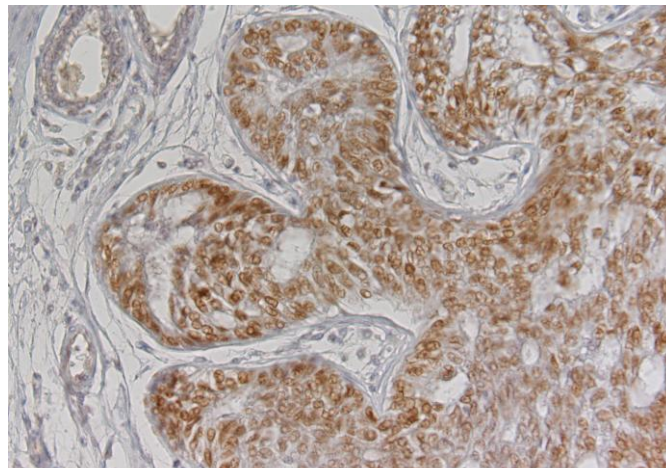




Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för anatomi fysiologi och biokemi

En studie av progesteronreceptorer i juvertumörer



Linda Stener

Uppsala

2013

Examensarbete inom veterinärprogrammet

ISSN 1652-8697
Examensarbete 2013:6

En studie av progesteronreceptorer i juvertumörer
A study of progesterone receptors in mammary tumours

Linda Stener

Handledare: Eva Hellmén, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Examinator: Andrzej Madej, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2013
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi
Kurskod: EX0754, Nivå A2E, 30hp*

*Nyckelord: progesteronreceptorer, hund, juvertumörer, progesteron, mifepristone
Key words: progesterone receptors, canine, mammary tumours, progesterone, mifepristone*

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2013:6*

INNEHÅLL

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	1
INLEDNING	3
Det normala juvret	3
Juvertumörer	5
Progesteron.....	6
Mifepristone	8
Fenolrött	8
Studiens syfte.....	8
MATERIAL OCH METODER	9
Delstudie 1 - Immunohistokemi	9
Delstudie 2 och 3 - Cellviabilitetsstudie	10
Delstudie 4 - Analys av progesteronkoncentration i celllysatsat och cellodlingsmedium	12
Delstudie 5 – Analys av progesteronreceptoruttryck i celllysatsat	12
Statistisk analys	13
RESULTAT	13
Delstudie 1 - Immunohistokemi	13
Delstudie 2 och 3 - Cellviabilitetsstudie	14
Delstudie 4 - Analys av progesteronkoncentration i celllysatsat och cellodlingsmedium	19
Delstudie 5 - Analys av progesteronreceptoruttryck i celllysatsat	20
DISKUSSION	21
Cellviabilitet.....	21
Etanolets påverkan på cellviabilitet.....	22
Analys av progesteron och progesteronreceptorer i celllysatsat och cellodlingsmedium	23
Cellodlingsmediets inverkan på cellviabiliteten.....	24
Immunohistokemi	25
Allmän diskussion	25
Felkällor	26
Framtida studier	26
REFERENSER	27

SAMMANFATTNING

I denna studie har förekomst av progesteronreceptorer i olika typer av primära juvertumörer undersökts med hjälp av immunohistokemi. Dessutom har tumörceller från carcinomcellinjen CMT-U27 odlats i olika cellodlingsmedium och exponerats för olika testsubstanser som binder till progesteronreceptorn (progesteron och RU486/mifepristone). Cellernas receptoruttryck och progesteroninnehåll utvärderades med hjälp av ELISA och tumörcellernas viabilitet analyserades med Colorimetric Cell Viability Test.

Av resultaten framgår att samtliga undersökta primära juvertumörer uttryckte progesteronreceptorer. De odlade cellerna hade högre cellviabilitet när de odlades utan fetalt bovint serum (FBS). Efter exponering med progesteron minskade tumörcellernas uttryck av progesteronreceptorer, vilket hämmades av mifepristone. Cellerna innehöll högre halter progesteron än det medium cellerna odlades i vilket kan tolkas som att de kan producera eget progesteron. De celler som inkuberades i endast progesteron var den enda grupp vars cellviabilitet minskade efter 48 timmars inkubation, vilket kan bero på att progesteron får celler att stanna i G1-fasen av cellcykeln och därmed hämma deras tillväxt.

SUMMARY

In this study the occurrence of progesterone receptors in different mammary tumours have been examined with immunohistochemistry. Furthermore tumour cells from the carcinoma cell line CMT-U27 have been cultured in different cell culture media and exposed to different test substances that bind to the progesterone receptor (progesterone and RU486/mifepristone). The receptor expression and progesterone content of the cells have been evaluated with ELISA and the cell viability was analyzed with Colorimetric Cell Viability Test.

The results show that all of the examined primary tumours expressed progesterone receptors. The cultured tumour cells had higher cell viability when grown without fetal bovine serum (FBS). Exposure of progesterone lowered the expression of progesterone receptors in the cells, an effect that was inhibited by mifepristone. The cells contained a higher rate of progesterone than the conditioned medium. This indicates that the cells produce their own progesterone. The cells that were incubated in progesterone alone were the only group with lower cell viability after 48 hours of incubation, this might be because of the effect of progesterone on cell cycle progression with an arrest in the G1-phase and thereby inhibiting the cell proliferation.

INLEDNING

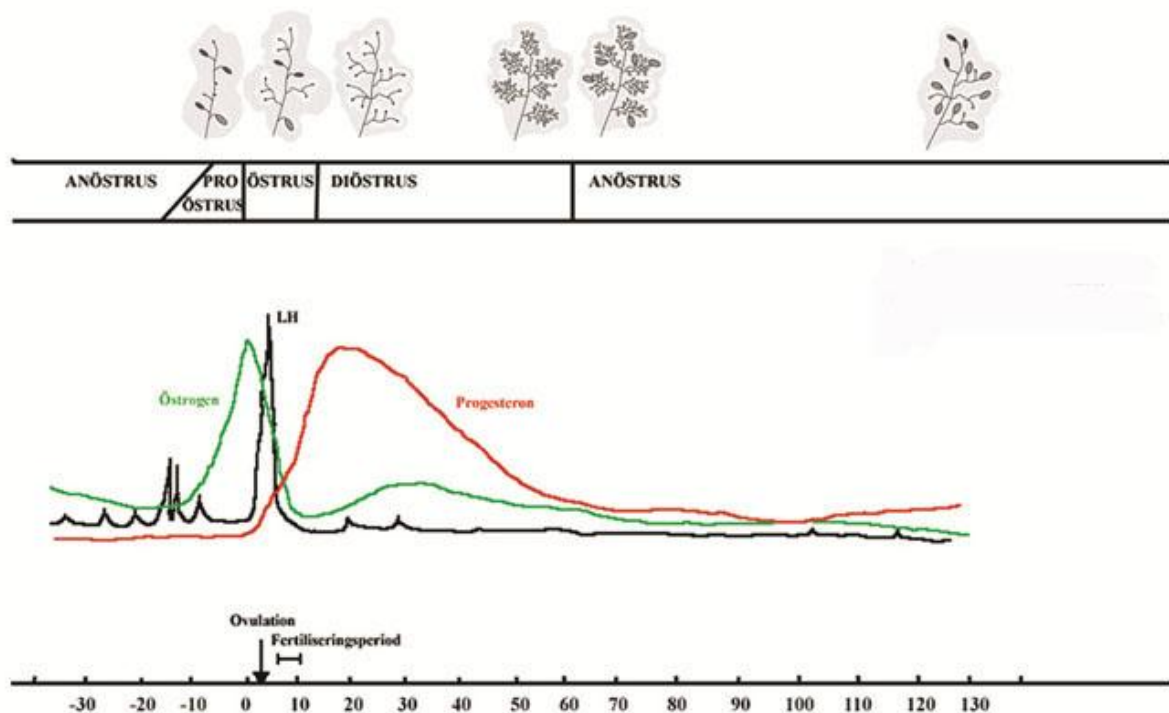
Det normala juvret

Tiken har normalt fem juverpar. Varje spene har 7-16 spenöppningar som försörjer lobar som är oberoende av varandra. Juvret är beläget i den subkutana bindväven och är en modifierad svettkörtel. Vävnaden består av epitelceller som bildar sekretoriska alveoler och utförsgångar (Sleeckx et al. 2011). Myoepiteliala celler bildar ett kontinuerligt lager kring utförsgångarna (Santos et al. 2010). Dessa celler bekläder även utsidan på alveolerna, men omfattningen påverkas av alveolernas sekretoriska stadium. Inaktiva alveoler omges av ett kontinuerligt myoepitelialt lager medan aktiva samt regressiva alveoler omgärdas av ett okontinuerligt skikt. Alveolerna består av enskiktat kubiskt till cylindriskt epitel. De minsta utförsgångarna består även de av enskiktat kubiskt epitel medan de större gångarna utgörs av ett tvåskiktat kubiskt till cylindriskt epitel som för de största utförsgångarna är förhornat och flerskiktat epitel. Mellan alveolerna finns ett stroma med bindväv, nerver, kärl och celler såsom makrofager och plasmaceller. Stromat bildar intra- och interlobulära septa som delar upp juvervävnaden i olika lobar. Interlobulära septa byggs upp av oregelbunden bindväv med mycket elastiska fibrer (Santos et al. 2010).

Juverutvecklingen styrs av ett samspel av hormoner och tillväxtfaktorer. Östrogen stimulerar cellproliferationen och progesteron förgreningen av gångsystemet som avslutas i alveoler. Progesteron har stor inverkan även under dräktigheten och unikt för tiken är att hon har ungefär lika höga progesteronhalter under dräktighet som under diöstrus (Concannon 2009). Juvervävnaden påverkas mycket av brunstcykeln och det stadium tiken befinner sig i (Figur 1). Vävnaden är inaktiv under stora delar av cykeln, d v s sen anöstrus, proöstrus samt östrus. Proliferation och differentiering sker framför allt under diöstrusfasen (Santos et al. 2010, Chandra et al. 2010).

Innan könsmognad är juvervävnaden inte fullt utvecklad (Chandra och Adler 2008, Santos et al. 2010), men till skillnad från en del andra djur kräver inte tiken dräktighet för att utveckla ett fullt differentierat juver. Endast enstaka omogna gångstrukturer med omgivande myoepiteliala celler kan ses sprida ut sig från spenbasen ner i dermis innan könsmognad (Santos et al. 2010, Nelson och Kelly 1974). Stromat mellan utförsgångarna består av tät bindväv och dominerar den prepubertala juvervävnaden (Santos et al. 2010). Under proöstrus ger vävnaden ett vilande intryck med inaktiva gångar och atrofisk körtelvävnad (Rehm et al. 2007, Chandra et al. 2010). Det är inte förrän under diöstrus som en kraftig utveckling och differentieringen av juvret sker (Chandra et al. 2010, Santos et al. 2010). Odifferentierat gång- och alveolarepitel prolifererar och bildar ett mer utvecklat lobsystem (Santos et al. 2010). Bindvävsstromat visar tecken på kraftig proliferation med aktiva fibroblaster och ökad vaskularisering (Chandra et al. 2010, Santos et al. 2010). Under diöstrusfasen avtar proliferationen av vävnad som istället mognar ut till ett fullständigt utvecklat juver med väldifferentierade lobar och tätpackade alveoler (Chandra et al. 2010, Santos et al. 2010, Nelson och Kelly 1974). Alveolerna är antingen fullt aktiva med utplattat till lågt kubiskt epitel eller partiellt sekretoriska med något högre epitelceller. Alveolerna och utförsgångar fylls med eosinofilt proteinrikt sekret. Gångarnas epitel är tunt, med utplattat till lågt kubiskt epitel. Intralobulära är stromat luckert, medan det interlobulärt bildar stråk av tätare bindväv

som avgränsar loberna (Santos et al. 2010). Den första delen av anöstrus liknar diöstrus, men tecken på en begynnande tillbakabildning av den aktiva juvervävnaden kan ses (Santos et al. 2010, Nelson och Kelly 1974), med allt fler kollapsade alveoler och gångar (Chandra et al. 2010, Santos et al. 2010). Subkutant kan ökad fettvävnad ses (Nelson och Kelly 1974). Det intralobulära stromat är tätare och består av mogen bindväv infiltrerat av lymfocyter, plasmaceller samt aktiva makrofager, även mellan loberna ses tät bindväv med låg celltäthet (Chandra et al. 2010, Santos et al. 2010). Under laktation är juvret fullt utvecklat och aktivt. Under den första delen av laktationsperioden har de kaudala juverdelarna fler alveoler, efter två månaders laktation börjar juvret tillbakabildas och tecken på detta ses först i de kraniala juverdelarna (Orfanou et al. 2010).



Figur 1: Tikens östralcykeln. Schematisk översikt över hormonella förändringar under den normala östralcykeln. Hormoner som redovisas är östrogen (pg/ml), progesteron (ng/ml) och LH (ng/ml). Modifierad efter Concannon (1986) och Concannon (2009) samt Santos et al. (2010).

Det normala juvret påverkas som tidigare nämnts av hormoner och uttrycker även olika hormonreceptorer under brunstcykeln. Under diöstrus står kroppen under hormonell dominans av progesteron (Concannon 1986). Över 90 % av normal juvervävnad har detekterbara progesteronreceptorer och östrongenreceptorer (PR respektive ER) i olika grad (Millanta et al. 2005, Donnay et al. 1995a, Donnay et al. 1995b). Juverdelarna inom en juverrad varierar en del. De kaudala juverdelarna har fler lober än de kraniala (Santos et al. 2010) och de har även högre koncentration av ER och PR jämfört med de kraniala (Donnay et al. 1995a, Donnay et al. 1995b). En förklaring till att de kraniala juverdelarna är mindre utvecklade än de kaudala kan vara skillnader i juverutveckling eller differentieringsgrad (Santos et al. 2010, Donnay et al. 1995b). PR och ER (α och β) i normal juvervävnad uttrycks i cellkärnorna hos alveolar- och gångepitel eller myoepiteliala celler (Chandra et al. 2010, Geraldtes et al. 2000, de las

Mulas et al. 2004). Donnay et al. (1995b) har visat att ER-koncentrationen är högre hos djur över fem år. Detta samband har även påträffats för PR (Rutteman et al. 1988), men i studien hittades inget samband för ER.

