történő tumorindukálás) akutfázis-válasszal reagálnak. Ebben a folyamatban különböző citokineket termelnek, melyek közül az IL-6 mennyisége nemi különbséget mutat. Hepatokarcinogenezist kémiai úton indukálva immunkompetens hím egerekben 100%-os volt a tumor incidenciája, míg nőstényekben mindössze 13%. Az ivartalanítás és az ösztrogén-kezelés hímeiben csökkentette a tumorok incidenciáját és méretét, míg nőstényekben az ivartalanítás és a tesztoszteron-kezelés növelte a tumorok előfordulásának gyakoriságát (Nakatani 2001). IL-6 knockout egerekben nem mutatkozott különbség. Ivartalanított nőstényekben megnőtt a tumor előfordulása, de ezt ösztrogénkezeléssel csökkenteni lehetett. ER α - ill. ER β -deficiens egereket használva kiderült, hogy ezért a védő hatásért az ER α a felelős (Naugler 2007). Az ösztrogénkezelés az IL-6 promóterének aktivitását csökkentette az NF- κ B transzkripciós faktor gátlásával (Naugler 2007), de nem-genomi úton, a MAPK közreműködésével is befolyásolhatja a Kupffer-sejtek IL-6-produkcióját (Suzuki 2007).

Előzetes vizsgálataink szerint a Kupffer-sejtek gadolinium-kloriddal történő gátlása fokozza a melanómasejtek májáttétképzését mind nőstény, mind hím állatokban. A kolóniaszám növekedése nőstény egerekben konzekvensőbb volt, mint hímeiben, ami valószínűsíti a Kupffer-sejtek szerepét a melanómasejtek túlélésében és kolóniaképzésében a máj mikrokörnyezetében.

A malignus melanóma a bőr legagresszívebb típusú tumora, gyorsan növekvő előfordulási rátával. Annak ellenére, hogy az évek során számos terápiás megközelítést alkalmaztak, az áttétes betegség még mindig nagyon rossz prognózisú, mivel a szisztémás kezelések kevésbé sikeresek. Így szükség van hatékonyabb szerekre a magas rizikójú és az áttétes melanóma kezeléséhez. A 2ME₂, mivel hatékony kísérletes

tumormodellekben, és kevésbé toxikus, reménykeltő jelölt klinikai kísérletekben I. és II. fázisban számos daganat, így például emlőrák és prosztata-karcinóma esetén (Lakhani 2003). Melanómasejtekre gyakorolt *in vitro* és *in vivo* hatása alapján úgy gondoljuk, hogy melanómás betegek klinikai vizsgálata is megfontolandó.

7 KÖVETKEZTETÉSEK

1. Humán melanóma-sejtvonalainkon nemihormon-receptorokat jelentős mennyiségben nem tudtunk kimutatni, és a hormonokkal a sejtek *in vitro* tulajdonságait számottevően nem tudtuk befolyásolni.
2. Emberi melanómasejtekben glükokortikoidreceptor-expressziót igazoltunk. Kimutattuk, hogy a GCR-expresszió melanómában alacsonyabb szintű, mint normális hámszövetben. Ugyanakkor a humán melanómasejtek mérsékelten érzékenyek dexametazonra.
3. Preklinikai modellben emberi melanómasejtek kifejezett szexfüggő májkolóniaképzési eltérést mutatnak, ami más szervek esetében nem áll fenn. A különbség a kolóniaképzés igen korai fázisában alakul ki.
4. 2-metoxi-ösztradiollal, az ösztrogén májban keletkező metabolitjával hatékonyan gátoltuk melanómasejtek szaporodását *in vitro* és *in vivo* körülmények között is. A 2ME₂ a sejtciklust a G₂/M fázisban gátolja, és apoptózist indukál, melyben szerepet játszanak a mikrotubulusok, a mitokondrium és a kaspázok is.

8 ÖSSZEFOGLALÁS

A hagyományosan hormondependens tumorok mellett egyre több daganattípusról derül ki, hogy eltérő módon viselkedik férfiakban és nőkben, arra utalva, hogy az endokrin tényezőknek szerepe lehet a betegség lefolyásában. Malignus melanóma esetében a premenopauzális nők túlélési rátája jobb, mint a posztmenopauzálisoké vagy a férfiaké. Ennek ellenére azok a kutatások, melyek a melanómák nemihormon-receptorstátuszát kívánták elemezni, nem vezettek egyértelmű eredményre. Az epidemiológiai megfigyeléseknek a kísérletes alátámasztása is igen ellentmondó eredményeket hozott.

Humán melanóma-sejtvonalainkon mi sem tudtunk fehérjeszinten számottevő mennyiségben jelenlévő nemihormon-receptorokat kimutatni. Bár mRNS-szinten detektálhatóak voltak, a kvantitatív vizsgálatok szerint nagyságrendileg kisebb mértékben expresszálódnak, mint a pozitív kontrollnak használt sejtvonalakon. A nemi hormonok nem befolyásolták jelentősen melanómasejtjeink *in vitro* tulajdonságait. A glükokortikoid-receptor kimutatható volt mind mRNS-, mind fehérjeszinten, a dexametazon mégis csak igen nagy dózisban hatott *in vitro*.

Munkacsoportunk korábbi eredményei azt mutatták, hogy humán melanómasejteket injektálva hím és nőtény SCID egerek lépébe, a metasztázisok száma hím egerekben jelentősen magasabb. Ez a különbség már az első napon kialakul. Farokvénába oltást követően a tüdő kolonizációjában nem volt ilyen különbség. Szívbe oltás után vizsgálva a kolóniaképzés mintázatát, csak a máj esetében találtunk különbséget a nemek között a kolóniák előfordulási gyakoriságában illetve számában. Megállapítottuk tehát, hogy a megfigyelt jelenség a májra specifikusnak tekinthető. Ezért vetődött fel a 2-metoxi-ösztradiol szerepe a nemi preferencia kialakulásában. A 2ME₂ az ösztradiolnak a májban keletkező metabolitja, és már ismert tumorelles hatásától. Hatását nem az ösztrogénreceptorokon keresztül fejt ki. Hatékonyan gátolta humán melanómasejtek szaporodását a sejtciklus befolyásolásával és apoptózis indukálásával. A mechanizmusban szerepet játszanak a mikrotubulusok, a mitokondrium és a kaszpázok is. *In vivo* lép-máj metasztázis modellben csökkentette a primer tumor méretét, a májattétek számát, és növelte az apoptotikus sejtek arányát az áttétekben.

