

**AZ INTERLEUKIN-6 (IL-6) ÉS A
HISZTAMIN SZEREPE A
MELANOMA AUTOKRIN
SZABÁLYOZÁSÁBAN**

Lázárné Molnár Eszter

Doktori értekezés

Témavezető: Dr. Tóth Sára

**Készült a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és
Immunbiológiai Intézetében**

**Doktori iskola: A humán molekuláris genetika és a
géndiagnosztika alapjai**

Programvezető: Prof. Dr. Falus András

Budapest, 2002

TARTALOMJEGYZÉK

ÖSSZEFOGLALÁS	4
SUMMARY	5
BEVEZETÉS	6
CÉLKITŰZÉSEK	7
ELMÉLETI ÁTTEKINTÉS	7
A MELANOMA KIALAKULÁSA ÉS FEJLŐDÉSE	7
A melanocita vonal (lineage) sejtjeinek érése	7
A melanoma kialakulásában szerepet játszó tényezők	9
A metasztázis kialakulása	10
NÖVEKEDÉSI FAKTOROK SZEREPE A MELANOMA PROGRESSZIÓJÁBAN	11
A melanociták és melanoma sejtek növekedési faktor szükséglete	11
Melanocitákat szabályozó növekedési faktorok	11
Növekedési faktorok és receptorok expressziója melanoma sejtekben	13
<i>Autokrin növekedési faktorok</i>	15
<i>A melanoma növekedési faktorok parakrin hatásai</i>	17
MELANOMA ÉS AZ IMMUNVÁLASZ	19
A melanociták szerepe az immunválaszban	19
Melanoma antigének	20
Melanoma immunterápia	21
Tumor túlélési mechanizmusok	22
AZ INTERLEUKIN-6 (IL-6) SZEREPE MELANOMÁBAN	22
Az IL-6, mint tumorsejtek növekedési faktora	23
Az IL-6 szerepe a tumorelles immunválaszban	24
HISZTAMIN ÉS MELANOMA	25
A hisztamin, mint tumor sejtek növekedési faktora	25
Hisztamin receptorok	26
AZ INTERLEUKIN-6 (IL-6) ÉS A HISZTAMIN KÖLCSÖNHATÁSA	29
MÓDSZEREK	30
EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	34
A HISZTAMIN SZEREPE AZ AUTOKRIN IL-6 EXPRESSZIÓ SZABÁLYOZÁSÁBAN	34
IL-6, IL-6R és gp130 expresszió melanoma sejtekben	34
Hisztamin antagonisták hatása a melanoma sejtek IL-6 expressziójára	38
A HDC enzim gátlása α-fluoro-metil-hisztidinnel (α-FMH) csökkenti az.. 40	
IL-6 termelést	40
A HISZTAMIN KÖZVETLENÜL IS SZABÁLYOZZA A MELANOMA SEJTEK OSZTÓDÁSÁT	41
Hisztamin receptor expresszió melanoma sejtekben	41
Szekunder messengerek	43
A hisztamin szerepe a melanoma sejtek proliferációjában	47
IL-6 HATÁSA A MELANOMA SEJTEK HISZTAMIN TARTALMÁRA ÉS A HISZTAMIN RECEPTOR EXPRESSZIÓRA	49
Az IL-6 szerepe a melanoma sejtek proliferációjában	49

Az IL-6 hatása a melanoma sejtek HDC és hisztamin tartalmára	52
A interleukin-6 hatása a H1 és H2 receptor expresszióra.....	56
KÖVETKEZTETÉSEK.....	57
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	62
IRODALOM	63
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	70
PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	73

ÖSSZEFOGLALÁS

A malignus melanoma a melanocita sejtek kóros elváltozásából létrejövő fokozottan invazív tumor. A malignus transzformációt növekedési faktorok és citokinek fokozott expressziója kíséri, amelyek autokrin és parakrin hatásaikkal biztosítják a tumor korlátlan növekedését. Az interleukin-6 (IL-6) egy bifunkcionális szereppel bíró növekedési faktor melanomában, a tumor progressziótól függően gátolhatja vagy fokozhatja a melanoma sejtek osztódását. A hisztamin és az azt előállító hisztidin dekarboxiláz enzim (HDC) jelentős mennyiségben kimutatható a melanoma sejtekben és megfigyelték, hogy a hisztamin fokozza az IL-6 bioszintézist glioblastoma és B lymphoma sejtvonalakban.

Kísérleteinkben célul tűztük ki a hisztamin és az IL-6 közötti kétoldalú kölcsönhatások tanulmányozását eltérő metasztatikus képességű humán melanoma vonalakban, valamint a hisztamin receptorok közvetlen szerepének a vizsgálatát a melanoma sejtek osztódásának szabályozásában.

Eredményeink azt mutatják, hogy az endogén hisztaminnak szerepe van a metasztatikus melanoma sejtek autokrin IL-6 bioszintézisében, H1 receptoron keresztül fokozza a melanoma sejtek IL-6 szekrécióját, mivel a H1 antagonistá triprolidin szignifikánsan csökkentette az IL-6 termelést.

A hisztamin közvetlenül is szabályozza a melanoma sejtek osztódását: H2 receptoron cAMP növekedés és PKA aktiválás révén fokozza a proliferációt a WM35 primer melanoma sejtekben, nagyobb koncentrációban pedig H1 receptoron keresztül gátolja az osztódást mindegyik vizsgált melanoma vonalban.

További kísérleteinkben azt tanulmányoztuk, hogy az IL-6 kezelés hogyan hat a hisztamin és HDC szintre, valamint a H1 és H2 receptor expresszióra a WM35 primer melanoma vonalban, amelyben az IL-6 jelentős növekedés gátlást vált ki. Eredményeink azt bizonyítják, hogy az IL-6 antiproliferatív hatásában szerepe van az intracelluláris hisztamin tartalom megnövekedésének és a H1/H2 receptor arány megváltozásának a H1 receptorok javára, ami jelentős növekedés gátlást eredményez.

Eredményeink azt bizonyítják, hogy a hisztamin és az IL-6 közötti kétoldalú kölcsönhatások fontos szerepet játszanak a különböző stádiumban lévő melanoma sejtek növekedésének szabályozásában.

SUMMARY

Malignant melanoma cells can be characterized by progressive expression of growth factors and cytokines that enables extensive and autonomous tumor growth by their multiple autocrine and paracrine effects. Interleukin-6 (IL-6) is a bifunctional growth factor in malignant melanoma, it can either inhibit or stimulate proliferation of melanoma cells, depending on the tumor stage. Histamine is an important mediator of normal and malignant cell proliferation. Histamine and histidine decarboxylase enzyme (HDC) responsible for its synthesis have been detected in significant amounts in melanoma cells and it was also shown that histamine can enhance IL-6 biosynthesis in glioblastoma and B lymphoma cell lines.

In this work we investigated the reciprocal interactions between histamine and IL-6 in melanoma cells of different metastatic stage, as well as the direct role of histamine receptors in melanoma cell proliferation. We have found, that autocrine IL-6 biosynthesis of metastatic melanoma cells is enhanced by histamine through H1 receptor, since H1 antagonist inhibited IL-6 secretion. Histamine also regulated directly melanoma cell proliferation: stimulated growth through H2 receptor via cAMP and PKA pathway in the primary WM35 melanoma cells and inhibited proliferation of all the melanoma lines in higher concentration, mediated by H1 receptor.

Further we investigated the effect of IL-6 treatment on the histamine and HDC content as well as on H1 and H2 receptor expression in the WM35 primary melanoma cells that were significantly inhibited by IL-6 in proliferation assay. We suggest that the antiproliferative effect of IL-6 in melanoma is in part mediated by a local increase in intracellular histamine content and by a switch of the H1/H2 histamine receptor status towards H1 receptor predominance, resulting in an overall decrease of cell proliferation.

In conclusion, our results suggest that bilateral interactions between histamine and IL-6, as melanoma growth factors, have important role in growth regulation of melanoma cells of different stage.

BEVEZETÉS

A malignus melanoma (*melanoma malignum*) napjainkban egyre gyakrabban előforduló, fokozottan invazív bőrtumor típus, amely igen magas letalitást mutat elsősorban a kaukázusi populáció körében. A melanoma a melanocita sejtek kóros, rosszindulatú elváltozásából jön létre rendszerint halmozott UV fény expozíció hatására. A genetikailag transzformált sejtekben számos malignus tulajdonság jelenik meg, és hogyha átjutnak az immunrendszer szűrőjén gyors, megállíthatatlan osztódásnak indulnak.

A malignusan transzformált sejtek egyik fő jellegzetessége, hogy növekedési faktorokat és citokineket kezdenek expresszálni, amelyek csökkentik az immunválasz hatékonyságát és autokrin hatásukkal lehetővé teszik a tumor önálló növekedését. Ugyanakkor a tumor által termelt citokinek és növekedési faktorok szabályozó hatást fejtenek ki a tumor mikrokozonyezetét alkotó normál sejtekre: fibroblasztokra, keratinocitákra, endotél sejtekre, gyulladásban résztvevő sejtekre, amelyek válaszképpen a tumor növekedését és fejlődését segítő anyagokat termelnek.

Az interleukin-6 (IL-6) egy olyan pleiotróp citokin, amely sokoldalú hematológiai és immunológiai szerepe mellett fontos szerepet tölt be a melanoma sejtek osztódásának szabályozásában is. Az IL-6 egy bifunkcionális növekedési faktor malignus melanomában, ugyanis gátló hatású a melanocitákra és a primer jellegű melanoma sejtekre, de az előrehaladott metasztatikus sejtek rezisztenssé válnak a gátló hatással szemben, és az általuk termelt IL-6 autokrin módon fokozza az osztódásukat.

A hisztamin egy biogén amin, amely fontos szerepet játszik számos fiziológiai és patológiai folyamatban. Az utóbbi évek kutatásai bebizonyították, hogy a hisztamin jelen van osztódó sejtekben, szövetekben és úgy a normál (sebgyógyulás), mint a kóros (tumorok) sejtosztódásban fontos szabályozó szerepet tölt be. A hisztamin a sejtosztódásra gyakorolt közvetlen hatása mellett akut gyulladásos és allergiás reakciók fontos mediátora és szabályozza számos citokin illetve citokin receptor expresszióját. Ugyanakkor a hisztamin termelődése és különböző sejteken kifejtett hatása is más molekulák, citokinek szabályozó hatása alatt áll. Normál (makrofág, endotél, keratinocita), valamint tumorosan transzformált (glioblastoma, astrocytoma, B lymphoma) sejtekben is leírták, hogy a hisztamin fokozza az IL-6 bioszintézisét.

CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink során az IL-6 és a hisztamin szabályozó szerepét vizsgáltuk különböző metasztatikus állapotú humán melanoma sejtek növekedésében. Legfontosabb kérdéseink a következők voltak:

Hogyan befolyásolja a hisztamin a melanoma sejtek autokrin IL-6 termelését?

Milyen közvetlen szerepe van a hisztaminnak a melanoma sejtek osztódásában, milyen receptorok és milyen jelátviteli utak vesznek ebben részt?

Hogyan hat az IL-6 a melanoma sejtek hisztamin és HDC tartalmára, és hogyan befolyásolja a H1 és H2 hisztamin receptor expressziót?

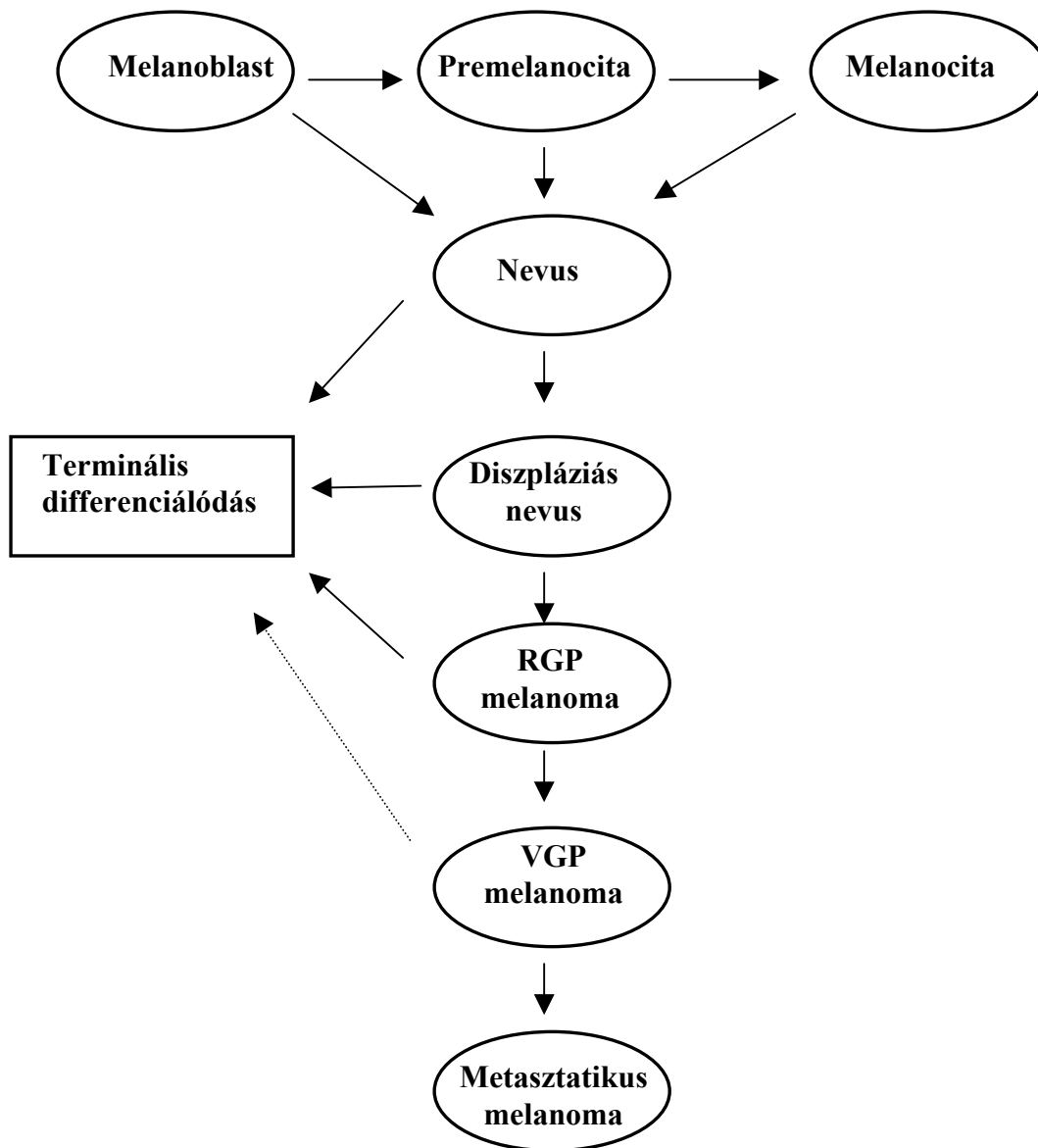
ELMÉLETI ÁTTEKINTÉS

A MELANOMA KIALAKULÁSA ÉS FEJLŐDÉSE

A malignus melanoma a melanocita sejtek kóros elváltozásából jön létre. A melanocita vonal (lineage) sejteinek érése több lépésben történik és vezethet tumoros transzformációhoz valamilyen karcinogén tényező hatására. A kialakult primer melanoma gyors növekedésnek indul, és áttéteket alakíthat ki a szervezet más szöveteiben, miközben hatékonyan kijátssza az immunrendszer tumorelles reakcióit.

A melanocita vonal (lineage) sejtjeinek érése

A melanocita jellegű sejtek a velőcsőből származnak, melanocita előalakok nagyon kis számban jelen vannak a bőrben. Funkcionális érésük és átalakulásuk több lépésben történik, jól elkülöníthető genetikai, immunológiai és klinikai jellemzők alapján (**1. ábra**). A közönséges szerzett nevus (common acquired nevus) a legkorábbi melanocita hiperplázia, amely érett melanociták hálózatából épül fel. Ettől eltérően a diszpláziás nevus szerkezeti, citológiai és morfológiai szempontból eltérő, és hisztogenetikailag a melanoma prekursorának tekinthető.



1. ábra. A melanocita vonal (lineage) sejtjeinek érése. RGP: radial growth primary melanoma, sugárirányban növekvő primer melanoma; VGP: vertical growth primary melanoma, függőleges irányban növekvő primer melanoma.

Az első malignus lépés a melanocitaérés során a radiális növekedésű (radial growth phase, RGP) primer melanoma megjelenése, amelyet önálló növekedés és helyi beszűrődés jellemez, de nincs metasztatikus aktivitása. A vertikális növekedésű (vertical growth phase, VGP) primer melanoma fokozottabban malignus, gyorsabban növekszik

és nagyobb valószínűséggel szóródhat. A metasztatikus melanoma a tumor kialakulásának utolsó lépése (82). A nevus sejtek illetve a primer melanoma sejtek esetenként differenciálódhatnak nem malignus, Schwann jellegű sejtekké, a differenciálódásra való képesség a tumor progresszióval csökken, illetve eltűnik.

A melanoma kialakulásában szerepet játszó tényezők

A malignus melanoma kialakulását elősegítő karcinogén hatások között elsősorban az UV sugárzást kell megemlítenünk. A melanoma kialakulásában feltehetően a 290-320 nm közé eső, UVB sugárzás játszik szerepet, az egyéni kockázati tényező a gyerekkorban elszenvedett, intermittens UV hiperexpozícióval arányos. Az UVB sugárzás genotoxikus hatása következtében a besugárzott DNS-en kémiai módosulás következtében pirimidin dimerizáció, ritkábban timin glikolok, DNS szál törések vagy DNS-fehérje keresztkötések jönnek létre (27).

Az UV sugárzás genotoxikus hatásának a kivédését enzimszisztemek biztosítják, amelyek felismerik, eltávolítják és kijavítják az UV fény által károsított DNS szekvenciát. A javító enzimszisztemek hibás vagy elégtelen működése genomikus instabilitást, a sejtciklus szabályozásának a felborulását vonhatja maga után, elősegítve a malignus transzformációt (80).

Karcinogén hatásai mellett az UV expozíció immunszuppresszív tényezőként is elősegítheti a tumor kialakulását. A bőrben található fotoreceptorok közül a transzurokánsav (deaminált L-hisztidin) UV sugárzás hatására cisz-urokánsavvá alakul és csökkenti a hatékony antigén prezentációt (16). Ugyanakkor az UV expozíció aktiválja a CD4⁺ limfociták FasL-mediált pusztító hatását az antigén prezentáló sejtek ellen, másrészt az UV sugárzás hatására a bőrben fokozódik a TNF- α , IL-1 α és β , IL-1Ra és IL-10 termelés, csökken az antigén prezentáció, fokozott lokális és szisztémás immunszuppresszív hatást eredményezve (2).

A bőrben található hízósejtek mediátorai alapvető szerepet játszanak az UVB indukált immunszuppresszióban. Különböző egértörzsekben megfigyelték, hogy a kontakt hiperszenzitivitás (CHS) UVB-indukált gátlásának mértéke összefüggést mutat a bőrben található hízósejtek számával. Hízósejt hiányos W^f/W^f egerekben az UVB önmagában nem csökkentette a szisztémás CHS tüneteit, csak akkor, ha vad típusú

hízósejteket ültettek vissza az egerek bőrébe. Ezzel szemben a hisztamin, amely a hízósejtek legfontosabb mediátora, szignifikánsan gátolta a CHS tüneteit (33).

A metasztázis kialakulása

A metasztázis kialakulása egy összetett folyamat, melynek során a tumorsejtek elhagyják az elsődleges tumor helyét, a vér- illetve nyirokerekhez vándorolnak, belépnek a keringésbe és végül valamilyen távoli szövetben megtelepedve új tumorokat hoznak létre. A metasztázis kialakulására jellemző a felszíni adhézions molekula mintázat átrendeződése: csökken a sejt-sejt kölcsönhatásban részt vevő molekulák (pl. kadherine) expressziója és egyidejűleg megnő az integrinek által közvetített sejt-mátrix kölcsönhatások száma. Ezeknek a folyamatoknak az eredményeképpen fokozódik a sejtek migrációs képessége, amit tovább növel az extracelluláris mátrix (ECM) összetevőinek lebontását végző mátrix metalloproteázok és szerin proteázok fokozott termelődése. Ugyanakkor a növekvő tumor vérellátásának biztosítására beindul a lokális angiogenezis folyamata, a tumor által termelt növekedési faktorok és citokinek a környező sejtekre hatva elősegítik az új erek kialakulását (46).

A tumor progresszió egyes stádiumai elkülöníthetők bizonyos fenotípusos jellegek alapján, mint pl. kromoszóma rendellenességek, tumor specifikus membrán antigének jelenléte, külső növekedési faktor szükséglet, növedési faktorok és receptorok expressziója (79).