Uttrycket av hormonreceptorer i juvret varierar med brunstcykeln. Under proöstrus är uttrycket av PR lågt i cytoplasman, vilket även gäller under tidig diöstrus. Detta kan bero på nedreglering av receptorn när kroppen står under inflytande av högt serumprogesteron (Donnay et al. 1995b), alternativt att receptorerna förflyttas in i kärnan under denna period. Under lutealfasen ökar både ER- och PR-uttryck (Chandra et al. 2010), vilket sammanfaller med en period av hög proliferation i juvervävnaden (Chandra et al. 2010, Santos et al. 2010). Chandra et al. (2010) fann starkt uttryck av PR under östrus och tidig diöstrus. Halterna minskade under mitten (Manee-in et al. 2009) till slutet av diöstrus (Chandra et al. 2010). I det fullt differentierade juvret uttrycktes få PR-positiva celler (Lantinga-van Leeuwen et al. 2000). PR-uttrycket är starkare i cytoplasman hos anöstrala tikar jämfört med skendräktiga tikar eller tikar som behandlats med medroxyprogesteronacetat (Donnay et al. 1995a). Medroxyprogesteronacetat (MPA) är en syntetisk progestin som bl.a. används för att förhindra ovulation hos hund som kan binda både PR och glukokortikoidreceptorer (Beijerink et al. 2008).

Juvertumörer

Juvertumören är tikens vanligaste tumör med en prevalens på 0,2 % (Klopfleisch et al. 2011). Det är främst medelålders till äldre tikar som drabbas med en genomsnittlig ålder på 8-10 år. Benjamin et al. (1999) fann att benigna tumörer upptäcktes tidigare hos något yngre hundar (7-9 år) än maligna tumörer (8-10 år) då de tittade på individuella hundar, men då den sammantagna åldersrelaterade incidensen bedömdes (som inkluderade alla tumörer hos varje tik i studien) var sambandet det omvända. Schneider et al. (1969) visade att tikar som kastrerats innan första löpet hade 0,5 % risk att utveckla juvertumörer. Detta kan jämföras med en motsvarande risk på 8 % och 26 % för de som genomgått en respektive två eller fler östralcykler. Tikar som kastrerades efter 2,5 års ålder uppvisade ingen minskad risk att utveckla juvertumörer.

Steroidreceptorer i juvertumörer

Progesteronreceptorer (PR) och östrogenreceptorer (ER) finns i både neoplastisk och normal juvervävnad och uttrycks framför allt i cellkärnan hos epiteliala celler. Man har inte sett någon skillnad i receptoruttryck (PR) för juvertumörer när man jämfört kastrationsstatus, ålder, hormonell status, eller antal/lokalisering av tumörerna (de Las Mulas et al. 2005, Donnay et al. 1993, Donnay et al. 1995a). Uttrycket av receptorerna (ER och PR) är svagare med stigande malignitetsgrad (de Las Mulas et al. 2005, de las Mulas et al. 2004, Donnay et al. 1993, Millanta et al. 2005, Nieto et al. 2000) och ER α uttrycks i högre grad i adenocarcinom jämfört med andra maligna tumörer som ej bildar tubulära strukturer (Nieto et al. 2000). Intressant nog uttrycks PR i högre grad än ER oavsett malignitet (de Las Mulas et al. 2005, Donnay et al. 1993). Bland benigna tumörer är det vanligast med ER α och PR-uttryck, medan det bland maligna tumörer är vanligare att de är negativa för ER α . Det är vanligare med uttryck av en eller båda receptorerna (ER α och PR) hos benigna (96 %) jämfört

med maligna (66 %) tumörer (de Las Mulas et al. 2005). Det finns även ett samband mellan ökande tumörstorlek och förlust av receptoruttryck (Donnay et al. 1995a) (de Las Mulas et al. 2005, Nieto et al. 2000) samt snabb tillväxthastighet och förlust av receptoruttryck (Donnay et al. 1995a). Steroidreceptorpositivitet (ER α , PR) är mindre vanligt hos metastaserande tumörer (de Las Mulas et al. 2005). Enligt (Donnay et al. 1993, Donnay et al. 1995a) påverkas receptoruttrycket av PR och ER i normalvävnaden inte av avståndet till tumören, d v s uttrycket är detsamma även långt ifrån tumören. Ett samband om än svagt mellan normal juvervävnad och tumören kan tyda på att även tumörens receptoruttryck regleras av samma signaler (Donnay et al. 1995a). När man jämfört receptoruttryck i normal juvervävnad med tumörvävnad hos samma djur upptäcktes att ER uttrycktes i mindre grad i tumörvävnaden, medan förhållandet var det motsatta för PR (Donnay et al. 1993, Donnay et al. 1995a). Millanta et al. (2005) fann inte detta samband och de undersökte vävnaden med immunohistokemi istället för biokemiska metoder. Fördelen med immunohistokemin är att receptorns lokalisering i cellerna samt vilka celler som är positiva kan undersökas, vilket inte kan göras med den biokemiska metoden som Donnay (Donnay et al. 1993, Donnay et al. 1995a) använde. Infärgning av PR hos tumörer genom immunohistokemi varierar mycket. Väldifferentierade tumörer har en tydlig nukleär infärgning medan andra kan ha ett mer heterogent infärgningsmönster, med ex perinukleär infärgning (Lantinga-van Leeuwen et al. 2000).

Hormonnivåer och tillväxtfaktorer hos tikar med juvertumörer

Tikar med maligna tumörer har högre nivåer av steroidhormon i serum och tumörvävnad jämfört med friska tikar och de med benigna tumörer (Queiroga et al. 2005, Illera et al. 2006). Halten tillväxthormon (GH) i serum är högre hos tikar med tumörer och högst hos de med maligna tumörer. Tikar med maligna juvertumörer har även högre halter av Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) jämfört med friska (Queiroga et al. 2010, Queiroga et al. 2008).

Progesteron

Progesteron är ett hormon som både kan stimulera och hämma celltillväxt beroende på dos samt vilken vävnad progesteronet verkar på (Groshong et al. 1997). Studier har visat att progestiner inducerar gener som är associerade med cellcykelprogression och/eller nedreglering av tillväxthämmande gener. Progesteron verkar i ett bifasiskt mönster. Kontinuerlig progestinbehandling är tillväxthämmande medan episodisk behandling är stimulerande. Progesteron stimulerar först en cellcykel och därefter induceras arrest i G1-fasen. Under arresten är cellerna resistent mot ny progesteronbehandling under 72 timmar (Groshong et al. 1997, Musgrove et al. 1991). Progesteron uppreglerar ALCAM, ett glykoprotein som är involverat i celladhesion, proliferation och tumörprogression. Uppregleringen av ALCAM kan vara en av förklaringarna till progesteronets antiproliferativa egenskaper in vitro (Purmonen et al. 2008).

Progesteronreceptorn

Signalvägar och uppbyggnad

Progesteronreceptorer har som nämnts tidigare upptäckts i både normal och tumöromvandlad juvervävnad. Effekten av progesteron medieras via PR som ingår i nukleära receptor-

superfamiljen (NR-superfamiljen) och reglerar gentranskription genom att binda DNA-reglerande sekvenser samt genom interaktion med coaktivatorer/repressorer för att reglera effekten av RNA-polymeras komplex (Mulac-Jericevic och Conneely 2004).

Det finns två typer av progesteronreceptorer; PR-A och PR-B, som man upptäckt hos flera ryggradsdjur. Normal juvervävnad från hund uttrycker framför allt PR-A, men även lägre halter av PR-B. PR-A finns framför allt i cellkärnan medan PR-B uttrycks både i cytoplasma och cellkärna (Gracanin et al. 2012). På humansidan har man funnit att dessa uppkommer genom transkription av två olika promotorer som verkar på samma gen (Kastner et al. 1990). PR-A innehåller en DNA-bindande domän, en ligandbindande domän, två transkriptionsaktiverande motiv, C-terminalen med den ligandberoende aktiveringsfunktionen (AF-2) och N-terminalens konstitutivt aktiva AF-1 (Skildum et al. 2005). Studier har visat att PR-B fungerar som en stark transkriptionsaktivator i olika PR-beroende promotorer och celltyper där PR-A är inaktiv. PR-B som därmed anses som mer transkriptionellt aktiv innehåller en extra N-terminal (AF-3). Receptorerna verkar genom flera olika mekanismer. Till exempel genom att påverka transkriptionsaktivitet genom att verka som ligandaktiverade transkriptionsfaktorer. När progesteron binder receptorn sker en konformationsförändring som leder till dimerisering av ligandbundna receptorer, fosforylering och nukleär translokation av receptorn som binder progestin responsiva element (PRE) i promotorregionen för målgener. Efter detta interagerar receptorn med transkriptionsfaktorer och coaktivatorer som leder till uppreglering av vissa gener. Receptortyperna kan även bilda dimerer med varandra och binda DNA (Mulac-Jericevic och Conneely 2004, Skildum et al. 2005).

Receptorerna kan även verka på andra sätt. PR behöver inte promotorer med PRE för att aktivera gener. En ligandbunden receptor kan interagera med transkriptionsfaktorer och coaktivatorer om promotorn innehåller transkriptionsfaktorn SP-1 (Owen et al. 1998). SP-1 är viktig i reglering av cellproliferation. Bamberger et al. (1996) fann att i närvaro av obunden PR kunde ”activating protein 1” (AP-1) aktivitet stimuleras och att denna stimulering motverkades vid närvaro av PR-ligand. PR kan även medverka i cytoplasmiska kinaskaskader och kan aktiveras genom interaktion med intracellulär kinasaktivitet även utan att ligand är närvarande samt kan aktivera gener genom MAPK-beroende signalvägar (Mulac-Jericevic och Conneely 2004).

Receptormedierad effekt

Olika vävnader har olika sammansättning av isoformerna (PR-A och -B) beroende på bl a utvecklingsstadium och hormonpåverkan (Mulac-Jericevic och Conneely 2004). Receptorerna uppvisar även olika biologiska funktioner, vilket beror på att de påverkar olika målgener (Mulac-Jericevic et al. 2003). Genom att studera möss där man släckt ut en eller båda isoformerna kan receptorernas fysiologiska funktion undersökas. Möss som saknar uttryck av PR-A uppvisar normal juverfunktion samtidigt med livmoderhyperplasi och onormal ovulation. PR-B påverkade juverutvecklingen under dräktighet, medan ovarier och uterus var opåverkade (Mulac-Jericevic et al. 2003). Vid utsläckning av båda receptorformerna visade mössen ett hämmat sexuellt beteende, anovulation, livmoderdysfunktion, hämmad

dräktighetsassocierad juverutveckling samt en onormal gonadotropinreglering (Lydon et al. 1995, Chappell et al. 1999, Tibbetts et al. 1999).

In vitro studier har funnit att PR-A kan undertrycka transkriptionell effekt av PR-B och andra nukleära receptorer (såsom ER) när de uttrycks i samma cell. De båda isoformerna reagerar även olika på progesteronantagonister. Medan antagonistbunden PR-A är inaktiv så kan antagonistbunden PR-B omvandlas till en stark transkriptionsfaktor (Mulac-Jericevic och Conneely 2004).

Övriga signalvägar för progesteron

Progesteron stimulerar till cellsvar utan att använda PR-medierad transkription som beskrivits ovan. Denna effekt kan uppnås dels genom PR-medierad aktivering av fosforyleringskaskader via Src/Ras/MAPkinas vägen. Progesteron kan även interagera med membranbundna receptorer för progesteron (mPR) som binder progesteron och samuttrycks i flera vävnader, däribland juvret. Membranreceptorerna finns i flera olika former, mPR α , mPR β , mPR γ (Kelder et al. 2010). På senare tid har fler progesteronbindande protein upptäckts som är besläktade med mPR och kallas mPR δ och mPR ϵ . De tillhör ”Progesteron och AdipoQ Receptor”-familjen (PAQR) men till skillnad från resterande medlemmar i denna familj binder mPR små steroidmolekyler vilket ger G-protein aktivering. Den steroidbindande förmågan skiljer sig mellan nPR och mPR, t ex har mifepristone (se nedan) ingen affinitet till mPR α och den syntetiska progestinen R5020 har låg eller ingen affinitet (Kelder et al. 2010).

Mifepristone

Mifepristone (RU486) är en typ II antagonist, det är inte en ren antagonist utan kan antingen aktivera eller undertrycka gentranskription beroende på aktuell celltyp och närvarande promotorer. När man i ett försök på kanin jämfört olika PR-ligander och rangordnat dem efter maximal PR-agonistisk aktivitet hade progesteron större effekt än mifepristone (Elger et al. 2000). När man testade förmågan att hämma effekterna av exogent progesteron var sambandet omvänt och mifepristone kunde hämma i dosberoende samband. Mifepristone binder även glukokortikoidreceptorn och har visat sig hämma COX-1 och -2 i endometriet hos kvinnor under implantation (Marions och Danielsson 1999). Beck et al. (1993) fann att mifepristone ändrade uttryck från att vara en ren antagonist till en agonist vid stimulering med cykliskt adenosin monofosfat (cAMP).

Fenolrött

Fenolrött är en pH-indikator som används i cellodlingsmedium. Studier har visat att fenolrött eventuellt kan mediera östrogenliknande effekt vid cellodling, huruvida detta är sant råder det oenighet kring (Moreno-Cuevas och Sirbasku 2000). Moreno-Cuevas och Sirbasku (2000) visade att östrogenliknande effekt inte kunde orsakas av fenolrött vid den halt som är tillgänglig i cellodlingsmedium.