9 IRODALOMJEGYZÉK

- Abrams MT, Robertson NM, Yoon K, Wickstrom E. (2004) Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by targeting the major splice variants of BIM mRNA with small interfering RNA and short hairpin RNA. *J Biol Chem*, 279: 55809-17.
- Agarwala SS, Ferri W, Gooding W, Kirkwood JM. (1999) A phase III randomized trial of dacarbazine and carboplatin with and without tamoxifen in the treatment of patients with metastatic melanoma. *Cancer*, 85: 1979-84.
- Attalla H, Mäkelä TP, Adlercreutz H, Andersson LC. (1996) 2-Methoxyestradiol arrests cells in mitosis without depolymerizing tubulin. *Biochem Biophys Res Commun*, 228: 467-473.
- Attalla H, Westberg JA, Andersson LC, Adlercreutz H, Mäkelä TP. (1998) 2-Methoxyestradiol-induced phosphorylation of Bcl-2: uncoupling from JNK/SAPK activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 247: 616-619.
- Avril MF, Delarue JC, Prade M. (1985) [Estrogen and progesterone receptors in malignant melanoma, benign pigmented nevi and basocellular epithelioma] *Pathol Biol (Paris)*, 33: 39-44.
- Awan AK, Iftikhar SY, Morris TM, Clarke PA, Grabowska AM, Waraich N, Watson SA. (2007) Androgen receptors may act in a paracrine manner to regulate oesophageal adenocarcinoma growth. *Eur J Surg Oncol*, 33: 561-8.
- Båtevik R, Grong K, Segadal L, Stangeland L. (2005) The female gender has a positive effect on survival independent of background life expectancy following surgical resection of primary non-small cell lung cancer: a study of absolute and relative survival over 15 years. *Lung Cancer*, 47: 173-81.
- Beato M, Klug J. (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update*, 6: 225-36.
- Berki T, Kumánovics G, Kumánovics A, Falus A, Ujhelyi E, Németh P. (1998) Production and flow cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody. *J Immunol Methods*, 214: 19-27.
- Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. (2002) Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer*, 38: 99-166.

- Bregman MD, Peters E, Sander D, Meyskens FL Jr. (1983) Dexamethasone, prostaglandin A, and retinoic acid modulation of murine and human melanoma cells grown in soft agar. *J Natl Cancer Inst*, 71: 927-32.
- Bu S, Blaukat A, Fu X, Heldin N-E, Landström M. (2002) Mechanisms for 2-methoxyestradiol-induced apoptosis of prostate cancer cells. *FEBS Lett*, 531: 141-151.
- Campbell-Thompson M, Lynch IJ, Bhardwaj B. (2001) Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res*, 61: 632-40.
- Charmandari E, Chrousos GP, Ichijo T, Bhattacharyya N, Vottero A, Souvatzoglou E, Kino T. (2005) The human glucocorticoid receptor (hGR) beta isoform suppresses the transcriptional activity of hGRalpha by interfering with formation of active coactivator complexes. *Mol Endocrinol*, 19: 52-64.
- Chaudhuri PK, Walker MJ, Beattie CW, Das Gupta TK. (1979) Endocrine correlates of human malignant melanoma. *J Surg Res*, 26: 214-19.
- Chauhan D, Catley L, Hideshima T, Li G, Leblanc R, Gupta D, Sattler M, Richardson P, Schlossman RL, Podar K, Weller E, Munshi N, Anderson KC. (2002) 2-Methoxyestradiol overcomes drug resistance in multiple myeloma cells. *Blood*, 100: 2187-2194.
- Cobb JP, McGrath A. (1974) In vitro effects of melanocyte-stimulating hormone, adrenocorticotrophic hormone, 17 beta-estradiol, or testosterone propionate on Cloudman S91 mouse melanoma cells. *J Natl Cancer Inst*, 52: 567-70.
- Cohen C, DeRose PB, Campbell WG, Schlosnagle DC, Sgoutas D. (1990) Estrogen receptor status in malignant melanoma. *Am J Dermatopathol*, 12: 562-4.
- D'Amato R, Lin CM, Flynn E, Folkman J, Hamel E. (1994) 2-Methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 3964-3968.
- Dabrosin C. (2005) Sex steroid regulation of angiogenesis in breast tissue. *Angiogenesis*, 8: 127-36.
- Daniel AR, Qiu M, Faivre EJ, Ostrander JH, Skildum A, Lange CA. (2007) Linkage of progestin and epidermal growth factor signaling: phosphorylation of progesterone receptors mediates transcriptional hypersensitivity and increased ligand-independent breast cancer cell growth. *Steroids*, 72: 188-201.

