



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Hormonell påverkan och receptoruttryck i juvertumörer hos hund

Caroline Klemming

*Uppsala
2015*

Kandidatarbete 15 hp inom veterinärprogrammet

Kandidatarbete 2015:15

Hormonell påverkan och receptoruttryck i juvertumörer hos hund

Hormonal influence and receptor expression in canine mammary tumours

Caroline Klemming

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

Examinator: *Eva Tydén, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

Kandidatarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: grund nivå, G2E

Kurskod: EX0700

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2015

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen / Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Delnummer i serie: 2015:15

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: *juvertumör, hund, progesteron, tillväxthormon, IGF, receptorer*

Key words: *canine mammary tumour, dog, progesterone, growth hormone, IGF, receptors*

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder.....	4
Litteraturoversikt.....	4
Cellsignalering	4
Progesteronreceptorn.....	4
Tillväxthormonreceptorn.....	5
IGF-receptorn	5
Uttryck och påverkan av hormoner och receptorer på juvertumörer.....	6
Progesterin och utveckling av juvertumörer.....	6
Uttryck av progesteronreceptorer	7
Isoformer av progesteronreceptorer	7
Lokal produktion av tillväxthormon.....	8
Tillväxthormon och juvertumörer	8
Uttryck av tillväxthormonreceptorn	10
Insulinliknande tillväxtfaktor och juvertumörer.....	10
Uttryck av IGF-receptorn	11
Diskussion	11
Litteraturförteckning	15

SAMMANFATTNING

Juvertumörer är de vanligaste tumörerna hos tikar och det finns olika typer av både benigna och maligna juvertumörer. De hormonella fluktuationerna som sker under östralcykeln driver utvecklingen av juervävnaden och behandling med progestiner (syntetiska ekvivalenter till progesteron) för uppskjutande av lopp har kopplats samman med förekomst av juvertumörer, vilket har lett till ett intresse för den hormonella påverkan på juvertumörutvecklingen. Hormonerna är i sin tur beroende av uttrycket av receptorer för att kunna ha effekt i vävnaden.

Syftet med den här litteraturstudien är att utreda uttrycket av hormoner och receptorer för progesteron, tillväxthormon (growth hormone, GH) och insulinliknande tillväxtfaktor (insulinlike growth factor, IGF) i normal juervävnad och i benigna och maligna tumörer, såväl som deras påverkan på juvertumörutvecklingen.

De intracellulära signalvägarna för progesteronreceptorer (PR), GH-receptorer (GHR) och IGF-I-receptorn (IGF-IR) är kopplade till cellproliferation och genreglering. De komplexa nätverken av signalvägar interagerar med varandra och en obalans i uttryck och reglering av hormoner, receptorer eller molekyler i cellen kan leda till att tumörer uppstår. Vid progestinbehandling har ökade nivåer av GH och IGF-I uppmätts och högst nivåer sågs i maligna tumörer. Uttrycket av PR visades vara högt i benigna juvertumörer i motsats till maligna tumörer där PR-uttrycket istället var lågt. Samtidigt har resultat visat på ett högre uttryck av GHR och IGF-IR i maligna tumörer. PR har också visats finnas i två isoformer, kallade PR-A och PR-B, och PR-A sågs dominera över PR-B i maligna tumörer. Nya studier på hundens PR-B tyder på att den kan ha en nedsatt funktion via mutationer i aktiveringsdomänen AF3 i PR-genen. Därför diskuteras vilken betydelse PR-B har hos hund och vikten framhävs av att i framtida studier analysera inte bara totalt PR-uttryck utan även skillnader mellan PR-A och PR-B. Varierande resultat från olika morfologiska juvertumörtyper har också påvisats och det anses därför viktigt att särskilja mellan slutsatser från tumörer med olika cellulärt ursprung.

Avslutningsvis konstateras progesteron-GH-IGF-axeln ha en stimulerande påverkan på juvertillväxten och att det finns skillnader i uttryck av hormoner och receptorer i tumöromvandlad vävnad. Resultaten tyder på att förlust av PR leder till att uttrycket av GH-genen blir progestinoberoende efter transformering till maligna tumörer och genen regleras då inte längre av de normala hormonella fluktuationerna. Istället produceras GH och IGF-I lokalt av tumörerna och uttrycket av deras receptorer ökar. Sammantaget tyder det på att det skapats en oberoende parakrin och autokrin produktion hos tumörcellerna som driver tumörens tillväxt. Motstridiga resultat kring GH/GHR-systemets proliferativa påverkan i olika juvertumörtyper anses tyda på att det krävs ytterligare forskning kring kopplingen mellan olika signalvägar, hormoner och receptorer som är inblandade i utvecklingen av juvertumörer.

SUMMARY

Mammary tumours are the most common tumours seen in female dogs and there are many different types of benign and malignant mammary tumours. The hormonal fluctuations during the oestrus cycle is the driving force of development of the mammary tissue and treatment with progestins (synthetic progesterone equivalents) for the postponement of ovulation has been correlated to the incidence of canine mammary tumours, which has led to the interest of studying the hormonal influence on the development of mammary tumours. The effect of hormones is in turn dependent on the expression of receptors in tissues.

The purpose of this literature study is to investigate the expression of hormones and receptors for progesterone, growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) in normal mammary tissue and benign and malignant tumours as well as their influence on the development of mammary tumours.

Intracellular signalling pathways for the progesterone receptor (PR), the GH-receptor (GHR) and the IGF-receptor (IGF-IR) are connected to cell proliferation and gene regulation. The complex networks of the signalling pathways interact with each other and an imbalance in the expression and regulation of hormones, receptors or molecules in the cell can lead to the development of tumours. During treatment with progestins, increasing levels of GH and IGF-I has been registered and the highest levels are seen in malignant tumours. The expression of PR was shown to be elevated in benign tumours. In contrast, malignant tumours showed a low expression of PR with a concurrent higher expression of GHR and IGF-IR. PR has also been shown to be expressed in two isoforms, PR-A and PR-B, of which the levels of PR-A are dominating over PR-B. Recent studies have revealed that the canine PR-B might have a diminished function caused by mutations in an activation domain in the PR-gene. Therefore the relevance of PR-B in dogs is discussed and the importance of analysing not only total expression of PR, but also the differences between PR-A and PR-B in future studies is emphasized. Varying results in different morphological types of mammary tumours has been shown and it is therefore considered important to distinguish between conclusions from tumours with different cellular origin.

In conclusion, it is determined that the progesterone-GH-IGF-axis has a stimulating effect on the growth of mammary tissue and there are differences in expression of hormones and receptors in mammary tumours. Results indicate that the loss of PR leads to independence from progestins in the expression of the GH-gene after malignant transformation of tumours and it is no longer regulated by the normal hormonal fluctuations. Instead, GH and IGF-I is produced locally by the tumour and the expression of their receptors are increased, indicating that an independent paracrine and autocrine production by the tumour cells themselves is created which leads to tumour growth. Contradicting results of the proliferative influence of the GH/GHR-system is considered to indicate the need for additional research regarding the link between the different signalling pathways, hormones and receptors that are involved in the development of canine mammary tumours.

INLEDNING

Juvertumörer är de vanligaste tumörerna hos tikar och de är kända för att variera i struktur och biologiskt beteende (Misdorp *et al.*, 1999). Enligt en studie utförd på information från försäkringsbolaget Agrias databas fann forskarna en incidens på 154 diagnoser av juvertumörer per 10 000 hundar och en ökande incidens med ålder (Egenvall *et al.*, 2005). Kvoten maligna tumörer har rapporterats utgöra mellan 10:1 till 2:1 av alla juvertumörer hos hund (Misdorp *et al.*, 1999).