Studiens syfte

Syftet med detta examensarbete var att studera progesteronreceptorer i juvertumörer från hund. Först utfördes en studie med immunohistokemi för att ta reda på vilka tumörer som har progesteroreceptorer samt i vilken utsträckning. Cellviabilitet undersöktes hos odlade

tumörceller (CMT-U27) efter inkubation i olika cellodlingsmedium eller efter exponering med PR-ligander (progesteron och/eller mifepristone). PR-uttrycket i tumörcellerna utvärderades med hjälp av ELISA efter exponeringen med ligander till progesteronreceptorn och även progesteroninnehållet i cellysat samt cellodlingsmedium undersöktes.

MATERIAL OCH METODER

Delstudie 1 - Immunohistokemi

Immunohistokemi användes för att undersöka vilka tumörer som har progesteronreceptorer (PR). Formalinfixerade, paraffinbäddade primära tumörer valdes ut för immunohistokemin (Tabell 1) och som kontroll användes carcinomcellinjen CMT-U27, passage 155. Försöket upprepades ytterligare en gång varvid normal juvervävnad (253 II) och cellinjen CMT-U27, passage 103 användes som kontroller. Immunohistokemin utfördes genom ABC-metoden (Avidin, biotin, peroxidas-metoden). Snitten avparaffinerades och rehydrerades innan de värmebehandlades i högtryckskokare (Decloaking chamber, Biocare Medical) med retrieval (Vektor 1:100). Därefter inkuberades snitten med avidin respektive biotin i 15 min vardera. Normalt hästserum (NHS) användes för att blockera ospecifik bindning under 60 minuters inkubation. Snitten inkuberades över natt med primärantikropp vid +4 C. Primärantikroppen som användes (Immunotech, klon PR10A9, 1:800) var en monoklonal musantikropp mot PR. De negativa kontrollerna inkuberades istället med IgG2a (1:32). Koncentrationen för IgG2a motsvarade samma koncentration som PR-antikroppen. Därpå följde inkubation med den biotinylade sekundärantikroppen (1:200) i 30 minuter och sedan ABC-Elite (Vector laboratories) i 45 minuter. Snitten färgades med 3,3-diaminobenzidin (DAB) under mikroskopkontroll och motfärgades sedan med Mayers hematoxylin, dehydrerades och monterades. Mellan varje steg efter högtryckskokningen (förutom efter steget med NHS), sköljdes vävnaden noggrant med Tris-HCl buffert (0,05 M, pH 7,6). All inkubation skedde i fukt-kammare vid rumstemperatur om inget annat specificerats.

Tabell 1: Paraffinsnitt utvalda till immunohistokemin

Tumörsnitt	Kontroll
Tubulopapillärt carcinom	Normaljuver 253 II
Comedocarcinom	CMT-U27, passage 103, 155
Lobulärt carcinom	
Sarkom	
Chondrosarkom	

Utvärdering av resultat gjordes genom att fastställa det procentuella antalet positivt infärgade celler i vävnaden. En cell vars kärna infärgats bedömdes som positiv. Det procentuella antalet infärgade cellkärnor noterades. Infärgningsintensiteten bedömdes och graderades enligt en fyrgradig skala (0 till +++), där noll innebar ingen infärgning och tre stark infärgning. I de fall som vävnaden var heterogent infärgad valdes representativa områden ut. Bedömningarna gjordes genom okulär besiktning av >300 celler i representativa fält vid en förstoring på 40x med hjälp av mikroskopering (Nikon Microphoto-FXA, Bergströms instrument AB, Stockholm, Sverige). För CMT-U27 var det dock inte möjligt att räkna >300 celler eftersom det inte fanns så många celler, antal celler som räknades var drygt 200.

Delstudie 2 och 3 - Cellviabilitetsstudie

Cellinjen

Cellinjen som användes under försöken nedan var CMT-U27, etablerad från ett juvercarcinom (Hellmen 1992). Cellerna odlades i cellodlingsflaskor med RPMI-1640 medium med fenolrött som berikats med 10 % fetalt bovint serum (FBS), (Sigma), L-glutamin (200 mM, 1:100, SVA, Sverige), penicillin (6 mg/ml, 1:50, SVA) samt streptomycinsulfat (5 mg/ml, 1:50, SVA). Cellerna odlades i inkubator (Memmert, Schwabach, Tyskland) med 5 % CO₂ vid 37 °C.

Delstudie 2 - Cellers viabilitet i olika cellodlingsmedium i närvaro, respektive frånvaro av progesteron

För utvärdering av cellers tillväxt i olika cellodlingsmedium i närvaro, respektive frånvaro av progesteron användes cellinjen CMT-U27, passage 146. Cellerna odlades under odlingsbetingelserna nämnda ovan fram till studien började. Analysen utfördes med hjälp av Colorimetric Cell Viability Kit I (CCVK-1/WST-8) (PromoKine, Tyskland). CCVK-I lösningen innehåller WST-8 som genom interaktion med dehydrogenaser i viabla celler bildar ett färgkomplex. Infärgningsintensiteten är proportionerlig mot antalet viabla celler och kan fastställas genom att mäta absorbansen vid 450 nm.

BL	ST2	ST5	BL	ST2	ST5	BL	ST2	ST5	BL	ST2	ST5
BL	ST3	ST5	BL	ST3	ST5	BL	ST3	ST5	BL	ST3	ST5
BL	ST3	ST6	BL	ST3	ST6	BL	ST3	ST6	BL	ST3	ST6
ST1	ST3	ST6	ST1	ST3	ST6	ST1	ST3	ST6	ST1	ST3	ST6
ST1	ST4	ST6	ST1	ST4	ST6	ST1	ST4	ST6	ST1	ST4	ST6
ST1	ST4	P+	ST1	ST4	P+	ST1	ST4	P+	ST1	ST4	P+
ST2	ST4	P+	ST2	ST4	P+	ST2	ST4	P+	ST2	ST4	P+
ST2	ST5	P+	ST2	ST5	P+	ST2	ST5	P+	ST2	ST5	P+

Figur 2. Cellproliferationsstudiens layout för 96-hålsplattan. Varje ruta motsvarar en brunn i 96-hålsplattan. Cellerna i de röda brunnarna inkuberades utan tillsats av fetalt bovint serum (S) eller fenolrött (F). De blå inkuberades utan fetalt bovint serum, men med fenolrött, de gröna med fetalt bovint serum, men utan fenolrött medan de svarta inkuberades med både fetalt bovint serum och fenolrött. Brunnarna markerade som BLANK (BL) hade ingen tillsats av celler utan endast cellodlingsmedium och CCVK-1. Tre replikat sattes till av varje cellkoncentration vilket markeras med samma slutsiffra (ex ST1). Totalt överfördes sex cellkoncentrationer i spannet 19 000 celler/ml (ST1) upp till 116 000 celler/ml (ST6) till plattan för varje cellodlingsmedium. Cellerna som inkuberades med progesteron (P+) hade enbart en cellkoncentration som motsvarade 38 600 celler/ml.

För att utvärdera hur tillsats av FBS (S) respektive fenolrött (F) påverkade cellproliferationen gjordes ett experiment. De cellodlingsmedium som användes var RPMI-1640 med/utan fenolrött (5 mg/l) samt med/utan 10 % FBS. Cellodlingsmediernas effekt undersöktes för sex olika cellkoncentrationer (19 000, 38 600, 58 000, 77 000, 96 000 resp. 116 000 celler/ml). Cellkoncentrationerna sattes i triplikat till en 96-håls platta (Figur 2) och för var och en av de fyra grupperna sattes även en BLANK utan celler, samt ett extra triplikat med cellkoncentrationen 38 600 celler/ml. De sistnämnda tre brunnarna var avsedda för progesterontillsats. Efter 24 timmars inkubation vid 37 °C, sköljdes alla brunnar tre gånger med fosfatbuffert (pH 7,4) och cellodlingsmediet byttes till ett av de olika testmedierna och

progesteron (P+, 10⁻⁶M) tillsattes till de för ändamålet avsedda brunnarna. Cellerna inkuberades ytterligare 24 timmar vid 37 °C. Efter två timmars inkubation med CCVK-1 avlästes absorbansen vid 450 nm (Infinite M1000, Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz).

Delstudie 3 - Progesteron och mifepristones (RU486) effekt på cellviabilitet

Syftet med denna studie var att undersöka hur cellviabiliteten påverkades av en berikning av cellodlingsmediet med en eller båda PR-liganderna; progesteron (10⁻⁶M) och mifepristone (10⁻⁶M). För delstudie 3 användes cellinjen CMT-U27, passage 146 respektive 147. Cellerna odlades under odlingsbetingelserna nämnda för cellinjen ovan fram till studien började. Analysen utfördes med hjälp av Colorimetric Cell Viability Kit (CCVK-1/WST-8), (PromoKine, Heidelberg, Tyskland).

Fyra serier av celler med sex olika cellkoncentrationer (15 000, 30 000, 45 000, 60 000, 75 000 och 90 000 celler/ml) utvärderades (delstudie 3a). Cellerna överfördes till en 96-håls platta enligt layouten i Figur 3. Brunnarna som var avsedda för etanolinkubation innehöll cellkoncentrationen 30 000 celler/ml. Alla cellkoncentrationer sattes i triplikat och för varje testsubstans sattes även en BLANK utan celler. Efter 24 timmars inkubation vid 37 °C sköljdes brunnarna tre gånger i fosfatbuffert innan cellodlingsmediet byttes till RPMI-1640 utan fenolrött. Cellerna inkuberades 24 timmar i det nya cellodlingsmediet innan mediet byttes till cellodlingsmedium berikat med testsubstansen/-erna. För grupperna med progesteron och/eller mifepristone sattes substansen till med halten 10⁻⁶M. Dessa substanser var spädda i etanol, med en slutkoncentration på 0,01 %. Till brunnarna avsedda för etanol sattes en koncentration på 0,0001 %. Cellerna inkuberades under 24 timmar. CCVK-1 adderades och absorbansen avlästes vid 450 nm (Infinite M1000, Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz) efter två timmars inkubation vid 37 °C.

BL	ST2	ST5	ST1	ST3	ST6	ST2	ST4	BL	ST3	ST5	ST2
BL	ST3	ST5	ST1	ST4	ST6	ST2	ST5	BL	ST3	ST6	ST2
BL	ST3	ST6	ST1	ST4	BL	ST2	ST5	ST1	ST3	ST6	
ST1	ST3	ST6	ST2	ST4	BL	ST3	ST5	ST1	ST4	ST6	
ST1	ST4	ST6	ST2	ST5	BL	ST3	ST6	ST1	ST4	BL	
ST1	ST4	BL	ST2	ST5	ST1	ST3	ST6	ST2	ST4	BL	
ST2	ST4	BL	ST3	ST5	ST1	ST4	ST6	ST2	ST5	BL	
ST2	ST5	BL	ST3	ST6	ST1	ST4	BL	ST2	ST5	ST2	

Figur 3: Layout för cellproliferationsstudien med ligander för progesteronreceptorn. Varje ruta motsvarar en brunn i plattan. Cellerna inkuberades i RPMI-1640 utan fenolrött och utan fetalt bovint serum (FBS). Cellerna i de rödmarkerade brunnarna inkuberades utan tillsats av någon testsubstans, de blå med både progesteron och mifepristone (RU486), de gröna med progesteron, de svarta med mifepristone medan de orangemarkerade brunnarna inkuberades med endast etanol. Progesteron och mifepristone tillsattes i halten 10⁻⁶M. Brunnarna markerade som BLANK (BL) hade ingen tillsats av celler utan endast cellodlingsmedium med/utan progesteronreceptorligand och CCVK-1 enligt beskrivningen för respektive behandling (färg). Tre replikat sattes till av varje cellkoncentration vilket markeras med samma slutsiffra (ex ST1). Totalt sattes sex cellkoncentrationer för varje medium i spannet 15 000 celler/ml (ST1) upp till 90 000 celler/ml (ST6) till plattan för varje grupp.

Ytterligare en platta sattes och hanterades på samma sätt (delstudie 3b), förutom att denna innehöll 25 000–152 000 celler/ml (25 000, 50 000, 76 000, 101 000, 127 000 och 152 000

celler/ml) och inkuberades 48 timmar med testsubstanserna. Vid delstudie 3b innehöll etanolbrunnarna cellkoncentrationen 50 000 celler/ml.

Delstudie 4 - Analys av progesteronkoncentration i celllysats och cellodlingsmedium

För att undersöka cellernas förmåga att producera progesteron användes Canine Progesterone ELISA kit (Cusabio, Wuhan Huamei Biotech Co. Ltd., Wuhan, Kina) som har ett detektionsområde på 0,125-50 ng/ml. Kitet användes även för att kontrollera hur mycket progesteron som fanns i cellodlingsmediet som använts i delstudie 2, d v s cellodlingsmedium med respektive utan FBS och utan fenolrött, (S+F- samt S-F-).

Cellerna odlades under odlingsbetingelserna nämnda under rubriken "Cellinjen" (se ovan) fram till studien började. 13 dagar innan försöket startade passerades cellerna till 34 stycken petriskålar (100 mm²), (passage 148). De odlades fyra dagar i komplett cellodlingsmedium och därefter byttes cellodlingsmediumet till RPMI utan fenolrött. Efter ytterligare tre dagar sköljdes skålarna tre gånger i fosfatbuffert och cellerna odlades vidare i RPMI utan fenolrött och utan FBS. Detta cellodlingsmedium ersattes av färskt likadant medium efter ytterligare tre dagar. Efter tre dagar byttes cellodlingsmedium igen och nu med respektive utan (d v s kontroll) tillsats av mifepristone, 10⁻⁶M. Efter 48 timmar sköljdes cellerna med iskall fosfatbuffert, skrapades, frystes och tinades enligt instruktionsmanualen. Efter två "frys-tina"-cykler med syfte att bryta upp cellernas membran centrifugerades cellerna i fem minuter vid 4332 G, 2-8°C. Celllysats samlades upp och analyserades. Konditionerat cellodlingsmedium d v s cellodlingsmedium som tumörcellerna (CMT-U27) inkuberats i under 48 timmar (med/utan mifepristone, 10⁻⁶M) användes också i försöket. Även oanvänt cellodlingsmedium motsvarande det cellodlingsmedium (S-F-) som använts under delstudie 2 analyserades för att kontrollera progesteroninnehåll. Celllysats innehöll motsvarande 100 000 000 celler/ml. Provet och standard sattes till en 96-håls platta. HRP-konjugat och antikropp tillsattes. Plattan inkuberades en timme vid 37 °C. Brunnarna tvättades därefter tre gånger (Wellwash 4MK2, Thermo Scientific) med tvättlösning. Substrat A och B adderades och plattan inkuberades 15 minuter vid 37 °C. Stopplösning adderades och absorbansen avlästes vid 450 nm (Infinite M1000, Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz). Samtliga reagens och prov var rumstempererade vid användning.