- Dank M, Nagykálnai T. Hormonszármazékok farmakológiája. Jeney A, Kralovánszky J (szerk.) Onkofarmakológia. Medicina, Budapest, 2005: 339-370.
- Daryanani D, Plukker JT, De Hullu JA, Kuiper H, Nap RE, Hoekstra HJ. (2003) Pregnancy and early-stage melanoma. *Cancer*, 97: 2248-53.
- Delarue JC, Avril MF, Charpentier P, Prade M. (1987) Estrogen receptors in malignant melanoma. *Arch Dermatol*, 123: 159-60.
- Dewhurst LO, Gee JW, Rennie IG, MacNeil S. (1997) Tamoxifen, 17beta-oestradiol and the calmodulin antagonist J8 inhibit human melanoma cell invasion through fibronectin. *Br J Cancer*, 75: 860-8.
- Di Leo A, Messa C, Cavallini A, Linsalata M. (2001) Estrogens and colorectal cancer. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 1: 1-12.
- Diaz NM, Mazoujian G, Wick MR. (1991) Estrogen-receptor protein in thyroid neoplasms. An immunohistochemical analysis of papillary carcinoma, follicular carcinoma, and follicular adenoma. *Arch Pathol Lab Med*, 115: 1203-7.
- Dingli D, Timm M, Russell SJ, Witzig TE, Rajkumar SV. (2002) Promising preclinical activity of 2-methoxyestradiol in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*, 8: 3948-3954.
- Djavaheiri-Mergny M, Wietzerbin J, Besançon F. (2003) 2-Methoxyestradiol induces apoptosis in Ewing sarcoma cells through mitochondrial hydrogen peroxide production. *Oncogene*, 22: 2558-2567.
- Döme B, Rásó E, Dobos J, Mészáros L, Varga N, Puskás LG, Fehér LZ, Lőrincz T, Ladányi A, Trikha M, Honn KV, Timár J. (2005) Parallel expression of alphaIIb beta3 and alpha v beta3 integrins in human melanoma cells upregulates bFGF expression and promotes their angiogenic phenotype. *Int J Cancer*, 116: 27-35.
- Dougherty SM, Mazhawidza W, Bohn AR, Robinson KA, Mattingly KA, Blankenship KA, Huff MO, McGregor WG, Klinge CM. (2006) Gender difference in the activity but not expression of estrogen receptors alpha and beta in human lung adenocarcinoma cells. *Endocr Relat Cancer*, 13: 113-34.
- Duncan LM, Travers RL, Koerner FC, Mihm MC Jr, Sober AJ. (1994) Estrogen and progesterone receptor analysis in pregnancy-associated melanoma: absence of immunohistochemically detectable hormone receptors. *Hum Pathol*, 25: 36-41.

- Emons G, Fleckenstein G, Hinney B, Huschmand A, Heyl W. (2000) Hormonal interactions in endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer*, 7: 227-42.
- Evinger AJ 3rd, Levin ER. (2005) Requirements for estrogen receptor alpha membrane localization and function. *Steroids*, 70: 361-3.
- Falkson CI, Ibrahim J, Kirkwood JM, Coates AS, Atkins MB, Blum RH. (1998) Phase III trial of dacarbazine versus dacarbazine with interferon alpha-2b versus dacarbazine with tamoxifen versus dacarbazine with interferon alpha-2b and tamoxifen in patients with metastatic malignant melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol*, 16: 1743-51.
- Fasco MJ, Hurteau GJ, Spivack SD. (2002) Gender-dependent expression of alpha and beta estrogen receptors in human nontumor and tumor lung tissue. *Mol Cell Endocrinol*, 188: 125-40.
- Fernö M, Borg A, Ingvar C, Jönsson PE. (1987) Estrogen receptor and binding site for estramustine in metastatic malignant melanoma. *Anticancer Res*, 7: 741-3.
- Feucht KA, Walker MJ, Das Gupta TK, Beattie CW. (1988) Effect of 17 β -estradiol on the growth of estrogen receptor-positive human melanoma *in vitro* and in athymic mice. *Cancer Res*, 48: 7093-7101.
- Fisher RI, Neifeld JP, Lippman ME. (1976) Oestrogen receptors in human malignant melanoma. *The Lancet*, 337-8.
- Fotsis T, Zhang Y, Pepper MS, Adlercreutz H, Montesano R, Nawroth PP, Schweigerer L. (1994) The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *Nature*, 368: 237-239.
- Friedman AE. (2005) The Estradiol-Dihydrotestosterone model of prostate cancer. *Theor Biol Med Model*, 2: 10.
- Ghosh R, Ott AM, Seetharam D, Slaga TJ, Kumar AP. (2003) Cell cycle block and apoptosis induction in a human melanoma cell line following treatment with 2-methoxyestradiol: therapeutic implications? *Melanoma Res*, 13: 119-127.
- Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. (1994) A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem*, 218: 314-319.

- Hawkins EF, Hutchens TW, Fligel S, Horn D, Markland FS. (1982) Glucocorticoids and melanoma: receptor properties of dexamethasone sensitive and resistant tumors. *J Steroid Biochem*, 16: 673-81.
- Heinlein CA, Chang C. (2004) Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev*, 25: 276-308.
- Helmbach H, Sinha P, Schadendorf D. (2003) Human melanoma: drug resistance. *Recent Results Cancer Res*, 161: 93-110.
- Herynk MH, Fuqua SA. (2004) Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Rev*, 25: 869-98.
- Hidaka H, Hotokezaka M, Nakashima S, Uchiyama S, Maehara N, Chijiwa K. (2007) Sex difference in survival of patients treated by surgical resection for esophageal cancer. *World J Surg*, 31: 1982-7.
- Horn D, Buzard RL. (1981) Growth inhibition by glucocorticoids in RPMI 3460 melanoma cells. *Cancer Res*, 41: 3155-60.
- Huang EJ, Wu CC, Huang HP, Liu JY, Lin CS, Chang YZ, Lin JA, Lin JG, Chen LM, Lee SD, Kuo WW, Huang CY. (2006) Apoptotic and anti-proliferative effects of 17beta-estradiol and 17beta-estradiol-like compounds in the Hep3B cell line. *Mol Cell Biochem*, 290: 1-7.
- Huang P, Feng L, Oldham EA, Keating MJ, Plunkett W. (2000) Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature*, 407: 390-395.
- Ito K, Utsunomiya H, Yaegashi N, Sasano H. (2007) Biological Roles of Estrogen and Progesterone in Human Endometrial Carcinoma - New Developments in Potential Endocrine Therapy for Endometrial Cancer - *Endocr J*, Sep 4
- Jatoi I, Gore ME. (1993) Sex, pregnancy, hormones and melanoma. *BMJ*, 307: 2-3.
- Jensen EV, Jordan VC. (2003) The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin Cancer Res*, 9: 1980-9.
- Kanda N, Watanabe S. (2001) 17beta-estradiol, progesterone, and dihydrotestosterone suppress the growth of human melanoma by inhibiting interleukin-8 production. *J Invest Dermatol*, 117: 274-83.
- Kataoka M, Schumacher G, Cristiano RJ, Atkinson EN, Roth JA, Mukhopadhyay T. (1998) An agent that increases tumor suppressor transgene product coupled with