Det finns olika typer av benigna och maligna juvertumörer och de indelas efter morfologiska och till viss del även prognostiska faktorer (Misdorp *et al.*, 1999). Benigna tumörer delas bland annat in i adenom, fibroadenom, blandade benigna tumörer och papillom i gångar. Maligna tumörer delas upp i ökande malignitetsgrad enligt följande: *in situ* carcinom, komplexa carcinom, enkla carcinom, specialtyper av carcinom såsom spindelcellscarcinom och anaplastiska carcinom, sarkom såsom fibrosarkom eller osteosarkom, samt carcinosarkom (Misdorp *et al.*, 1999). Metastaser kan också bildas från de maligna tumörerna och spridas både lymfogent och hematogent.

Hundens östralcykel innefattar fyra faser: proöstrus, östrus, metöstrus, anöstrus. Progressionen av dessa faser styrs bland annat av fluktuerande halter av hormonerna östrogen och progesteron. Lutealfasen är hos hund 55-75 dagar, vilket är längre än hos många andra arter och gör att tikar är under påverkan av progesteron en lång period (Concannon, 2009). Under de olika faserna sker histologiska förändringar i juvervävnaden (van Garderen *et al.*, 1999). Under anöstrus är körtelvävnaden inaktiv, men i lutealfasen, under metöstrus, då ökande koncentrationer av progesteron frisätts sker en hög stimulans av juvervävnaden (Misdorp, 1988). Behandling med progestiner (syntetiska ekvivalenter till progesteron) för uppskjutande av lopp har också kopplats samman med förekomst av juvertumörer, medan östrogenbehandling inte har setts öka risken för juvertumörer hos hund (Rutteman, 1992). En skyddande effekt har istället setts av kastration (Misdorp, 1988). Dessa upptäckter gör den hormonella påverkan på tumörutvecklingen särskilt intressant.

Hormoner är beroende av uttrycket av deras respektive receptorer i olika vävnader för att signaler ska spridas in i cellen och förändra cellens beteende. De intracellulära signalvägarna är komplexa och när regleringen av dessa går fel kan tumörer uppstå. Kartläggning av skillnader i sekretion av progesteron, tillväxthormon (growth hormone, GH) och insulinliknande tillväxtfaktor (insulin-like growth factor, IGF) samt uttrycket av deras receptorer i normal juvervävnad samt i benigna och maligna tumörer skulle därför kunna ge ledtrådar om vad som gått fel och leda till förbättrade behandlingsmetoder.

De frågeställningar uppsatsen ämnar besvara är följande:

- Hur påverkar progesteron, GH och IGF samt deras respektive receptorer utvecklingen av juvertumörer hos hund?
- Finns det skillnader i uttryck av hormoner och receptorer mellan normal juvervävnad, benigna respektive maligna tumörer?

MATERIAL OCH METODER

Denna litteraturstudie bygger på artiklar från databaserna PubMed och Web of Science. Sökord som använts är mammary AND canine AND (tumor* OR tumour*) AND cancer AND progesteron* AND (progesterone receptor* OR PR) AND (growth hormone OR GH) AND IGF*, samt olika kombinationer av dessa. Därutöver har referenser från översiktsartiklar använts för att hitta ytterligare information.

LITTERATURÖVERSIKT

Många studier har utförts för att undersöka hormonell påverkan på juvertumörutvecklingen. Denna litteraturöversikt kommer att behandla uttrycket av progesteron, GH och IGF samt deras respektive receptorer i olika studerade juvertumörer. Avsnittet inleds med en introduktion till hormonernas receptorer och signalvägar.

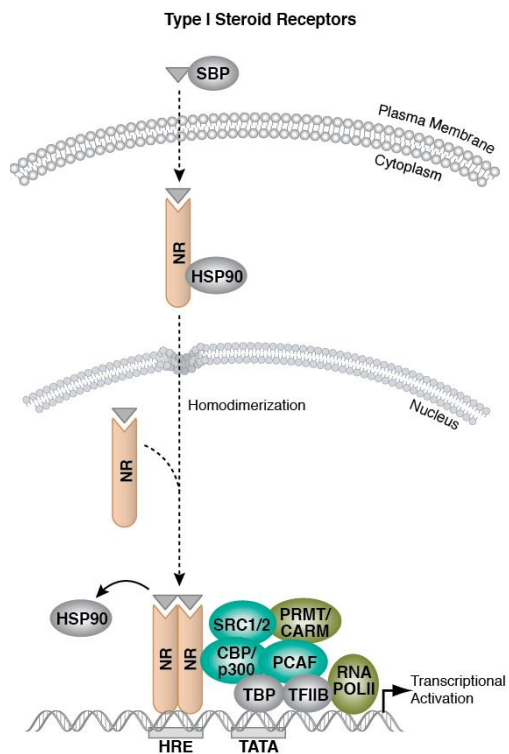
Cellsignalering

För att en organism ska kunna leva måste cellerna kommunicera och samverka. Detta gör de via signalvägar där olika proteiner och andra molekyler kommer i kontakt med och påverkar varandra, vilket sprider signalen vidare exempelvis till kärnan där transkription av målgener aktiveras. Målgenerna kan vara gener för hormoner som sedan frisätts och via endokrin, parakrin eller autokrin spridning kan påverka både andra och den egna cellen genom inbindning till receptorer.

Progesteronreceptorn

Progesteronreceptorn (PR) är en steroidreceptor som är en typ I kärnreceptor. PR finns i cytoplasman och vid inbindning av liganden translokeras komplexet till kärnan. Dimerisering av receptorn och inbindning till progestin-responsiva element (PRE) i promotorregioner leder till transaktivering av specifika gener i målvävnaden, exempelvis genen för GH. Signalvägen för PR finns beskriven i Figur 1 nedan. Receptorerna kan också delvis aktiveras när de binder liganden i cytoplasman.

Progesteronreceptorn förekommer i flera isoformer som transkriberas från samma gen, men aktiveras av olika promotorer (Kastner *et al.*, 1990). Isoformerna PR-A och PR-B skiljer sig åt genom att PR-A-proteinet saknar PR-B-uppstomssegmentet (BUS) som innehåller aktiveringsfunktion-3 domän, AF3. PR-A:s N-terminala sekvens innehåller en kärnlokaliseringssignal, aktiveringsfunktion 1 (AF1), två områden som interagerar med östrogenreceptorn (ER) i cytoplasman samt en prolinrik sekvens som kan interagera med tyrosinkinaser av c-Src-familjen (Gracanin *et al.*, 2012a). Dessa sekvenser har även påvisats hos PR-B som via aktivering i cytoplasman tros kunna aktivera signalvägarna för Src/Ras/MAP-kinas (Ballaré *et al.*, 2003). Vid dimeriseringen av PR kan både homodimerer och heterodimerer av PR-A och PR-B bildas (Mulac-Jericevic & Conneely, 2004).



Figur 1: Generell signalväg vid inbindning av progesteron till PR. NR = nuclear receptor. Figur reproducerad med tillstånd av Cell Signaling Technology, Inc.