Az utóbbi időben jelentős előrelépések történtek a malignus melanoma onkogenomikai jellemzésében, cDNS microarray-k használatával lehetővé válik az egyes altípusok molekuláris osztályozása a génexpressziós vizsgálat matematikai feldolgozásával (4). A génexpressziós mintázat vizsgálata cDNS array vagy differential display módszerrel lehetővé teszi a tumor progresszió, a metasztázis molekuláris történéseinek nyomkövetését, és nem utolsósorban a megfelelő terápia beállítását is (96, 10).

Növekedési faktorok szerepe a melanoma progressiójában

A melanociták és melanoma sejtek növekedési faktor szükséglete

Különböző stádiumban levő melanoma tumorokból izolált sejtek *in vitro* vizsgálatával pontosan meghatározhatók az eltérő stádiumban levő melanocita léziók tenyésztési feltételei. A melanoma sejtek és melanociták exogén növekedési faktor szükségletét az **1. táblázatban** foglaltuk össze (28).

1. táblázat. A tumor progresszió különböző fázisaiból izolált sejtek *in vitro* tenyésztéséhez szükséges növekedési faktorok és más mitogének.

Normál melanociták	Nevus sejtek	Primer melanomák	Metasztatikus melanomák	
			Korai és közepes	Késői
Inzulin vagy IGF-I	Inzulin vagy IGF-I	Inzulin vagy IGF-I	Inzulin vagy IGF-I*	-
α -MSH	α -MSH	-	-	-
bFGF	bFGF*	-	-	-
TPA	TPA*	-	-	-

* = kevésbé igényelt; IGF-I = Inzulinhoz hasonló növekedési faktor I; α -MSH = α - melanocita stimuláló hormon; bFGF = Bázikus fibroblaszt növekedési faktor; TPA = 12-O-tetradekanoil-forbol-13-acetát.

Melanocitákat szabályozó növekedési faktorok

A melanociták a mikrokozonyzetük által biztosított növekedési faktorokkal szoros függőségi viszonyban állnak, mivel saját növekedési faktor expressziójuk korlátozott. Leggyakrabban a TGF- β és az SCF transzkriptuma mutatható ki

melanocitákban és nevusokban, receptor szignálként pedig az EGFR, FGFR, NGFRp70 és a c-kit mRNS-eket detektálták. Immunhisztokémiával szövetmintákban kimutatták kis mennyiségben a TNF- α -t, IL-8-t és TNF- β -t is. A növekedési faktor és receptor együttes expressziója nem jellemző a nevusokra, kivételt képez a TNF- α , TGF- β , GM-CSF és SCF, és ezek többnyire növekedést gátló jeleket közvetítenek (64).

A melanociták funkcióit szabályozó növekedési faktorokat a **2. táblázatban** foglaltuk össze.

2. táblázat. A normál melanociták funkcióit befolyásoló szolubilis faktorok.

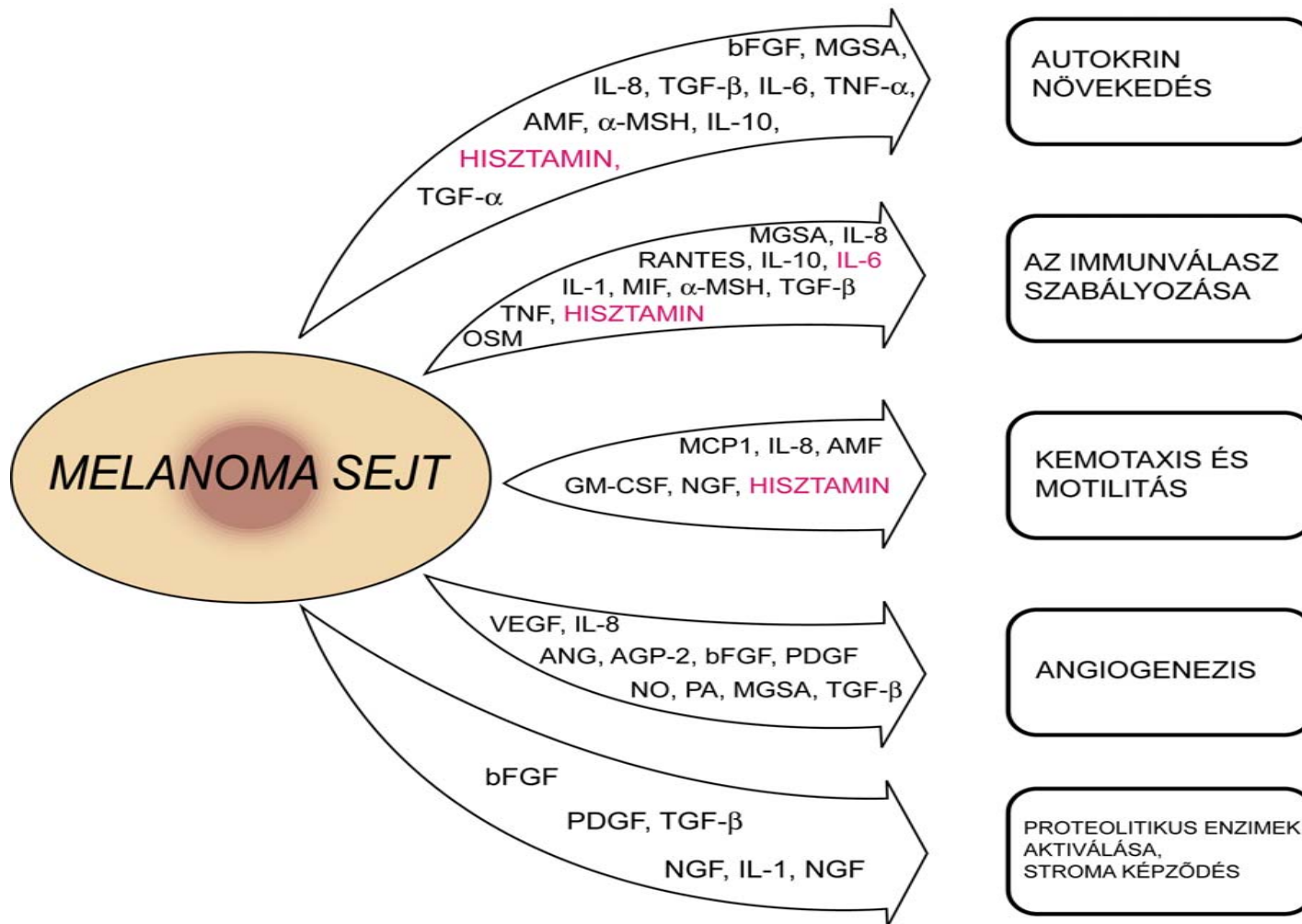
Faktor	Funkció	A faktort termelő sejtek	Referencia
α -MSH	melanogenezist stimulál	agyalapi mirigy, endotél sejtek, monociták, keratinociták*	90
ET-1	- a melanocita proliferációt fokozza ET B receptoron, az α -MSH-val szinergikusan - migrációt szabályozza - melanogenezist stimulálja 1nM alatt, gátolja nagyobb koncentrációban, - α -MSH receptor expressziót növel.	keratinociták	88
bFGF	- melanocita proliferációt stimulál, - migrációt szabályoz	keratinociták, fibroblasztok, monociták, endotél sejtek	32, 37
HGF	- elősegíti a melanocita prekursorok túlélését, proliferációját, differenciálódását, melanocitózist okoz - E-cadherint down-regulál, a melanociták dermális lokalizációját elősegíti	fibroblasztok, monociták	45
TNF α	- melanogenezist mRNS és enzimatisz szinten gátol - proliferációt gátol	monociták, makrofágok, limfociták	55
SCF	- melanocita túlélést, migrációt, UVB-indukált pigmentációt elősegíti	epidermisz sejtek (keratinociták, fibroblasztok)	30

Faktor	Funkció	A faktort termelő sejtek	Referencia
IGF-1	- növekedés fokozás	limfociták	18
GH	- növekedést fokozó hatása szinergikus az IGF-1 és bFGF hatásával	agyalapi mirigy	18
TGF-α	melanocita migráció fokozása	keratinociták, monociták	62
LTC4	melanocita migráció fokozása		62
TGF-β1	proliferáció gátlása	endotél sejtek	44
IL-1α	proliferáció és melanogenezis gátlása	fibroblasztok, keratinociták, stb.	87
IL-6	proliferáció és melanogenezis gátlása	fibroblasztok, stb.	87
Hisztamin	- tirozináz aktivitás növelése, melanogenezis indukció H2 receptoron PKA aktiválással	elsősorban hízósejtek	102

* α -MSH-val analóg hatású proopiomelanocortin (POMC) peptideket, így ACTH-t is termelnek UV fény hatására, ezek ugyancsak MC-1 receptoron stimulálják a melanogenezist.

Növekedési faktorok és receptorok expressziója melanoma sejtekben

A melanoma sejtek növekedési előnyre tesznek szert azért, hogy autokrin és parakrin növekedési faktorokat és citokineket termelnek külső mitogén faktorok hiányában is (**2. ábra**). Számos növekedési faktor és receptor expressziója szorosan összefügg a tumor progressziójával.



2. ábra. A melanoma sejtek által termelt növekedési faktorok autokrin és parakrin hatásai.

Autokrin növekedési faktorok

A tumorsejt által termelt autokrin növekedési faktorok (bFGF, MGSA, IL-8, IL-6 stb) a tumorsejt által szintén expresszált receptorukhoz kötődve legtöbbször mitogén hatást eredményező jelátviteli kaszkádot indítanak el (85). Külső hatások, pl. gyulladáshoz vezető mediátorok fokozhatják az autokrin növekedési faktorok termelődését, így az IL-6 expresszió fokozódását észlelték humán melanoma vonalakban IL-1 β , TNF- α vagy PMA hatására (47).

Egyes növekedési faktorok a melanociták, illetve a korai stádiumú melanoma sejtek növekedését parakrin módon gátolják, míg a későbbi stádiumú melanoma sejtekben rezisztencia alakul ki a gátló hatással szemben, és az általuk termelt növekedési faktor autokrin módon serkenti az osztódásukat. Ezt a jelenséget megfigyelték az IL-6, az onkosztatin M (OSM) és a TGF- β esetén is (51, 77).

A **bázikus fibroblaszt növekedési faktor (bFGF)** a leggyakoribb autokrin növekedési faktor melanoma sejtekben, normál melanocitákban nem expresszálódik. A bFGF autokrin termelődése összefügg a c-MYC proto-onkogén expressziójával (57). A bFGF elsősorban a nagy affinitású FGF-R1-en fejti ki mitogén hatását, mivel a csonka, intracelluláris kináz doménnel nem rendelkező FGF-R1-el transzfektált melanoma sejtek in vitro proliferációja és túlélése, valamint az in vivo tumorképző képessége is nagymértékben lecsökken, valószínűleg az Src kináz család inaktivációja miatt (101). Az autokrin bFGF termelés növekedési autonómiához vezet, de nem elégséges a teljes malignus fenotípus kialakulásához, ezt bizonyítja, hogy a bFGF cDNS-sel transzfektált egér melanociták, habár fokozott bFGF termelés és autonóm növekedés jellemzi őket, nem képesek tumorépzésre, ha nude egérbe ültetik őket (17).

A **TGF- α (transzformáló növekedési faktor α)** termelődése melanomában tumorspecifikus jelenség, a normál melanociták csak UV besugárzás hatására képesek TGF- α termelésre. A TGF- α sejtproliferációt aktiváló hatását közvetítő EGF receptor expressziója szoros összefüggésben van a melanoma progresszióval (78).

A **TGF- β (transzformáló növekedési faktor β)** gátolja a normál melanociták osztódását, a melanoma sejtek viszont kevésbé érzékenyek vagy rezisztensek a gátló hatással szemben, sőt a TGF- β autokrin stimuláló tényezővé válhat előrehaladott

malignus melanomában. A TGF- β fehérje *in situ* vizsgált expressziója összefügg a TGF- β III típusú receptor, valamint a Ki67 proliferációs marker, a HLA-DR és a β 3 integrin alegység expressziójával, tehát a TGF- β fehérje a melanoma metasztatikus progressziójának a biológiai markere lehet (63).

Az **MGSA (melanoma növekedést stimuláló aktivitás)** vagy **GRO α** (növekedést szabályozó fehérje) CXC családba tartozó kemokin, amelyet a Hs294T humán melanoma vonal felülűszojából izoláltak először (76). Melanocitákban és nevus sejtekben nem mutatható ki, folyamatos expresszáltatása immortalizált egér melanocitákban 100%-ban tumoros transzformációhoz vezetett. Hogyha az MGSA-t overexpresszáló, transzformált melanocita sejteket SCID egérbe ültették, a tumorok kialakulása szignifikánsan gátolható volt MGSA antitest kezeléssel (53).

Az ugyancsak CXC kemokin családba tartozó **IL-8** expressziója összefügg a melanoma sejtek metasztatikus képességével. Az IL-8 mRNS ellen készített antiszenz oligonukleotid dóziszfüggően gátolta a sejtproliferációt, a kolóniaképződést agarban, valamint az IL-8 szekréciót melanoma sejtekben. Az oligomerek megvonásával a hatás reverzibilis volt (81). Az autokrin IL-8 expressziót fokozza az exogén IL-1 α és a TNF- α (104).

Az **IL-10** nagy mennyiségben mutatható ki előrehaladott melanomás betegek szérumában és a melanoma vonalak jelentős részében. Az IL-10 receptort expresszáló melanoma vonalakban IL-10 hatására csökkent az MHCI, MHCII és ICAM-1 expresszió, de fokozódott a sejtproliferáció, anti-IL-10 antitest viszont gátolta a melanoma sejtek osztódását (103). A melanoma sejtek által termelt IL-10 a tumor ellenes immunválasz gátlásával is segíti a melanoma sejtek növekedését, melanoma felülűszo, valamint rekombináns IL-10 egyaránt csökkentette a kevert limfocita reakciót (MLR), valamint a TNF- α , γ -IFN és IL-2 termelést perifériás limfocita tenyészetben (8).

Az agyalapi mirigy által termelt **α -melanotropin (α -MSH, melanocita stimuláló hormon)** kis mennyiségben egyéb szövetekben, így melanomában is termelődik, fontos szabályozója a melanocita eredetű sejteknek. A melanoma sejtek által is expresszált melanokortin-1 receptoron (MC1-R) hatva autokrin módon szabályozza a növekedést, differenciálódást és a melanogenezist, fokozza a melanizációért felelős tirozináz enzim expresszióját (50).

Az **autokrin motilitás faktor (AMF)** metasztatikus melanoma sejtek által termelt citokin, amely sejtfelszíni receptorához (gp78) kötődve fokozza a termelő sejt random és irányított migrációját. Az AMF receptor expressziója arányos a melanoma metasztatikus képességével és a tumor klinikai stádiumával (67).

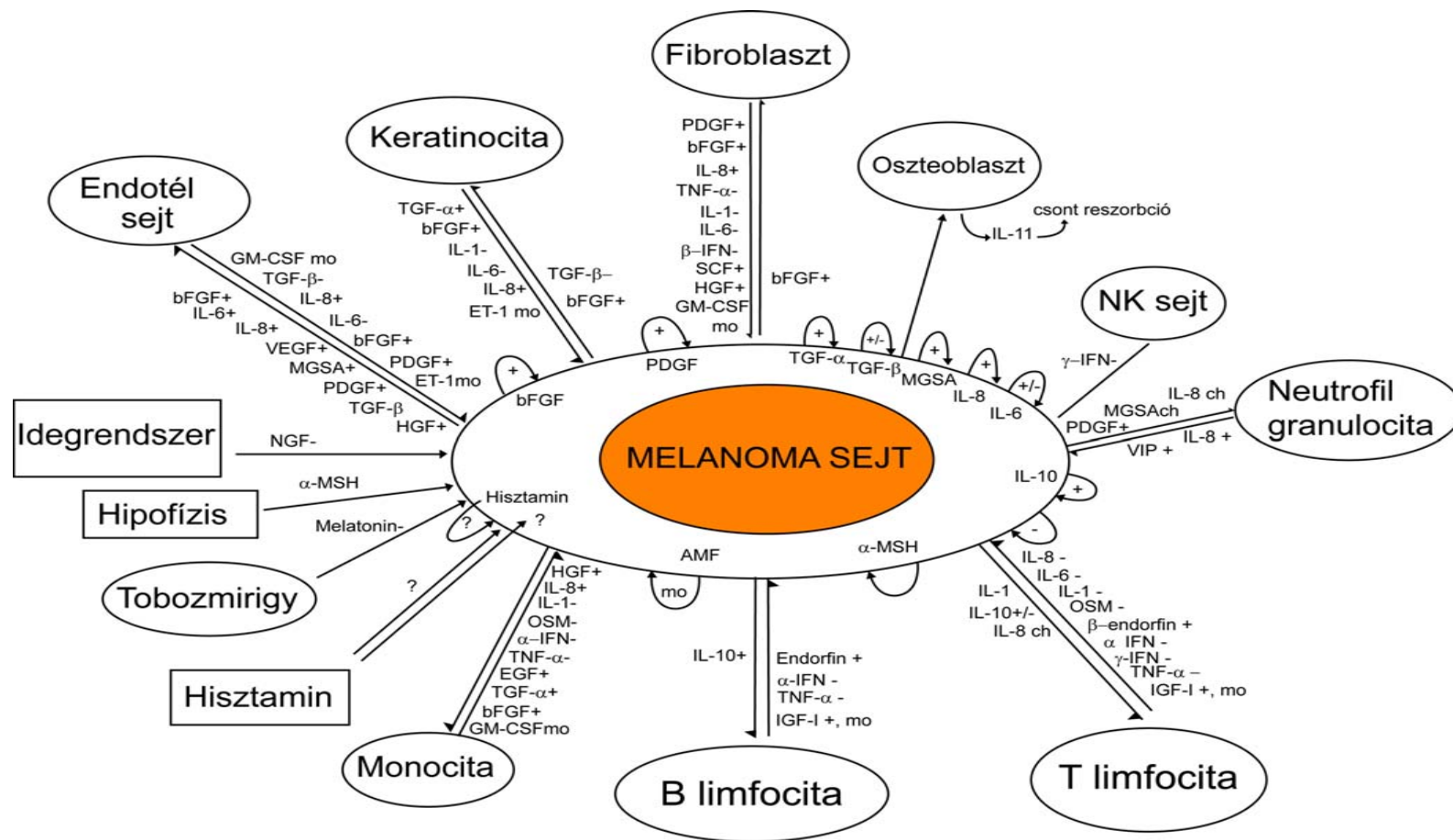
A melanoma sejtek növekedését gátolja a **MIA (melanoma inhibitory activity, melanoma gátló tényező)**, amely lassítja a G1-ből az S fázisba való átmenetet, az S fázist magát és megállítja a sejtciklust a G2 fázisban. Malignus melanoma esetén nagy mennyiségben mutatható ki a szérumban, ezért klinikai tumor markerként is használható, mivel normál melanociták nem termelik (5).

A melanoma sejtek növekedését gátló faktorok közül megemlíthetjük az IL-1-t és az aktivált humán T limfociták által termelt onkosztatin M (OSM)-t, amelyek jelentős antiproliferatív hatással rendelkeznek, de a melanoma progresszió során rezisztencia alakul ki (6, 73). Az IL-1 rezisztens sejtvonalakban kimutatható az endogén IL-1 expresszió, valamint az autokrin IL-6 termelés fokozódása (1).

A melanoma növekedési faktorok parakrin hatásai

A melanoma sejtek által termelt növekedési faktorok a mikro környezetükben található sejtek: keratinociták, fibroblasztok, monociták, endotélek, limfociták, granulociták funkcióira is hatással vannak. A környező sejtek is számos aktiváló (IGF-I, PDGF, Scatter faktor, proteolitikus enzimek) vagy gátló (IL-1, IL-6, OSM, TGF- β , interferonok, TNF) faktort termelnek, amelyek segíthetik a tumor növekedését angiogenetikus hatásukkal, az immunrendszer gátlásával, fokozhatják a motilitást, adhéziót, elősegítve a metasztázis képződést vagy akár gátolhatják a tumort és differenciálódáshoz vezethetnek. A melanoma sejtek és a környező sejtek közötti kölcsönhatásokat a **3. ábrán** tüntettük fel.