- systemic transgene delivery inhibits growth of metastatic lung cancer *in vivo*. *Cancer Res*, 58: 4761-4765.
- Kawai H, Ishii A, Washiya K, Konno T, Kon H, Yamaya C, Ono I, Minamiya Y, Ogawa J. (2005) Estrogen receptor alpha and beta are prognostic factors in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 11: 5084-9.
- Kemeny MM, Busch E, Stewart AK, Menck HR. (1998) Superior survival of young women with malignant melanoma. *Am J Surg*, 175: 437-445.
- Klauber N, Parangi S, Flynn E, Hamel E, D'Amato RJ. (1997) Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol. *Cancer Res*, 57: 81-86.
- Klotz L. (2000) Hormone therapy for patients with prostate carcinoma. *Cancer*, 88: 3009-14.
- Kogianni G, Mann V, Ebetino F, Nuttall M, Nijweide P, Simpson H, Noble B. (2004) Fas/CD95 is associated with glucocorticoid-induced osteocyte apoptosis. *Life Sci*, 75: 2879-95.
- Kokoschka EM, Spona J, Knobler R. (1982) Sex steroid hormone receptor analysis in malignant melanoma. *Brit J Dermat*, 107: 54-59.
- Kopper L, Hahn TV, Lapis K. (1982) Experimental model for liver metastasis formation using Lewis lung tumor. *J Cancer Res Clin Oncol*, 103: 31-38.
- La Vecchia C, Lucchini F, Negri E, Levi F. (2004) Trends in oral cancer mortality in Europe. *Oral Oncol*, 40: 433-9.
- Ladányi A, Tímár J, Bocsi J, Tóvári J, Lapis K. (1995) Sex-dependent liver metastasis of human melanoma lines in SCID mice. *Melanoma Res*, 5: 83-86.
- Ladányi A, Tímár J, Paku S, Molnár G, Lapis K. (1990) Selection and characterization of human melanoma lines with different liver-colonizing capacity. *Int J Cancer*, 46: 456-461.
- Lakhani NJ, Sarkar MA, Venitz J, Figg WD. (2003) 2-Methoxyestradiol, a promising anticancer agent. *Pharmacotherapy*, 23: 165-172
- Lama G, Angelucci C, Bruzzese N, Iacopino F, Nori SL, D'Atri M, Turriziani M, Bonmassar E, Sica G. (1998) Sensitivity of human melanoma cells to oestrogens, tamoxifen and quercetin: is there any relationship with type I and II oestrogen binding site expression? *Mel Res*, 8: 313-22.

- Lange CA. (2004) Making sense of cross-talk between steroid hormone receptors and intracellular signaling pathways: who will have the last word? *Mol Endocrinol*, 18: 269-78.
- Lasithiotakis KG, Leiter U, Gorkiewicz R, Eigentler T, Breuninger H, Metzler G, Strobel W, Garbe C. (2006) The incidence and mortality of cutaneous melanoma in Southern Germany: trends by anatomic site and pathologic characteristics, 1976 to 2003. *Cancer*, 107: 1331-9.
- Lau KM, Mok SC, Ho SM. (1999) Expression of human estrogen receptor-alpha and -beta, progesterone receptor, and androgen receptor mRNA in normal and malignant ovarian epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 5722-7.
- LaVallee TM, Zhan XH, Herbstritt CJ, Kough EC, Green SJ, Pribluda VS. (2002) 2-Methoxyestradiol inhibits proliferation and induces apoptosis independently of estrogen receptors α and β . *Cancer Res*, 62: 3691-3697.
- LaVallee TM, Zhan XH, Johnson MS, Herbstritt CJ, Swartz G, Williams MS, Hembrough WA, Green SJ, Pribluda VS. (2003) 2-Methoxyestradiol up-regulates death receptor 5 and induces apoptosis through activation of the extrinsic pathway. *Cancer Res*, 63: 468-475.
- Leachman SA, Jackson R, Eliason MJ, Larson AA, Bologna JL. (2007) Management of melanoma during pregnancy. *Dermatol Nurs*, 19: 145-52.
- Lecavalier MA, From L, Gaid N.J. (1990) Absence of estrogen receptors in dysplastic nevi and malignant melanoma. *Am Acad Dermatol*, 23: 242-6.
- Lederman S, Lew RA, Koh HK, Sober AJ. (1985) Influence of estrogen administration on tumor characteristics and survival in women with cutaneous melanoma. *JNCI*, 74: 981-985.
- Leslie KK, Espey E. (2005) Oral contraceptives and skin cancer: is there a link? *Am J Clin Dermatol*, 6: 349-55.
- Levin ER. (2005) Integration of the extra-nuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol*, 19: 1951-9.
- Lewin DI. Researchers get down to the α s and β s of estrogens effect. (1997) *J NIH Res*, 9: 23-5.
- Li X-F, Kinuya S, Yokoyama K, Koshida K, Mori H, Shiba K, Watanabe N, Shuke N, Michigishi T, Tonami N. (2002) Benefits of combined radioimmunotherapy and

- anti-angiogenic therapy in a liver metastasis model of human colon cancer cells. *Eur J Nucl Med*, 29: 1669-1674.
- Lipkin G. (1970) Sex factors in growth of malignant melanoma in hamsters: in vivo and in vitro correlation. *Cancer Res*, 30: 1928-30.
- Lopes MT, Sonohara S, Chammas R, Brentani MM. (1991) Effects of steroids on laminin-binding integrins in a human melanoma cell line. *Int J Cancer*, 48: 73-80.
- Lopez RE, Bhakoo H, Paolini NS, Rosen F, Holyoke ED, Goldrosen MH. (1978) Effect of estrogen on the growth of B-16 melanoma. *Surg Forum*, 29: 153-4.
- Losordo DW, Isner JM. (2001) Estrogen and angiogenesis: A review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21: 6-12.
- Lukanova A, Kaaks R. (2005) Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14: 98-107.
- Lukits J, Remenár E, Rásó E, Ladányi A, Kásler M, Tímár J. (2007) Molecular identification, expression and prognostic role of estrogen- and progesterone receptors in head and neck cancer. *Int J Oncol*, 30: 155-60.
- Mabjeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, Pribluda VS, Swartz GM, Johnson MS, Willard MT, Zhong H, Simons JW, Giannakakou. (2003) 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell*, 3: 363-375.
- Machens A, Hauptmann S, Dralle H. (2006) Disparities between male and female patients with thyroid cancers: sex difference or gender divide? *Clin Endocrinol (Oxf)*, 65: 500-5.
- MacKie RM, Bray C, Vestey J, Doherty V, Evans A, Thomson D, Nicolson M; Scottish Melanoma Group. (2007) Melanoma incidence and mortality in Scotland 1979-2003. *Br J Cancer*, 96: 1772-7.
- Makar AP. (2000) Hormone therapy in epithelial ovarian cancer. *Endocr Relat Cancer*, 7: 85-93.
- Maksymowych AB, Robertson NM, Litwack G. (1993) Efficacy of pyridoxal treatment in controlling the growth of melanomas in cell culture and an animal pilot study. *Anticancer Res*, 13: 1925-37.
- Martin A, Clynes M. (1993) Comparison of 5 microplate colorimetric assays for *in vitro* cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnology*, 11: 49-58.