Delstudie 5 – Analys av progesteronreceptoruttryck i celllysats

Syftet med delstudie 5 var att undersöka cellernas uttryck av progesteronreceptorer (PR) efter behandling med progesteron och/eller mifepristone (RU486), 10⁻⁶M, varvid Dog Progesterone ELISA Kit (Cusabio, Wuhan Huamei Biotech Co. Ltd., Wuhan, Kina) användes som har en detektionsnivå på 15,6-4000 pg/ml.

Cellerna odlades under odlingsbetingelserna nämnda för cellinjen (se ovan under rubriken "Cellinjen") fram till studien började. 13 dagar innan testsubstanserna progesteron och/eller mifepristone, 10⁻⁶M tillsattes passerades cellerna till petriskålar (se ovan). Cellerna behandlades under 48 timmar innan de sköljdes med iskall PBSx1, skrapades, frystes och tinades enligt tillverkarens instruktion. Efter två "frys-tina" cykler centrifugerades proven i 5000 G under fem minuter vid 2-8 °C. Celllysats som innehöll motsvarande 100 000 000

celler/ml samlades upp och användes i försöket som utfördes enligt instruktionsmanualen, vilket innebar att prov och standard överfördes till en 96-håls platta och inkuberades två timmar. Efter inkubationen tömdes plattan på vätska varpå biotinantikropp tillsattes och plattan inkuberades på nytt en timme. Brunnarna tvättades tre gånger med tvättbuffert (Wellwash 4MK2, Thermo Scientific). HRP-avidin adderades och plattan inkuberades en timme, därefter tvättades brunnarna fem gånger. TMB-substrat adderades och inkuberades 15 minuter varpå stopplösning adderades och absorbansen avlästes vid 450 nm (Infinite M1000, Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz). All inkubation skedde vid 37 °C och samtliga reagenter och prov var rumstempererade vid användning.

Statistisk analys

Den statistiska analysen utfördes med hjälp av statistikprogrammet ANOVA (SAS, 1997) och baserades på enskilda absorbansvärden vid olika cellkoncentrationer för grupperna som inkuberats med olika cellodlingsmedium respektive med/utan olika testsubstanser. Tukeys test användes för signifikanstest av grupperna varvid gränsen för statistisk signifikans sattes vid 5 % nivån ($p < 0,05$). Modeller som användes redovisas här nedan:

Modell 1: Summan av alla de enskilda cellkoncentrationernas absorbans för respektive grupp (cellodlingsmedium alternativt testsubstans) jämfördes.

Modell 2: De enskilda absorbansvärdena vid olika cellkoncentrationer jämfördes för respektive cellkoncentration och grupp.

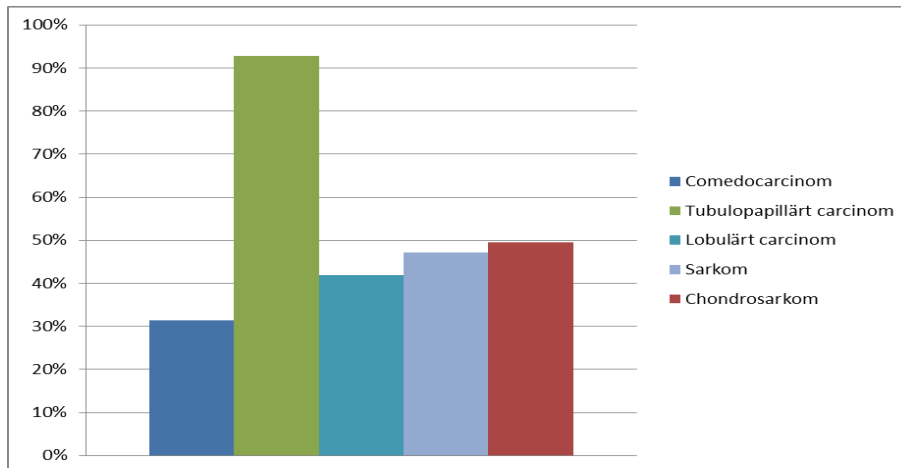
Vid analysen av resultaten från delstudie 4 och 5 användes progesteronkoncentrationerna (ng/ml) respektive PR-koncentrationerna (pg/ml) istället för absorbansvärden.

RESULTAT

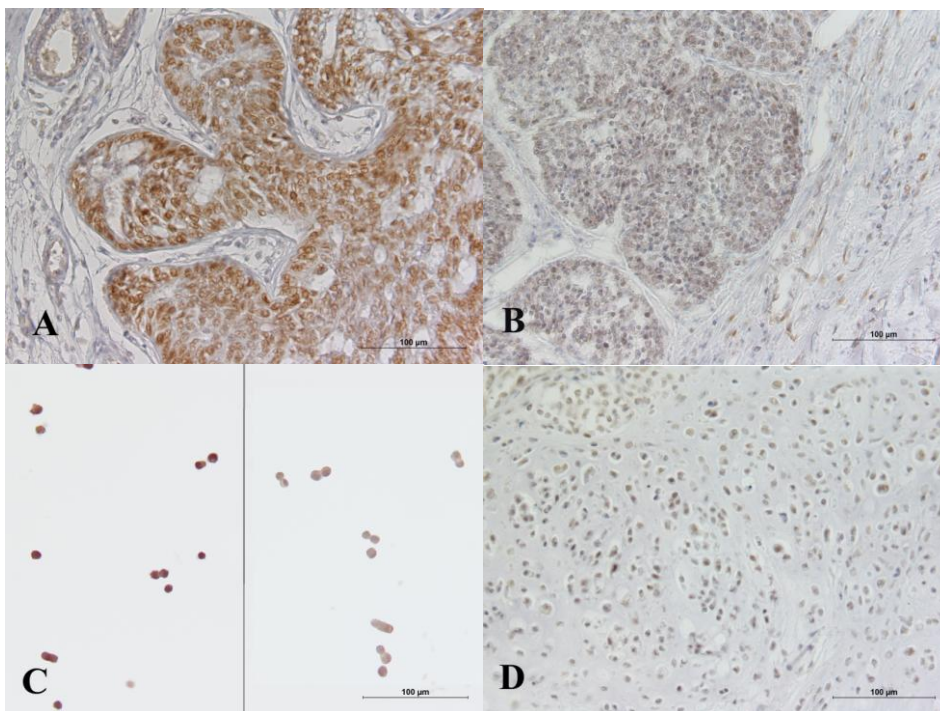
Delstudie 1 - Immunohistokemi

Resultaten från immunohistokemin redovisas i Figur 4 och 5. Syftet med denna delstudie var att undersöka vilken cellinje som skulle användas i de fortsatta experimenten. Den monoklonala musantikroppen (PR10A9, Immunotech) färgade in kärnorna i epiteliala celler i utförsgångar samt alveoler hos den positiva kontrollen, 253II. Alla tumörer färgades in för progesteronreceptorn, men i olika grad (Figur 5). Det tubulopapillära carcinomet (>90% infärgade kärnor) hade starkast infärgningsintensitet (++ till +++). För de övriga tumörerna varierade infärgningsintensiteten (0 till +) och karakteriserades av områden med positiva kärnor samt områden utan infärgning, dvs med helt ofärgade celler.

Utifrån resultatet från immunohistokemin valdes cellinjen CMT-U27 ut som cellinje i fortsatta försök. Det är ett juvercarcinom som även använts som kontroll under immunohistokemin (passage 103). Cellerna var konsekventa i sitt uppträdande och hade en stark infärgningsintensitet (100 % infärgade celler med ++ till +++) för progesteronreceptorn.



Figur 4: Infärgning av progesteronreceptorer (PR) med immunohistokemi. Som positivt infärgad cell räknades en cell vars cellkärna färgats in med DAB för PR. Det procentuella antalet infärgade kärnor redovisas för olika tumörer. Resultatet som visas är medelvärden från två testomgångar. Ingen hänsyn har här tagits till infärgningsintensiteten, som dock visade sig vara kraftigast för det tubulopapillära carcinomet (++ till +++) medan övriga tumörer hade svagare intensitet (0 till +) (se Figur 5).



Figur 5: Infärgning av progesteronreceptorer med DAB som färgar in positiva celler brunt. A: Tubulopapillärt carcinom. B: Comedocarcinom. C: Cellinjen CMT-U27, till vänster positivt infärgade celler och till höger negativ kontroll D: Chondrosarkom.

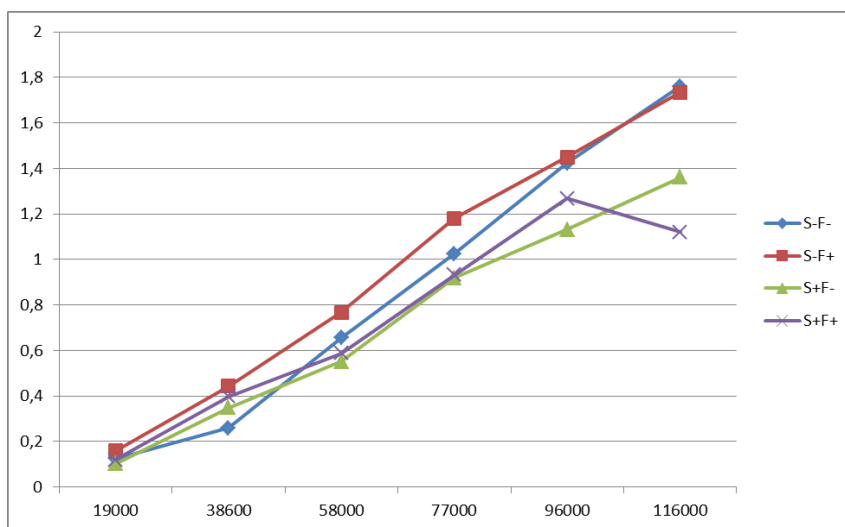
Delstudie 2 och 3 - Cellviabilitetsstudie

Delstudie 2 - Cellers tillväxt i olika cellodlingsmedium i närvaro, respektive frånvaro av progesteron.

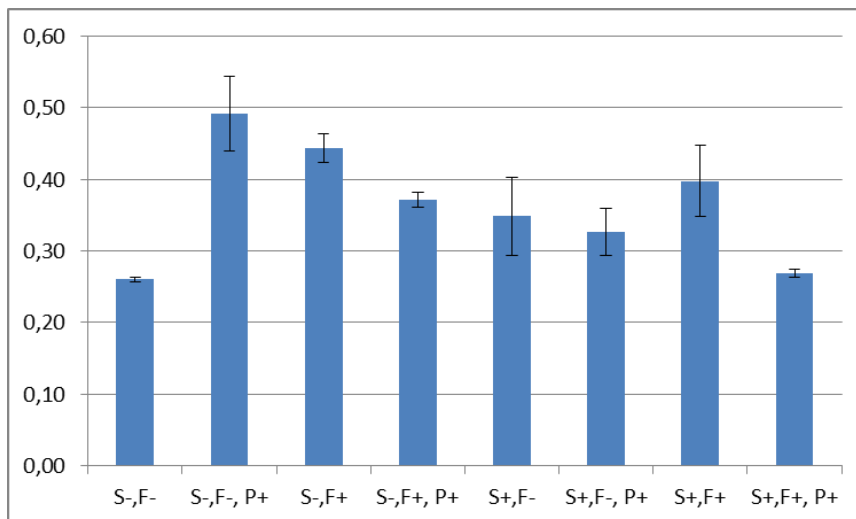
Resultatet från denna studie redovisas i Figur 6 och 7. Syftet med experimentet var att undersöka hur olika cellodlingsmedier påverkar cellproliferationen. Testsubstanserna som användes var cellodlingsmedium med/utan fenolrött samt med/utan 10 % FBS. Absorbansen

som redovisas är proportionerlig mot antalet viabla celler. Av Figur 6 framgår att absorbansen för de olika cellodlingsmedierna inte är konsekvent över de olika cellkoncentrationerna vilket även kom i uttryck av en stark signifikans för samspelseffekten ($p < 0,0001$) mellan cellodlingsmedium och cellkoncentration enligt modell 1. Även om det endast var signifikanta skillnader för cellkoncentrationen 116 000 celler/ml ($p = 0,0014$) fanns en generell tendens att celler som inkuberats utan FBS (S-F- och S-F+) hade en högre absorbans och därmed högre antal viabla celler än de som inkuberats med FBS (S+F- och S+F+). Vid 38 600 celler/ml fanns det en statistisk skillnad ($p = 0,048$) mellan cellerna som inkuberats i FBS-fritt cellodlingsmedium med/utan fenolrött (S-F-, S-F+). Även vid 96 000 celler/ml upptäcktes en signifikant skillnad ($p = 0,023$) mellan de celler som inkuberades i serumfritt medium och de som inkuberades med serum men utan fenolrött (S+F-), vid övriga cellkoncentrationer upptäcktes inga signifikanta skillnader. Det skall också noteras att celler som inkuberats i cellodlingsmedium med FBS och fenolrött (S+F+) viker av och planar ut vid den högsta cellkoncentrationen (Figur 6).