Az **angiogenesis** folyamata alapvető fontosságú a tumor növekedésében egy kritikus méret fölött, mivel az újonnan képződött kapillárisok látják el a tumorsejteket



3. ábra. A melanoma sejtek autokrin és parakrin szabályozása. (+ = növekedés fokozása, - = növekedés gátlása, mo = motilitási faktor, ch = kemotaktikus faktor).

tápanyaggal és lehetővé teszik a tumorsejtek keringésbe jutását, terjedését. A **vaszkuláris endotél növekedési faktor (VEGF)** mitogén és érpermeabilitást fokozó hatással rendelkezik. Melanocitákban nem mutatható ki, expressziója összefügg a melanoma malignus progressziójával. Az endogén VEGF expresszió csökkentése antiszenz stratégiával jelentősen gátolta a tumor növekedését intracerebrális humán melanoma xenograftokban (72). Szintén fokozottan angiogenetikus és mitogén hatású a **bFGF**. bFGF vagy FGFR1 antiszenz cDNS-sel transzfektált melanoma sejteket nude egérbe ültetve a tumorok regresszáltak az angiogenezis gátlása és az ezt követő nekrozis miatt (97). A bFGF angiogenetikus hatását fokozza a **TGF- β** , amely önmagában is felgyorsítja új kapillárisok kialakulását (63). A tumort infiltráló aktivált makrofágok stimulálhatják a melanoma sejtek angiogenetikus faktorainak a termelődését, fokozva ez által a metasztázisra való képességet (93).

A melanoma sejtek által termelt növekedési faktorok parakrin hatásai között fontos szerepe van a **proteolitikus enzimek aktiválásának és a stróma képződésnek**. Extracelluláris degeneratív enzimek, elsősorban mátrix metalloproteázok és szerin proteázok termelésével a tumor sejt az extracelluláris mátrix (ECM) elemeinek a feloldásával fokozott invazivitásra tesz szert. A melanoma sejtek által termelt bFGF aktiválja az urokinázt és a szöveti plazminogén aktivátort, ugyanakkor fokozza a IV-es típusú kollagenáz szintézisét is (12). A PDGF elősegíti a glükózaminoglikán szintézist a környező fibroblasztokban, hialuronátban gazdag mátrix kialakulását eredményezve (26).

Melanoma és az immunválasz

A melanociták szerepe az immunválaszban

A melanociták fontos szerepet töltenek be az immunválaszban. Egyrészt citokineket (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β , GM-CSF in vitro), valamint NO-t termelnek, elősegítve az antigénprezentáló sejtek (APC), így a Langerhans sejtek érését és vándorlását a bőrben. Másrészt a melanociták maguk is képesek fagocitózisra, az antigén lebontására és prezentálására. A folyamatban a melanociták által expresszált kostimulációs molekulák, mint pl. ICAM-1 és LFA-3 is részt vesznek. Azok az

antigének, amelyek nem kerülnek feldolgozásra, átadódnak a szomszédos sejteknek a melanocitákra specifikus melanoszóma organelum transzferrel (14).

Melanoma antigének

A tumor sejtekben megjelenő tumor-specifikus illetve tumorhoz asszociált antigének az immunrendszer celluláris és/vagy humorális effektor mechanizmusait aktiválhatják. A melanoma sejtekben eddig azonosított antigének több csoportba sorolhatók (40).

Az első csoportba azok az antigének tartoznak, amelyek **genetikai módosulás vagy alternatív/atípusos transzkriptum megjelenése** következtében jöttek létre. *Pontmutációk* következtében gyakran egyedi, tumorspecifikus antigének keletkeznek, így pl. a sejtciklus szabályozásában szerepet játszó ciklinfüggő CDK4 kináz fehérje mutációja jellemző bizonyos melanoma sejtekre. A triózfoszfát izomeráz enzim mutációja fokozott CD4+ T sejt aktiválást kiváltó peptid kialakulását eredményezi. Melanomában gyakori a sejtciklust gátló p53 fehérje többféle mutációja, melynek következtében eltérő p53 peptidek jelenhetnek meg. Familiáris melanomában gyakori a p16 mutáció vagy deléció, amely kemorezisztenciát, illetve irradiációs rezisztenciát okozhat. Melanoma sejtekben gyakori az egyik ECM-t alkotó proteoglikán, a decorin ektópiás expressziója, valamint a CD44v3 heparán szulfát splice variáns vagy egyes trombocita integrinek (α IIb β 3) megjelenése metasztatikus stádiumban (92).

Kimutatták, hogy tumorsejtekben az immunrendszer hatékonyan felismeri az alternatív transzkripcióval létrejött epitópokat és a pszeudogénről vagy antiszenz DNS-ről átírt géntermékeket is.

A „**rák-here**” („**cancer-testis**”) **antigének** tumorokban és fiziológiásan kizárólag az MHC-hiányos hereszövetben expresszálódnak. Ide tartozik a melanoma antigén gén családja (MAGE) amelyeknek emberben 23 tagját írták le (24). Míg az előbbi antigéneket a CD8+ T sejtek ismerik fel, a szintén ebbe a csoportba tartozó NY-ESO-1 antigén specifikus ellenanyag termelést és CD4+ T sejt aktivációt is kiválthat (40).

A **melanocita differenciálódási antigének** a melanocita jellegű sejtekben, a melanocita/melanoma differenciálódás szakaszaiban expresszálódnak. Ebbe a csoportba

tartozik a tirozináz/tirozin hidroxiláz, amely a melaninszintézis fontos szabályozója, a gp100/Pmel17, MART-1/Melan-A, valamint melanoszóma membrán fehérjék, mint pl. tirozináz-függő fehérje-1 és 2 (TRP-1/gp75, TRP-2). A differenciálódási antigéneket autoreaktív CD8+ T sejtek és/vagy autoantitestek ismerik fel melanomás betegekben.

Melanoma immunterápia

A celluláris és humorális effektorok által felismert tumor antigének azonosítása új lehetőségeket tár fel a daganat immunterápia számára. Számos klinikai vizsgálat van folyamatban specifikus tumor antigén peptidekkel történő vakcinák alkalmazásával, amelyek a páciensbe juttatva specifikus immunválaszt váltanak ki, elsősorban DTH-t és CD8+ T sejt választ, tumor regressziót eredményezve. Kedvező eredmények vannak a jelenleg ismert legnagyobb immunogenitású, „rák-here” csoportba tartozó NY-ESO-1 antigén peptidjeivel történő immunizálással melanomás betegekben (42). A CD8+ T sejt aktiválás mellett antitest válasz is megjelenik, ami arra utal, hogy a CD4+ T sejtek is aktiválódnak a tumor sejt felszínén MHCII segítségével prezentált epitópok ellen.

A terápiás hatékonyságot fokozza olyan adjuvánsok használata, amelyek kostimulációs faktorokat aktiválnak, illetve T sejt stimuláló citokinek szekrécióját fokozzák. A GM-CSF tartós Th1 és CD8+ T sejt választ indukál a dendritikus sejtek hatékony aktiválásával. Az IL-2 és IL-12 hatékonyan aktiválja a Th1 és CD8+ T limfocitákat, tumor regressziót indukálva. Klinikai vizsgálatokat végeztek IL-2, IL-7, IL-12 citokingénekkal transzfektált, irradiált autológ melanoma sejtek visszajuttatásával is (74, 42).

Az immunterápia hatékonysága fokozható hisztamin kezeléssel: IL-2 és α -IFN terápia mellett adott adjuváns hisztamin szignifikánsan növelte a túlélést előrehaladott metasztatikus melanómában szenvedő betegeknél. Ismert, hogy a hisztamin H2 receptoron keresztül gátolja az NK sejteken a fagociták által indukált szuppresszív szignált, és így fenntartja az NK sejtek tumor ölő aktivitását (34).

Tumor túlélési mechanizmusok

Az immunsurveillance kijátszása, a hatékony immunválasz elkerülése a tumor kialakulásának alapvető feltétele. A melanoma sejtek gyakran elveszítik releváns tumor antigénjeiket. Más esetben az antigén prezentáció szenved zavart, proteaszóma defektus vagy TAP transzporter deficiencia következtében, és így a releváns tumor antigén peptid nem jut ki a sejt felszínére az MHC molekulakomplexszel. Gyakran megfigyelhető bizonyos MHC allélek downregulációja, vagy hiánya, vagy a β_2 mikroglobulin mutációja, melyek következtében szintén nem jöhet létre hatékony antigén prezentáció. Kimutatták, hogy metasztatikus melanoma sejtek Fas/CD95 ligandot expresszálnak (a melanociták nem), és a Fas szenzitív tumor-infiltráló T limfocitákban apoptózist indukálnak (31). Ugyanakkor a melanoma sejtek védekeznek a FasL+ CD8+ T limfociták apoptózist kiváltó hatása ellen azáltal, hogy fokozott mértékben expresszálnak receptor-mediált sejthalált gátló fehérjéket (FLIP, FLICE inhibitory protein) (68). Megemlíthetjük a tumorelles immunválasz hatékonyságát gátló szolubilis faktorok, mint pl. TGF- β , IL-10 termelését is.

AZ INTERLEUKIN-6 (IL-6) SZEREPE MELANOMÁBAN

Az IL-6 egy pleiotrop citokin, amely nagy mennyiségben termelődik stimulált monocitákban, fibroblasztokban, endotél sejtekben, valamint számos más sejtben, szintézisét fiziológiásan stimulálja az IL-1, endotoxinok, TNF, PDGF, OSM. Az IL-6 citokin család tagjai közé tartozik a leukémia inhibitor faktor (LIF), ciliáris neurotrofikus faktor (CNTF), OSM, IL-11, kardirotrofin-1 (CT-1), közös jelátvivő elemként mindannyian a gp130 transzmembrán glikoproteint használják. Az IL-6 citokin család tagjai a májban akut fázis fehérjék expresszióját indukálják.

Az IL-6 fehérje egy nagyobb prekursor fehérjéből keletkezik, 185 aminosavból áll, és több helyen glikozilált, eltérő glikoziláltságú molekuláris formáit mutatták ki monocitákban.

Az IL-6 receptor (IL-6R, gp80) egy erősen glikozilált 80 kDa-os fehérje, 449 aminosavból épül fel, elsősorban T sejteken, aktivált B sejteken, monocitákon és hepatocitákon expresszálódik. A bekötődött IL-6-ból és az IL-6R-ból álló komplex a

jelátvivő szerepet betöltő gp130-al asszociál, majd az aktiválódás homodimer képződéshez vezet, az aktív IL-6 receptor komplex egy hexamer struktúra. A jelátvitel következő lépése a gp130 dimerizáció által kiváltott tirozin kináz aktiválás, elsősorban Jak1, Jak2 és Tyk2 részvételével, de Btk, Tec és Fes kinázok, valamint a MAP kináz kaszkád is aktiválódhat. A STAT-ok (signal transducer and transcriptional activator) közül a Stat3, a Stat1 és a Stat5b foszforilációjával a különböző aktivált Stat fehérjék nukleáris transzkripciós komplexeket alkotnak amelyek olyan enhancer régiókhoz kötődhetnek, mint pl. a pIRE (palindromic interferon regulated elements). pIRE enhancerrel rendelkezik pl. az IRF-1 gén, amely egy citosztatikus és anti-onkogén aktivitású transzkripciós faktor (71).

A gp130-t olyan sejtek is expresszálják, amelyeken nincsen IL-6R. Úgy az IL-6R-nak, mint a gp130-nak szolubilis formái is léteznek, amelyek az IL-6R esetében alternatív splicing eredményeként, a gp130 esetében pedig proteolitikus hasítással keletkeznek, és modulálják az IL-6 hatását (61).

Az IL-6 elsősorban hematopoietikus, immunológiai és gyulladásozó folyamatokban játszik szerepet. Az IL-6 differenciációs faktora a B sejteknek, szerepe van a T sejt aktivációban és érésben, a CD8+ T sejtek differenciálódásában, elősegíti a B sejteknek plazma sejtekké való átalakulását. A hematopoesis korai szakaszában fokozza a multipotens őssejtek proliferációját, elősegíti a megakariociták érését és a vérlemezkék kialakulását és kulcsszerepet játszik az akut válasz fehérjék képződésében.

Az IL-6, mint tumorsejtek növekedési faktora

Az IL-6 szerepet játszik malignus folyamatokban is, elsősorban hematológiai tumorokban. Az IL-6 autokrin növekedési faktor myelomában, vese carcinomában, lymphomában, méhnyakrákban, prosztataraákban. Más tumorok növekedését gátolja, ilyenek az emlő carcinoma, tüdőrák vagy hystiocyticus lymphoma.

Melanomában az IL-6 a tumor növekedési stádiumától függően szabályozza a sejtproliferációt. Primer melanoma vonalakban és korai melanoma léziókban az IL-6 jelentősen gátolja a sejtosztódást. A tumor progresszióval ez a gátlás megszűnik és rezisztencia alakul ki, habár az IL-6 rezisztens melanoma sejtek IL-6R és gp 130 expressziója, ligand-kötése, valamint a Jak kináz foszforiláció sem csökken.

Előrehaladott metasztatikus melanomában az autokrin módon termelt IL-6 fokozhatja a sejtproliferációt, a metasztatikus melanoma vonalak 50%-a termel IL-6-t. IL-6 antiszenz oligonukleotidok jelentősen gátolták a növekedést ezekben a sejtvonalakban, ezzel szemben neutralizáló antitestekkel nem lehetett gátlást elérni (51). Metasztatikus melanomás betegeken végzett felmérés szerint a betegek szérum IL-6 szintje arányos a tumor terheltséggel (tumor load) és magasabb szérum IL-6 szintet mutattak ki a biokemoterápiára rezisztens betegeknél (66). Antiszenz IL-6 expressziós vektorral transzfektált IL-6 termelő humán melanoma sejtek kisebb, lassabban kialakuló és növekvő tumorokat képeztek nude egérben (52).

IL-6 transzfektált melanoma sejtekben az IL-6R expressziójának csökkenését észlelték, melynek következtében IL-6 rezisztencia alakult ki. Előrehaladott metasztatikus melanoma sejtek válaszképessége az IL-6 antiproliferatív hatásával szemben *in vitro* helyreállítható volt rekombináns, szolubilis IL-6R alkalmazásával. Az IL-6+sIL-6R kombináció irreverzibilis növekedés gátlást és differenciálódást váltott ki a B16-F10.9 sejtvonalban, fokozta az IRF-1 anti-onkogén transzkripciós faktor termelődését és DNS-kötő képességét, valamint a p21 promotor aktivitását is (71).

Az IL-6 szerepe a tumorelles immunválaszban

Mivel az IL-6 elősegíti a B és T limfociták érését illetve aktivációját, a tumorelles immunválasz kialakulásában is szerepet játszik. Humán fibrosarcoma vagy vastagbél carcinoma xenograftot hordozó egerekben az IL-6 terápia csökkentette a tumor növekedését és a metasztázisok kialakulását. Csökkent antigenitású tumorokban, mint pl. B16 melanomában az IL-6 fokozhatja a tumorelles választ nem specifikus gyulladási folyamatok beindítása révén. Ha IL-6R-t nem expresszáló, IL-6-ra proliferatív választ nem adó B16 melanoma sejteket transzfektáltak IL-6 expressziós vektorral és a sejteket egerekbe ültették, az IL-6-t termelő tumorok sokkal lassabban növekedtek, jellemző volt a fokozott gyulladási sejt beszűrődés és a kisebb érhalózat (86). Az IL-6 immunterápia klinikai hatékonyságát vizsgálták szolid tumoros, köztük melanomás betegeknél is, de a tumorelles hatás nem volt szignifikáns, viszont neurotoxikus és más mellékhatások jelentkeztek (84).

HISZTAMIN ÉS MELANOMA

A hisztamin, mint tumor sejtek növekedési faktora

A hisztamin (2-(4-imidazolil)-etilamin) egy olyan biogén amin, amely fontos szerepet játszik számos gyulladáshoz és allergiás folyamatban, szabályozza a gyomorsav-termelést és a neurotransmisszióban, valamint az immunválasz szabályozásában is részt vesz. Az utóbbi évek kutatásai azt bizonyítják, hogy a hisztamin jelen van osztódó sejtekben, így a sebgyógyulás, valamint az embriogenezis és hematopoiesis sejtjeiben, de tumorsejtekben is fokozott lokális hisztamin termelés mutatható ki.

A hisztamin szintéziséért felelős enzim a hisztidin dekarboxiláz (HDC), amely piridoxál 5'-foszfát koenzimmal működik, és a lokális hisztamin bioszintézis specifikus markere. A HDC expresszió mRNS és fehérje szinten, valamint a HDC aktivitása is jelentősen fokozódik bizonyos tumorokban, így colorectalis carcinomában, prosztatata adenomában, petefészek tumorokban, gliasejtes tumorokban és melanomában. A hisztamin tumorproliferációban betöltött szerepét hangsúlyozza, hogy a HDC enzim irreverzibilis gátlása α -fluoro-metil hisztidinnel, vagyis a *de novo* hisztamin szintézis blokkolása csökkenti a hepatoma és colorectalis karcinoma sejtek proliferációját *in vitro* és *in vivo* (3).

A hisztamin metabolizmusában két enzim vesz részt, a diamino-oxidáz (DAO) és a hisztamin N-metil transzferáz (HNMT). A DAO emelkedett mennyiségben mutatható ki tumoros szövetekben, tüdőrák sejtekben, pajzsmirigy, hasnyálmirigy, gyomor, nyelőcső és petefészek tumorokban, melanomában, endometrium karcinomában. Humán vastagbél polipokban, amelyek premalignus állapotban vannak, csökken a DAO aktivitás a környező szövetekhez viszonyítva. A HNMT expresszió csökken emlő adenokarcinomában, a szöveti hisztamin szint emelkedésével párhuzamosan.

A melanocitáktól eltérően úgy a primer, mint a metasztatikus melanoma szövetekben és melanoma sejtvonalakban is kimutatható a hisztamin, valamint az aktív HDC enzim. A hisztamin lebontásában részt vevő DAO és HNMT expressziója eltérő mennyiségben, de kimutatható mind a primer, mind pedig a metasztatikus melanoma sejtekben (13).

Hisztamin receptorok

A hisztamin receptorok a hét transzmembrán doménnel rendelkező, G fehérjékhez kapcsolt membránreceptorok népes családjába tartoznak. Jelenleg négyféle hisztamin receptort ismerünk, a H1, H2, H3 és H4 receptorok jellegzetes szöveti eloszlással és jelátviteli utakkal rendelkeznek (36). A hisztamin receptorok főbb jellemzőit a **3. táblázatban** foglaltuk össze.

A **hisztamin H1 receptor (H1R)** a foszfolipáz C (PLC) enzimet aktiválja Gq családba tartozó, pertussis toxinra nem érzékeny G fehérjén keresztül. A foszfatidil-inozitol difoszfát hidrolízisével IP₃ és DAG keletkezik és proteinkináz C (PKC) aktiválódik, megnö az intracelluláris Ca²⁺ szint. A PKC aktiválás, valamint az intracelluláris Ca²⁺ szint megnövekedése következtében más jelátviteli utak aktiválódása is kimutatható, így NO, cGMP, arachidonsav-származékok (prosztanoidok) és cAMP is keletkezhet H1 receptor aktiválásra. A H1 receptorra jellemző az idő és dózis függő deszenzitizálás, ami az IP₃ képződés gyengülésével jár, poszt-transzlációs módosulás, receptor foszforiláció következtében.

A **H2 hisztamin receptor (H2R)** Gs fehérje révén az adenil cikláz kaszkádot indítja el, intracelluláris cAMP növekedést és proteinkináz A (PKA) aktiválást eredményezve. A H2 receptor aktiválás a PLC kaszkádot is aktiválhatja intracelluláris Ca²⁺ szint-növekedéssel egyes emlőtumor sejtvonalakban és eger bőrtumorokban (15, 23), sőt a HL60 sejtvonalban a cAMP és PLC útvonal párhuzamos aktiválódását is leírták (58). A H2R sejtosztódásban betöltött szerepét hangsúlyozza, hogy mindkét jelátviteli út szabályozhatja a sejtproliferációt és differenciálódást. A H2R antagonisták nagy többségére jellemző az inverz agonizmus, melynek során a receptor inaktív állapotba kerül a receptor-antagonista kötődés okozta konformációváltozás miatt.

A **H3 receptort** mint preszinaptikus autoreceptort fedezték fel, amely a központi idegrendszerben (KIR) gátolja a hisztamin, illetve más neuromediátorok felszabadulását (acetilkolin, dopamin, szerotonin, noradrenalin). Nagy affinitású, pertussis szenzitív G fehérjéhez kapcsolt receptor, amely az adenil cikláz enzim gátlásával fejt ki hatását. Az eddig ismert hisztamin receptoroktól eltérően a H3 receptor gén két intront tartalmaz, feltehetően alternatív splicing révén patkányban 2 izoforma kialakulását észlelték (89). Habár a periférián is észlelték H3R expressziót, elsősorban a KIR-i hatásai jelentősek,

szerepet játszik az alvás-ébrenlét, a tanulás-memória, táplálékfelvétel szabályozásának folyamataiban és bizonyos betegségek, mint gyerekkori figyelem-hiányos hiperaktivitás szindróma (ADHD) vagy epilepszia kezelésében számításba jöhetnek H3 antagonisták (48).

3. táblázat. A hisztamin receptorok áttekintése.