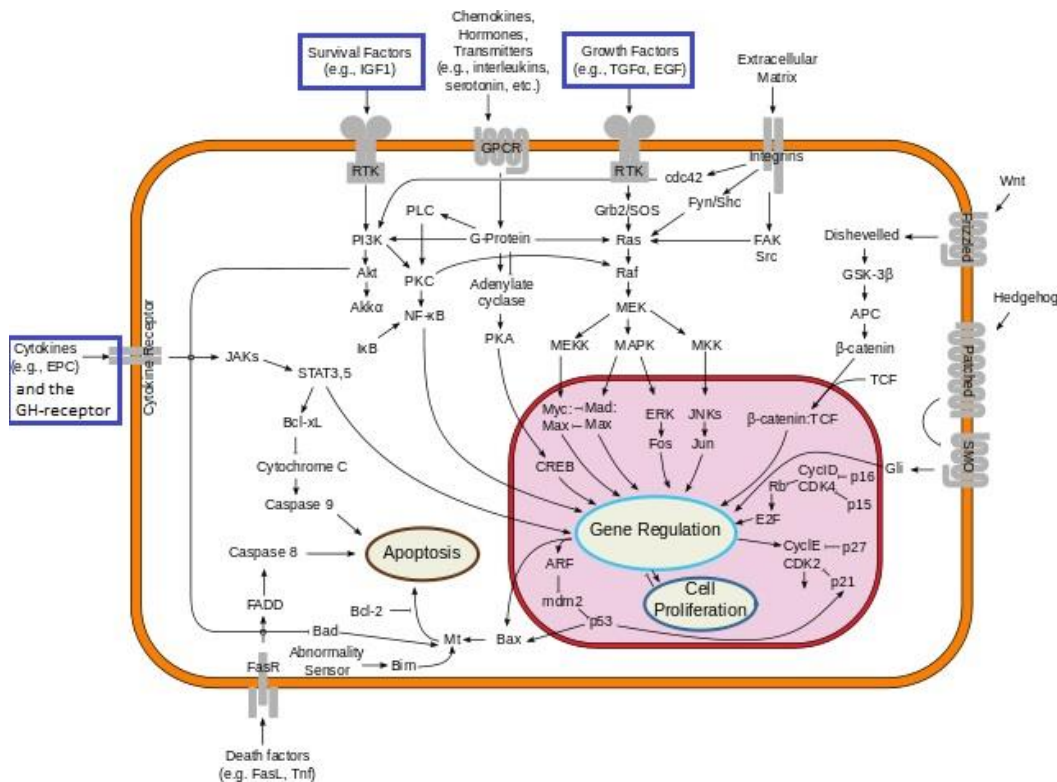
(<http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=pathways-nuclear>).

Tillväxthormonreceptorn

GH-receptorn (GHR) är en tyrosinkinaserceptor, vilken är en typ av receptor som kan aktivera många olika signalvägar samtidigt och därför förmedla signaler för komplexa processer i cellen såsom proliferation. När GH binder till GHR dimeriseras receptorn och det cytoplasmatiska tyrosinkinaset Janus kinas-2 (JAK2) binder då till GHR. Detta leder till tyrosylfosforylering av både GHR och JAK2, varvid JAK2 aktiverar transkriptionsfaktorer som Stat5A och Stat5B. Dessa dimeriseras och translokeras till cellkärnan där de binder till promotorregioner vilket påverkar transkription av målgener (van Garderen *et al.*, 2001), se Figur 2. GHR kan också aktivera Ras-proteinet som i sin tur aktiverar fosforyleringskaskaden av MAP-kinas (mitogen activated protein kinase). MAP-kinas aktiverar transkriptionsregulatorer och förändrar proteinaktivitet, vilket leder till proliferation och differentiering.

IGF-receptorn

IGF-I-receptorn (IGF-IR) är också en tyrosinkinaserceptor. Vid inbindning av IGF-I till receptorn sker en dimerisering och autofosforylering av de cytoplasmatiska delarna av receptorn. Den aktiverade IGF-IR kan sedan initiera ett antal olika signalvägar som leder till celltillväxt, överlevnad, proliferation och differentiering, se Figur 2. En av dessa är fosfoinositid 3-kinas (PI3-kinas) som binder serin/treonin-kinaset Akt som kan inaktivera ett apoptosfrämjande protein (Bad), vilket gör att ett apoptoshämmande protein (Bcl-2) blir aktivt. Akt kan även aktivera serin/treonin-kinaset mTor, vilket leder till celltillväxt. IGF-IR kan som GHR också aktivera Ras-MAP-kinaskaskaden.



Figur 2: Generella signalvägar för GHR och IGF-I. Modifierad efter figuren "Signal transduction pathways" av cybertery under licensen (CC BY-SA 3.0).

Uttryck och påverkan av hormoner och receptorer på juvertumörer

Progesterin och utveckling av juvertumörer

Progesterin används för uppskjutande av lopp hos tikar. Tidiga studier visade vid måttliga till höga doser av progesterin en ökad tillväxt av juvervävnad, vilken var större än den förväntade normala tillväxten under metöstrus (Nelson & Kelly, 1976). Histologiska förändringar som visats efter kastration och behandling med progesterin sågs framförallt vara prolifererande juverepitel (Selman *et al.*, 1995).

Hundar som behandlats med progesterin har också visats ha något högre risk att utveckla benigna juvertumörer, men samband sågs inte med maligna tumörer (Misdorp, 1988; Selman *et al.*, 1995). Dock har resultat visat att yngre hundar med både benigna och maligna tumörer oftare var behandlade med progesterin (Misdorp, 1988). Effekterna ansågs vara dosberoende då högre risk för utveckling av juvertumörer enbart sågs vid högre doser. Samma forskargrupp fann ingen koppling till utveckling av multipla tumörer och ingen signifikant skillnad mellan utveckling av olika tumörtyper mellan progesterinbehandlade och obehandlade tikar. I andra studier har utveckling av palperbara noduli påvisats i multipla juverdelar vid behandling med progesterin, vilka också visade sig växa i storlek under långtidsbehandling (Selman *et al.*, 1994b).

Uttryck av progesteronreceptorer

Den höga proliferationen i normal juvervävnad under lutealfasen sker samtidigt som ett ökat uttryck av ER och PR (Chandra *et al.*, 2010). Biokemiska analyser har visat att mer än 90 % av prover från normal juvervävnad är positiva för PR (Rutteman *et al.*, 1988; Donnay *et al.*, 1993). Nyare immunohistokemiska analyser har visat övervägande nukleär PR-infärgning av epitelceller från normal juvervävnad, men utebliven infärgning hos myoepiteliala celler samt stromaceller. Proliferativa delar av epitelet färgades in starkt för PR och även en svag cytoplasmatisk infärgning sågs i dessa celler. Väldifferentierad vävnad, såsom epitelceller i lobulärveolär vävnad, infärgades svagare (Lantinga-van Leeuwen *et al.*, 2000; Gracanin *et al.*, 2012a).

I en studie visades koncentrationen av PR vara signifikant ($p < 0,02$) högre i benigna tumörer än i normal juvervävnad (Rutteman *et al.*, 1988). Benigna tumörer som utvecklades till maligna hade också högre koncentrationer av PR än benigna tumörer som inte gjorde det. Antalet PR-positiva benigna tumörer var 49 av 53, vilket innebar en signifikant ($p < 0,02$) skillnad från de maligna tumörerna där PR-positivitet fanns hos enbart 12 av 23 tumörer. PR-receptornegativitet var något vanligare hos tumörer av högre malignitetsgrad. Liknande resultat har också funnits i studier med RT-qPCR (kvantitativ realtidspolymeraskedjereaktion) då 75 % av dysplasierna, 100 % av de benigna tumörerna och 59 % av carcinomen visades positiva för mRNA för totalt PR (Guil-Luna *et al.*, 2014b). *In vitro* har carcinomcellinjen CMT-U27 från hund testats för PR-uttryck och 25 % av cellerna har visat sig uttrycka PR (Guil-Luna *et al.*, 2014a). Uttrycket av PR i metastaser uppvisade sällan PR-positivitet (Rutteman *et al.*, 1988), resultat som stämmer överens med immunohistokemiska analyser av de las Mulas *et al.* (2005).