Vid jämförelse (Figur 7) av absorbansen för grupperna som inkuberats med progesteron (P+) respektive utan (P-) vid cellkoncentrationen 38 600 celler/ml erhöles enbart signifikanta skillnader för celler som odlats utan FBS och fenolrött (S-F-) ($p = 0,012$) respektive för de som odlats utan FBS, men med fenolrött (S-F+) ($p = 0,035$). I det serumfria cellodlingsmediet (S-) hade progesteronet en stimulerande effekt, medan förhållandet var det motsatta om fenolrött (F+) ingick i cellodlingsmediet.



Figur 6: Medelvärden av absorbansen (y-axeln, nm) efter 24 timmars inkubation, för cellodlingsmedium med respektive utan 10 % fetalt bovint serum (S+, S-) och 5 mg/L fenolrött (F+, F-) vid sex olika cellkoncentrationer (x-axel, celler/ml).

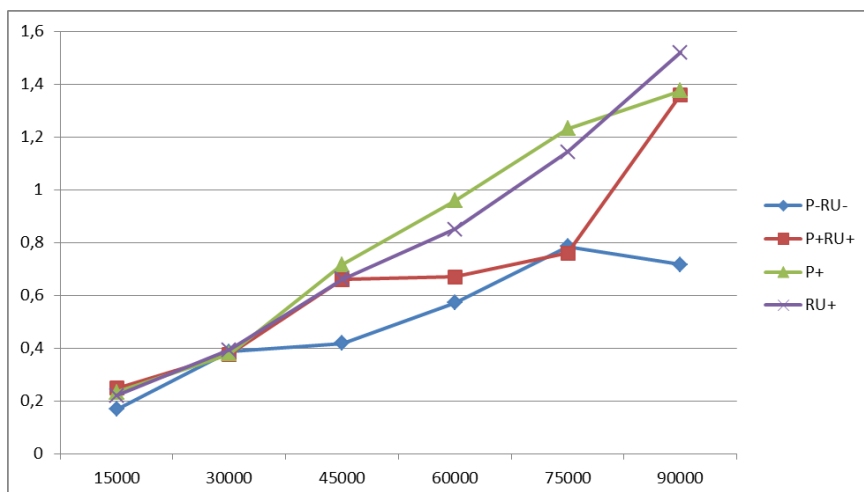


Figur 7: Medelvärden av absorbansen (y-axeln, nm) efter 24 timmars inkubation i cellodlingsmedium med respektive utan progesteron, $10^{-6}M$ (P+, P-), fetalt bovint serum (S+, S-) respektive fenolrött (F+, F-) vid cellkoncentrationen 38 600 celler/ml. Standardavvikelse anges för varje stapel.

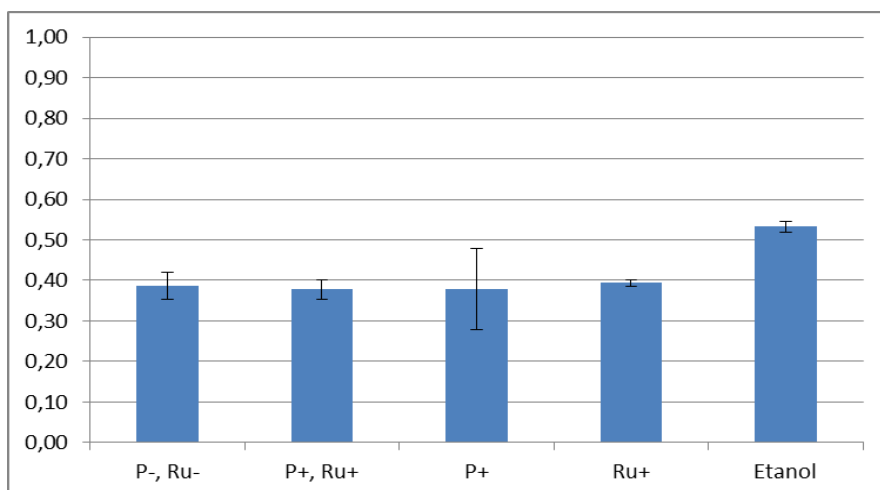
Delstudie 3 - Progesteron och mifepristones (RU 486) påverkan på cellproliferation

Syftet var att undersöka hur cellproliferationen påverkades då cellerna behandlades med ligander till progesteronreceptorn vid olika cellkoncentrationer. Resultatet redovisas i Figur 8-12.

Samspelseffekten mellan testsubstans och cellkoncentration var starkt signifikanta ($p < 0,0001$) både efter 24 och 48 timmars inkubation vilket också framgår av Figur 8 och 10 som visar att absorbansen för testsubstanserna inte var konsekvent över cellkoncentrationerna. I delstudie 3a (Figur 8) med 24 timmars inkubation hade kontrollen (P-, RU-) i princip genomgående lägst absorbans, vilket också var statistiskt signifikant för cellkoncentrationer över 30 000 celler/ml. Vid cellkoncentrationen 45 000 celler/ml hade kontrollen (P-RU-) signifikant lägre absorbans än övriga grupper ($p = 0,0094$), vid 90 000 celler/ml ($p = 0,0014$). Generellt hade celler som inkuberades med endast progesteron (P+) samt de som inkuberades med endast mifepristone (RU+) högst absorbans medan de som inkuberades med både progesteron och mifepristone (P+RU+) varierade över de olika cellkoncentrationerna. Vid 60 000 celler/ml ($p = 0,0046$) hade progesterongruppen (P+) signifikant högre absorbans jämfört med kontrollen och de celler som inkuberades med båda testsubstanserna (P+RU+). Grupperna som inkuberades med mifepristone (RU+ och P+RU+) skilde sig signifikant från övriga grupper och kontrollen hade återigen lägst absorbans och skilde sig signifikant från övriga. Vid 75 000 celler/ml hade de celler som inkuberades med antingen mifepristone (RU+) eller progesteron (P+) högst absorbans ($p = 0,0008$). Vid cellkoncentrationen 30 000 celler/ml undersöktes hur etanol inverkar på cellproliferationen (Figur 9). Skillnaden mellan testsubstanserna var inte signifikanta men etanolen tenderade ha högst absorbans.

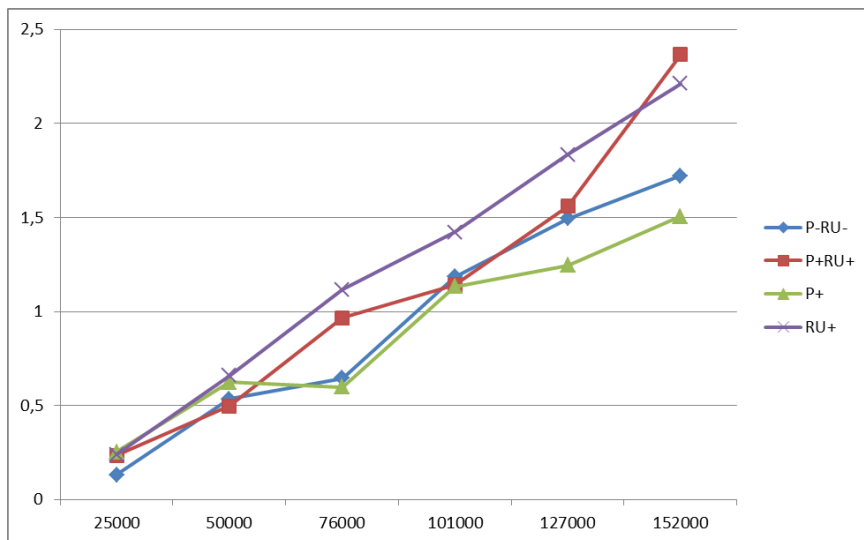


Figur 8: Medelvärden för absorbans (y-axeln, nm) vid olika cellkoncentrationer (x-axeln celler/ml) för olika testsubstanter efter 24 timmars inkubation. Cellerna inkuberades med respektive utan testsubstanserna; progesteron, 10^{-6} M (P+, P-) respektive mifepristone/RU486, 10^{-6} M (RU+, RU-).

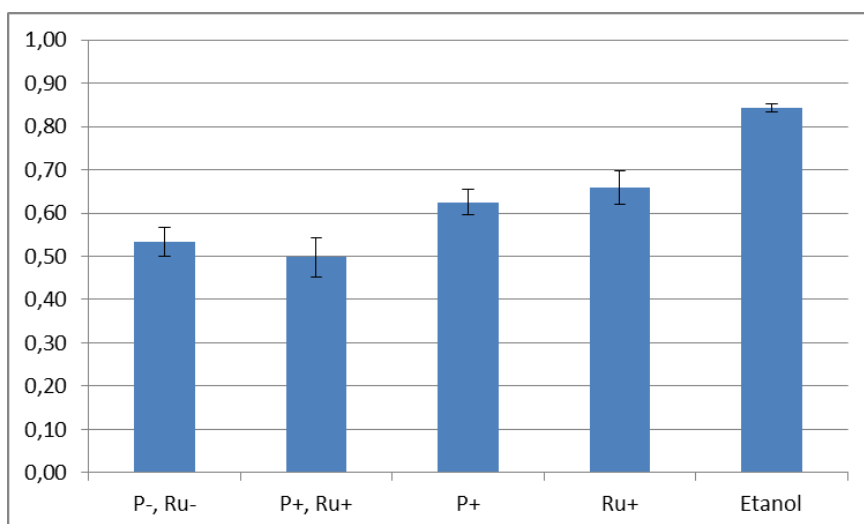


Figur 9: Medelvärden för absorbans (y-axeln, nm) för testsubstanserna progesteron, 10^{-6} M (P+, P-), mifepristone/RU486, 10^{-6} M (RU+, RU-) samt etanol, vid en cellkoncentration på 30 000 celler/ml efter 24 timmars inkubation. Standardavvikelse anges för varje stapel.

I delstudie 3b med 48 timmars inkubationstid och något högre cellkoncentrationer än i delstudie 3a hade brunnarna som inkuberades med mifepristone med/utan progesteron (RU+, P+RU+) generellt högre absorbans ($p < 0,0001$) över samtliga cellkoncentrationer medan den negativa kontrollen (P-RU-) och de som inkuberades med progesteron (P+) hade lägst (Figur 10). Detta visades även vid 76 000 celler/ml ($p < 0,0001$) samt 152 000 celler/ml ($p = 0,0012$) vid analys av enskilda cellkoncentrationer. Vid 127 000 celler/ml hade cellerna som inkuberades med endast mifepristone signifikant högre absorbans än de som inkuberades med endast progesteron ($p = 0,0472$). Vid analys av cellkoncentration med 50 000 celler/ml hade etanol högst absorbans och var signifikant skilt ($p = 0,0002$) från de övriga testsubstanserna (Figur 11). Vid samma cellkoncentration hade även celler som inkuberats med endast mifepristone signifikant högre absorbans ($p = 0,0002$) jämfört med de som inkuberades med båda testsubstanserna (P+RU+).

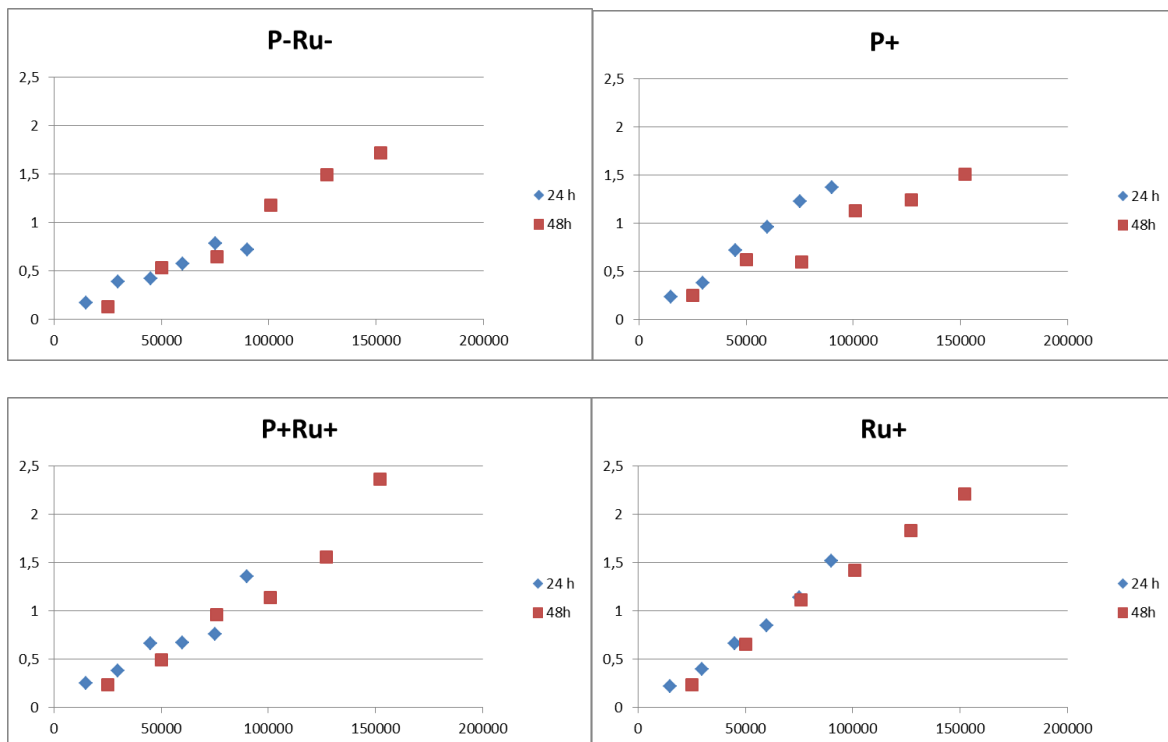


Figur 10: Medelvärden för absorbans (y-axeln, nm) vid olika cellkoncentrationer (x-axeln celler/ml) för olika testsubstanser efter 48 timmars inkubation. Cellerna inkuberades med respektive utan testsubstanserna; progesteron, 10^{-6} M (P+, P-) respektive mifepristone/RU486, 10^{-6} M (RU+, RU-).