	H1	H2	H3	H4
Kromoszóma lokalizáció	3p25	5	20p11	18q11.2
Génszerkezet	intronmentes	intronmentes	2 intron	2 intron
Fehérje: - aminosavak száma - móltömeg	487 56 kDa	359 40 kDa	445 49 kDa	390 44 kDa
Fő jelátviteli út	Gq/11, Ca ²⁺ ↑	Gs, cAMP↑	G1/o, cAMP↓	Gα15/16, cAMP↓, MAPK↑
Hisztamin iránti affinitás	mikromólos	mikromólos	nanomólos	nanomólos
Jellemző agonista	2-(3-klórfenil)-hisztamin	impromidin	(R)α-metil-hisztamin	hisztamin
Jellemző antagonist	mepyramin	cimetidin	thioperamid	
Szöveti eloszlás	Simaizmok többsége, endotél sejtek, adrenális medulla, szív, központi idegrendszer (KIR).	Gyomor parietális sejtek, vaszkuláris simaizom, adipociták, bazofil és neutrofil sejtek, T sejtek, KIR, szív.	KIR, perifériás idegek (szív, tüdő, gyomor-bél traktus), endotélium, enterokromaffin sejtek.	leukociták: eozinofilok, neutrofilok, T sejtek, dendritikus sejtek, monociták, hízósejtek, csontvelő, lép, vékonybél.

	H1	H2	H3	H4
Élettani funkció	Simaizom kontrakció, NO \uparrow , endotél sejt összehúzódás, érpermeabilitás fokozása, depolarizáció és fokozott neuronális kisülés, negatív inotrop hatás, katekolamin felszabadulás fokozódása.	Gyomorsav szekréció fokozása, simaizom ellazulás, +inotrop és chronotrop hatás; csökkent kisülés, hiperpolarizáció vagy a jelátvitel gyorsítása a KIR-ben; limfocita funkciók gátlása.	Neurotranszmitter felszabadulás gátlása, a tuberomamilláris hisztaminerg neuronok kisülésének gátlása.	? Feltehetően immunológiai folyamatok szabályozása, gyulladás, asthma.

Az újonnan felfedezett **H4 hisztamin receptor** expressziója fehérvérsejteken, főleg eozinofilokon, neutrofilokon, valamint T sejteken, dendritikus sejteken, hízósejteken, csontvelőben, lépben, vékonybélben, nyirokcsomókban, herében, vesében, kisebb mértékben harántcsíkolt és szívizomban is kimutatható (70, 65). Homológia, génszerkezet és farmakológiai jellemzők szempontjából is a H3 receptorhoz áll legközelebb (39). Felfedezése H3R fragmensekkel, homológia kereséssel történt, humán genomiális könyvtárak szűrése során. Megfigyelték, hogy mononukleáris sejtek, valamint csontvelői eredetű hízósejtek aktivációja során a H4R expresszió csökken, IL-10, valamint IL-13 jelenlétében úgyszintén. Nyugvó CD4⁺ és CD8⁺ sejtekben a H4R expresszió magasabb, mint az aktivált T sejtekben. Valószínűleg szerepet játszik a gyulladásban, az immunfolyamatok szabályozásában, így a tumorok elleni immunválaszban, a melanoma kutatásában is figyelmet érdemlő terület lehet.

A membrán receptorok mellett feltételezték egy intracelluláris hisztamin kötőhely létezését, amelyhez egy tamoxifen származék, a DPPE (N, N-dietil-2-[4-(fenilmetil) fenoxi] etánamin) kötődik és gátolja a hisztamin hatását, utóbb kiderült, hogy a DPPE hatékonysága a hisztamin citokróm p450 molekulához való kötődésének a gátlásán alapszik.

A hisztamin receptorok közül a H1 és a H2 receptor jelenlétét is kimutatták melanoma sejteken. Whitehead RJ 1988-ban melanoma sejtvonalakban kimutatta, hogy a hisztamin az intracelluláris cAMP szint gyors, az alapértéket 50-100-szor meghaladó növekedését okozta, amely ranitidinnel és cimetidinnel gátolható volt, de H1 antagonistákkal nem. Az A875 humán melanoma vonalban a hisztamin DNS szintézist és sejtproliferációt fokozó hatása (foszfolipáz C aktiválás és intracelluláris Ca^{2+} szint növekedés révén) teljes mértékben gátolható volt H1 antagonistákkal, a cimetidin nem bizonyult hatásosnak (91). Ugyanakkor más adatok szerint H2 antagonisták hatékonyan gátolták a sejtproliferációt humán melanoma vonalokban, a ranitidin hatékonyabban, mint a cimetidin (95).

AZ INTERLEUKIN-6 (IL-6) ÉS A HISZTAMIN KÖLCSÖNHATÁSA

A hisztamin sokféle immunológiai reakcióban játszott szerepe - mint pl. akut gyulladásos és allergiás jelenségek – mellett szabályozza számos citokin expresszióját és hatását, ugyanakkor a hisztamin hatását is több szinten szabályozhatják citokinek (pl. a hisztamin felszabadulás, illetve hisztamin receptor expresszió megváltoztatásával).

Számos adatból ismert, hogy a hisztamin képes fokozni az IL-6 termelést normális és tumoros sejtekben egyaránt. Humán tüdő makrofág sejtekben a hízósejtekből felszabaduló hisztamin H1R-on Ca^{2+} -szint növeléssel fokozza az IL-6 expressziót (94), akárcsak szem kötőhártya hámsejtekben (99), H1 antagonistákkal mindkét esetben kompetitíven gátolja a hisztamin indukálta IL-6 termelést. Normál humán keratinociták IL-6 expressziója növekszik hisztamin, illetve fokozottabban hisztamin és UV fény hatására, H1 antagonistákkal gátolja a hatást (83). Ugyancsak leírták a hisztamin aktiváló és IL-6 indukáló hatását köldökvéna endotél sejtekben (HUVEC), ahol H1 antagonisták szintén csökkentették a citokin szekréciót (60).

Tumorosan transzformált sejtekben szintén ismert a hisztamin IL-6 expressziót indukáló hatása, így humán B lymphoma, valamint glioblastoma sejtvonalakban kimutatható az IL-6 expresszió növekedése hisztamin hatására mRNA és fehérje szinten egyaránt, és a hatás H1 antagonistával szelektíven gátolható (19).

A hisztamin ugyanakkor az IL-6 receptor expresszióját is szabályozza, amint azt humán lymphoid, monocytoid és hepatoma sejtvonalakban kimutatták, H1R-on fokozza, H2R-on csökkenti az IL-6 kötődését receptorához (56).

MÓDSZEREK

Sejtenyésztés

Kísérleteinket négy, különböző metasztatizáló képességgel rendelkező humán melanoma vonalon végeztük, amelyeket Dr. Tímár József bocsátott rendelkezésünkre. Az M1/15 és HT168/91 fokozott, a primer léziókból származó WM983B és a WM35 alacsony (WM983B), illetve nem (WM35) metasztatizáló jellegű. A sejteket RPMI 1640 (Gibco) tápoldatban tenyésztettük, amely 10% borjú savót (FCS, foetal calf serum) és antibiotikumot (gentamicin) tartalmazott.

Reagensek

A felhasznált hisztamin, H1 antagonistá triprolidin és pirillamin Sigma, a H2 antagonistá ranitidin és famotidin ICN (USA), a H3 antagonistá thioperamid Tocris, a humán rekombináns IL-6 Serotec termék volt. A DPPE vagy (N, N-dietil-2-[4-(fenilmetil)-fenoxi]-etánamin hidrokloridot Dr. Hudecz F szintetizálta (ELTE, Budapest). Az α -fluoro-metil-hisztidin (α -FMH) Kollonitsch J. ajándéka volt. A H1 agonista 2-(3-fluorofenil)-hisztamin és a H2 agonista arpromidin Dr. W. Schunack (Berlin) ajándéka volt.

IL-6 mérés

A sejtekről eltávolított felülúszóban az IL-6 koncentrációt ELISA kit segítségével, a gyártó útmutatása alapján mértük. A felhasznált ELISA kit Diagnosticum (Budapest) és Quantikine (R&D, Minneapolis, USA) termék volt. A sejtszámot MTT módszerrel, illetve tripánkékes festés után számolással ellenőriztük. A felülúszó mintákat lemérésig -20°C -on tároltuk.

mRNS izolálás és RT-PCR

A teljes celluláris RNS-t a melanoma sejtekből Chomczinsky fenol-kloroformos módszerével izoláltuk (9).

A reverz transzkripciót (RT) és a polimeráz láncreakciót (PCR) egy Pharmacia Ataq Gene Controller-ben végeztük. A reverz transzkripcióhoz a reakcióelegy (20 µl) 1 µg teljes RNS-t, 25mM Mg²⁺-t, 10x puffert, 10 mM dNTP-t, 5 U RN-áz inhibitor, 1 µl oligo-dT-t és 25 U Mu-LV reverz transzkriptáz enzimet tartalmazott (Perkin Elmer).

A PCR-hez használt reakcióelegy 1x puffert, MgCl₂-t, dNTP-t, Taq polimerázt, szenz és antiszenz primereket és cDNS-t tartalmazott 50 µl végtérfogatban, a reakció feltételeit mindenik primer párnál optimalizáltuk.

Az IL-6 PCR-hez használt oligonukleotid primerek: 5'-CGGTACATCCTCG ACGGCATCTCAG-3' szenz és 5'- CCTCAGGCTGGACTGCAGGAAGTCC-3' antiszenz (Falus A). Az IL-6 R szenz primer: 5'- AAG GAC CTC CAG CAT CAC TGT GTC A-3', az anti-szenz: 5'- CCT TCA GAG CCC GCA GCT TCC ACG T-3'. A gp130 szenz primer: 5'-CTC GTG TGG AAG ACA TTG CCT CCT T-3' és az antiszenz 5'-TTG GTC CCA CTC TAA GAC AGC TTC G-3' (59).

A H1 receptor PCR-hez használt oligonukleotid primerek szekvenciái a következők: 5'-TGG TCA CAG TAG GGC TCA AC szenz, 5'-CAA GGT GGG CAG GTA GAA GT antiszenz; a H2 receptorra az 5'-TCG TGT CCT TGG CTA TCA C szenz és 5'- CCT TGC TGG TCT CGT TCC T antiszenz primereket használtuk (43).

A primereket a szekvenciák alapján a Gibco BRL Custom Primers szintetizálta.

A PCR termékeket 0.01% etídium bromidot tartalmazó 2%-os agaróz gélben futtattuk 100 V feszültség mellett 45 percig, és megfelelő méretű molsúly markerhez viszonyítva azonosítottuk.

Sejtproliferáció mérés kolóniaképződéses módszerrel

A sejteket 6 lyukú tenyésztőedénybe osztottuk alacsony sejtszámmal (1700 sejt/lyuk) és hisztamin (10⁻⁸ - 10⁻⁵ M), H1 agonista 2-(3-fluorofenil)-hisztamin (10⁻⁵ M) és H2 agonista arpromidin (10⁻⁵ M), forskolin (5x10⁻⁶ M, Sigma), illetve humán rekombináns IL-6 (5-10-50-100 ng/ml) jelenlétében tenyésztettük addig, amíg a legalább 50 sejtből álló kolóniák kialakultak. Formalinos fixálás és toluidinkék festés után megszámloltuk a kolóniákat, az eredményeket a kontroll százalékában fejeztük ki.

Sejtproliferáció mérés MTT módszerrel

A 96 lyukú tenyésztőedénybe szétesztott sejtekhez a kezelési idő lejárta után 0,5%-os MTT oldatot adtunk 1 : 10 térfogat arányban és 37°C-on inkubáltuk 4 h-t. Az MTT vagy 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difenil tetrazólium bromid Sigma termék volt. Az inkubálási idő lejárta után eltávolítottuk a felülúszókat, és DMSO-ban (dimetil szulfoxid, Sigma) feloldottuk a keletkezett csapadékot. Ezután ELISA reader (Labsystems Multiscan MS) segítségével lemértük a plate-eket 540, illetve 620 nm-en.

Az intracelluláris cAMP szint mérése

A sejteket 24 lyukú tenyésztőedényben foszfodieszteráz gátló (10^{-3} M IBMX, 3-izobutil-1-metil-xantin, Sigma) előkezelés után hisztaminnal és hisztamin agonistákkal stimuláltuk 10 percig 37°C-on. A keletkezett cAMP-t abszolút etanollal kivontuk, majd az etanol elpárologtatása után acetát pufferben (pH=6,3) oldottuk a radioimmunoassay (RIA) méréshez. A RIA-hoz albuminnal konjugált szukcinil cAMP ellen kialakított ellenanyagot, valamint jódozott ($\text{Na}^{[125]\text{I}}$, Amersham) 2'-O-mono-szukciniladenozin-3', 5'-ciklikus monofoszfát tirozil-metil észter kompetitort (150 Ci/mmol) használtunk. Az antigén-antitest komplexeket BSA és etanol jelenlétében kicsaptuk, majd centrifugálás után az üledék aktivitását Packard Autogamma-ban mértük le (Omar P. Pignataro, Biológiai és Kísérleti Orvostudományi Intézet, Buenos Aires).

Intracelluláris IP3 mérés

A sejteket $10 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^3H -mioinozitol (Amersham) jelenlétében tenyésztettük 18 h-ig, majd Hanks oldatban 37°C-on, 10 mM LiCl (Sigma) előkezelés után 20 percig hisztaminnal illetve hisztamin agonistákkal stimuláltuk. Pozitív kontrollként NaF-t (Sigma) használtunk minden kísérletben. A sejtekből kloroform-metanol-víz eleggyel kivont inozitolfoszfátot Dowex AG-X8 anioncserélő gyantán választottuk el. A kapott frakciók aktivitását folyadékszintillációs számlálóban (LSC) mértük le. A ^3H -inozitolfoszfát mennyiségét a sejtekhez hozzáadott, nem beépült ^3H -mioinozitol mennyiséghez viszonyítottuk mindegyik minta esetén (25).

HDC kimutatása Western blottal

A rekombináns humán IL-6-tal (5-100 ng/ml) kezelt sejteket lizáltuk majd 10 µg fehérje tartalmú mintákat vittünk fel 10%-os poliakrilamid géltre elválasztás céljából (SDS-PAGE). A szétvált fehérjéket PVDF nylon membránra (Millipore) blottoltuk. A HDC fehérje specifikus kimutatásához 100 ng/ml affinitás tisztított poliklonális csirke anti-HDC antitestet (HDC318-325 pAb), majd HRP-konjugált anti-csirke antitestet (0,5 µg/ml, Promega) használtunk. Az ECL reagens hozzáadásával (Amersham Life Science) kapott fluoreszcencia jelet X-Omat (Kodak) filmmel detektáltuk. A csíkok egymáshoz viszonyított erősségét denzitometriásan értékeltük.

HDC és hisztamin kimutatása áramlási citometriával

HDC kimutatásához a sejteket 4 %-os paraformaldehid oldattal fixáltuk, majd szaponin oldattalⁱ permeabilizáltuk. A HDC jelöléséhez egy poliklonális, csirke anti-humán HDC antitestet használtunk (HDC318-325 pAb), amelyet intézetünk a Promega céggel közösen fejlesztett ki (29). Második ellenanyagként FITC-konjugált, nyúl anti-csirke IgY antitestet (Promega), kontrollként nem immunizált csirke szérumot (Promega) alkalmaztunk.

Az intracelluláris **hisztamin** kimutatásához a sejteket 4%-os EDAC-kal [(1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid klorid, Sigma] fixáltuk, szaponin oldattal permeabilizáltuk, majd nyúl antihisztamin antitesttel (Sigma), ezután pedig FITC-jelölt kecske anti-nyúl antitesttel (Sigma) jelöltük.

Az így előkészített, 2%-os paraformaldehidben felvett minták fluoreszcenciáját Beckton-Dickinson FACS Calibur áramlási citométerrel mértük le.

A hisztaminra festett sejteket kripton/argon lézerrel felszerelt BioRad MRC 1024 konfokális lézer scanning mikroszkóppal (CLSM) is megvizsgáltuk.

IL-6 immunohisztokémia

A tárgylemezre növesztett melanoma sejteket 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk, majd ellenanyag kezelés előtt 0,5 %-os BSA-val blokkoltuk 1 órát. Ezután a tárgylemezeket nyúl anti-humán-IL-6 antitesttel (Sigma) inkubáltuk szobahőmérsékleten, nedves kamrában egy óráig, végül pedig FITC-jelölt anti-nyúl

ⁱ A szaponin oldat 0,1% szaponint (Sigma), 0,1% NaN₃-t és 1% FCS-t tartalmazott.

antitesttel (Sigma) fél óráig. A jelölt sejteket ezután kripton/argon lézerrel felszerelt BioRad MRC 1024 konfokális lézer scanning mikroszkóppal (CLSM) vizsgáltuk. A nem specifikus háttér kötődés becslésére a primer ellenanyagának megfelelő izotípus kontrollt használtunk (Buzás Edit ajándéka).

Statisztikai módszerek

Az eredmények statisztikai elemzéséhez Student féle t próbát és one way ANOVA-t használtunk.

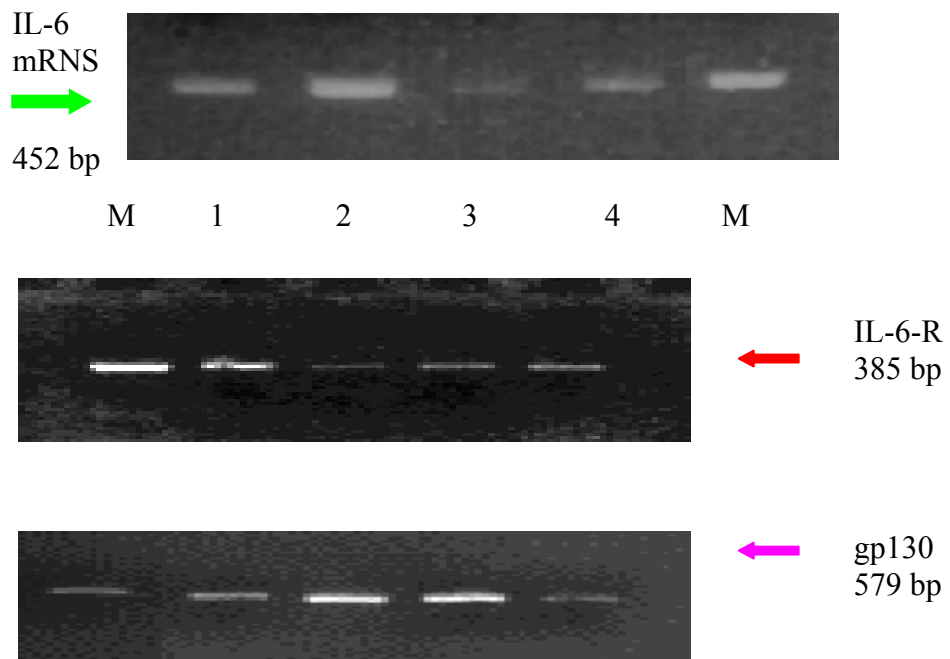
EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

A HISZTAMIN SZEREPE AZ AUTOKRIN IL-6 EXPRESSZIÓ SZABÁLYOZÁSÁBAN

IL-6, IL-6R és gp130 expresszió melanoma sejtekben

Első lépésként megvizsgáltuk alapállapotban a melanoma sejtek IL-6 és IL-6 receptor expresszióját. Mindegyik vizsgált melanoma vonalban kimutatható volt az IL-6 mRNS RT-PCR módszerrel, valamint az IL-6 receptor (IL-6R, gp80) és a receptor komplexben résztvevő, az IL-6 citokincsaládra jellemző közös jelátvivő elem, a gp130 mRNS expresszió (**4. ábra**).

Meghatároztuk a melanoma vonalak konstitutív IL-6 szekrécióját is ELISA módszerrel, és azt tapasztaltuk, hogy a fokozottan metasztatikus M1/15 és HT168/91 vonalak szecernálnak IL-6-ot, míg a másik két vonal, a WM983B és a WM35 felülúszójában nem, illetve nagyon kis mennyiségben, 6 nap tenyésztési idő után mérhető IL-6 (**4. táblázat**).



4. ábra. IL-6, IL-6 receptor (gp80) és gp130 mRNS expresszió humán melanoma vonalakban (RT-PCR). 1 – M1/15, 2 – HT168/91, 3 - WM35, 4 – WM983B, M – IL-6, IL-6R, illetve gp130 cDNS méretét jelölő markerek.

4. táblázat. IL-6 fehérje kimutatása ELISA módszerrel a melanoma sejtek felülúszójából.