PR-uttryck har setts variera mellan olika histologiska subtyper av juvertumörer i flera studier (Lantinga-van Leeuwen *et al.*, 2000; de las Mulas *et al.*, 2005). Lantinga-van Leeuwen *et al.* (2000) såg att väldifferentierade enkla adenom uppvisade nukleär infärgning av alla epitelceller, medan andra enkla samt komplexa tumörer hade heterogen nukleär infärgning. Carcinom visade både negativ infärgning för PR och ibland en annorlunda perinukleär infärgning av epitelceller. I komplexa tumörer uppvisade ofta spindelceller cytoplasmatisk infärgning (Lantinga-van Leeuwen *et al.*, 2000).

Isoformer av progesteronreceptorer

PR förekommer i två isoformer, PR-A och PR-B, hos hund. PR-A har visats uttryckas i högst mängd i två prover från hundar i metöstrus, medan PR-B också återfanns i prover från hundar i anöstrus samt från hundar efter progestinbehandling (Lantinga-van Leeuwen *et al.*, 2000). Guil-Luna *et al.* (2014b) fann med RT-qPCR att PR-A och PR-B återfanns i alla prover från dysplasier, benigna tumörer och carcinom och att PR-A dominerade över PR-B i carcinom och komplexa adenom. Med western blot-analys visade också Gracanin *et al.* (2012a) att protein från PR-A dominerade över PR-B och ett ökat uttryck av PR-A-protein påvisades i carcinom jämfört med normal och hyperplastisk juvervävnad (Gracanin *et al.*, 2012a).

Gracanin *et al.* (2012a; 2012b, 2014) har undersökt de underliggande mekanismerna för progestininducerade förändringar i juver hos hund. Genom att jämföra aminosyrasekvensen för PR mellan hund, katt och människa visades att PR-A saknar BUS-regionen som finns hos PR-B och som innehåller AF3-sekvensen. Vid jämförelsen med katt och människa fann de att två kärnreceptorsekvenser (^{55, 155}LxxLL) och en tryptofan (¹⁴⁰W) i BUS-regionen hos PR-B var förändrade hos hund, vilka enligt forskarna i andra studier visat sig vara viktiga för AF3:s funktion (Gracanin *et al.*, 2012a). Övriga regioner samt aminosyrasekvensen för PR-A uppvisade hög överensstämmelse mellan alla arterna (Gracanin *et al.*, 2012a). Sekvensen för AF3 jämfördes också mellan olika hunddjur och forskarna fann att mutationerna är unikt konserverade inom familjen hunddjur (Gracanin *et al.*, 2012b).

För att ta reda på om de strukturella förändringarna i hundens PR-B påverkar dess funktion utfördes en *in vitro*-studie av cellinjen CNMm som härrör från en lymfknutemetastas av ett juvercarcinom hos hund och som normalt inte uttrycker PR. I studien sågs aktiverad hund-PR-B (canine, cPR-B) enbart förändra uttrycket av 40 gener, medan det vid aktivering av human PR-B (hPR-B) och en chimär av cPR-A och human BUS (hBUS) sågs en förändring av uttrycket i 518 respektive 693 gener (Gracanin *et al.*, 2014). Alla gener som aktiverades av cPR-B utgjorde en subgrupp av generna som aktiverades av hPR-B och hBUS. Gemensamma för de testade PR-B-varianterna var gener för celladhesion, epitel- till mesenkymtransformation (epithelial-mesenchymal transition, EMT) och angiogenes. Vid inkubering med progesteron sågs ingen effekt hos celler med cPR-B, men en ökad cellproliferation hos celler med hPR-B och hBUS. Forskarna menar att detta är en indikation på att PR-B saknar biologisk funktion hos hund (Gracanin *et al.*, 2014).

Lokal produktion av tillväxthormon

GH frisätts normalt från hypofysen via en pulserande frisättning (Bhatti *et al.*, 2007). Utöver detta har forskare funnit en lokal produktion av GH i juvervävnad hos hund som kan stimuleras av exogena och endogena progestiner (Selman *et al.*, 1994b; Mol *et al.*, 1995). Selman *et al.* (1994b) visade att detta gav upphov till en överproduktion av GH i juvret, vilket resulterade i ökade IGF-koncentrationer samt symptom som liknade akromegali (kopplat till hypersekretion av GH). Den inducerade GH-produktionen verkar därmed vara biologiskt aktiv och når den systemiska cirkulationen (Selman *et al.*, 1994a), samt påverkar den normala GH-pulsen (Bhatti *et al.*, 2007). Överproduktionen uppvisade autonom karaktär då reaktion vid stimulering med GHRH respektive clonidine (α_2 -adregen agonist) eller dämpning av SMS 201-995 (somatostatin analog) uteblev (Selman *et al.*, 1994b).

Tillväxthormon och juvertumörer

I normal juvervävnad fann van Garderen *et al.* (1997) att proliferativa epitelceller i prealveolära strukturer uttryckte GH, men i det efterföljande differentierade alveolära epitelet uppvisades minskat GH-uttryck. Flera studier har visat på progestininducerad GH-produktion i hyperplasier samt benigna och maligna juvertumörer (Feldman *et al.*, 1993; Mol *et al.*, 1995; van Garderen *et al.*, 1997; Bhatti *et al.*, 2007). Epitelceller från hyperplasier har med

elektronmikroskopi visats innehålla sekretoriska granula med GH, vilket bekräftar lokal produktion av GH även i hyperplastiskt juverepitel (van Garderen *et al.*, 1997).

I både benigna och maligna tumörer påträffades GH-mRNA framförallt i epitel, men även i spindelceller (myoepitelialt ursprung) i ett fåtal maligna tumörer (van Garderen *et al.*, 1997). Tumörers malignitet och nivåer av GH har visats vara positivt korrelerade, och nivåerna var signifikant ($p < 0,01$) högre i maligna tumörer än benigna. Maligna egenskaper som tumörens tillväxttakt, storlek, adherens och hudulcerationer sågs hos tumörer med höga GH-nivåer. Högst sågs nivåerna vara i de höggradigt maligna tumörtyperna carcinosarkom och solida carcinom (Queiroga *et al.*, 2008).

Lantinga-van Leeuwen *et al.* (2000) analyserade hyperplastisk juvervävnad från en hund och fann att alla celler som producerade GH uttryckte PR, men att alla celler som uttryckte PR inte producerade GH. Forskarna menar därför att PR verkar vara ett krav för progestininducerat genuttryck av GH, men att PR ensamt inte är tillräckligt. I maligna juvertumörer påvisades däremot GH-mRNA i prover från solida carcinom, som samtidigt visade sig vara PR-negativa (Mol *et al.*, 1995). Koncentrationerna av GH-mRNA fluktuerade dock kraftigt mellan olika maligna juvercarcinom. Liknande resultat har även setts efter progestinbehandling då signifikant ($p < 0,002$) högre GH-genuttryck i juvervävnad sågs i samband med signifikant lägre uttryck av gener för PR ($p < 0,01$) och GHR ($p < 0,03$) (Bhatti *et al.*, 2007).