Figur 11: Medelvärden för absorbans (y-axeln, nm) för testsubstanserna progesteron, 10^{-6} M (P+, P-), mifepristone/RU486, 10^{-6} M (RU+, RU-) samt etanol, vid en cellkoncentration på 50 000 celler/ml efter 48 timmars inkubation. Standardavvikelse anges för varje stapel.

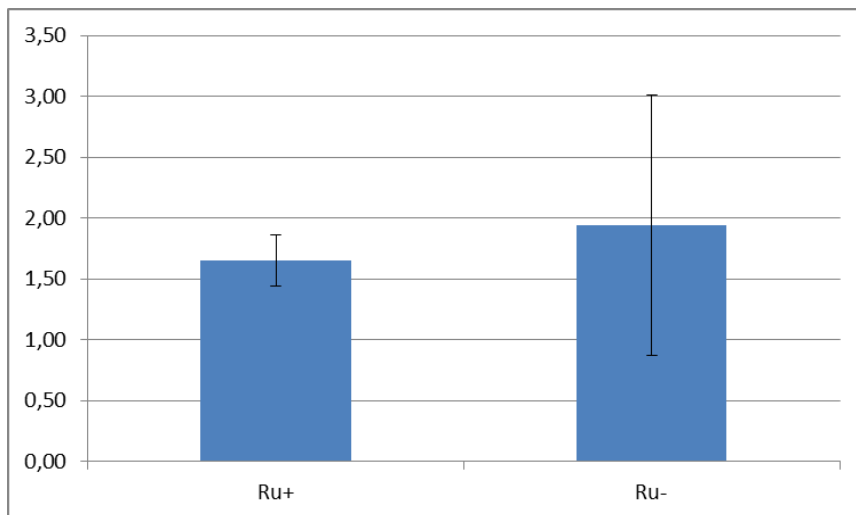
När man jämförde absorbansen efter 24 respektive 48 timmars inkubation uppmärksammades att kurvornas lutning var ungefär desamma för alla testsubstanser utom för de som fått tillgång till endast progesteron (P+) (Figur 12). Cellerna som haft tillgång till progesteron tenderade att ha lägre absorbans efter 48 timmar jämfört med 24 timmar.



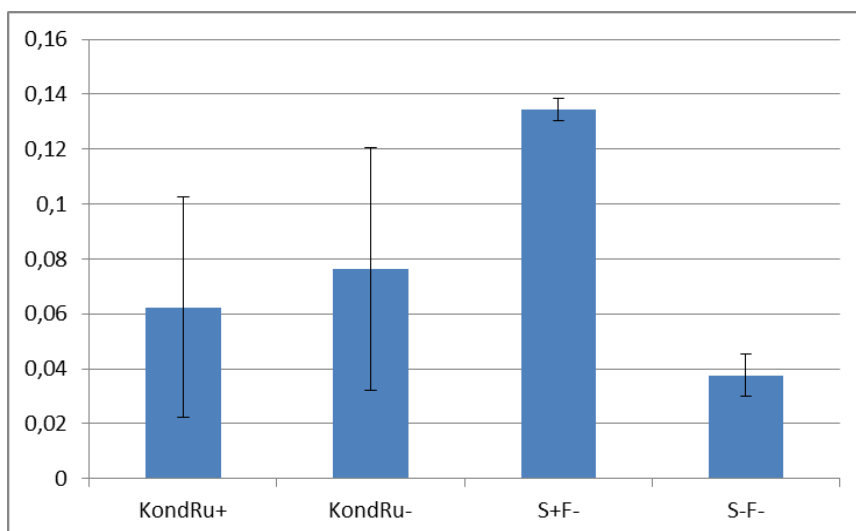
Figur 12: Medelvärden för absorbansen (y-axeln, nm) vid olika cellkoncentrationer (x-axeln, celler/ml) efter 24 respektive 48 timmars inkubation med respektive utan de olika testsubstanserna *d v s* progesteron, 10^{-6} M (P+, P-) samt mifepristone/RU486, 10^{-6} M (RU+, RU-). Observera att cellkoncentrationerna var olika för 24 respektive 48 timmars experimenten.

Delstudie 4 - Analys av progesteronkoncentration i cellysat och cellodlingsmedium

Syftet med delstudien var att ta reda på vilken progesteronkoncentration som fanns i cellodlingsmedierna som använts i tidigare försök, samt att undersöka progesteronhalten i cellodlingsmediet och i cellysat efter att de odlats med respektive utan mifepristone (10^{-6} M) i 48 timmar. Resultatet från delstudien redovisas i Figur 13 och 14. Inga signifikanta skillnader kunde påvisas, men cellysatet innehöll högre halt progesteron (1,7–1,9 ng/ml) än de konditionerade cellodlingsmedierna (0,062-0,076 ng/ml). Visserligen är det stora skillnader mellan medelvärdena i Figur 13, 14, men stor variation mellan enskilda observationer har lett till stora medelfel. Trots stor variation finns tendens till att cellysaten från celler som inkuberades med mifepristone (RU+) hade lägre progesteroninnehåll än de som ej exponerats för mifepristone (RU-) (Figur 13).



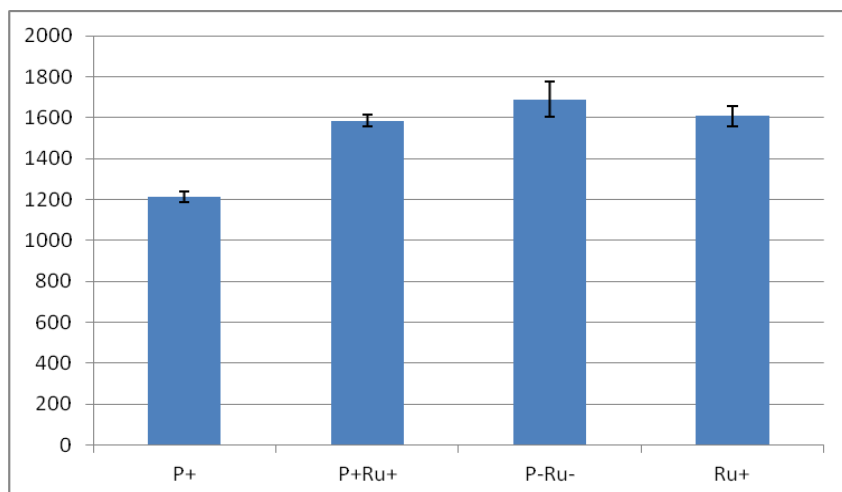
Figur 13: Progesteronmedelvärden (y-axeln, ng/ml) efter 48 timmars inkubation med olika testsubstanser (x-axeln) vid analys av progesteronkoncentration. RU+ = cellysat efter de petriskålar med tillsatt mifepristone/RU486 ($10^{-6}M$), RU- = cellysat från de petriskålar där mifepristone ej tillsats, d v s kontrollen. Standardavvikelse anges för varje stapel.



Figur 14: Progesteronmedelvärden (y-axeln, ng/ml) vid analys av progesteronkoncentration för olika cellodlingsmedium (x-axeln) d v s konditionerat cellodlingsmedium med respektive utan mifepristone/RU486 (RU+, RU-), och oanvänt cellodlingsmedium med respektive utan fetalt bovint serum (S+, S-) samt utan fenolrött (F-). Standardavvikelse anges för varje stapel.

Delstudie 5 - Analys av progesteronreceptoruttryck i cellysat

Syftet med delstudien var att undersöka cellernas PR-uttryck efter 48 timmars inkubation med progesteron och/eller mifepristone, $10^{-6}M$. Resultatet redovisas i Figur 15. Testsubstansen ”P+”, d v s enbart tillsats av progesteron hade signifikant lägre halt av progesteronreceptorer jämfört med övriga substanser ($p=0,0010$). Därutöver förekom inga signifikanta skillnader.



Figur 15: Medelvärden av progesteronreceptorhalt (y-axeln, pg/ml) från delstudie 5 efter inkubation med respektive utan testsubstanserna (x-axeln) dvs progesteron, 10^{-6} M (P+, P-) respektive mifepristone/RU486, 10^{-6} M (RU+, RU-). Standardavvikelse anges för varje stapel.

DISKUSSION

Syftet med arbetet var att studera progesteronreceptorn hos juvertumörer och att ta reda på om och hur cellerna påverkades av stimulering med PR-ligander. Absorbansen som redovisats är proportionerlig mot antalet viabla celler. Proverna som analyserades i delstudie 4 och 5 bestod av celllysat som erhållits efter att ha brutit upp cellmembranen genom frysning för att komma åt intracellulära receptorer.

Cellviabilitet

Delstudie 3 visade att celler som inkuberades med progesteron eller mifepristone under 24 timmar hade högre antal viabla celler än kontrollen och de som fått tillgång till både progesteron och mifepristone. Cellviabiliteten är ett uttryck för cellernas livsduglighet och således indirekt även för antalet livsdugliga celler. Efter 48 timmars inkubation låg grupperna (med ett undantag) kvar på samma nivå och som efter 24 timmars inkubation. Eftersom cellinjen har en fördubblingstid på 48 timmar (Hellmen 1992) hade man kanske förväntat sig att absorbansen skulle ökat efter 48 timmars inkubation på g a att cellerna delat sig. Cellinjen (CMT-U27) är dock inte synkroniserad (personlig kommentar Hellmén) vilket innebär att cellerna kan befinna sig i olika delar av cellcykeln varvid alla celler inte delar sig samtidigt. För att utreda detta vidare hade cellerna således behövt studeras under längre tidsperiod än 48 timmar. En förklaring kan emellertid vara att då man byter från serumnehållande cellodlingsmedium till serumfritt kan cellernas tillväxt avstanna efter en kort tids inkubation (Kielberg et al. 1994).

Den grupp som avvek från det generella mönstret var cellerna som inkuberades med endast progesteron. Deras cellviabilitet hade minskat efter 48 timmars inkubation. Minskad viabilitet kan bero på minskat antal levande och viabla celler och kan förklaras på flera olika sätt när det gäller cellerna som inkuberats med progesteron. Om vi utgår från att orsaken till att de övriga grupperna ligger kvar på samma nivå efter både 24 och 48 timmars inkubation är en effekt av bytet av cellodlingsmedium till serumfritt, så är det mycket intressant att de som

inkuberats med progesteron inte har svarat på samma sätt. Vissa (Kielberg et al. 1994) menar att en serumliknande effekt kan kvarstå under längre period, vilket kan ha påverkat resultatet och i så fall bör de ha minskat skillnaderna mellan grupperna. Cellerna inkuberades i delstudie 3 under 24 timmar i cellodlingsmedium utan FBS innan testsubstanserna tillsattes. Optimalt hade man kunnat låta cellerna anpassa sig till de olika cellodlingsmedierna under en längre period och då möjligen fått ett mer korrekt resultat. Tanken här var dock att det skulle ge en indikation på hur cellerna skulle bete sig i det cellodlingsmedium valdes för utvärdering av mifepristone respektive progesteron under de följande delstudierna, som hade en inkubationstid på maximalt 48 timmar. In vitro har man visat hur progesteron verkar bifasiskt på cellproliferationen (Groshong et al. 1997, Musgrove et al. 1991). Progesteron ger först en acceleration genom en cellcykel och därefter arrest i G1-fasen och det tar sedan 72 timmar innan en ny progesterondos ger tillväxtstimulerande effekt på cellerna (Groshong et al. 1997, Musgrove et al. 1991). Andra möjliga förklaringar till att viabiliteten minskat efter 48 timmar för cellerna som inkuberats med endast progesteron kan vara att själva cellodlingsmediet förbrukats eller att toxiska metaboliter ansamlats. Detta är dock mindre troligt med tanke på att cellerna som inkuberats med mifepristone hade samma absorbans och därmed lika många viabla celler som de progesteronbehandlade cellerna vid 24 timmars inkubation. Cellodlingsmediet bör därför i så fall ha förbrukats för båda grupperna, men sådan indikation saknas. En annan möjlighet är att progesteronet har tagit slut i cellodlingsmediet och därmed inte kan påverka cellerna längre. Resultatet i denna studie pekar dock på att tumörcellerna producerar eget progesteron, vilket gör denna förklaring mindre trolig. I en studie av en cellinje utgående från humana bröstcancer celler hade progesteron en halveringstid på 2-4 timmar då det adderades till cellernas odlingsmedium (Horwitz et al. 1986). Frågan är dock hur låga koncentrationerna kan vara för att receptorererna skall aktiveras. Detta har jag inte lyckats utreda.

Normala celler minskar/slutar proliferera när de närmar sig 100 % konfluens. Om de tumörceller som användes i denna studie betett sig på samma sätt så bör inte förhållandet vara linjärt utan absorbansen skulle då minska och planas ut i en platåfas så som den gör efter 24 timmars inkubation för kontrollen (P-RU-). Intressant nog så visar inte resultaten några tydliga tecken på detta för de övriga grupperna, varken efter 24 eller 48 timmars inkubation och vid inspektion i mikroskop fann man att tumörcellerna växte på varandra då de nått 100 % konfluens.

Etanolets påverkan på cellviabilitet

Cellerna som inkuberades med endast etanol i delstudie 3 hade högst cellviabilitet av alla grupperna vid de två cellkoncentrationer som användes (30 000 respektive 50 000 celler/ml). Det verkar således som att etanol har en stimulerande effekt på cellviabiliteten. Tidigare studier har visat hur etanol stimulerar cellcykelprogression och DNA-syntes hos neuroepiteliala celler (Santillano et al. 2005). Eftersom testsubstanserna (progesteron och mifepristone) späddes i etanol (0,01 %) som var 10 000 gånger starkare än de som endast fick etanol komplicerar detta resultattolkningen. Etanolens stimulerande effekt kan således även haft samma effekt i de brunnar som inkuberats med testsubstanserna. Om så är fallet är det möjligt att alla testsubstanserna hämmade cellviabiliteten istället för att stimulera den och att den hämmande effekten var starkast för progesteron efter 48 timmars inkubation. Hur stor

etanolets effekt var är dock omöjligt att säga eftersom de inkuberades med olika etanolkoncentration. Det går inte heller att utröna hur etanolet kan ha interagerat med testsubstansernas effekt. En studie har dock visat hur etanol kan inducera uttryck av ER α i närvaro av ligandbunden ER α och nedreglera tumörsuppressorn BRCA1 (Fan et al. 2000). CMT-U27 uttrycker inte ER α , men jag har inte hittat någon studie som utesluter liknande effekt som Fan et al. (2000) upptäckte även på andra steroidreceptorer.