- Massarweh S, Schiff R. (2006) Resistance to endocrine therapy in breast cancer: exploiting estrogen receptor/growth factor signaling crosstalk. *Endocr Relat Cancer*, 13: 15-24.
- McArdle CS, McMillan DC, Hole DJ. (2003) Male gender adversely affects survival following surgery for colorectal cancer. *Br J Surg*, 90: 711-5.
- McCarty KS Jr, Szabo E, Flowers JL, Cox EB, Leight GS, Miller L, Konrath J, Soper JT, Budwit DA, Creasman WT, et al. (1986) Use of a monoclonal anti-estrogen receptor antibody in the immunohistochemical evaluation of human tumors. *Cancer Res*, 46: 4244-48.
- Mendelsohn ME, Karas RH. (2005) Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science*, 308: 1583-7.
- Micheli A, Mariotto A, Giorgi Rossi A, Gatta G, Muti P. (1998) The prognostic role of gender in survival of adult cancer patients. *Eur J Cancer*, 34: 2271-2278.
- Mihalik R, Uher F, Pocsik EE, Berczi L, Benczur M, Kopper L. (1996) Detection of drug-induced apoptosis by flow cytometry after alkaline extraction of ethanol fixed cells. *Pathol Oncol Res*, 2: 78-83.
- Miller JG, Gee J, Price A, Garbe C, Wagner M, Mac Neil S. (1997) Investigation of oestrogen receptors, sex steroids and soluble adhesion molecules in the progression of malignant melanoma. *Melanoma Res*, 7: 197-208.
- Miller JG, Mac Neil S. (1997) Gender and cutaneous melanoma. *Br J Dermatol*, 136: 657-665.
- Moore R, Doherty D, Chamberlain R, Khuri F. (2004) Sex differences in survival in non-small cell lung cancer patients 1974-1998. *Acta Oncol*, 43: 57-64.
- Morley P, Whitfield JF, Vanderhyden BC, Tsang BK, Schwartz JL. (1992) A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology*, 131: 1305-12.
- Morvillo V, Luthy IA, Bravo AI, Capurro MI, Portela P, Calandra RS, Mordoh J. (2002) Androgen receptors in human melanoma cell lines IIB-MEL-LES and IIB-MEL-IAN and in human melanoma metastases. *Melanoma Res*, 12: 529-38.
- Mukhopadhyay T, Roth JA. (1997) Induction of apoptosis in human lung cancer cells after wild-type *p53* activation by methoxyestradiol. *Oncogene*, 14: 379-384.

- Nakatani T, Roy G, Fujimoto N, Asahara T, Ito A. (2001) Sex hormone dependency of diethylnitrosamine-induced liver tumors in mice and chemoprevention by leuprorelin. *Jpn J Cancer Res*, 92: 249-56.
- Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, Karin M. (2007) Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science*, 317: 121-4.
- Neifeld JP, Lippman ME. (1980) Steroid hormone receptors and melanoma. *J Invest Dermatol*, 74: 379-381.
- Nozoe T, Oyama T, Takenoyama M, Hanagiri T, Sugio K, Yasumoto K. (2007) Significance of immunohistochemical expression of estrogen receptors alpha and beta in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res*, 13: 4046-50.
- O'Meara AT, Cress R, Xing G, Danielsen B, Smith LH. (2005) Malignant melanoma in pregnancy. A population-based evaluation. *Cancer*, 103: 1217-26.
- Osborne CK, Schif R. (2005) Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J Clin Oncology*, 23: 1616-22.
- Oshima Y, Kuroda Y, Kunishige M, Matsumoto T, Mitsui T. (2004) Oxidative stress-associated mitochondrial dysfunction in corticosteroid-treated muscle cells. *Muscle Nerve*, 30: 49-54.
- Osman AM, Jansen PW, Smets LA, Benckhuijsen C. (1985) Glucocorticoid receptors and cell cycle progression in human melanoma cell lines. *J Cell Physiol*, 125: 306-12.
- Paku S, Rot A, Ladányi A, Lapis K. (1989) Demonstration of the organ preference of liver selected 'high metastatic' Lewis lung tumor cell line. *Clin Exp Metastasis*, 7: 599-607.
- Paloyan E, Hofmann C, Prinz RA, Oslapas R, Shah KH, Ku WW, Ernst K, Smith M, Lawrence AM. (1982) Castration induces a marked reduction in the incidence of thyroid cancers. *Surgery*, 92: 839-48.
- Panis Y, Nordlinger B, Delelo R, Herve JP, Infante J, Kuhnle M, Ballet F. (1990) Experimental colorectal liver metastases. Influence of sex, immunological status and liver regeneration. *J Hepatol*, 11: 53-7.
- Patel JD, Bach PB, Kris MG. (2004) Lung cancer in US women: a contemporary epidemic. *JAMA*, 291: 1763-8.

- Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, Hughes CC, Levin ER. (2002) Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. *J Biol Chem*, 277: 50768-75.
- Piantelli M, Maggiano N, Ricci R, Larocca LM, Capelli A, Scambia G, Isola G, Natali PG, Ranelletti FO. (1995) Tamoxifen and quercetin interact with type II estrogen binding sites and inhibit the growth of human melanoma cells. *J Invest Dermatol*, 105: 248-53.
- Picariello L, Fiorelli G, Martinetti V, Tognarini I, Pampaloni B, Tonelli F, Brandi ML. (2003) Growth response of colon cancer cell lines to selective estrogen receptor modulators. *Anticancer Res*, 23: 2419-24.
- Pribluda VS, Gubish ER, LaVallee TM, Treston A, Swartz GM, Green SJ. (2000) 2-Methoxyestradiol: An endogenous antiangiogenic and antiproliferative drug candidate. *Cancer Metastasis Rev*, 19: 173-179.
- Proctor JW, Auclair BG, Stokowski L. (1976) Endocrine factors and the growth and spread of B16 melanoma. *J Natl Cancer Inst*, 57: 1197-8.
- Proctor JW, Yamamura Y, Gaydos D, Mastromatteo W. (1981) Further studies on endocrine factors and the growth and spread of B16 melanoma. *Oncology*, 38: 102-5.
- Qadan LR, Perez-Stable CM, Anderson C, D'Ippolito G, Herron A, Howard GA, Roos BA. (2001) 2-Methoxyestradiol induces G₂/M arrest and apoptosis in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 285: 1259-1266.
- Qanungo S, Basu A, Das M, Halder S. (2002) 2-Methoxyestradiol induces mitochondria dependent apoptotic signaling in pancreatic cancer cells. *Oncogene*, 21: 4149-4157.
- Qiu M, Olsen A, Faivre E, Horwitz KB, Lange CA. (2003) Mitogen-activated protein kinase regulates nuclear association of human progesterone receptors. *Mol Endocrinol*, 17: 628-42.
- Rampen FHJ. (1984) Sex differences in survival from cutaneous melanoma. *Int J Dermat*, 23: 444-452.
- Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, Greene GL, Levin ER. (2004) Plasma membrane estrogen receptors exist and function as dimers. *Mol Endocrinol*, 18: 2854-65.

- Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, 307: 1625-30.
- Richardson B, Price A, Wagner M, Williams V, Lorigan P, Browne S, Miller JG Mac Neil S. (1999) Investigation of female survival benefit in metastatic melanoma. *Brit J Cancer*, 80: 2025-2033.
- Robertson JF, Come SE, Jones SE, Beex L, Kaufmann M, Makris A, Nortier JW, Possinger K, Rutqvist LE. (2005) Endocrine treatment options for advanced breast cancer-the role of fulvestrant. *Eur J Cancer*, 41: 346-56.
- Rusthoven JJ, Quirt IC, Iscoe NA, McCulloch PB, James KW, Lohmann RC, Jensen J, Burdette-Radoux S, Bodurtha AJ, Silver HK, Verma S, Armitage GR, Zee B, Bennett K. (1996) Randomized, double-blind, placebo-controlled trial comparing the response rates of carmustine, dacarbazine, and cisplatin with and without tamoxifen in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 14: 2083-90.
- Rümke P, Persijn JP, Korsten CB. (1980) Oestrogen and androgen receptors in melanoma. *Br J Cancer*, 41: 652-56.
- Schleicher RL, Hitselberger MH, Beattie CW. (1987) Inhibition of hamster melanoma growth by estrogen. *Cancer Res*, 47: 453-9.
- Schmidt AN, Nanney LB, Boyd AS, King LE, Ellis DL. (2006) Oestrogen receptor-beta expression in melanocytic lesions. *Exp Dermatol*, 15: 971-80.
- Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R. (2004) Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ*, 11: 45-55.
- Schumacher G, Kataoka M, Roth JA, Mukhopadhyay T. (1999) Potent antitumor activity of 2-methoxyestradiol in human pancreatic cancer cell lines. *Clin. Cancer Res*, 5: 493-499.
- Schumacher G, Neuhaus P. (2001) The physiological estrogen metabolite 2-methoxyestradiol reduces tumor growth and induces apoptosis in human solid tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*, 127: 405-410.
- Shaw HM, McGovern VJ, Milton GW, Farago GA, McCarthy WH. (1982) The female superiority in survival in clinical stage II cutaneous malignant melanoma. *Cancer*, 40: 1941-1944.

- Shimada K, Nakamura M, Ishida E, Kishi M, Konishi N. (2003) Roles of p38- and c-jun NH2-terminal kinase-mediated pathways in 2-methoxyestradiol-induced p53 induction and apoptosis. *Carcinogenesis*, 24: 1067-1075.
- Simon SR, Ershler WB. (1985) Hormonal influences on growth of B16 murine melanoma. *J Natl Cancer Inst*, 74: 1085-8.
- Singh P, Reubi JC, Rajakumar G, Guo YS, Prioux H, Chicone L. (1993) In vivo mitogenic effects of estradiol on colon cancers: role of gastrin and gastrin receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 46: 49-60.
- Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. (2004) Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev*, 84: 1155-228.
- Smyth JF, Gourley C, Walker G, MacKean MJ, Stevenson A, Williams AR, Nafussi AA, Rye T, Rye R, Stewart M, McCurdy J, Mano M, Reed N, McMahon T, Vasey P, Gabra H, Langdon SP. (2007) Antiestrogen therapy is active in selected ovarian cancer cases: the use of letrozole in estrogen receptor-positive patients. *Clin Cancer Res*, 13: 3617-22.
- Soengas MS, Lowe SW. (2003) Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*, 22: 3138-3151.
- Stabile LP, Davis AL, Gubish CT, Hopkins TM, Luketich JD, Christie N, Finkelstein S, Siegfried JM. (2002) Human non-small cell lung tumors and cells derived from normal lung express both estrogen receptor alpha and beta and show biological responses to estrogen. *Cancer Res*, 62: 2141-50.
- Suba Zs. (2007) Gender-related hormonal risk factors for oral cancer. *Pathol Oncol Res*, 13: 195-202.
- Suzuki T, Yu HP, Hsieh YC, Choudhry MA, Bland KI, Chaudry IH. (2007) Estrogen-mediated activation of non-genomic pathway improves macrophages cytokine production following trauma-hemorrhage. *J Cell Physiol*.
- Tamir G, Milo Y, Rothem A, Sulkes J, Hauben DJ. (1996) Cutaneous malignant melanoma in young adults under age 30. *Isr J Med Sci*, 32: 1290-6.
- Tangkijvanich P, Mahachai V, Suwangool P, Poovorawan Y. (2004) Gender difference in clinicopathologic features and survival of patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 10: 1547-50.

- Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. (2005) Identity of fan estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*, 146: 624-32.
- Trikha M, Tímár J, Zacharek A, Németh JA, Cai Y, Döme B, Somlai B, Rásó E, Ladányi A, Honn KV. (2002) Role for beta3 integrins in human melanoma growth and survival. *Int J Cancer*, 101: 156-67.
- Ueo H, Matsuoka H, Sugimachi K, Kuwano H, Mori M, Akiyoshi T. (1990) Inhibitory effects of estrogen on the growth of a human esophageal carcinoma cell line. *Cancer Res*, 50: 7212-5.
- Ulmer MJ, Tonita JM, Hull PR. Trends in invasive cutaneous melanoma in Saskatchewan 1970-1999. *J Cutan Med Surg*. 2003; 7: 433-42.
- Utsumi Y, Nakamura T, Nagasue N, Kubota H, Harada T, Morikawa S. (1991) Effect of 17 beta-estradiol on the growth of an estrogen receptor-positive human esophageal carcinoma cell line. *Cancer*, 67: 2284-9.
- Vincze B, Sinkovics I, Keresztes S, Gergye M, Boér A, Remenár E, Péter I, Szentirmay Z, Kremmer T, Kásler M. (2004) [Clinical significance of serum thyroglobulin and antithyroglobulin antibody in differentiated thyroid cancer after thyroid ablation] *Magy Onkol*, 48: 27-34.
- Visbal AL, Williams BA, Nichols FC 3rd, Marks RS, Jett JR, Aubry MC, Edell ES, Wampfler JA, Molina JR, Yang P. (2004) Gender differences in non-small-cell lung cancer survival: an analysis of 4,618 patients diagnosed between 1997 and 2002. *Ann Thorac Surg*, 78: 209-15.
- Vizoso FJ, Rodriguez M, Altadill A, González-Diéguez ML, Linares A, González LO, Junquera S, Fresno-Forcelledo F, Corte MD, Rodrigo L. (2007) Liver expression of steroid hormones and Apolipoprotein D receptors in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 13: 3221-7.
- Walker MJ, Beattie CW, Patel MK, Ronan SM, Das Gupta TK. (1987) Estrogen receptor in malignant melanoma. *J Clin Oncol*, 5: 1256-61.
- Walker MJ, Chaudhuri PK, Das Gupta TK, Beattie CW. (1980) Influence of host sex on the growth of human melanoma. *Proc Soc Exp Biol Med*, 165: 96-9.

- Walker MJ, Ronan SG, Han MC, Beattie CW, Das Gupta TK. (1991) Interrelationship between histopathologic characteristics of melanoma and estrogen receptor status. *Cancer*, 68: 184-8.
- Wang Z, Malone MH, He H, McColl KS, Distelhorst CW. (2003) Microarray analysis uncovers the induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 278: 23861-7.
- Wei Q, Cheng L, Amos CI, Wang LE, Guo Z, Hong WK, Spitz MR. (2000) Repair of tobacco carcinogen-induced DNA adducts and lung cancer risk: a molecular epidemiologic study. *J Natl Cancer Inst*, 92: 1764-72.
- Wichmann MW, Muller C, Hornung HM, Lau-Werner U, Schildberg FW. (2001) Gender differences in long-term survival of patients with colorectal cancer. *Br J Surg*, 88: 1092-8.
- Wolf M, Holle R, Hans K, Drings P, Havemann K. (1991) Analysis of prognostic factors in 766 patients with small cell lung cancer (SCLC): the role of sex as a predictor for survival. *Br J Cancer*, 63: 986-92.
- Wolters U, Stutzer H, Isenberg J. (1996) Gender related survival in colorectal cancer. *Anticancer Res*, 16: 1281-9.
- Yue T-L, Wang X, Loudon CS, Gupta S, Pillarisetti K, Gu J-L, Hart TK, Lysko PG, Feuerstein GZ. (1997) 2-Methoxyestradiol, an endogenous estrogen metabolite, induces apoptosis in endothelial cells and inhibits angiogenesis: possible role for stress-activated protein kinase signaling pathway and Fas expression. *Mol Pharmacol*, 51: 951-962.
- Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssiere JL, Petit PX, Kroemer G. (1995) Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death *in vivo*. *J Exp Med*, 181: 1661-1672.
- Zang EA, Wynder EL. (1996) Differences in lung cancer risk between men and women: examination of the evidence. *J Natl Cancer Inst*, 88: 183-92.
- Zhu BT, Conney AH. (1998) Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis*, 19: 1-27.
- Zouboulis CC, Chen WC, Thornton MJ, Qui K, Rosenfield R. (2007) Sexual hormones in human skin. *Horm Metab Res*, 39: 85-95.

10 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

1. **Dobos J**, Tímár J, Bocsi J, Burián Z, Nagy K, Barna G, Peták I, Ladányi A. (2004) In vitro and in vivo antitumor effect of 2-methoxyestradiol on human melanoma. *Int J Cancer*, 112: 771-6. (IF: 4,416)
2. Döme B, Rásó E, **Dobos J**, Mészáros L, Varga N, Puskás LG, Fehér LZ, Lőrincz T, Ladányi A, Trikha M, Honn KV, Tímár J. (2005) Parallel expression of alphaIIb beta3 and alphav beta3 integrins in human melanoma cells upregulates bFGF expression and promotes their angiogenic phenotype. *Int J Cancer*, 116: 27-35. (IF: 4,700)

Disszertációtól független közlemények:

1. Döme B, **Dobos J**, Tóvári J, Paku S, Kovács G, Ostoros G, Tímár J. (2007) Circulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells: characterization, mobilization and therapeutic considerations in malignant disease. *Cytometry, Part A* (közlésre elfogadva, IF: 3,293)
2. Döme P, Teleki Z, Rihmer Z, Péter L, **Dobos J**, Kenessey I, Tóvári J, Tímár J, Paku S, Kovács G, Döme B. (2007) Circulating endothelial progenitor cells and depression: a possible novel link between heart and soul. *Mol Psychiatry* (közlésre elfogadva, IF: 11,804)
3. Lövey J, Kenessey I, Rásó E, **Dobos J**, Vágó A, Kásler M, Futosi K, Döme B, Tímár J, Tóvári J. (2007) A rekombináns humán erythropoietin- α fokozza a humán laphámrák sugárérzékenységét preklinikai modellben. *Magy Onkol*, 51: 53-61.
4. Döme B, Tímár J, **Dobos J**, Mészáros L, Rásó E, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Magyar M, Ladányi A, Bogos K, Tóvári J. (2006) Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 66: 7341-7. (IF: 7,656)