Krol *et al.* (2009) utförde en *in vitro*-studie på två cellinjer från hund, CMT-U27 (ursprung från ett enkelt carcinom) och CMT-U309 (ursprung från en spindelcellstumör). CMT-U27 sågs i studien ha högre proliferativa och antiapoptotiska egenskaper då den visades ha kortare cellcykel, högre uttryck av det antiapoptotiska proteinet Bcl-2 och lägre antal celler som genomgick apoptos, jämfört med CMT-U309. När generna för den höga tillväxten hos celler från CMT-U27 kartlades visades överuttryckta gener vara inblandade i signaler nedströms från GHR, en signalväg forskarna menar är associerad med en ökad cellproliferation via aktivering av proteiner i STAT-familjen. Signalvägarna för den mer långsamt proliferande CMT-U309 visade sig vara mer beroende av signalvägar för TGF- β , neuroregulin 1 och adhesion.

Enligt en studie av van Garderen *et al.* (2001) i cellinjen CMT-U335 (ursprung från ett lågt differentierat osteosarkom) sågs administrering av GH ge en ökad dosberoende tyrosylfosforylering av Stat5A och Stat5B via GHR, vilket forskarna menar visar på en viktig roll för GH/GHR-systemet även *in vivo*. I motsats till ovan nämnda studiers resultat, som tytt på en koppling mellan proliferativt epitel och GH-uttryck, sågs en måttligt minskad proliferationshastighet hos CMT-U335-tumörceller vid administrering av GH. Detta ledde till att forskarna ifrågasatte GH-uttryckets betydelse för tumörprogression. Dock kunde det inte visas om denna minskade proliferation medieras av JAK/STAT-signalvägen.

Uttryck av tillväxthormonreceptorn

GH:s effekt i normal och tumöromvandlad juvervävnad beror på uttrycket av GHR i vävnaden (van Garderen *et al.*, 1999). Feldman *et al.* (1993) påvisade i en studie på råttor GH:s och GHR:s direkt stimulerande effekt på differentiering av juvret. Immunohistokemiska-analyser har visat diffus immunoreaktivitet för GHR i myoepiteliala celler och epitelceller i normala juvervävnadsprover från alla stadier av juverutvecklingen (van Garderen *et al.*, 1999). I sen lutealfas uppvisade icke-sekretoriskt alveolärt epitel immunoreaktivitet generellt, medan sekretoriskt alveolärt epitel uppvisade tydligt minskad eller fullständig förlust av immunoreaktivitet för GHR. Detta menar forskarna tyder på att GHR-uttrycket i alveolärt epitel enbart är nedreglerat vid fullständig differentiering.

Tumöromvandlad benign och malign juvervävnad uppvisade stark immunoreaktivitet för GHR oberoende av histopatologisk indelning. Carcinom skilde sig dock genom att uppvisa både immunopositiva och immunonegativa tumörceller. Medan GH-produktionen visades vara begränsad till epitelceller (van Garderen *et al.*, 1997), fann van Garderen *et al.* (1999) även GHR-uttryck i spindelceller. Resultaten menar forskarna indikerar både autokrin och parakrin funktion av GH lokalt i juvret.

För molekylär karaktärisering av GH-receptorn sekvenserades mRNA från juvervävnad och van Garderen *et al.* (1999) fann då både mRNA av hela GHR-genen, men även fyra andra GHR-mRNA med alternativ splicing. Dessa mRNA hade förlorat delar av eller hela exon 6-9 vilket gav upphov till förändringar i läsramen och introduktion av stoppkodon. Forskarna menar att dessa trunkerade GHR kan fungera som GH-bindande proteiner (GHBP) då de förlorat den transmembranbindande och cytoplasmatiske delen av receptorn och därmed inte kan binda till cellmembranet. I normal juvervävnad uppmättes en låg förekomst av mRNA med alternativ splicing, medan det inte kunde detekteras i de flesta maligna juvertumörerna. Däremot fann de uttryck av både hela GHR och tre alternativa transkript i osteosarkomcellinjen CMT-U335 (van Garderen *et al.*, 1999).

Insulinliknande tillväxtfaktor och juvertumörer

GH kan ha direkta effekter på perifer vävnad, men främst styrs de tillväxtbefrämjande effekterna av GH via IGF (Selman *et al.*, 1994b). IGF-I produceras vanligtvis i levern eller i perifer vävnad och progestininducerad produktion av lokalt GH i juvervävnad menar Mol *et al.* (1996) kan leda till lokal produktion av IGF-I. Detta styrks av två andra studier som fann att IGF-I i plasma ökar under en längre tid efter progestinbehandling och att nivåerna av GH och IGF-I är positivt korrelerade (Selman *et al.*, 1994b; Bhatti *et al.*, 2007). I en studie i juvertumörcellinjen CMT-U335 fann forskare en ökning av antalet celler på 140 % vid inkubering med IGF-I, vilket visar på att IGF-I har en mitogen aktivitet (Oosterlaken-Dijksterhuis *et al.*, 1999).

Queiroga *et al.* (2008) visade att IGF-I-nivåer var positivt korrelerade med malignitet och medelkoncentrationen var signifikant ($p < 0,05$) högre i maligna tumörer än i benigna. Koncentrationskillnaden mellan normal juvertvävnad och benigna tumörer var dock inte signifikant ($p < 0,05$). De tumörtyper med högst IGF-I-nivåer var carcinosarkom och solida carcinom och egenskaper som tillväxttakt, tumörstorlek, adherenser och hudulcerationer fanns vara positivt korrelerade med IGF-I-nivåer i maligna tumörer.

Uttryck av IGF-receptorn

Få studier har hittills utförts på uttrycket av IGF-IR i juvertumörer hos hund, men Dolka *et al.* (2011) visade att 67 % av tumörerna uttryckte IGF-IR i cancerceller. Högre uttryck av IGF-IR sågs också vid högre malignitet, såsom i solida och enkla carcinom, och ökat uttryck sågs i carcinom med högt PR-uttryck. IGF-IR var även positivt korrelerat till uttryck av de apoptotiska proteinerna p53 och Bax (Dolka *et al.*, 2011).

Lokalt syntetiserade IGF-bindande proteiner (IGFBP) har visats kunna reglera den tillväxtstimulerande effekten av IGF-I (Mol *et al.*, 1996). Fördelningen av IGFBP:s analyserades i cellinjen CMT-U335 och mRNA för IGFBP-4 och IGFBP-5 påvisades då med northern blotting och förekomst av IGFBP-2 och IGFBP-6 påvisades med western immunoblotting (Oosterlaken-Dijksterhuis *et al.*, 1999).

DISKUSSION

Frågeställningarna för litteraturstudien var hur progesteron, GH, IGF och deras receptorer påverkar utvecklingen av juvertumörer hos hund, samt om skillnader finns i uttryck mellan normal juvertvävnad, benigna respektive maligna tumörer. Litteraturstudien täcker inte detaljerade skillnader mellan olika juvertumörtyper. Dock kan det konstateras att flera studier har innefattat en hög andel carcinom och många av de resultat som presenteras här är därför baserade på tumörer av epitelialt ursprung. Detta är viktigt att poängtera eftersom viss skillnad har kunnat urskönjas i hormon- och receptoruttryck mellan celler av mesenkymalt och epitelialt ursprung, framförallt i PR-uttryck (Lantinga-van Leeuwen *et al.*, 2000; Gracanic *et al.*, 2012a).