Analys av progesteron och progesteronreceptorer i celllysat och cellodlingsmedium

En fråga som ställdes under arbetets gång var om cellerna kunde producera eget progesteron som därmed kunde agera autokrint och parakrint på omgivande tumörceller. Delstudie 4 berörde denna frågeställning och visade att progesteronkoncentrationen var mycket lägre i det konditionerade cellodlingsmediet jämfört med i celllysatet. Med tanke på progesteronets halveringstid (Horwitz et al. 1986) och inkubationstiden i FBS-fritt cellodlingsmedium (d v s nio dagar) kan inte detta progesteron vara en restprodukt från tidigare inkubation i FBS-innehållande cellodlingsmedium. Att halten var mycket högre i celllysatet jämfört med i det konditionerade cellodlingsmediet kan bero på aktivt upptag av progesteron från mediet, men möjligheten finns att cellinjen CMT-U27 kan producera progesteron i FBS-fritt cellodlingsmedium. Delstudien visade även hur det konditionerade cellodlingsmediet hade högre halter av progesteron än det oanvända cellodlingsmediet (S-F-). Nivåerna i cellodlingsmedierna är dock lägre än detektionsnivåerna som anges för metoden, men tillsammans pekar resultaten i delstudien på att cellinjen kan producera progesteron. Om de halter som uppmätts i denna studie är tillräckligt höga för att aktivera progesteronreceptorer kan dock inte besvaras. Det fanns även en tendens till att celllysatet efter cellerna som inkuberades med mifepristone hade lägre progesteronhalt än celllysatet från de celler som inkuberades utan mifepristone. Detta tyder på att mifepristone inhiberat progesteronproduktionen.

Progesteron verkar framför allt via sina nukleära receptorer. Brisken et al. (1998) fann dock att progesteron även kan verka parakrint och att inte alla juverceller behöver uttrycka PR för att utvecklas normalt vid progesteronstimulering. En förklaring kan vara progesteronets effekt på tillväxthormon (GH). Tikar med maligna tumörer har högre halter av GH i serum än friska tikar (Queiroga et al. 2010). Progestinbehandling har visats kunna leda till ökad GH-produktion som härrör från juvret (Selman et al. 1994), vilket kunde hämmas genom behandling med mifepristone (Watson et al. 1987). GH mRNA har hittats i både normal och tumöromvandlad juvervävnad hos hund och är identisk med GH som har sitt ursprung ifrån hypofysen (Mol et al. 1995). Receptorn för GH (GHR) har upptäckts i normal och tumöromvandlad juvervävnad hos hund, men är nedreglerad i fullständigt differentierade alveoler (van Garderen et al. 1999). Det finns således en samlokalisering mellan GH och PR i juverceller. Alla celler som uttrycker GH uttrycker även PR, men inte alla celler som uttrycker PR innehåller GH (Lantinga-van Leeuwen et al. 2000). Carcinom kan dock uttrycka GH och samtidigt ha förlorat sitt PR-uttryck. Det indikerar att tumöromvandling kan leda till förlust av progesteronberoende kontroll (Mol et al. 1995, van Garderen et al. 1997). Det kan även vara av intresse att nämna att tumörer från kastrerade tikar inte uttrycker GH (van Garderen et al. 1997). GH är känt för sin proliferativa effekt. Effekten är dock inte helt

ensidig. Under en studie med tumörcellinjen CMT-U335 visade sig GH inducera minskad cellproliferation, eventuellt för att tillväxthormonet även har förmågan att inducera differentiering av celler (van Garderen et al. 2001).

De celler som hade inkuberats med progesteron hade lägre halter av PR i delstudie 5 än de som inkuberats med mifepristone. Studier har visat att östrogen kan inducera PR- och ER-uttryck, medan progesteron inducerar minskat uttryck av receptorerna på endometrieceller från hund (Galabova-Kovacs et al. 2004). I det normala juvret minskar PR-uttrycket under diöstrus (Manee-in et al. 2009). Att progesteronexponering ledde till minskat PR-uttryck hos cellerna kan dock indikera att CMT-U27 har funktionella progesteronreceptorer eftersom de svarade som förväntat på exponeringen.

Det minskade receptoruttrycket som progesteron gav upphov till i denna studie kunde hämmas genom tillsats av mifepristone. I avsnittet ovan diskuterades hur progesteron får cellerna att stanna i G1-fas efter 48 timmars inkubation och detta verkar kräva funktionella PR (Groshong et al. 1997, Musgrove et al. 1991). Denna studie visar att progesteron kan leda till ett minskat uttryck av PR och även till lägre cellviabilitet än grupper som inkuberades med mifepristone. Det kan vara så att minskat uttryck av PR kan medverka till lägre antal viabla celler eller vice versa. Det var även tydligt att grupperna som inkuberats med mifepristone med eller utan tillsats av progesteron hade högst cellviabilitet vilket kan förklaras av att mifepristone hämmade progesteronets effekt.

Cellodlingsmediets inverkan på cellviabiliteten

Det fanns en tendens till att cellerna som inkuberades utan fetalt bovint serum (FBS) hade högre viabilitet än de som inkuberats med FBS. Att serum kan ha en hämmande effekt på tillväxten har visats i andra studier t ex Moreno-Cuevas och Sirbasku (2000) och beror på hur cellerna interagerar med bl a olika tillväxtfaktorer och hormoner i serumet. Eftersom serum framställs från levande djur så är det omöjligt att fastställa exakt vad som ingår eftersom varje produktomgång är unik. Intressant nog var det bara de celler som inkuberats i FBS-fritt cellodlingsmedium som hade signifikanta skillnader mellan celler som haft respektive inte haft tillgång till progesteron. När FBS väl tillförts hade tillsatsen av extra progesteron ingen större betydelse. Ännu mer intressant är att för de celler som inkuberats utan vare sig FBS eller fenolrött (S-F-) så gav progesteronet en stimulerande effekt på cellviabiliteten, men för celler som inkuberats utan FBS, men med fenolrött (S-F+) var sambandet det omvända. Någon förklaring till detta har jag dock inte lyckats finna i litteraturen.

Skillnaden mellan de celler som inkuberades med respektive utan progesteron var mindre för de celler som hade inkuberades i cellodlingsmedium utan FBS men med fenolrött (S-F+) jämfört med de som ej haft tillgång till vare sig FBS eller fenolrött (S-F-). Moreno-Cuevas och Sirbasku (2000) fann att vid odling av östrogenreceptorpositiva (ER+) bröstcancer celler (T47D) kunde fenolrött (8 och 16 mg/L) inducera en liten ökning av PR efter fyra dagars inkubation som motsvarade vad östrogen (10^{-14} M) åstadkom. Detta förklarades som en östrogen effekt från kontaminerande ämnen. I cellodlingsmediet med fenolrött som använts i denna studie fanns 5 mg/L. Det är inte osannolikt att tillsatsen av fenolrött haft en liten

stimulerande effekt som medierades genom interaktion med ER β , vilket är en receptor som CMT-U27 uttrycker (personlig kommentar Hellmén).

Immunohistokemi

Syftet med delstudie 1 var att välja en cellinje för de fortsatta studierna och undersöka vilka tumörer som uttrycker PR. Immunohistokemin utfördes två gånger. Det var främst epitelceller som färgades in, men även en del fibroblaster. Den tumör som hade starkast infärgning samt även procentuellt flest antal infärgade cellkärnor var ett tubulopapillärt carcinom samt cellinjen CMT-U27 som användes i senare delstudier. Intressant nog var det inte bara carcinom som var positiva utan alla tumörer i studien färgades in för PR i olika grad. Resultatet stämmer överens med tidigare studier som också funnit att både sarkom och carcinom har PR i olika utsträckning beroende på malignitetsgrad (Donnay et al. 1995a, Toniti et al. 2009). Huruvida malignitetsgraden spelade in på infärgningsgrad och intensitet i denna studie går inte att uttala sig om då materialet var begränsat till alltför få snitt. Det hade dock varit intressant att upprepa försöken i studien med en cellinje etablerad från ett juversarkom.

Allmän diskussion

Cellinjen som användes vid cellodlingsförsöken (delstudie 2-5) var CMT-U27, etablerad från ett spontant uppkommet juvercarcinom (Hellmen 1992). Denna cellinje är känd för att uttrycka progesteronreceptorer vilket även visades i immunohistokemin och vid analys av progesteronreceptorer med hjälp av ELISA. En nyligen publicerad studie har visat att juvervävnad från hund uttrycker båda isoformerna av PR och PR-A uttrycks i högre grad än PR-B (Gracanin et al. 2012). Carcinom uttryckte PR-A starkare än normal och hyperplastisk vävnad (Gracanin et al. 2012). Tyvärr vet man inte vilken/vilka isoformer av PR som CMT-U27 uttrycker (personlig kommentar Hellmén).

Eftersom juvret genomgår stora förändringar under brunstcykeln utsätts tiken för cykler med proliferation av odifferentierade stamceller i juvret. Detta kan spela en central roll vid tumörbildning av juvret (van Garderen och Schalken 2002). Progesteronets roll i juvertumörernas patogenes kan mycket väl vara att bilda ett förstadium till tumörbildning genom sina proliferativa egenskaper i det normala juvret. Progesteronet har dock visat sig vara ett hormon med väldigt variabel effekt. Steroidhormonet har in vitro visats hämma cellproliferation genom att få cellerna att stanna i G1-fasen av cellcykeln (Groshong et al. 1997, Musgrove et al. 1991). Studier har visat att kastration innan 2,5 års ålder minskar risken för att utveckla juvertumörer (Schneider et al. 1969) och att höga doser av progestiner kan leda till utveckling av benigna tumörer (Nelson et al. 1973). Nelson et al. (1973) visade att tumörerna framför allt bestod av epiteliala och myoepiteliala celler, men att även tumörer med ben- och broskbildning utvecklades. Det har tidigare nämnts att skillnader i receptoruttryck (ER α och eller PR) när man jämfört kastrationsstatus, hormonell status eller antal/lokalisering av tumörer inte påvisats (Donnay et al. 1993, Donnay et al. 1995a, de Las Mulas et al. 2005). Det bör dock noteras att det i dessa studier inte framgår om tikarna kastrerats innan 2,5 års ålder så det är svårt att uttala sig om hur en kastration innan denna ålder uppnåtts skulle påverka receptoruttryck. Under diöstrus, då kroppen står under starkt inflytande av progesteron, genomgår juvret ett stadium av kraftig proliferation (Chandra et al. 2010) och

även progestiner har visat sig ge nodulär hyperplasi i juvret (Schneider et al. 1969). Sambandet mellan GH och progesteron i juvret har diskuterats tidigare i arbetet och kan förklara en del av de effekter man ser av progesteron.

Tikar med maligna tumörer har högre halter av steroidhormoner i serum (Queiroga et al., 2005, Illera et al., 2006) och progesteron kan ombildas till olika steroidhormon i kroppen. Resultaten i denna studie tyder på att CMT-U27 kan producera progesteron och att cellerna efter progesteronexponering minskar sitt uttryck av PR. Detta kan förklara varför receptoruttrycket för PR minskar med ökad malignitet, vilket har visats i flera studier (de Las Mulas et al. 2005, de las Mulas et al. 2004, Donnay et al. 1993, Millanta et al. 2005, Nieto et al. 2000).

Felkällor

Av misstag blev de till 96-hålsplattan tillsatta cellkoncentrationerna olika mellan 24 och 48 timmars inkubationerna (delstudie 2a och 2b), vilket kan ha påverkat resultatet. Trots allt är huvudresultaten likartade.

Värt att notera är också att det mellan 24 och 48 timmars inkubation skiljer i passagenummer. Av litteraturen framgår att varje gång cellerna trypsineras och passeras så kan genotypiska och fenotypiska egenskaper förändras (Kielberg et al. 1994). Därför har spridningen av passager minimerats i studien.

Framtida studier

Det som mätts i studien är cellviabiliteten. Det hade varit intressant att även inkludera ett steg för att kontrollera celldöd vid inkubation med progesteron och/eller mifepristone. Mifepristone påverkar inte bara progesteronreceptorn utan är även antagonist till glukokortikoidreceptorn. Alla tumörer som undersöktes i detta examensarbete uttryckte progesteronreceptorer och i cellodlingsstudierna (delstudie 2-5) användes en cellinje med ursprung från ett juvercarcinom. Det vore väldigt intressant att utföra denna studie även med sarkom och även att vidareutveckla studien av CMT-U27 genom att studera uttryck av GH, dess receptor (GHR) samt glukokortikoidreceptorn.

Tack

Jag vill tacka min fantastiska handledare E. Hellmén för hennes enorma stöd och hjälp under arbetets gång. Jag tackar vänligt S. Guil-Luna och J. Martín de las Mulas för tillgång till Progesteron och RU486/mifepristone. Jag vill även passa på att tacka institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi för hjälp och ett varmt välkomnande.