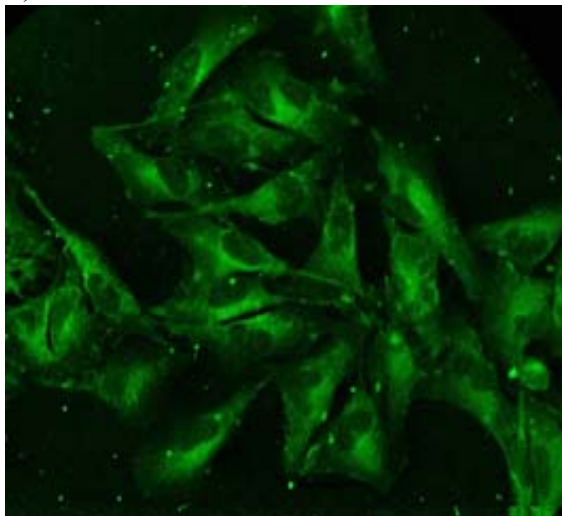
Melanoma vonal	IL-6 (pg/ml/10 ⁴ sejt)		
	1. nap	3. nap	6. nap
M1/15	0	44,2 ± 0	16,3 ± 1
HT168/91	54,2 ± 14,2*	127,1 ± 2,8	23,8 ± 0,9
WM35	0	0	9,9 ± 5,8
WM983B	0	0	0

* n = 4

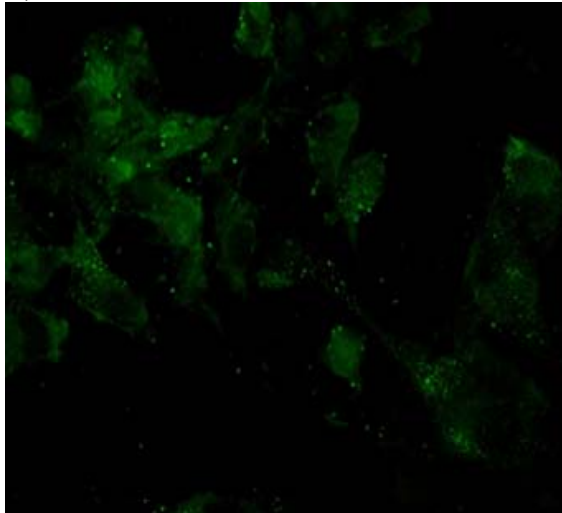
További vizsgálódás céljából IL-6 immunhisztokémiás vizsgálatot végeztünk a melanoma vonalakon. Azt tapasztaltuk, hogy habár az IL-6-ot nem szekretáló WM35 sejtek citoplazmájában is kimutatható az IL-6 fehérje (**5. ábra**), valószínűleg egy szekréción blokk következményeként nem választódik ki kimutatható mennyiségben a felülúszóba, de ennek bizonyítására további vizsgálatok szükségesek.

Az IL-6R és gp130 együttes expressziója az általunk vizsgált összes melanoma vonalban jelzi, hogy ezek a sejtek **IL-6 rezponzívek**. Az IL-6 mRNS expresszió a melanoma vonalak metasztatikus jellegétől függetlenül kimutatható mindegyik vizsgált vonalban, **az IL-6 szekréción megjelenése a metasztatikus progresszióra utal**, ugyanis ismert, hogy ez csak fokozottan metasztatikus, előrehaladott melanomákra jellemző.

a)



b)



5. ábra. IL-6 fehérje kimutatása a WM35 primer melanoma sejtekben immuncitokémiával. Az intracelluláris IL-6-ot indirekt módon FITC-jelölt ellenanyag segítségével mutattuk ki, az ábrán a konfokális mikroszkópos felvételek láthatók. a) IL-6 jelölt sejtek, b) IgG izotípus kontroll.

Hisztamin antagonisták hatása a melanoma sejtek IL-6 expressziójára

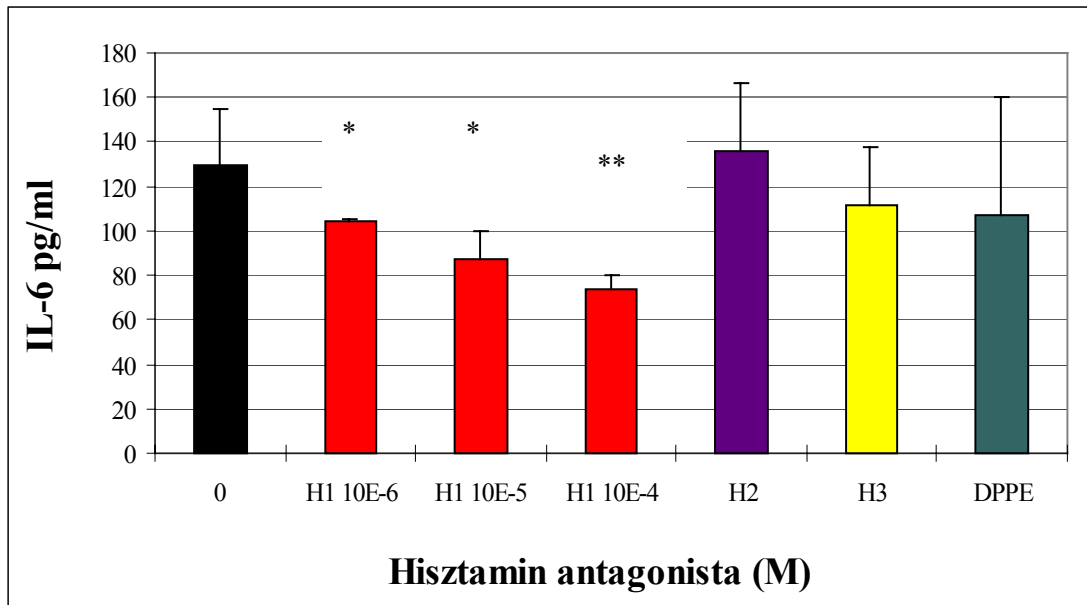
Hogy tanulmányozhassuk az intracelluláris hisztaminnak a melanoma sejtek IL-6 bioszintézisében betöltött szerepét, hisztamin antagonistákkal kezeltük a melanoma sejt kultúrákat. H1-antagonista (triprolidin), H2-antagonista (ranitidin), H3-antagonista (thioperamid) és DPPE (intracelluláris hisztamin kötőhely gátló) hozzáadása után meghatároztuk a felülúszóba kibocsátott IL-6 mennyiségét ELISA módszerrel.

A különböző hisztamin antagonisták IL-6 termelésre gyakorolt hatása a **6.a ábrán** látható az M1/15 metasztatikus melanoma vonal esetén.

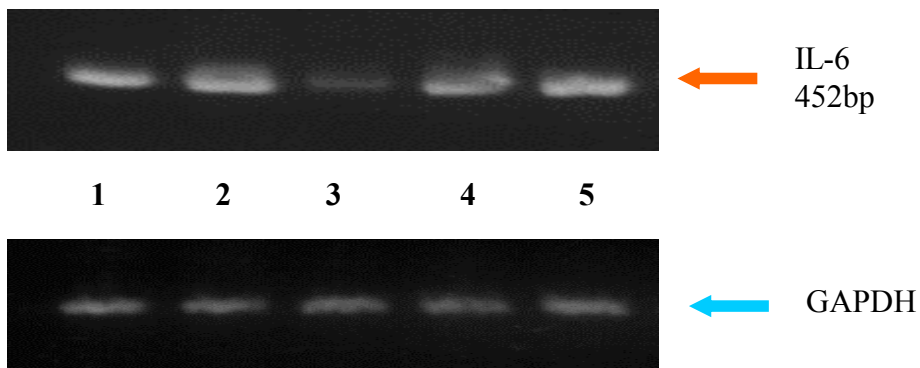
Az IL-6 szekréció koncentráció-függően csökkent a H1 antagonistá triprolidin hatására, ez a csökkenés 10^{-6} - 10^{-4} M koncentrációnál 12-42%-ot ért el. A H2, H3 antagonistá, valamint a DPPE hatása nem volt szignifikáns. A HT168/91 melanoma vonalnál hasonló tendencia figyelhető meg, a WM35 és a WM983 vonalak viszont nem termeltek IL-6 fehérjét antihisztamin kezelés után sem. A fehérje mérésekkel párhuzamosan megvizsgáltuk az IL-6 mRNS változását is RT-PCR módszerrel, és azt tapasztaltuk, hogy a nagyobb koncentrációjú triprolidin kezelésnél csökkent az IL-6 mRNS expresszió (**6.b ábra**).

Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a melanoma sejtek által előállított **hisztamin szabályozza a metasztatikus melanoma vonalak autokrin IL-6 termelését**. Az autokrin IL-6 bioszintézist a hisztamin elsősorban H1 receptoron keresztül szabályozza, mivel kizárólag a H1 antagonistá triprolidin jelenlétében mérhető az IL-6 csökkenés, más antagonisták hatására nem. Ez a jelenség összhangban van a hisztamin más sejt típusokban megfigyelt, szintén H1R mediált hatásával, ugyanis ismert, hogy a hisztamin növeli az IL-6 termelést humán tüdő makrofágokban (94), szem kötőhártya epitél sejtekben (99), köldökvéna endotél sejtekben (60), glioblastoma és B lymphoma sejtekben is (19).

a)



b)



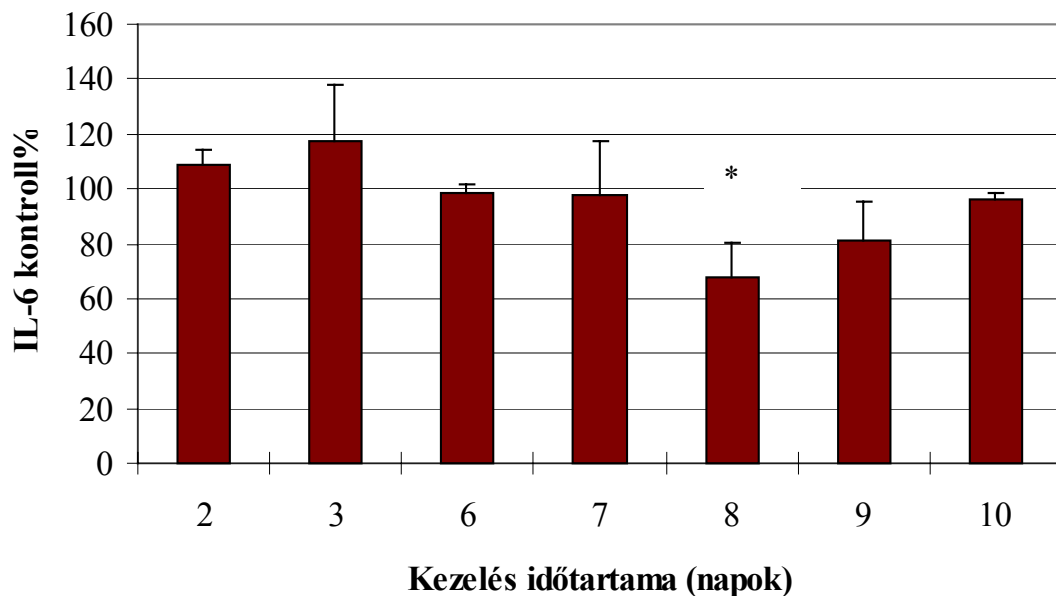
6. ábra. Hisztamin antagonist kezelés hatása az M1/15 és HT168/91 melanoma vonalak IL-6 termelésére. a) Az M1/15 melanoma vonal IL-6 termelésének változása hisztamin antagonist kezelés (72 h) hatására, a H1 antagonist triprolidin dózisfüggően csökkenti az IL-6 szekréciót (ELISA). n = 3; *, p < 0.05; **, p < 0.01 (Student t próba).

b) Triprolidin hatása az IL-6 mRNA expresszióra (felső kép). 1- IL-6 cDNS mólsúly marker, 2-kezeletlen sejtek, 3- $5 \cdot 10^{-4}$ M, 4- 10^{-4} M, 5- 10^{-5} M triprolidin.

A HDC enzim gátlása α -fluoro-metil-hisztidinnel (α -FMH) csökkenti az IL-6 termelést

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a melanoma sejtek - akár csak más normálisan vagy kórosan osztódó sejt – jelentős mennyiségben tartalmaznak hisztamint és az azt kizárólagosan előállító hisztidin dekarboxiláz (HDC) enzimet (29, 13). Következő kísérletünkben megvizsgáltuk a HDC enzim irreverzibilis gátlásának a hatását a HT168/91 melanoma vonal IL-6 termelésére. Gátlószerként α -fluoro-metil-hisztidint (α -FMH) használtunk, amely „öngyilkos” molekulaként irreverzibilisen és szelektíven gátolja a HDC-t, kovalens kötést képezve az enzim aktív centrumának egy szerin csoportjával (98). Huzamos α -FMH kezelés hatására tranziensen, de szignifikánsan csökkent az endogén IL-6 termelés a 8. tenyésztési napon a HT168/91 vonalban (7. **ábra**). Mivel az α -FMH a *de novo* hisztamin termelést gátolja, az IL-6 termelésre gyakorolt hatása az *in vitro* tenyésztés és kezelés későbbi szakaszában érvényesül, ami arra utal, hogy a melanoma sejtek jelentős intracelluláris hisztamin készletet tartalmaznak. Ugyanakkor ismert, hogy számos más szolubilis faktor is szabályozza az IL-6 expresszióját, ilyenek az IL-1 β , TNF- α (69), substance P (49), adenzin (21), prosztaglandinok (20), ceramidok (22), noradrenalin és VIP (54), ezek kompenzáló hatásával is számolnunk kell ahhoz, hogy a lokális IL-6 szekréciót jellemezhessük.

Az α -FMH-val végzett kísérlet eredményei is alátámasztják azt a következtetésünket, hogy **a melanoma sejtek által tartalmazott hisztamin szabályozó szerepet játszik az autokrin IL-6 termelésében.**



7. ábra. A HDC gátló α -FMH (10^{-4} M) csökkenti az IL-6 termelést a HT168/91 melanoma vonalban (ELISA). Az ábrán a kontrollhoz viszonyított százalékos értékek vannak feltüntetve. n = 3, p < 0.05 (Student t próba).

A HISZTAMIN KÖZVETLENÜL IS SZABÁLYOZZA A MELANOMA SEJTEK OSZTÓDÁSÁT

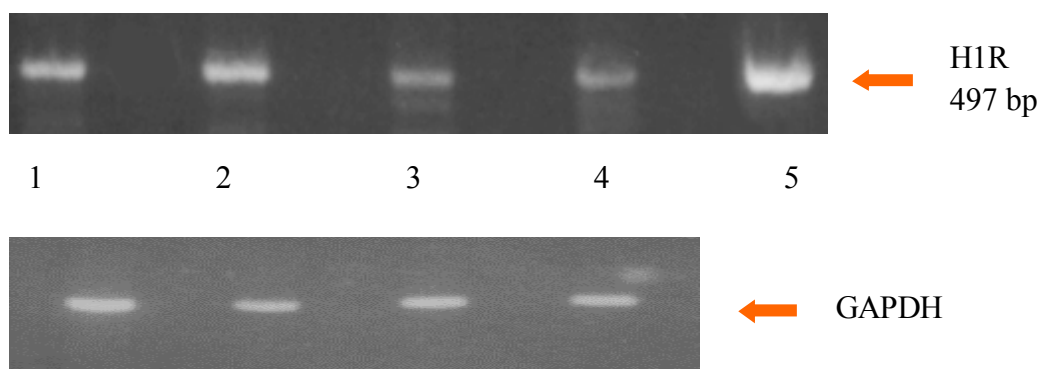
Hisztamin receptor expresszió melanoma sejtekben

Az utóbbi években előtérbe került a hisztaminnak a tumor proliferációban játszott szerepe, és számos adat utal arra, hogy a hisztamin a melanoma sejtek szabályozásában is fontos szerepet játszik. Tilly B C és munkatársai 1990-ben közölték, hogy exogén hisztamin fokozta melanoma sejtekben a DNS szintézist és a sejtproliferációt H1 receptoron keresztül, foszfolipáz C-t aktiválva. A hisztamin-indukált DNS szintézis és kemotaxis teljes mértékben gátolható volt H1 antagonistákkal (91). cAMP aktivációhoz kötött H2 receptorok jelenlétét szintén kimutatták a melanoma sejteken (100), ugyanakkor H2 antagonistákról (cimetidin, ranitidin) leírták, hogy fokozzák a melanoma sejtekben a tirozináz aktivitást, a melanin képződést, valamint gátolják a sejtosztódást (95). Reynolds és társai szintén kimutatták

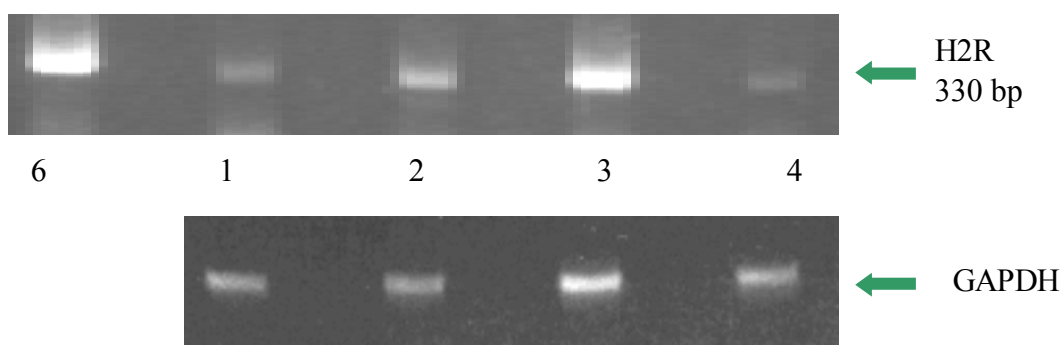
a hisztamin cAMP mediált mitogén hatását melanoma sejtvonalakban, és a hatás mind H1, mind H2 receptor antagonistákkal gátolható volt (75).

RT-PCR módszerrel megvizsgáltuk a H1 és H2 receptor expressziót a melanoma sejtvonalainkban. Azt tapasztaltuk, hogy a metasztatikus jellegtől függetlenül mindegyik melanoma vonalban expresszálódik a H1 és a H2 receptor is (**8. ábra**). Az endogén hisztamin, valamint a H1 és H2 membránreceptorok egyidejű jelenléte a melanoma sejtekben felveti az autokrin szabályozás lehetőségét.

a)



b)



8. ábra. H1 (a) és H2 (b) hisztamin receptorok expressziója humán melanoma sejtvonalakban (RT-PCR). 1 – M1/15, 2 – HT168/91, 3 - WM35, 4 – WM983B melanoma vonalak, 5 – H1R cDNS kontroll, 6 – H2R cDNS kontroll. A H1 és H2 receptor expressziós képek alatt az egyes mintákban kimutatott humán gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) housekeeping gén expressziója látható.

Másodlagos hírvivők

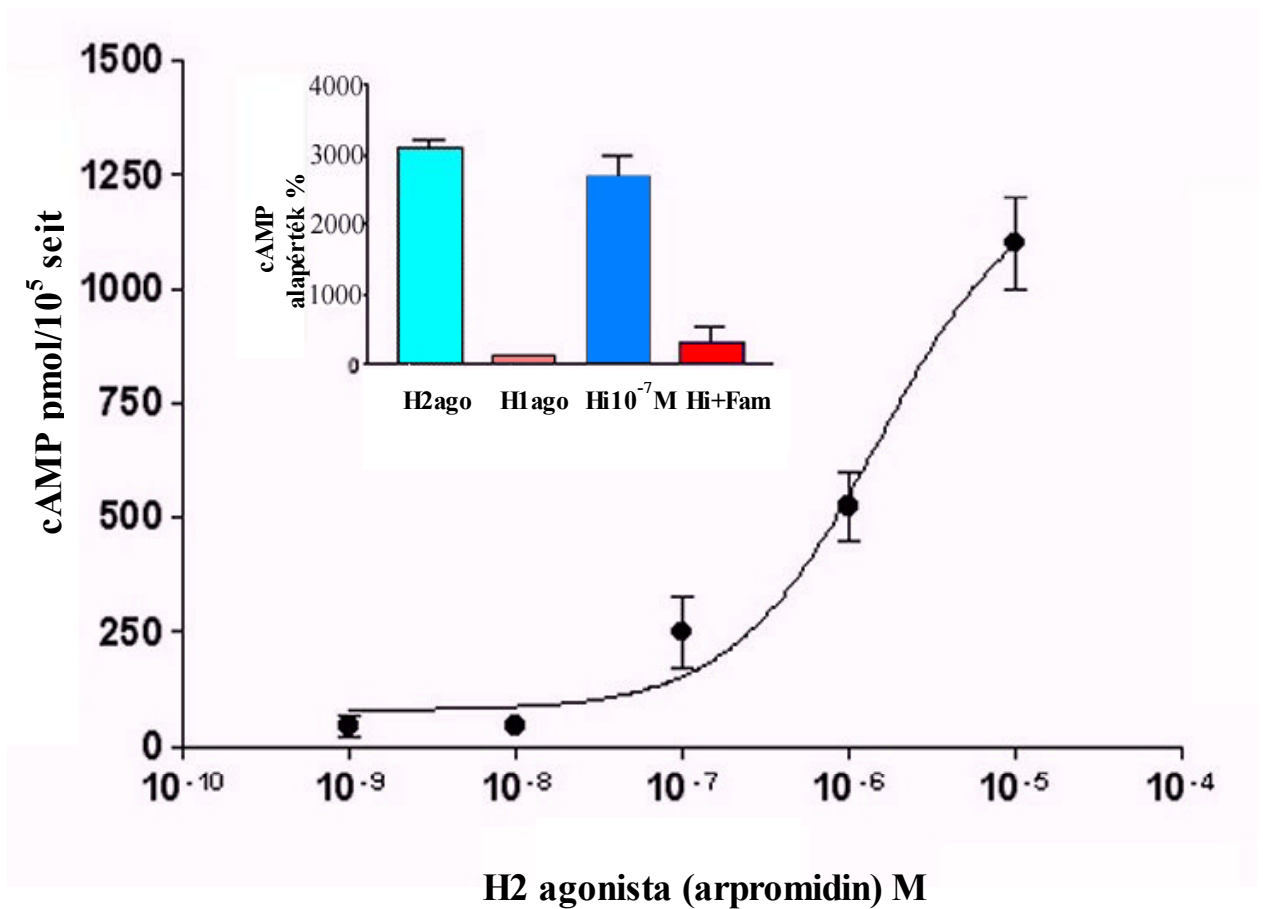
A melanoma sejtek hisztamin receptorainak funkcionális jellemzése céljából a receptor aktiválás következtében keletkező másodlagos hírvivő molekulák termelését is meghatároztuk. A G_s fehérjéhez kapcsolt H₂ receptor aktiválása leggyakrabban adenil cikláz aktiválást és intracelluláris cAMP szint emelkedést indukál, ezért elsőként a hisztamin, illetve hisztamin receptor ligandok hatására keletkező cAMP-t mutattuk ki RIA módszerrel.