Előadások, posztterek:

1. Ladányi A, Rásó E, **Dobos J**, Lőrincz T, Tóvári J, Tímár J. (2007) A beteg nemének szerepe a melanóma és egyéb daganatok progressziójában – áttekintés és kísérletes adatok. Magyar Onkológusok Társasága XXVII. Kongresszusa, Budapest, Magyar Onkológia 51
2. **Dobos J**, Kenessey I, Mészáros L, Rásó E, Döme B, Tóvári J. (2007) Keringő endotheliális progenitor sejtek meghatározása és jelentősége humán nem-kissejtes tüdőtumorban. 37. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg
3. Ladányi A, **Dobos J**, Tóvári J, Rásó E, Lőrincz T, Zádori G, Tímár J. (2006) Sex dependence of metastatization by human melanoma is organ-specific in a SCID mouse model. 19th Meeting of the European Association for Cancer Research, Budapest, Proc p.179
4. Ladányi A, Tóvári J, Lőrincz T, Rásó E, **Dobos J**, Tímár J. (2006) Liver specificity of sex-dependent metastasis formation by human melanoma in SCID mice. 97th Annual Meeting of AACR, Washington, Proc 47: 1014
5. Tóvári J, Tímár J, **Dobos J**, Mészáros L, Rásó E, Kenessey I, Rényi-Vámos F, Bogos K, Magyar M, Döme B. (2006) Prognostic significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. 97th Annual Meeting of AACR, Washington, Proc 47: 657
6. Döme B, Tímár J, **Dobos J**, Mészáros L, Rásó E, Paku S, Kenessey I, Bogos K, Magyar M, Rényi-Vámos F, Tóvári J. (2006) Prognostic significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. Molecular Biology & Human Diseases, Bécs
7. Rásó E, Magyar M, **Dobos J**, Tímár J, Döme B, Ostoros Gy, Strausz J. (2005) Az epidermális növekedési faktor-receptor tirozinkináz domén (EGFR-TK) mutációjának kimutatása bronchiális citológiai mintákban. Magyar Onkológusok Társasága XXVI. Kongresszusa, Budapest, Magyar Onkológia 49: 73
8. Ladányi A, Rásó E, **Dobos J**, Tímár J. (2005) A beteg nemének szerepe a daganatos progresszióban. 35. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg
9. **Dobos J**, Kenessey I. (2005) Glükokortikoid-receptor (GCR) melanómákban. 35. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg

10. **Dobos J**, Tímár J, Bocsi J, Burián Z, Nagy K, Barna G, Ladányi A. (2004) In vitro and ind vivo antitumor effect of 2-methoxyestradiol on human melanoma. 2nd Int Melanoma Res Congr, Phoenix, Proc AB29.
11. **Dobos J**, Tímár J, Bocsi J, Burián Z, Nagy K, Barna G, Peták I, Ladányi A. (2004) In vitro and in vivo antitumor effect of 2-methoxyestradiol on human melanoma. 18th Meeting of the European Association for Cancer Research, Innsbruck, Proc p. 213
12. Tímár J, Döme B, Mészáros L, Varga N, Rásó E, **Dobos J**, Puskás LG, Ladányi A, Trikha M. (2004) Parallel expression of alpha(IIb)beta(3) and alpha(v)beta(3) integrins in human melanoma cells upregulates bFGF expression and promotes their angiogenic phenotype. 18th Meeting of the European Association for Cancer Research, Innsbruck, Proc p. 191
13. **Dobos J**, Ladányi A, Bocsi J, Burián Zs, Tímár J. (2003) Az ösztrogén-metabolit 2-metoxiösztradiol (2ME2) hatása humán melanómára. Magyar Onkológusok Társasága XXV. Kongresszusa, Szeged, Magyar Onkológia 47: 249
14. **Dobos J**, Ladányi A, Bocsi J, Paku S, Tímár J. (2001) Nemi hormonok hatása emberi melanómasejtekre. Fiatal Onkológusok Fóruma, Pécs

11 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Ladányi Andreának, témavezetőmnek, aki szakdolgozó éveim óta irányította és segítette munkámat, és Prof. Dr. Tímár Józsefnek, munkacsoportunk vezetőjének, aki képzésemhez és kutatómunkámhoz minden támogatást megadott.

Köszönetet mondok az Országos Onkológia Intézet vezetőjének, Dr. Kásler Miklósnak, hogy hozzájárult ahhoz, hogy kutató tevékenységemet ebben az intézményben folytathassam.

Köszönöm Prof. Dr. Kopper Lászlónak és Prof. Dr. Jeney Andrásnak, hogy a Patológiai tudományok Doktori Iskola vezetőjeként illetve az Onkológia program vezetőjeként lehetővé tették tudományos tevékenységemet.

Külön köszönettel tartozom Dr. Rásó Erzsébetnek, akitől a molekuláris biológiai jártasságot szereztem, és a nemihormon-receptorok expressziójának meghatározásában nyújtott segítséget. Köszönöm az OOI Tumor Progressziós Osztály több jelenlegi illetve régebbi munkatársának, Dr. Tóvári Józsefnek, Dr. Kenessey Istvánnak, Dr. Lőrincz Tamásnak, Dr. Burián Zsuzsannának, Parragné Derecskei Katalinnak és Sinka Andrásnének, hogy a nagyobb, vagy olykor apró-cseprő problémáimban is mindig a segítségemre voltak. Gaudi Istvánnak a statisztikai elemzésekben nyújtott segítségéért, a Semmelweis Egyetem 1.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetből Dr. Bocsi Józsefnek, Dr. Nagy Katalinnak, Dr. Barna Gábornak és Dr. Peták Istvánnak az áramlási citométeres mérésekben nyújtott segítségéért.

Végül szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak, hogy hosszú éveken át megteremtették a tudományos tevékenységemhez szükséges háttérrel, és mellettem álltak minden probléma leküzdésében.