Studier har visat att progestinbehandling ger en något högre risk att utveckla benigna juvertumörer, men ingen stark koppling till maligna tumörer har kunnat visas även om maligna tumörer har setts efter behandling i vissa fall (Misdorp, 1988; Mol *et al.*, 1995; Selman *et al.*, 1995). Progestiner har dock visats kunna inducera lokal överproduktion av GH i juvret som har en autonom karaktär då den inte kan stimuleras eller dämpas av varken GHRH eller somatostatins-analoger (Selman *et al.*, 1994b). GH kan ha direkta effekter, men styr främst tillväxtbefrämjande effekter via induktion av IGF (Selman *et al.*, 1994b) och både GH och IGF-I associeras i högre nivåer med juvertumörer av högre malignitetsgrad (Queiroga *et al.*, 2008). Resultaten visar på en lokal progesteron-GH-IGF-axel i juvret med högre induktion av GH samt IGF-I i maligna juvertumörer. Dessa skapar en tillväxtbefrämjande miljö som sedan inte kan hämmas, vilket tyder på att ett oberoende av den normala hormonregleringen utvecklas. Progestiners bidragande roll i utvecklingen av juvertumörer hos hund visar på dess mitogena effekt via GH och IGF-I, men inte på att progestiner direkt är mutagena. Forskare hävdar att

proliferativa celler är känsliga för mutagener och genom att skapa en proliferativ miljö i juvret kan progestiner därmed bidra till tumörutvecklingen (van Garderen *et al.*, 1997). Varje celldelning kan betraktas som en risk för att mutationer ska uppstå och i en miljö med högt antal celldelningar kan mutationer som leder till cancer lättare ackumuleras i cellerna.

Uttrycket av receptorer i juvertumörer verkar bero på hur långt gången sjukdomen är enligt resultaten från studierna som sammanfattats i litteraturöversikten. En hypotes som tidigt lades fram av Cikes (1978) är hur cancerceller kan undgå de tillväxtreglerande signalerna via ett ökat uttryck av receptorer, och på så sätt påverkas starkare även då koncentrationen cirkulerande hormon är låg. Studien av Rutterman *et al.* (1988) visade just ett signifikant högre uttryck av PR i benigna tumörer än i normalvävnad, högst i de benigna tumörer som utvecklades till maligna. I ett tidigt skede verkar alltså benigna tumörer vara beroende av progesteron för tillväxt. Dock förlorades genuttrycket av PR i de mest maligna tumörerna och metastaser sågs sällan uttrycka PR (Rutteman *et al.*, 1988; Lantinga-van Leeuwen *et al.*, 2000; de las Mulas *et al.*, 2005; Guil-Luna *et al.*, 2014b). Detta indikerar att i malign tumöromvandling hos hund sker en växling till ett oberoende av hormoner (Rutteman *et al.*, 1988).

Ökad produktion av hormoner, tillväxtfaktorer och deras receptorer i tumörerna kan i sin tur vara en möjlighet för att undkomma hormonberoendet, vilket flera studier också har visat förekommer i juvertumörer. Lantinga-van Leeuwen *et al.* (2000) menade att uttryck av PR i normal juvervävnad är ett krav för progestininducerat uttryck av GH. Mol *et al.* (1995) visade dock att detta inte var fallet för maligna carcinom eftersom celler som påvisades innehålla GH-mRNA var PR-negativa. Detta anser jag tyder på att GH-genen uttrycks progestinberoende efter malign transformering av juvervävnaden, även om det fanns variation mellan olika carcinom. Den normala nedregleringen av GHR i differentierat sekretoriskt epitel verkar inte heller ske vid tumöromvandling då både benigna och maligna tumörer uppvisade stark infärgning för GHR (van Garderen *et al.*, 1999). GH-produktion visades vara begränsad till epitelceller (van Garderen *et al.*, 1997), men van Garderen *et al.* (1999) fann även GHR-uttryck i mesenkymala spindelceller i tumörer. Detta indikerar enligt forskarna både en autokrin och en parakrin funktion av GH och GHR lokalt i juvret.

Varierande resultat har setts i flera studier och forskare har exempelvis funnit både PR-positiva och PR-negativa carcinom (Lantinga-van Leeuwen *et al.*, 2000; de las Mulas *et al.*, 2005). Dessa skillnader i resultat menar jag delvis beror på att olika metoder använts. Lantinga *et al.* (2000) och de las Mulas *et al.* (2005) analyserade specifik PR-infärgning av celler med immunohistokemi medan Rutterman *et al.* (1988) mätte koncentrationen av cytosoliskt protein i homogeniserad vävnad. Den senare metoden är ett kvantitativt bättre mått, men de påpekar i sin studie att normala epitelceller kan finnas insprängda i vissa tumörer och därmed vara en orsak till bias. Genom att rapportera de tumörer som histologiskt påvisats innehålla normala celler separat bör de dock ha undvikit större felaktigheter. Ytterligare orsaker till skillnader i resultat kan vara att små studiepopulationer använts eftersom avvikande resultat då får stora konsekvenser. I studien av Rutterman *et al.* (1988) är antalet prover inom vissa grupper lågt, exempelvis analyserades bara 6 metastaser och det står inte redovisat vilka tumörer metastaserna kommer ifrån, vilket gör det osäkert att dra generella slutsatser. Hela studien

inkluderar dock ett stort antal prover, över 130, och flera olika histologiska typer av tumörer. I studien av Lantinga-van Leeuwen *et al.* (2000) är antalet prover lågt inom vissa grupper och det framgår inte tydligt hur många prover som ingått i studien, vilket jag anser är en brist även om de redovisar vart de fått proverna ifrån och vad för typ av vävnad det är.

Uttrycket av PR-A har i nya studier visats dominera över PR-B i carcinom och var också högre jämfört med normal vävnad (Gracanin *et al.*, 2012a; Guil-Luna *et al.*, 2014b). Studier har även visat att hundens PR-B har en lägre transaktiveringsfunktion på målgener än människans PR-B, vilket kopplats till mutationer i AF3-domänen (Gracanin *et al.*, 2012b, 2014). Vid inkubering med progesteron sågs hos celler från cellinjen CNMm med human PR-B en ökad proliferation, medan det inte sågs alls hos celler med hundens PR-B (Gracanin *et al.*, 2014). Detta anser forskarna tyder på att PR-B saknar biologisk funktion hos hund. De visar även att mutationerna är unikt konserverade inom familjen hunddjur och jag anser att detta bör studeras vidare för att ta reda på om det är en av orsakerna till den höga förekomsten av juvertumörer hos hund.

En annan aspekt som är viktig att ta hänsyn till är lokaliseringen av PR-A respektive PR-B som diskuteras skilja sig åt. PR-A har påvisats främst i kärnan, medan PR-B har närvaro i både kärnan och i cytoplasman, och resultat indikerar att PR-B kan interagera med ER och signalvägarna för c-Src, Ras och MAP-kinas i cytoplasman (Ballaré *et al.*, 2003). Gracanin *et al.* (2014) har utfört sina studier i en cellinje som inte uttrycker ER, vilket andra forskare har visat behövs för cytoplasmatisk aktivering av PR-B. Därför kan inte en funktionell cytoplasmatisk roll för PR-B uteslutas och jag anser att denna möjlighet för signalering via PR-B behöver utredas mer för att kunna bevisa att den helt saknar funktion hos hund. Forskarna till studien varnar också själva att deras testsystem i cellinjen kan vara artificiellt. Heterodimerer av PR-A och PR-B har även visats kunna bildas (Mulac-Jericevic & Conneely, 2004) vilket jag tänker kan leda till ytterligare möjligheter för PR att påverka signalvägar i cellen. Därför hade det varit intressant att studera heterodimerer av PR-isoformerna i juvervävnaden hos hund.

Resultaten kring det varierande uttrycket av PR i juvervävnad och tumörer tillsammans med de nya resultaten att PR-A och PR-B har både gemensamma, men också skild påverkan på transkription av gener (Gracanin *et al.*, 2014) vilket jag anser visar på vikten av att analysera uttrycket av både PR-A och PR-B i juvervävnaden och inte enbart totalt PR innehåll. Studier av totalt PR-uttryck som presenterats visar också varierande nukleär och cytoplasmatisk infärgning av celler och detta skulle kunna spegla de olika isoformernas uttryck, men eftersom de inte särskiljs i dessa studier kan den aspekten inte analyseras. Forskning har även visat att isoformernas uttryck kan variera mellan olika juvertumörtyper och malignitetsgrad och därmed eventuellt påverka tumörutvecklingen i olika grad.