REFERENSER

- Bamberger, A. M., Bamberger, C. M., Gellersen, B. & Schulte, H. M. (1996) Modulation of AP-1 activity by the human progesterone receptor in endometrial adenocarcinoma cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(12), 6169-74.
- Beck, C. A., Weigel, N. L., Moyer, M. L., Nordeen, S. K. & Edwards, D. P. (1993) The progesterone antagonist RU486 acquires agonist activity upon stimulation of cAMP signaling pathways, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(10), 4441-5.
- Beijerink, N. J., Bhatti, S. F., Okkens, A. C., Dieleman, S. J., Duchateau, L. & Kooistra, H. S. (2008) Pulsatile plasma profiles of FSH and LH before and during medroxyprogesterone acetate treatment in the bitch, *Theriogenology*, 70(2), 179-85.
- Benjamin, S. A., Lee, A. C. & Saunders, W. J. (1999) Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles, *Vet Pathol*, 36(5), 423-36.
- Brisken, C., Park, S., Vass, T., Lydon, J. P., O'Malley, B. W. & Weinberg, R. A. (1998) A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(9), 5076-81.
- Chandra, S. A. & Adler, R. R. (2008) Frequency of different estrous stages in purpose-bred beagles: a retrospective study, *Toxicol Pathol*, 36(7), 944-9.
- Chandra, S. A., Mark Cline, J. & Adler, R. R. (2010) Cyclic morphological changes in the beagle mammary gland, *Toxicol Pathol*, 38(6), 969-83.
- Chappell, P. E., Schneider, J. S., Kim, P., Xu, M., Lydon, J. P., O'Malley, B. W. & Levine, J. E. (1999) Absence of gonadotropin surges and gonadotropin-releasing hormone self-priming in ovariectomized (OVX), estrogen (E2)-treated, progesterone receptor knockout (PRKO) mice, *Endocrinology*, 140(8), 3653-8.
- Concannon, P. W. (1986) Canine pregnancy and parturition, *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 16(3), 453-75.
- Concannon, P. W. (2009) Endocrinologic control of normal canine ovarian function, *Reprod Domest Anim*, 44 Suppl 2, 3-15.
- de Las Mulas, J. M., Millan, Y. & Dios, R. (2005) A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog, *Vet Pathol*, 42(2), 200-12.
- de las Mulas, J. M., Ordas, J., Millan, M. Y., Chacon, F., De Lara, M., Espinosa de los Monteros, A., Reymundo, C. & Jover, A. (2004) Immunohistochemical expression of estrogen receptor beta in normal and tumoral canine mammary glands, *Vet Pathol*, 41(3), 269-72.

- Donnay, I., Rauis, J., Devleeschouwer, N., Wouters-Ballman, P., Leclercq, G. & Verstegen, J. (1995a) Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs, *Am J Vet Res*, 56(9), 1188-94.
- Donnay, I., Rauis, J., Wouters-Ballman, P., Devleeschouwer, N., Leclercq, G. & Verstegen, J. P. (1993) Receptors for oestrogen, progesterone and epidermal growth factor in normal and tumorous canine mammary tissues, *J Reprod Fertil Suppl*, 47, 501-12.
- Donnay, I., Wouters-Ballman, P., Devleeschouwer, N., Leclercq, G. & Verstegen, J. (1995b) Changes in oestrogen, progesterone and epidermal growth factor receptor concentrations and affinities during the oestrous cycle in the normal mammary gland and uterus of dogs, *Vet Res Commun*, 19(2), 101-13.
- Elger, W., Bartley, J., Schneider, B., Kaufmann, G., Schubert, G. & Chwalisz, K. (2000) Endocrine pharmacological characterization of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators with respect to PR-agonistic and antagonistic activity, *Steroids*, 65(10-11), 713-23.
- Fan, S., Meng, Q., Gao, B., Grossman, J., Yadegari, M., Goldberg, I. D. & Rosen, E. M. (2000) Alcohol stimulates estrogen receptor signaling in human breast cancer cell lines, *Cancer Res*, 60(20), 5635-9.
- Galabova-Kovacs, G., Walter, I., Aurich, C. & Aurich, J. E. (2004) Steroid receptors in canine endometrial cells can be regulated by estrogen and progesterone under in vitro conditions, *Theriogenology*, 61(5), 963-76.
- Geraldes, M., Gartner, F. & Schmitt, F. (2000) Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours, *Vet Rec*, 146(14), 403-6.
- Gracanin, A., de Gier, J., Zegers, K., Bominaar, M., Rutteman, G., Schaefers-Okkens, A., Kooistra, H. & Mol, J. (2012) Progesterone receptor isoforms in the mammary gland of cats and dogs, *Reprod Domest Anim*, 47 Suppl 6, 313-7.
- Groshong, S. D., Owen, G. I., Grimison, B., Schauer, I. E., Todd, M. C., Langan, T. A., Sclafani, R. A., Lange, C. A. & Horwitz, K. B. (1997) Biphasic regulation of breast cancer cell growth by progesterone: role of the cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27(Kip1), *Mol Endocrinol*, 11(11), 1593-607.
- Hellmen, E. (1992) Characterization of four in vitro established canine mammary carcinoma and one atypical benign mixed tumor cell lines, *In Vitro Cell Dev Biol*, 28A(5), 309-19.
- Horwitz, K. B., Pike, A. W., Gonzalez-Aller, C. & Fennessey, P. V. (1986) Progesterone metabolism in T47Dco human breast cancer cells--II. Intracellular metabolic path of progesterone and synthetic progestins, *J Steroid Biochem*, 25(6), 911-6.

- Illera, J. C., Perez-Alenza, M. D., Nieto, A., Jimenez, M. A., Silvan, G., Dunner, S. & Pena, L. (2006) Steroids and receptors in canine mammary cancer, *Steroids*, 71(7), 541-8.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H. & Chambon, P. (1990) Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B, *EMBO J*, 9(5), 1603-14.
- Kelder, J., Azevedo, R., Pang, Y., de Vlieg, J., Dong, J. & Thomas, P. (2010) Comparison between steroid binding to membrane progesterone receptor alpha (mPRalpha) and to nuclear progesterone receptor: correlation with physicochemical properties assessed by comparative molecular field analysis and identification of mPRalpha-specific agonists, *Steroids*, 75(4-5), 314-22.
- Kielberg, V., Brünner, N., Briand, P., & Hansen, K. E. (1994) Cellodling, en praktisk handbok i odling av mammalieceller, Mölndal: AB Labassco förlag.
- Klopfleisch, R., von Euler, H., Sarli, G., Pinho, S. S., Gartner, F. & Gruber, A. D. (2011) Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: news from an old disease, *Vet Pathol*, 48(1), 98-116.
- Lantinga-van Leeuwen, I. S., van Garderen, E., Rutteman, G. R. & Mol, J. A. (2000) Cloning and cellular localization of the canine progesterone receptor: co-localization with growth hormone in the mammary gland, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 75(4-5), 219-28.
- Lydon, J. P., DeMayo, F. J., Funk, C. R., Mani, S. K., Hughes, A. R., Montgomery, C. A., Jr., Shyamala, G., Conneely, O. M. & O'Malley, B. W. (1995) Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities, *Genes Dev*, 9(18), 2266-78.
- Manee-in, S., Srisuwatanasagul, S., Lohachit, C., Suwimonteerabutr, J. & Sirivaidyapong, S. (2009) Estrogen receptor alpha (ER α) and progesterone receptor (PR) in the mammary gland of bitches during different stages of estrous cycle, *Comparative Clinical Pathology*, 19(2), 173-178.
- Marions, L. & Danielsson, K. G. (1999) Expression of cyclo-oxygenase in human endometrium during the implantation period, *Mol Hum Reprod*, 5(10), 961-5.
- Millanta, F., Calandrella, M., Bari, G., Niccolini, M., Vannozzi, I. & Poli, A. (2005) Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues, *Res Vet Sci*, 79(3), 225-32.
- Mol, J. A., van Garderen, E., Selman, P. J., Wolfswinkel, J., Rijnberk, A. & Rutteman, G. R. (1995) Growth hormone mRNA in mammary gland tumors of dogs and cats, *J Clin Invest*, 95(5), 2028-34.

- Moreno-Cuevas, J. E. & Sirbasku, D. A. (2000) Estrogen mitogenic action. III. Is phenol red a "red herring"? *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 36(7), 447-64.
- Mulac-Jericevic, B. & Conneely, O. M. (2004) Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors, *Reproduction*, 128(2), 139-46.
- Mulac-Jericevic, B., Lydon, J. P., DeMayo, F. J. & Conneely, O. M. (2003) Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(17), 9744-9.
- Musgrove, E. A., Lee, C. S. & Sutherland, R. L. (1991) Progestins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-fos, and c-myc genes, *Mol Cell Biol*, 11(10), 5032-43.
- Nelson, L. W. & Kelly, W. A. (1974) Changes in canine mammary gland histology during the estrous cycle, *Toxicol Appl Pharmacol*, 27(1), 113-22.
- Nelson, L. W., Weikel, J. H., Jr. & Reno, F. E. (1973) Mammary nodules in dogs during four years' treatment with megestrol acetate or chlormadinone acetate, *J Natl Cancer Inst*, 51(4), 1303-11.
- Nieto, A., Pena, L., Perez-Alenza, M. D., Sanchez, M. A., Flores, J. M. & Castano, M. (2000) Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance, *Vet Pathol*, 37(3), 239-47.
- Orfanou, D. C., Poulis, A., Ververidis, H. N., Mavrogianni, V. S., Taitzoglou, I. A., Boscios, C. M. & Fthenakis, G. C. (2010) Histological features in the mammary glands of female dogs throughout lactation, *Anat Histol Embryol*, 39(5), 473-8.
- Owen, G. I., Richer, J. K., Tung, L., Takimoto, G. & Horwitz, K. B. (1998) Progesterone regulates transcription of the p21(WAF1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene through Sp1 and CBP/p300, *J Biol Chem*, 273(17), 10696-701.
- Purmonen, S., Manninen, T., Pennanen, P. & Ylikomi, T. (2008) Progestins regulate genes that can elicit both proliferative and antiproliferative effects in breast cancer cells, *Oncol Rep*, 19(6), 1627-34.
- Queiroga, F. L., Perez-Alenza, D., Silvan, G., Pena, L., Lopes, C. S. & Illera, J. C. (2010) Serum and intratumoural GH and IGF-I concentrations: prognostic factors in the outcome of canine mammary cancer, *Res Vet Sci*, 89(3), 396-403.
- Queiroga, F. L., Perez-Alenza, M. D., Silvan, G., Pena, L., Lopes, C. & Illera, J. C. (2005) Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 94(1-3), 181-7.

- Queiroga, F. L., Perez-Alenza, M. D., Silvan, G., Pena, L., Lopes, C. S. & Illera, J. C. (2008) Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17beta-estradiol) in canine mammary tumours, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 110(1-2), 76-82.
- Rehm, S., Stanislaus, D. J. & Williams, A. M. (2007) Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels, *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 80(3), 233-45.
- Rutteman, G. R., Misdorp, W., Blankenstein, M. A. & van den Brom, W. E. (1988) Oestrogen (ER) and progestin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states, *Br J Cancer*, 58(5), 594-9.
- Santillano, D. R., Kumar, L. S., Prock, T. L., Camarillo, C., Tingling, J. D. & Miranda, R. C. (2005) Ethanol induces cell-cycle activity and reduces stem cell diversity to alter both regenerative capacity and differentiation potential of cerebral cortical neuroepithelial precursors, *BMC Neurosci*, 6, 59.
- Santos, M., Marcos, R. & Faustino, A. M. (2010) Histological study of canine mammary gland during the oestrous cycle, *Reprod Domest Anim*, 45(5), e146-54.
- Schneider, R., Dorn, C. R. & Taylor, D. O. (1969) Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival, *J Natl Cancer Inst*, 43(6), 1249-61.
- Selman, P. J., Mol, J. A., Rutteman, G. R., van Garderen, E. & Rijnberk, A. (1994) Progestin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland, *Endocrinology*, 134(1), 287-92.
- Skildum, A., Faivre, E. & Lange, C. A. (2005) Progesterone receptors induce cell cycle progression via activation of mitogen-activated protein kinases, *Mol Endocrinol*, 19(2), 327-39.
- Sleeckx, N., de Rooster, H., Veldhuis Kroeze, E. J., Van Ginneken, C. & Van Brantegem, L. (2011) Canine mammary tumours, an overview, *Reprod Domest Anim*, 46(6), 1112-31.
- Tibbetts, T. A., DeMayo, F., Rich, S., Conneely, O. M. & O'Malley, B. W. (1999) Progesterone receptors in the thymus are required for thymic involution during pregnancy and for normal fertility, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(21), 12021-6.
- Toniti, W., Buranasinsup, S., Kongcharoen, A., Charoonrut, P., Puchadapirom, P. & Kasorndorkbua, C. (2009) Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in canine mammary tumors, *Asian Pac J Cancer Prev*, 10(5), 907-11.
- van Garderen, E., de Wit, M., Voorhout, W. F., Rutteman, G. R., Mol, J. A., Nederbragt, H. & Misdorp, W. (1997) Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors. Evidence for a potential autocrine/paracrine stimulatory loop, *Am J Pathol*, 150(3), 1037-47.

- van Garderen, E. & Schalken, J. A. (2002) Morphogenic and tumorigenic potentials of the mammary growth hormone/growth hormone receptor system, *Mol Cell Endocrinol*, 197(1-2), 153-65.
- van Garderen, E., Swennenhuis, J. F., Hellmen, E. & Schalken, J. A. (2001) Growth hormone induces tyrosyl phosphorylation of the transcription factors Stat5a and Stat5b in CMT-U335 canine mammary tumor cells, *Domest Anim Endocrinol*, 20(2), 123-35.
- van Garderen, E., van der Poel, H. J., Swennenhuis, J. F., Wissink, E. H., Rutteman, G. R., Hellmen, E., Mol, J. A. & Schalken, J. A. (1999) Expression and molecular characterization of the growth hormone receptor in canine mammary tissue and mammary tumors, *Endocrinology*, 140(12), 5907-14.
- Watson, A., Rutteman, G., Rijnberk, A. & Mol, J. (1987) Effect of somatostatin analogue SMS 201-995 and antiprogestin agent RU 486 in canine acromegaly, *Frontiers of Hormone Research*, 17, 193-8.