A 4 vizsgált melanoma vonalban a cAMP növekedés a primer jellegű WM35 vonalban volt a legnagyobb mértékű. H₂ agonista arpromidin hatására szignifikáns, dóziszfüggő cAMP szint növekedést mutattunk ki, amely elérte az alapérték 30-szorosát (**9. ábra**). EC₅₀ értéke 1 μ M volt. Hasonló cAMP emelkedést mértünk hisztamin hatására is, viszont H₁ agonista [2-(3-fluorofenil)-hisztamin] nem okozott mérhető cAMP szint változást. A H₂ antagonistá famotidin meggátolta a hisztamin indukálta cAMP szint emelkedést (**9. ábra**, hisztogram), ami egyértelműen bizonyítja a H₂ receptorok szerepét.

A WM983B és M1/15 vonalnál a hisztamin indukálta cAMP növekedés kisebb mértékű volt, nem haladta meg az alapérték kétszeresét (**10. ábra**), míg a fokozottan metasztatikus HT168/91 vonalban nem volt kimutatható szignifikáns cAMP szint emelkedés hisztamin receptor aktiváció hatására.

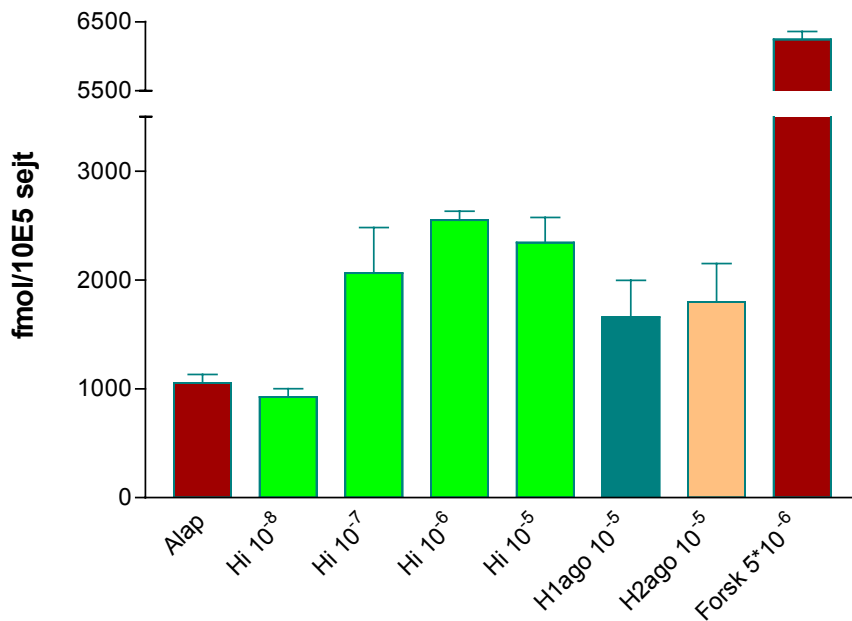
Az M1/15 és HT168/91 vonaloknál inozitol turnover vizsgálatokat is végeztünk, és azt tapasztaltuk, hogy az intracelluláris IP₃ szint 30 %-kal növekedett az alapállapothoz képest hisztamin (10^{-5} M) és H₁ agonista hatására (**11. ábra**). A WM vonaloknál azonos körülmények között nem sikerült IP₃ változást mérni, valószínűleg a gyorsabb turnover miatt.

A jelátviteli mérések alátámasztják a funkcionális hisztamin receptorok jelenlétét a melanoma sejtvonalakon. A WM35 primer melanoma vonalban a hisztamin illetve a H₂ agonista gyors és jelentős mértékű, az alapérték 30-szorosát elérő cAMP-szint növekedést okoz, amit H₂ antagonistá szelektíven gátol.

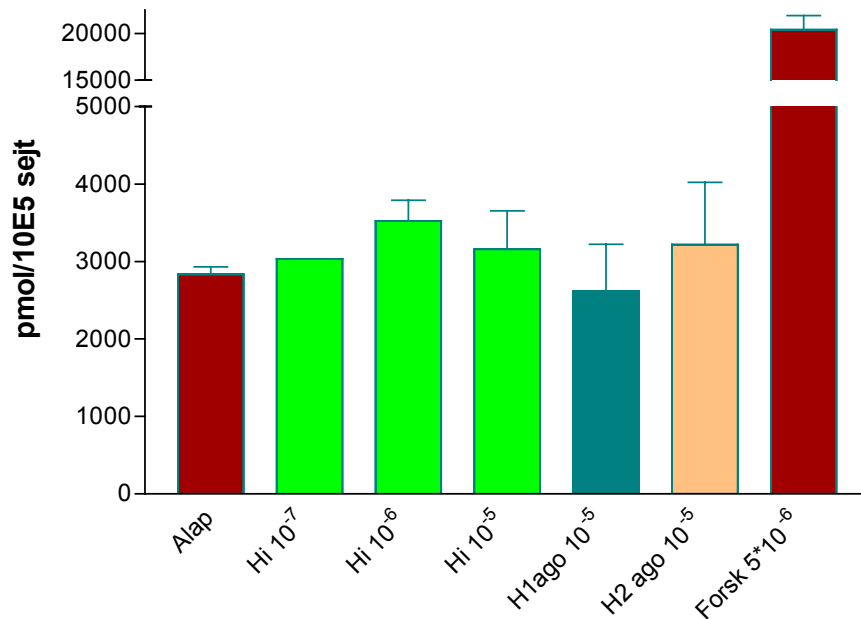


9. ábra. WM35 sejtekben a H2 agonista arpromidin dózis-függően fokozza a cAMP képződését. A beékelt oszlop diagrammon 10⁻⁵ M arpromidin (H2 ago), 10⁻⁷ M hisztamin (Hi) és 10⁻⁵ M 2-(3-fluorofenil)-hisztamin (H1 ago) hatása van feltüntetve. A 10⁻⁵ M H2 antagonistá famotidin specifikusan felfüggeszti a hisztamin cAMP képződést indukáló hatását.

a)

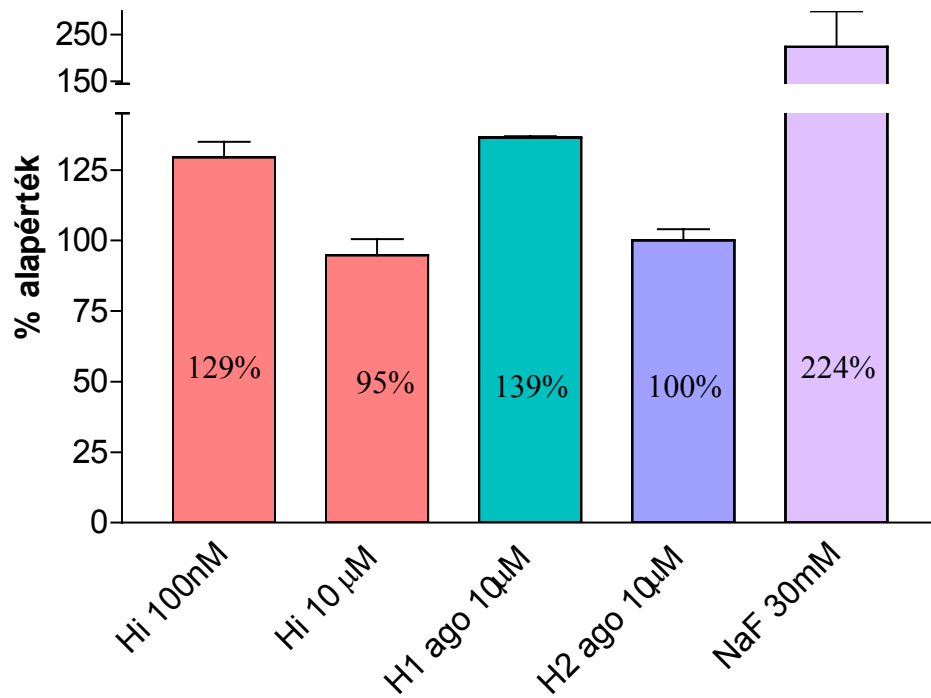


b)

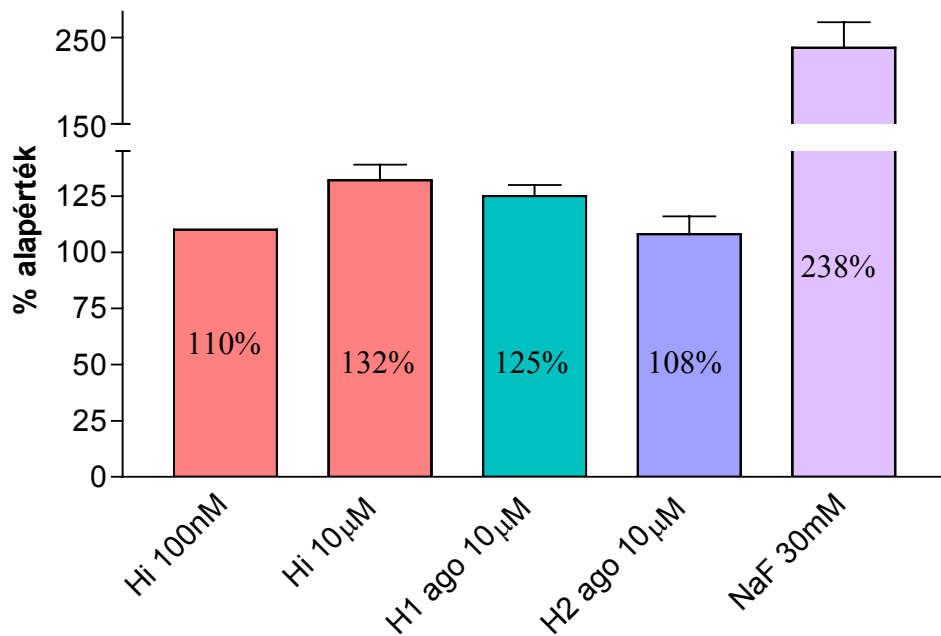


10. ábra. Hisztamin és hisztamin receptor agonisták fokozzák az M1/15 (a) és WM983B (b) humán melanoma vonalakban a cAMP képződést. Hisztamin hatására kis mértékben emelkedik a cAMP szint, szemben a kontrollként használt forskolinnal, amely 600-700 %-os cAMP növekedést okoz.

a)



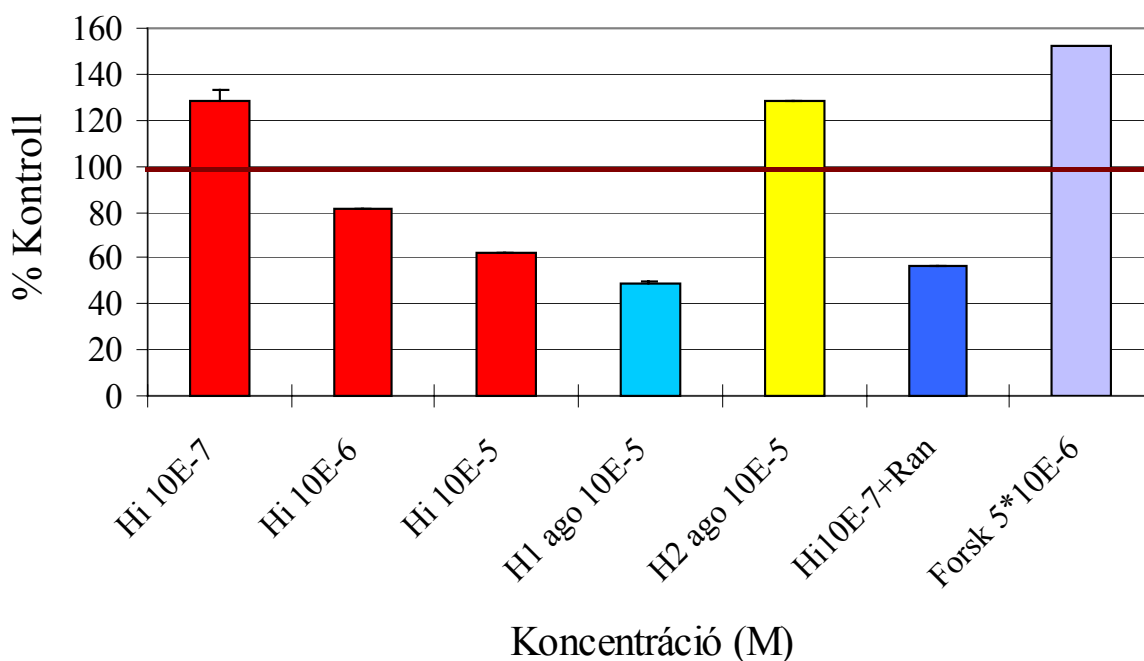
b)



11. ábra. Hisztamin és hisztamin agonista stimulus fokozza az IP3 képződést az M1/15 (a) és HT168/91 (b) melanoma vonalakban. Pozitív kontrollként 30mM-os nátrium fluoridot használtunk, amely az inozitolfoszfat képződést több, mint 200%-kal fokozta.

A hisztamin szerepe a melanoma sejtek proliferációjában

A melanoma sejtekben, illetve a sejtek felülúszójában mérhető hisztamin, mint ligand, valamint a funkcionálisan aktív H1 és H2 receptorok együttes jelenléte felveti annak lehetőségét, hogy a hisztaminnak autokrin növekedési faktor szerepe lehet ezekben a sejtekben (7, 11). Ezért következő kísérleteinkben megvizsgáltuk a hisztamin és különböző hisztamin agonisták hatását a melanoma sejtek osztódására, monolayerben történő kolóniaképződéses módszert alkalmazva. A hisztamin kis koncentrációban (10^{-7} M) szignifikánsan növelte a sejtkolóniák számát a WM35 vonalnál (12. ábra).



12. ábra. Hisztamin és hisztamin agonisták hatása a WM35 melanoma vonal proliferációjára. A sejtproliferációt monolayerben történő kolóniaképződéses módszerrel vizsgáltuk, az ábrán a kezeletlen mintához viszonyított százalékos értékek vannak feltüntetve. H1 agonistaként 2-(3-fluorofenil)-hisztamint, H2 agonistaként arpromidint használtunk. A kontrollként alkalmazott forskolin is növelte a sejtproliferációt.

Hasonló mértékben ugyancsak növelte a kolónia számot a H2 agonista apromidin és a kontrollként használt forskolin (5 μ M) is, ami azt mutatja, hogy a hisztamin az intracelluláris cAMP szint megnövekedése, valamint a proteinkináz A enzim aktiválása révén fejt ki sejtproliferációt fokozó hatását. A hisztaminnal együtt adott H2 antagonistáranitidin teljes mértékben gátolta a hisztamin sejtproliferációt fokozó hatását (**12. ábra**). A fokozottabban metasztatikus melanoma vonaloknál nem észleltünk szignifikáns proliferatív hatást kis koncentrációjú hisztamin, illetve H2 agonista hatására.

Ezzel ellentétesen nagyobb, 10^{-5} M hisztamin és H1 agonista kezelés jelentősen csökkentette a kolóniaszámot mind a négy vizsgált melanoma vonalnál (**5. táblázat**).

5. táblázat. Hisztamin és hisztamin agonisták hatása az M1/15, HT168/91 és WM983B humán melanoma vonalak proliferációjára. A sejtproliferációt kolónia képződéssel vizsgáltuk. Az ábrán a kezeletlen mintákhoz viszonyított kolóniaszám százaléka van feltüntetve.

Melanoma vonal	H1 agonista (10 μ M)	H2 agonista (10 μ M)	Hisztamin (10 μ M)	Forskolin (5 μ M)
WM35	56 % *	135 % *	52 % *	170 % *
WM 983B	76 % *	111 %	54 % *	72 % *
HT 168	56 % *	74 %	54 % *	64 % *
M1/15	65 % *	86 %	73 % *	74 % *

H1 agonista: 2-(3-fluorofenil)-hisztamin, H2 agonista: arpromidin. n = 5; *, p < 0.05 a kontrollhoz viszonyítva (100 %), one way ANOVA.

A mérési eredmények azt bizonyítják, hogy a hisztamin kétféle módon szabályozza a WM35 primer melanoma sejtek osztódását: kis, 10^{-7} M koncentrációban növeli, nagy (10^{-5} M) koncentrációban pedig csökkenti a kialakuló kolóniák számát. Ez a kettős hatás eltérő receptorok, illetve jelátviteli utak segítségével valósul meg, tehát végeredményben a hisztaminra adott választ a melanoma sejt prognosztikus állapota, valamint a H1 és H2 receptorok aránya határozza meg. Érdekes módon a metasztatikus melanoma sejtekben nem mutatható ki hasonló mértékű H2 receptor aktiválódás, mint a WM35 primer sejtvonalban, ahol az intracelluláris cAMP szint nagymértékű megnövekedésével párhuzamosan mutatható ki a hisztamin sejtproliferációt fokozó hatása (**5. táblázat**).

IL-6 HATÁSA A MELANOMA SEJTEK HISZTAMIN TARTALMÁRA ÉS A HISZTAMIN RECEPTOR EXPRESSZIÓRA

Habár a hisztamin IL-6 és IL-6R expressziót szabályozó szerepe számos sejttípusban ismert (56, 19), keveset tudunk e szabályozó mechanizmus fordított oldaláról, vagyis arról, hogy van-e, illetve milyen szerepe van az IL-6-nak a hisztamin metabolizmus, receptor expresszió, illetve jelátvitel szabályozásában.

További kísérleteink során az eredetileg feltett kérdés másik oldalára is választ kerestünk: befolyásolja-e az IL-6 a melanoma sejtek hisztamin és HDC tartalmát, valamint a hisztamin receptor expressziót. Mivel az IL-6 – eddigi eredményeink és irodalmi adatok szerint – gátolja a WM35 melanoma sejtek proliferációját, az a kérdés is felvetődött, hogy van-e szerepe a hisztaminnak, a hisztamin receptoroknak az IL-6 gátló hatásában.

Az IL-6 szerepe a melanoma sejtek proliferációjában

A tanulmányozott melanoma vonalakban kimutatható az IL-6R és a gp130 közös jelátvivő elem expressziója. Autokrin IL-6 szekréciónak csak a metasztatizáló vonalakban detektáltunk, de a primer vonalak citoplazmájában is kimutatható az IL-6 immuncitokémiai módszerrel (a WM35 primer vonalban a 6. tenyésztési napon a

kimutatási határ közelében mért kis IL-6 mennyiség nagy valószínűséggel az elpusztult, szétesett sejtekből származik).