Forskare verkar oense om huruvida GH/GHR-systemet inducerar proliferation och differentiering eller enbart differentiering, som kan ha en skyddande effekt mot tumörutveckling. Normal juvervävnad uttrycker GH i proliferativt epitel, men har ett minskat uttryck av GH i differentierad vävnad (van Garderen *et al.*, 1997), vilket jag tolkar som ett tecken på att GH normalt kan ha en roll i proliferation och differentiering. Överuttryck av nedströms signalvägar för GHR visades i carcinomcellinjen CMT-U27 och forskarna anser att

detta är associerat med ökad cellproliferation via Stat-proteiner (Krol *et al.*, 2009). Den mer långsamt prolifererande spindelcellstumörcellinjen CMT-U309 hade inte ett överuttryck av GH-genen. I en studie i osteosarkomcellinjen CMT-U335 sågs dock en måttligt minskad proliferationshastighet vid inkubation med GH som forskarna menar kan tyda på att GH snarare inducerar differentiering i denna cellinje (van Garderen *et al.*, 2001). Tidigare redovisade resultat har visat ett högre uttryck av GH i epitelceller och carcinom (van Garderen *et al.*, 1997; Queiroga *et al.*, 2008) och jag anser att detta kan tyda på att olika celltyper reagerar olika på GH och att olika mutationer kan ligga bakom utvecklingen av juvertumörer. Jag anser därför att det är viktigt att se till vilken typ av cellinje som använts i studier och dess egenskaper för att kunna dra relevanta slutsatser.

Forskare spekulerar i att det uteblivna uttrycket av GHBP:s som visats i juvertumörer *in vivo* kan leda till ökad signalering av de intakta GH-receptorerna jämfört med normal juvertumör (Mol *et al.*, 1999; van Garderen *et al.*, 1999; van Garderen & Schalken, 2002). Detta eftersom GH då inte binds upp av GHBP:s och därmed finns högre koncentrationer av fritt GH som kan binda till GHR. Resultaten från osteosarkomcellinjen CMT-U335 visar dock att denna tumörtyp uttrycker tre olika GHBP:s (van Garderen *et al.*, 1999) och jag spekulerar därför i att olika uttryck av GHBP:s även skulle kunna vara en orsak till skillnaderna i GH:s proliferativa effekt funna mellan olika tumörtyper. IGFBP:s som funnits i cellinjen CMT-U335 (Oosterlaken-Dijksterhuis *et al.*, 1999) tros också vara viktiga modifierare av IGF-I:s tillväxtstimulerande effekter. Olika varianter av IGFBP verkar också ha olika funktioner, vilket visar på att det finns ännu fler regleringsnivåer som kan spela in i tumörutvecklingen (Mol *et al.*, 1996, 1999).

IGF-I och dess receptor är starkt kopplat till proliferation och GH har visats inducera IGF-I (Selman *et al.*, 1994b; Oosterlaken-Dijksterhuis *et al.*, 1999). Jag anser att det är troligt att induktionen av IGF-I sker genom att GH binder in till GHR vilket aktiverar Jak/Stat-signalvägen som i sin tur aktiverar IGF-I-genen i cellkärnan. De varierande resultaten kring GH:s proliferativa påverkan skulle därför kunna bero på skillnader i uttryck av IGF-IR i juvertumörer av olika ursprung, vilket är ett område som ännu inte undersökts utförligt hos hund. IGF-IR har dock setts uttryckas i högre mängd vid högre malignitet (Dolka *et al.*, 2011). Svaret på hur detta ökade uttryck sker har inte kunnat påvisas. De flesta forskare verkar utgå ifrån GH:s proliferativa effekt och den uppenbara kopplingen mellan GH och GHR-uttryck i maligna tumörer samt kopplingen till IGF-I och det ökade uttrycket av IGF-IR styrker dess roll i tumörutvecklingen. Trots det anser jag att de skilda resultaten visar på vikten av att ytterligare undersöka de signalvägar som GH aktiverar för att bekräfta detta.

IGF-IR-uttryck har visats vara positivt korrelerat till uttryck av de apoptotiska proteinerna p53 och Bax (Dolka *et al.*, 2011). Forskarna menar att det ökade IGF-IR-uttrycket i maligna tumörer kan vara förknippat med mutationer i p53-genen, som är en viktig tumörsuppressorgen, se Figur 2. Via sådana mutationer kan p53 ha förlorat sin funktion vilket leder till minskade proapoptotiska signaler för tumörcellerna som då kan överleva och fortsätta dela sig. I studien gjordes ingen analys av om en mutation i p53-genen förelåg och därför är det svårt att uttala sig om det verkligen är så, men eftersom mutationer i p53 är vanligt i många cancerformer anser jag att scenariot inte är helt otroligt.

De intracellulära signalvägarna för de olika receptorerna, se Figur 2, visar att GHR och IGF-IR är kopplade till cellproliferation, differentiering och överlevnad. Båda receptorerna kan aktivera MAP-kinaskaskaden och även PR diskuteras kunna aktivera MAP-kinas i cytoplasman (Ballaré *et al.*, 2003). De komplexa nätverken av signalvägar interagerar och kan både stimulera och inhibera varandra, men kopplingar mellan signalvägarna har inte i detalj kunnat utredas här. Mutationer i hundens PR-B är intressant ny kunskap och fler mutationer som ligger till grund för förändringar i signalvägarna finns troligtvis också. Kända proto-onkogener och tumörsuppressorgener finns i de signalvägar som tagits upp såsom p53, c-Src och Ras och mutationer i dessa är kopplat till ohämmad tillväxt och tumörutveckling. Forskning pågår för att förstå de komplexa sambanden och de störningar i funktion och uttryck av hormoner, receptorer och faktorer i signalvägarna som kan skapa den obalans som orsakar tumörutvecklingen i juvret.

Sammantaget anser jag att progesteron-GH-IGF-axeln verkar ha en stimulerande påverkan på juvertillväxten och att det finns en skillnad i uttryck av hormoner och receptorer i tumöromvandlad vävnad. Progestininducerad ökad produktion av GH inducerar i sin tur höga nivåer av IGF-I i benigna tumörer. I dessa har också ett ökat uttryck av PR visats, medan maligna tumörer verkar ha förlorat PR-uttrycket. Maligna tumörer av högre grad har dessutom ett ökat uttryck av GH och IGF-I samt GHR och IGF-IR, vilket jag anser tyder på att GH-genen blir progestinoberoende vid malign tumöromvandling. Juvvertillväxten stannar därmed inte av och involueras utan växer oberoende av det hormonella regleringssystemet. Detta sker troligt via en parakrin och autokrin produktion i tumörcellerna av GH och IGF-I, vilka binder till GHR och IGF-IR. Jag anser att de motstridiga resultaten kring GH/GHR-systemets proliferativa effekt i olika juvertumörtyper tyder på att det krävs ytterligare forskning kring kopplingen mellan olika signalvägar, hormoner och receptorer inblandade i utvecklingen av juvertumörer.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Ballaré, C., Uhrig, M., Bechtold, T., Sancho, E., Domenico, M. D., Migliaccio, A., Auricchio, F. & Beato, M. (2003). Two Domains of the Progesterone Receptor Interact with the Estrogen Receptor and Are Required for Progesterone Activation of the c-Src/Erk Pathway in Mammalian Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 23(6), pp 1994–2008.
- Bhatti, S. F. M., Rao, N. A. S., Okkens, A. C., Mol, J. A., Duchateau, L., Ducatelle, R., van den Ingh, T. S. G. A. M., Tshamala, M., Van Ham, L. M. L., Coryn, M., Rijnberk, A. & Kooistra, H. S. (2007). Role of progestin-induced mammary-derived growth hormone in the pathogenesis of cystic endometrial hyperplasia in the bitch. *Domestic Animal Endocrinology*, 33(3), pp 294–312.
- Cikes, M. (1978). Expression of Hormone Receptors in Cancer-Cells - Hypothesis. *European Journal of Cancer*, 14(3), pp 211–215.
- Concannon, P. W. (2009). Endocrinologic control of normal canine ovarian function. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 44 Suppl 2, pp 3–15.
- Dolka, I., Motyl, T., Malicka, R., Sapiernyński, E. & Fabisiak, M. (2011). Relationship between receptors for insulin-like growth factor- I, steroid hormones and apoptosis-associated proteins in canine mammary tumors. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 14(2), pp 245–251.
- Donnay, I., Rauis, J., Wouters-Ballman, P., Devleeschouwer, N., Leclercq, G. & Versteegen, J. P. (1993). Receptors for oestrogen, progesterone and epidermal growth factor in normal and

- tumorous canine mammary tissues. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 47, pp 501–512.
- Egenvall, A., Bonnett, B. N., Ohagen, P., Olson, P., Hedhammar, A. & von Euler, H. (2005). Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive Veterinary Medicine*, 69(1-2), pp 109–127.
- Feldman, M., Ruan, W., Cunningham, B. C., Wells, J. A. & Kleinberg, D. L. (1993). Evidence that the growth hormone receptor mediates differentiation and development of the mammary gland. *Endocrinology*, 133(4), pp 1602–1608.
- Van Garderen, E., van der Poel, H. J., Swennenhuis, J. F., Wissink, E. H., Rutteman, G. R., Hellmén, 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), pp 5907–5914.
- Van Garderen, E. & Schalken, J. A. (2002). Morphogenic and tumorigenic potentials of the mammary growth hormone/growth hormone receptor system. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 197(1-2), pp 153–165.
- Van Garderen, E., Swennenhuis, J. F., Hellmén, E. & Schalken, J. A. (2001). Growth hormone induces tyrosyl phosphorylation of the transcription factors Stat5a and Stat5b in CMT-U335 canine mammary tumor cells. *Domestic Animal Endocrinology*, 20(2), pp 123–135.
- 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. *The American Journal of Pathology*, 150(3), pp 1037–1047.
- Gracanin, A., de Gier, J., Zegers, K., Bominaar, M., Rutteman, G. R., Schaeffers-Okkens, A. C., Kooistra, H. S. & Mol, J. A. (2012a). Progesterone receptor isoforms in the mammary gland of cats and dogs. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 47 Suppl 6, pp 313–317.
- Gracanin, A., Voorwald, F. A., van Wolferen, M., Timmermans-Sprang, E. & Mol, J. A. (2014). Marginal activity of progesterone receptor B (PR-B) in dogs but high incidence of mammary cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 144 Pt B, pp 492–499.
- Gracanin, A., van Wolferen, M. E., Sartorius, C. A., Brenkman, A. B., Schoonen, W. G. & Mol, J. A. (2012b). Canid progesterone receptors lack activation function 3 domain-dependent activity. *Endocrinology*, 153(12), pp 6104–6113.
- Guil-Luna, S., Hellmén, E., Sánchez-Céspedes, R., Millán, Y. & Martín de las Mulas, J. (2014a). The antiprogesterins mifepristone and onapristone reduce cell proliferation in the canine mammary carcinoma cell line CMT-U27. *Histology and Histopathology*, 29(7), pp 949–955.
- Guil-Luna, S., Stenvang, J., Brünner, N., Sánchez-Céspedes, R., Millán, Y., Gómez-Laguna, J. & de las Mulas, J. M. (2014b). Progesterone receptor isoform analysis by quantitative real-time polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin-embedded canine mammary dysplasias and tumors. *Veterinary Pathology*, 51(5), pp 895–902.
- 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. *The EMBO journal*, 9(5), pp 1603–1614.
- Krol, M., Pawlowski, K. M., Skierski, J., Rao, N. a. S., Hellmen, E., Mol, J. A. & Motyl, T. (2009). Transcriptomic profile of two canine mammary cancer cell lines with different proliferative and anti-apoptotic potential. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 60 Suppl 1, pp 95–106.
- 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. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 75(4-5), pp 219–228.
- Misdorp, W. (1988). Canine mammary tumours: protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *The Veterinary Quarterly*, 10(1), pp 26–33.
- Misdorp, W., Else, R. W., Hellmén, E. & Lipscomb, T. P. (1999). *WHO Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat*. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology in cooperation with the American Registry of Pathology and The World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Referennse on Comparative Oncology. (Second). ISBN 1-881041-66-2.
- Mol, J. A., van Garderen, E., Rutteman, G. R. & Rijnberk, A. (1996). New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary glands of dogs, cats and humans. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 57(1-2), pp 67–71.
- 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. *The Journal of Clinical Investigation*, 95(5), pp 2028–2034.
- Mol, J. A., Lantinga-van Leeuwen, I. S., van Garderen, E., Selman, P. J., Oosterlaken-Dijksterhuis, M. A., Schalken, J. A. & Rijnberk, A. (1999). Mammary growth hormone and tumorigenesis-- lessons from the dog. *The Veterinary Quarterly*, 21(4), pp 111–115.
- Mulac-Jericevic, B. & Conneely, O. M. (2004). Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction (Cambridge, England)*, 128(2), pp 139–146.
- De las Mulas, J. M., Millán, 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. *Veterinary Pathology*, 42(2), pp 200–212.
- Nelson, L. W. & Kelly, W. A. (1976). Progestogen-related gross and microscopic changes in female Beagles. *Veterinary Pathology*, 13(2), pp 143–156.
- Oosterlaken-Dijksterhuis, M. A., Kwant, M. M., Slob, A., Hellmén, E. & Mol, J. A. (1999). IGF-I and retinoic acid regulate the distribution pattern of IGFBPs synthesized by the canine mammary tumor cell line CMT-U335. *Breast Cancer Research and Treatment*, 54(1), pp 11–23.
- Queiroga, F. L., Pérez-Alenza, M. D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C. S. & Illera, J. C. (2008). Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17beta-estradiol) in canine mammary tumours. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 110(1-2), pp 76–82.
- Rutteman, G. (1992). Contraceptive Steroids and the Mammary-Gland - Is There a Hazard - Insights from Animal Studies. *Breast Cancer Research and Treatment*, 23(1-2), pp 29–41.
- 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. *British Journal of Cancer*, 58(5), pp 594–599.
- Selman, P. J., van Garderen, E., Mol, J. A. & van den Ingh, T. S. (1995). Comparison of the histological changes in the dog after treatment with the progestins medroxyprogesterone acetate and proligestone. *The Veterinary Quarterly*, 17(4), pp 128–133.
- Selman, P. J., Mol, J. A., Rutteman, G. R., van Garderen, E. & Rijnberk, A. (1994a). Progestin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. *Endocrinology*, 134(1), pp 287–292.
- Selman, P. J., Mol, J. A., Rutteman, G. R. & Rijnberk, A. (1994b). Progestin treatment in the dog. I. Effects on growth hormone, insulin-like growth factor I and glucose homeostasis. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 131(4), pp 413–421.