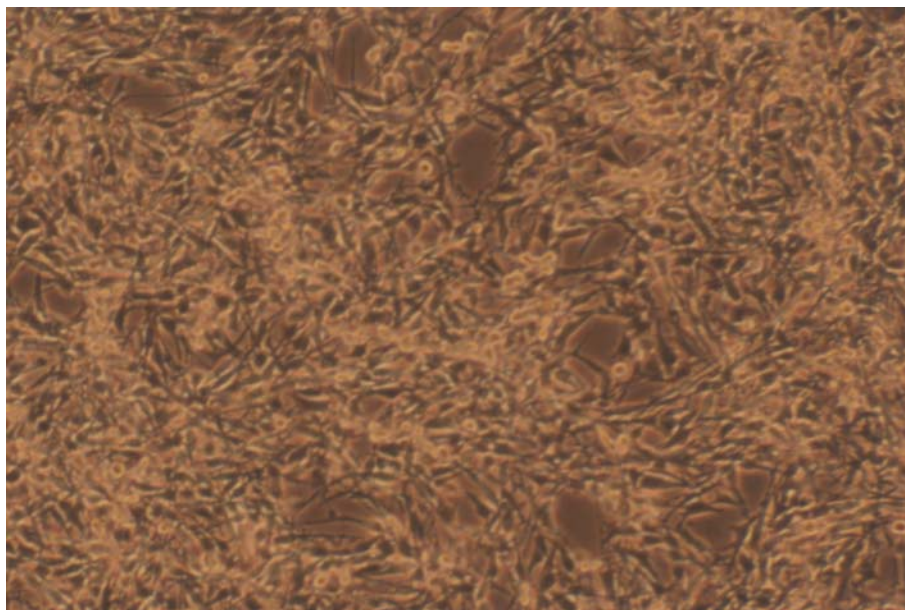
A további kísérleteinkben az exogén IL-6 szerepét vizsgáltuk, elsősorban a primer melanoma vonalakban. Monolayerben történő kolóniaképződéses módszert alkalmazva azt tapasztaltuk, hogy az IL-6 1-100 ng/ml koncentrációban jelentősen csökkentette a WM983B kultúrákban a kolóniák számát (20-59 %) (6. táblázat), és meggátolta a kolóniák kialakulását a WM35 sejtvonalnál. Rövidebb kezelési időnél sejtszám mérést végezve azt tapasztaltuk, hogy az IL-6 dóziszfüggően, nagymértékben és szignifikánsan csökkentette a primer jellegű WM35 melanoma vonal proliferációját (13. és 14. ábra), és ez MTT módszerrel is reprodukálható volt.

6. táblázat. Az interleukin-6 kezelés szignifikánsan csökkenti a WM983B melanoma sejtkultúrákban kialakuló kolóniák számát. A sejteket 1-100 ng/ml IL-6-tal kezeltük 8 napig és meghatároztuk a monolayerben kialakuló kolóniák számát (lásd módszerek).

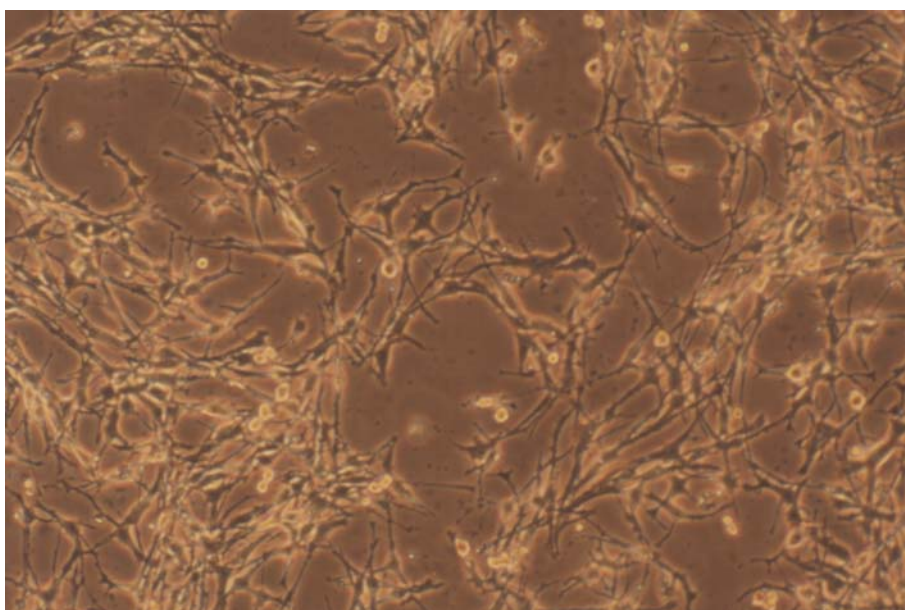
Interleukin-6 ng/ml, n=4	Kolóniaszám/well ± s.e.m.	Gátlás (%)
0	31 ± 1	-
1	24 ± 2	20
5	14 ± 1	54,1
10	13 ± 2	57,4
50	13 ± 1	57,4
100	12 ± 1	59,0

Eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy az IL-6 szignifikánsan és dóziszfüggően csökkenti az IL-6-ot nem termelő primer WM35, illetve kis metasztatikus képességgel rendelkező WM983B melanoma sejtek osztódását.

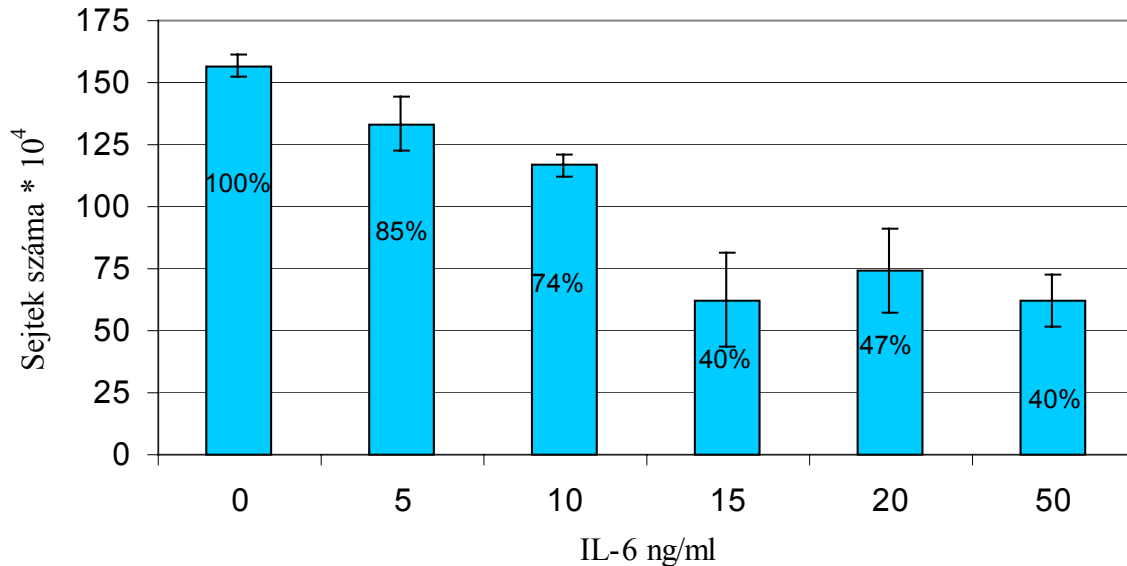
a)



b)



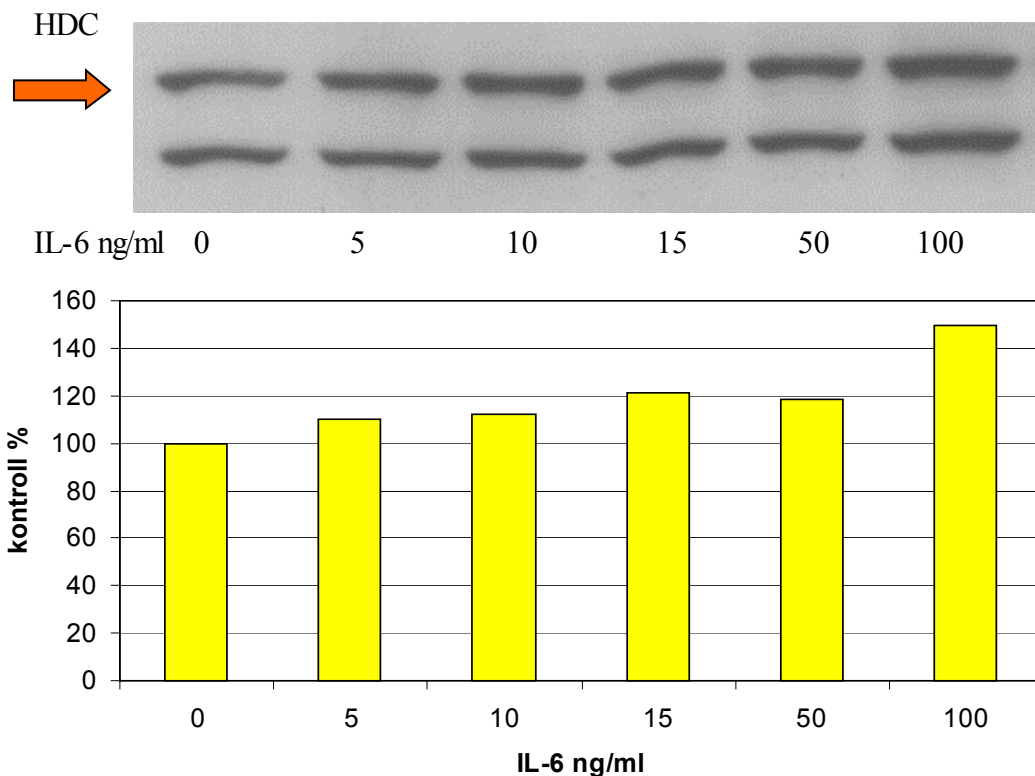
13. ábra. Az interleukin-6 csökkenti a WM35 melanoma sejtek proliferációját. A sejteket 20 ng/ml IL-6-tal kezeltük 72 h-ig. Fáziskontraszt mikroszkópos felvétel (Nikon Diaphot TMD, 10x nagyítás). a- Kezeletlen, b- 20 ng/ml IL-6 kezelt.



14. ábra. Az interleukin-6 dózisfüggően gátolja a WM35 melanoma sejtek osztódását. Az ábrán 72 órás IL-6 kezelés után, tripánkék festés mellett mért sejtszámok láthatók, az oszlopokon a kezeletlen mintákhoz viszonyított százalékos értékek vannak feltüntetve.

Az IL-6 hatása a melanoma sejtek HDC és hisztamin tartalmára

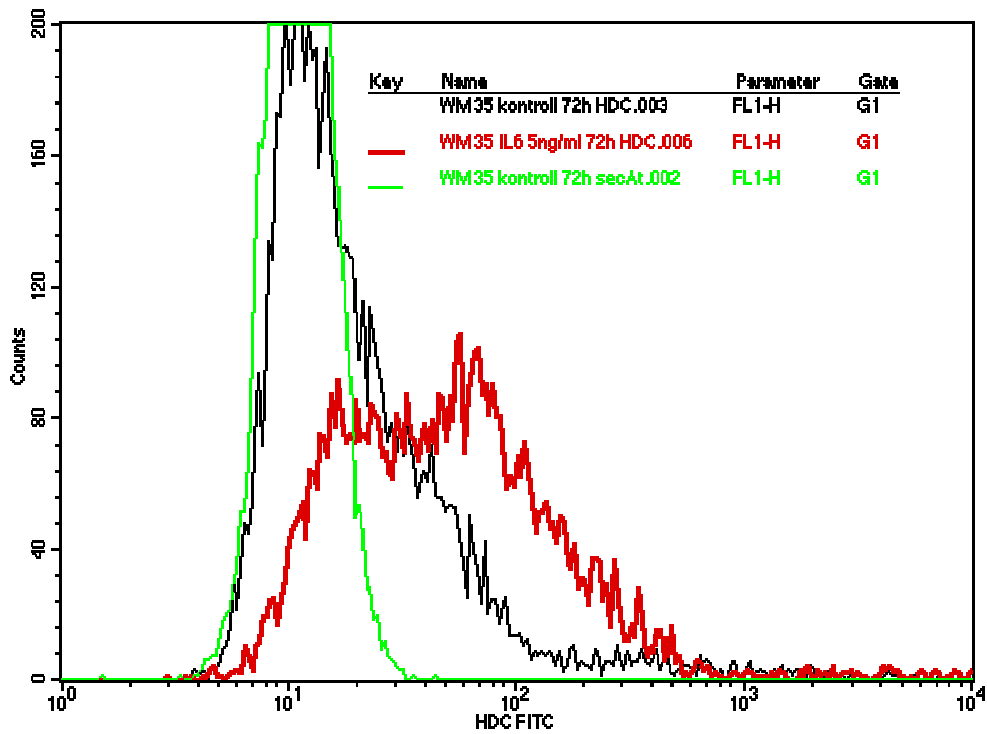
Következő kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy van-e valamilyen hatása az exogén IL-6 kezelésnek az intracelluláris HDC, illetve hisztamin tartalomra, elsősorban a primer jellegű WM melanoma vonalakban. A sejteket 5-100 ng/ml IL-6-tal kezeltük majd Western blot és áramláscitometriás méréseket végeztünk az intracelluláris HDC szintjének a meghatározására kezelt, valamint kontroll sejtekben. Western blot módszerrel kimutattuk, hogy az IL-6 dózisfüggő módon növelte a sejtek HDC tartalmát, a kontroll sejtekhez viszonyítva 10-55 %-kal, amint azt a denzitometriás kiértékelés mutatja (15. ábra). A Western bloton látható második, 39 kDa körüli csík valószínűleg egy kisebb méretű, proteolitikus hasítással keletkező HDC izoforma, amely a HDC posztranszlációs módosulása következtében jöhet létre, egy hasonló méretű izoforma létét bizonyították patkány HDC esetében (Fleming JV et al, Mol Cell Biol 20: 4932-47, 2000).



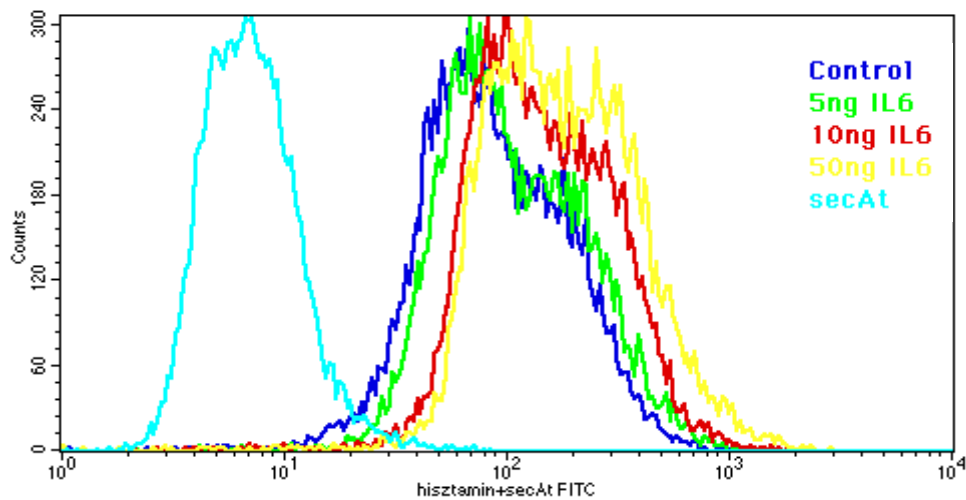
15. ábra. Az interleukin-6 növeli a WM35 melanoma sejtek hisztidin dekarboxiláz (HDC) tartalmát (Western blot). Az oszlopdiaagram a Western blot denzitometriás kiértékelését ábrázolja.

Az áramlási citometriás vizsgálat során is megnövekedett HDC szintet mértünk az IL-6 kezelt mintákban (**16. ábra**).

Az intracelluláris hisztamin mérését is áramlási citometriásan végeztük egy specifikus ellenanyag segítségével, indirekt jelölést alkalmazva. Az eredmények azt mutatják, hogy az IL-6 kezelés jelentős növekedést okoz a melanoma sejtek hisztamin tartalmában (**17. ábra**). A hisztamin-jelzett sejteket lézer konfokális mikroszkópban is megvizsgáltuk. Azt észleltük, hogy az IL-6 kezelés jelentősen megnövelte az erősebben hisztamin pozitív sejtek számát (**18. ábra**).

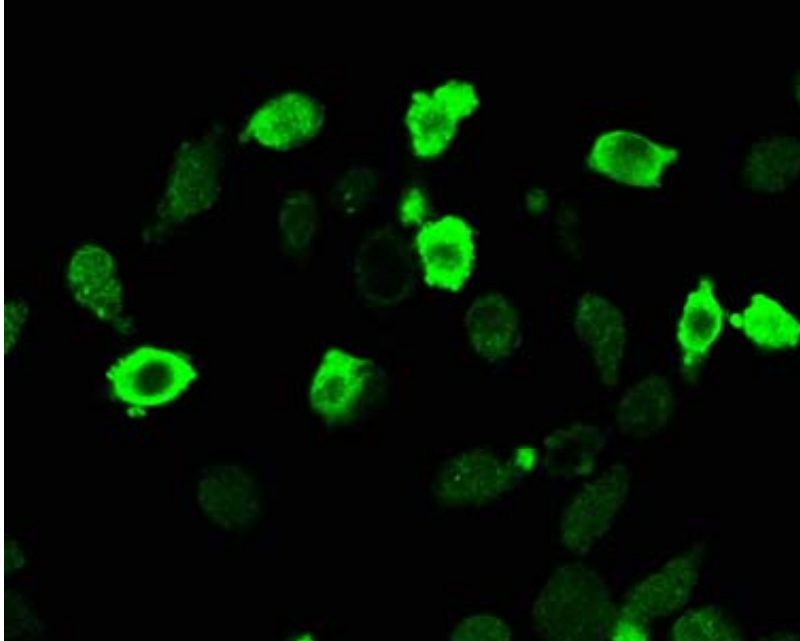


16. ábra. IL-6 kezelés hatása a WM35 melanoma sejtek HDC tartalmára (áramlási citometriás vizsgálat). Az ábrán zöld színnel az aspecifikus kontrollt, fekete színnel a kezeletlen mintát, piros színnel az 5 ng/ml IL-6-tal kezelt sejteket jelöltük.

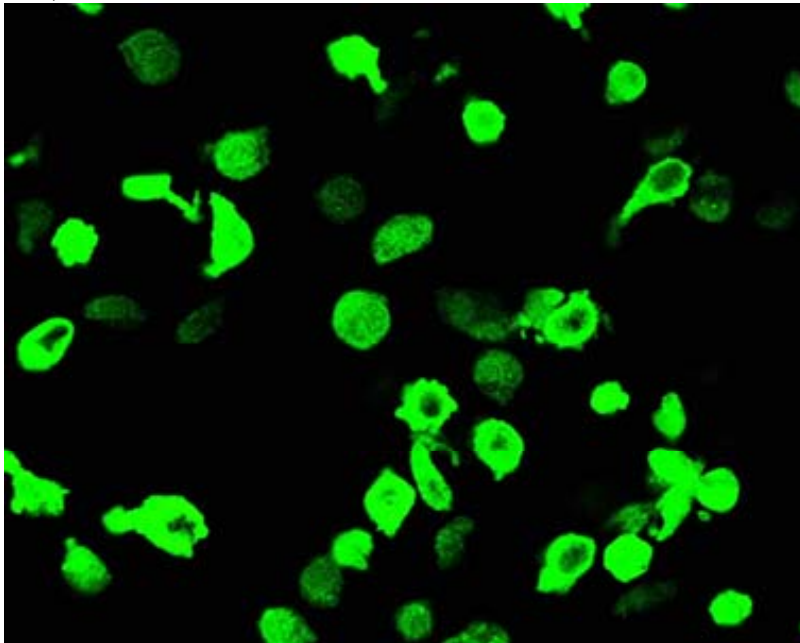


17. ábra. A hisztamin tartalom változása WM35 melanoma sejtekben IL-6 kezelés hatására (áramlási citometriás vizsgálat). Kék színnel a kezeletlen, zöld színnel az 5 ng/ml, piros színnel a 10 ng/ml, sárga színnel az 50 ng/ml IL-6-tal kezelt mintákat tüntettük fel, a világoskék az aspecifikus kontrollt jelöli.

a)



b)

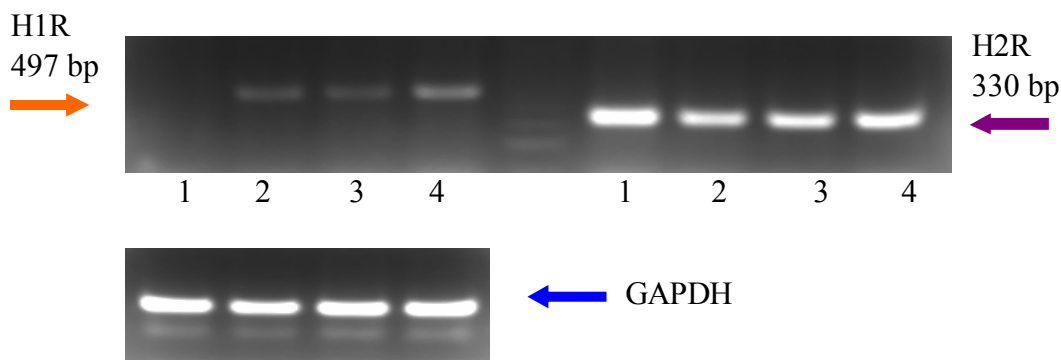


18. ábra. Az interleukin-6 kezelés növeli a hisztamin-pozitív sejtek számát a WM35 melanoma vonalban. Az ábrán az antihisztamin ellenanyaggal indirekt módon jelölt sejtek láthatók a konfokális mikroszkópos felvételen. a) Kezeletlen minta, b) 5 ng/ml IL-6-tal kezelt sejtek.

Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy az exogén IL-6 megnöveli a primer melanoma sejtekben a HDC, illetve hisztamin tartalmat, tehát a hisztaminnak szerepe lehet az IL-6 jelentős antiproliferatív hatásában, amelyet a primer jellegű melanoma vonalakban észleltünk.

A interleukin-6 hatása a H1 és H2 receptor expresszióra

Az IL-6 kezelt WM35 melanoma sejtekben RT-PCR módszerrel megvizsgáltuk az interleukin-6 kezelés hatását a H1 és H2 hisztamin receptor expresszióra. Azt találtuk, hogy az IL-6 eltérően szabályozza a H1 és H2 receptor mRNS szintet. IL-6 hatására dózis-függően megnőtt a H1 receptor expresszió, és csökkent a H2 receptor expresszió a glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) housekeeping génre normalizálva (19. ábra).



19. ábra. Az interleukin-6 hatása a H1 és H2 hisztamin receptor expresszióra WM35 humán melanoma vonalban (RT-PCR). 1- Kezeletlen, 2 - 5 ng/ml, 3 - 20 ng/ml, 4 - 50 ng/ml IL-6.

Eredményeinkből következik, hogy az IL-6 ellentétes módon szabályozza a H1 és H2 hisztamin receptor expressziót a WM35 primer melanoma vonalban. Figyelembe véve a hisztamin receptorok szerepét ezen melanoma sejtek proliferációjában, a H2R aktiváló, illetve a H1R gátló hatását, az IL-6 kezelés következtében létrejövő expressziós mintázat egyértelműen a sejtosztódás csökkenése irányában hat.

KÖVETKEZTETÉSEK

A melanoma kialakulását elősegítő malignus folyamatok meghatározó jellemzője, hogy a melanoma sejtek fokozott mértékben expresszálnak növekedési faktorokat és citokineket, amelyek a tumor progresszióját elősegítik direkt autokrin hatásukkal és/vagy a környező sejtekre gyakorolt parakrin hatásaikkal, mint pl. a tumor ellenes immunválasz gátlásával. A melanoma malignus progressziója során jelentősen növekszik számos növekedési faktor expressziója, mint pl. bFGF, TGF- β , a TNF- β , a GM-CSF, IL-1, IL-8 és IL-6. Másrészt a növekedési faktor receptorok is koexpresszálódnak a melanoma sejteken, ami autokrin szabályozási funkciók megjelenését teszi lehetővé, mint például az intenzív növekedés vagy az invazív tulajdonságok, pl. motilitás fokozódása.

A hisztamin a sejtproliferációban játszott szerepe révén, mint újonnan leírt növekedési faktor került a tumorok növekedésével kapcsolatos kutatások középpontjába. Egyre több adat van arra nézve, hogy közvetlenül hat bizonyos tumorok osztódására, illetve a helyileg kialakuló immunválaszt több szinten is befolyásolja, pl. a T sejt polarizáció irányát Th2 túlsúly irányába változtatja meg. Ugyanakkor ismert, hogy a hisztamin számos citokin bioszintézisét és hatását is szabályozza különböző sejttípusokban, ez a szabályozás kétirányú is lehet, mivel a hisztamin képződését, felszabadulását is befolyásolhatják citokinek (41).

Az interleukin-6 egy pleiotrop citokin, amelyet elsősorban makrofágok, keratinociták, fibroblasztok és endotél sejtek termelnek, szerepe számos gyulladáshoz (akut fázis fehérjék képződése) és immunológiai (B limfociták érése, hematopoiesis) folyamatban ismert. Az IL-6 expresszió fokozódik LPS, virális termékek, IL-1, γ -IFN és

más szabályozó tényezők hatására, a folyamat molekuláris mechanizmusában szerepet játszanak az NF-IL-6 és NF- κ B transzkripciós faktorok, valamint más, részben ismeretlen szabályozó elemek.

Melanoma sejtekben az IL-6 expresszió jelentős mértékben növekszik a tumor progresszióval, normális melanociták nem expresszálnak IL-6-t. Melanomában az IL-6 szerepe kettős, mivel gátolja a melanociták és a korai, primer melanoma sejtek osztódását, de az előrehaladott, metasztatikus sejtek rezisztenssé válnak a gátló hatással szemben, sőt az általuk termelt „saját” IL-6 autokrin módon fokozza az osztódásukat.

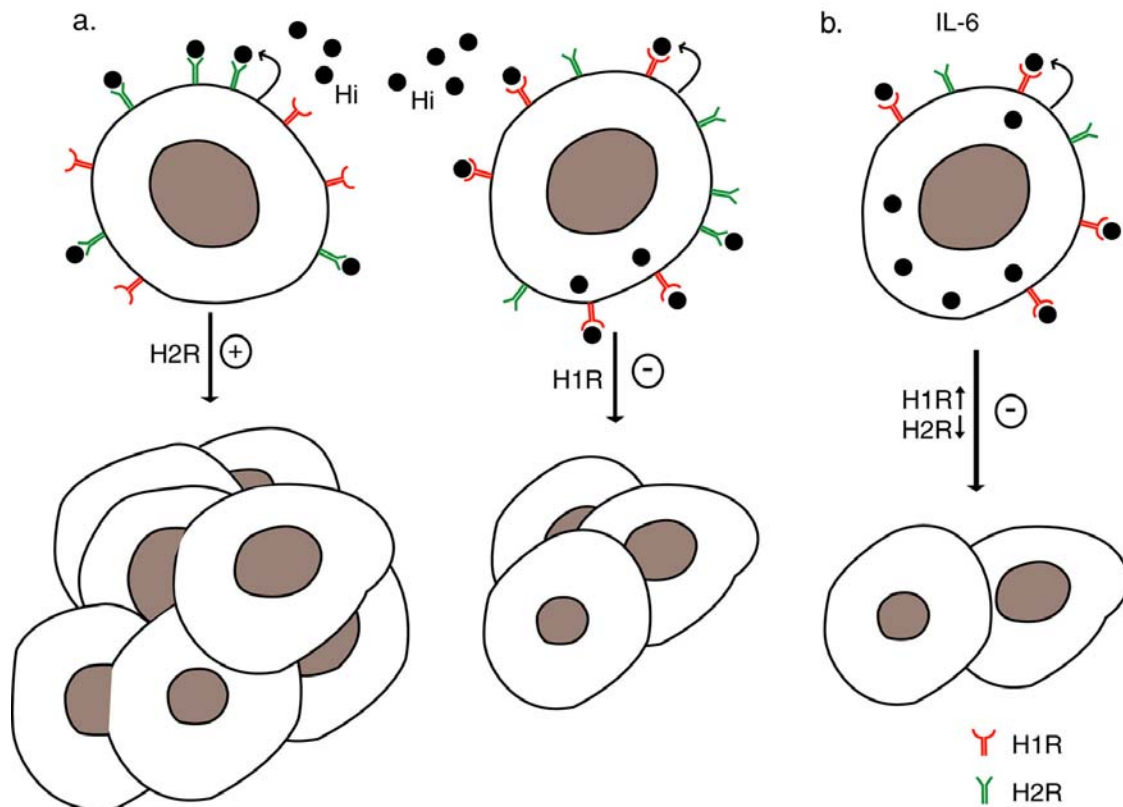
A hisztamin, valamint az azt kizárólagosan előállító hisztidin dekarboxiláz enzim jelenléte a melanoma sejtekben egyértelműen bizonyított. A hisztamin antagonistákkal végzett kísérleteink azt bizonyítják, hogy a metasztatikus melanoma vonalakban az autokrin IL-6 termelést a melanoma vonalak által termelt hisztamin szabályozza. Az autokrin IL-6 bioszintézis szabályozása H1 receptoron keresztül történik, mivel kizárólag a H1 antagonistá triprolidin csökkentette a szecernált IL-6 mennyiséget. Az intracelluláris HDC enzim α -FMH-val történő irreverzibilis gátlása az IL-6 termelés átmeneti, de reprodukálható csökkenéséhez vezetett a HT168/91 melanoma vonalban. A melanoma sejtek által tartalmazott hisztamin tehát szerepet játszik a lokális IL-6 bioszintézis szabályozásában, befolyásolva ezáltal az IL-6 autokrin hatását, H1 receptor mediált mechanizmus révén.

Ugyanakkor az endogén hisztamin, valamint a hisztamin H1 és H2 receptorok együttes jelenléte a melanoma sejtekben felveti a hisztamin közvetlen autokrin szabályozási lehetőségét a melanoma sejtekben. A proliferációs kísérletek eredményei azt bizonyítják, hogy a hisztamin koncentrációtól függően ellentétes módon szabályozza a WM35 primer melanoma sejtek osztódását: nagy koncentrációban (10^{-5} M) gátolja, alacsony (10^{-7} M) koncentrációban növeli a kialakuló sejtkolóniák számát. A H1 agonista 2-(3-fluorofenil)-hisztamin a nagyobb hisztamin koncentrációval analóg módon csökkentette, míg a H2 agonista arpromidin növelte a kolóniák számát, akárcsak a kisebb (10^{-7} M) koncentrációjú hisztamin. H2 antagonisták: ranitidin és famotidin a hisztaminnal együtt adva meggátolták a proliferáció fokozódását, ami a H2 receptorok egyértelmű szerepét bizonyítja. Jelátviteli méréseink szerint a melanoma H2 receptorok aktiválása funkcionálisan az intracelluláris cAMP szint megnövekedését indukálja, a magas cAMP szint, valamint a proteinkináz A aktiváció fontos elemei a hisztamin

mitogén hatásáért felelős jelpályának. Ezt alátámasztja, hogy a kontrollként használt forskolin ugyancsak fokozta a proliferációt az adott kísérleti rendszerben (**12. ábra**). Ezek az eredmények közvetlenül bizonyítják, hogy az endogén úton termelt hisztamin autokrin növekedési faktorként szabályozza a primer jellegű melanoma sejtek proliferációját. Ugyanakkor *in vivo* a tumor környezetében található sejtek, pl. a hízósejtek által termelt hisztamin koncentráció-függően parakrin módon szabályozhatja a melanoma sejtek növekedését.

A hisztamin fokozza az IL-6 bioszintézist H1 receptoron keresztül számos sejttípusban, normális vagy tumorosan transzformált sejtekben, így tüdő makrofágokban, keratinocitákban, endotél és astrocytoma sejtekben, valamint B lymphoma és glioblastoma sejtekben is. Azt is tudjuk, hogy a hisztamin az IL-6 receptor expressziót is befolyásolja, H1R-on növeli, H2R-on csökkenti az IL-6R expressziót. Keveset tudunk viszont a hisztamin-citokin szabályozás fordított oldaláról, vagyis arról, hogy az IL-6 hogyan befolyásolja a hisztamin bioszintézisét, hatását a melanoma sejtekben. A vizsgált melanoma vonalakban kimutatható az IL-6R és a gp130 expresszió, ugyanakkor csak a metasztatikus jellegű melanoma vonalak termelnek mérhető mennyiségű IL-6 fehérjét, a primer vonalak nem vagy csak elenyésző mennyiségben. Az exogén IL-6 kezelés viszont koncentráció-függően erőteljesen gátolja a primer jellegű WM melanoma vonalak osztódását. Kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy van-e szerepe a sejtekben található hisztaminnak, illetve hisztamin receptoroknak az IL-6 által mediált nagyfokú proliferáció gátlásban. Eredményeink azt mutatják, hogy az exogén IL-6 kezelés növelte a melanoma sejtek HDC tartalmát és az intracelluláris hisztamin szintet is. Ismert, hogy a melanoma sejtek képesek hisztamin leadásra illetve felvételre környezetük felé (13), tehát a hisztamin a sejtek külső környezetében, a felülúszóban is nagyobb mennyiségben lehet jelen. Ugyanakkor IL-6 jelenlétében megváltozott a sejtek hisztamin receptor expressziós mintázata: tartós (72 óras) IL-6 kezelés hatására jelentősen csökkent a H2 receptorok expressziója, illetve megnőtt a H1 receptor expresszió a primer WM35 melanoma vonalban. A megnövekedett hisztamin termelés, valamint a H1 receptor expresszió növekedése, másfelől a H2 receptorok szintjének csökkenése egy olyan lokális egyensúly kialakulásának kedvez, amely jelentős növekedés gátlást eredményez (**20. ábra**). Az endogén hisztamin tehát közvetve szerepet játszik az IL-6 sejtproliferáció gátló

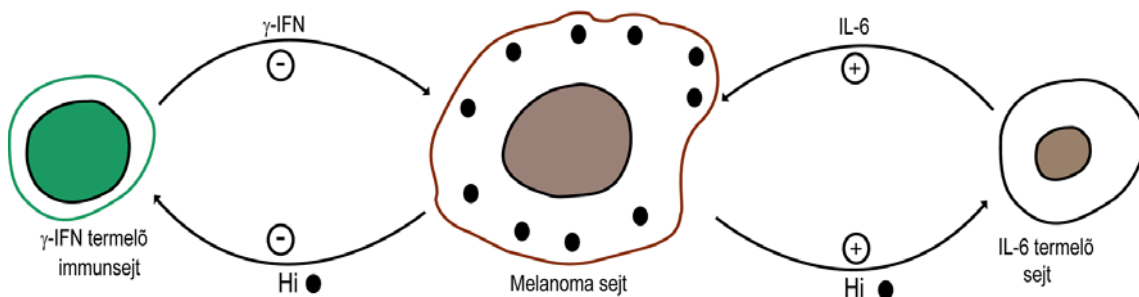
hatásában a primer melanoma vonalakban. Eredményeink alapján feltételezhető tehát egy olyan kölcsönhatás a lokális IL-6 és hisztamin szabályozásban, amely végső soron növekedés gátlást eredményez primer jellegű humán melanomában.



20. ábra. a) A hisztamin hatása a melanoma sejtek osztódására: H2 receptoron fokozza, H1 receptoron csökkenti a primer WM35 melanoma sejtek kolónia képződését. b) Az IL-6 megnöveli a sejtek hisztamin tartalmát és a H1/H2 hisztamin receptor arányt a H1 receptorok javára változtatja meg. Mindez a melanoma sejtek proliferációjának a csökkenése irányába hat.

Metasztatikus melanomában a hisztamin növeli az IL-6 bioszintézist H1 receptoron keresztül, ugyanakkor IL-6 kezelés hatására megnő a melanoma sejtek HDC illetve hisztamin tartalma a primer melanoma vonalakban, mindez arra utal, hogy az IL-6 és hisztamin kölcsönösen serkenthetik egymás bioszintézisét.

A hisztamin és a lokális citokin hálózat közötti kölcsönhatást a melanoma szöveti környezetében tovább bonyolítja a hisztamin és a γ -interferon közötti kölcsönös gátló hatás (38, 35). A melanoma sejt által termelt hisztamin, valamint a környező sejtek által termelt IL-6 és γ -interferon közötti kétoldalú kölcsönhatások a **21.ábrán** vannak feltüntetve.



21. ábra. Kétirányú hisztamin-citokin kölcsönhatások a melanoma sejtek környezetében. A környező sejtek által termelt IL-6 növeli a melanoma sejtek hisztamin tartalmát, a hisztamin pedig fokozhatja azok IL-6 termelését. Ezzel szemben a γ -interferon csökkenti a melanoma sejt HDC tartalmát, a melanoma által termelt hisztamin pedig a γ -IFN-t termelő limfocitára hat gátlóan.

Következtetesként elmondhatjuk, hogy a melanoma sejtek által termelt hisztamin és IL-6 fontos szerepet tölt be az eltérő stádiumban levő melanoma sejtek növekedésében. Eredményeink azt mutatják, hogy az IL-6 és a hisztamin közvetlen hatása mellett a két jelpálya közötti kölcsönhatások és kapcsolatok tovább finomítják a melanoma sejtek növekedésének szabályozását. Mindezek mellett az IL-6 receptor és a G fehérjékhez kötött hisztamin receptorok jelátvitelét befolyásoló genetikai polimorfizmusok feltárásával tovább bővíthet ez egyes melanoma betegeknél található komplex szabályozási mechanizmusról alkotott képünk.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani Dr. Falus Andrásnak, a Genetikai, Sejt- és Immunbiológia Intézet igazgatójának, amiért lehetővé tette, hogy az általa vezetett PhD programban részt vehessek, laboratóriumában dolgozhassak és munkámban irányított.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Tóth Sárának az irányítását, szakmai tanácsait.

Munkatársaim közül elsősorban Dr. Hegyesi Hargitának köszönöm segítőkészségét, közvetlenségét, azt, hogy a szakmai tapasztalatait megosztotta velem.

Ugyancsak köszönöm Darvas Zsuzsának és László Valériának a segítőkészségét, hasznos szakmai tanácsait.

Köszönöm Dr. Pállinger Évának a áramlásicitometriás vizsgálatokban nyújtott szíves segítségét.

Ugyancsak köszönöm Dr. Kovács Péter segítségét a konfokális mikroszkópos vizsgálatok elvégzésében.

Köszönettel tartozom Dr. Szalai Csabának, amiért gyakran segítségemre volt értékes szakmai tanácsaival.

Köszönöm az intézet minden dolgozójának a készséges szakmai és emberi segítőkészségét.

Közvetlen munkatársaimnak és PhD hallgató társaimnak köszönöm, hogy kellemes légkörben velük dolgozhattam.

Külön köszönettel tartozom Farkasné Nagy Krisztina, Ördögh Judit és Orbán Andrea asszisztenseknek önzetlen segítőkészségükért, értékes gyakorlati tanácsaikért.

Végül köszönöm Dr. Elena Rivera profeszorasszonynak, hogy két és fél hónapot laboratóriumában dolgozhattam Buenos Airesben. Ugyancsak köszönöm a labor többi tagjának, Graciella Cricco, Gabriela Martin és mások önzetlen segítségét is.

IRODALOM

1. Araki M, Yano T, Hayashi H, Takii T, Suzuki K, Onozaki K: Resistance to the antiproliferative effect of IL-1 on human melanoma cell line is associated with endogenous production of IL-1 and IL-6. *Int J Cancer* 56: 275-280, 1994.
2. Barr RM, Walker SL, Tsang W, Harrison GI, Ettehadi P, Greaves MW, Young AR: Suppressed alloantigen presentation, increased TNF-alpha, IL-1, IL-1Ra, IL-10 and modulation of TNF-R in UV-irradiated human skin. *J Invest Dermatol* 112: 5692-8, 1999.
3. Bartholeyns J, Bouclier M.: Involvement of histamine in growth of mouse and rat tumors: antitumoral properties of monofluoromethylhistidine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of histidine decarboxylase. *Cancer Res* 44(2):639-45, 1984.
4. Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y et al: Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 406: 536-40, 2000.
5. Bosserhof AK, Kaufmann M, Kaluza B, Bartke I, Zirngibl H, Hein R, Stolz W, Buettner R: Melanoma-inhibiting Activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Cancer Res* 57: 3149-3153, 1997.
6. Brown T J, Liubin M N, Marquardt H: Purification and characterization of cytostatic lymphokines produced by activated human T lymphocytes. *J Immunol* 139: 2977-2983, 1987.
7. Burtin C, Scheinmann P, Salomon JC, Lespinats G, Canu P.: Decrease in tumour growth by injections of histamine or serotonin in fibrosarcoma-bearing mice: influence of H1 and H2 histamine receptors. *Br J Cancer* 1982 Jan;45(1):54-60
8. Chen Q, Daniel V, Maher DW, Hersey P: Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *Int J Cancer* 56: 755-60, 1994.
9. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Biochem* 162(1):156-9, 1987.
10. Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO: Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 406: 532-35, 2000.
11. Cricco G, Engel N, Davio C, Fitzsimons C, Bergoc R and Rivera E: Histamine as an Autocrine Growth Factor in Experimental Mammary Carcinomas. *Agents and Actions*, 43:17-20, 1994.
12. Cross M, Dexter T M: Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell* 64:271-280, 1991.
13. Darvas Z, Sakurai E, Hegyesi H, Otsu H, Watanabe T, Falus A: Turnover of histamine in human melanoma cell lines. *Inflamm Res* 49:S70-1, 2000.
14. Das PK, van den Wijngaard RM, Wankowicz-Kalinska A, Le Poole IC: A symbiotic concept of autoimmunity and tumor immunity: lessons from vitiligo. *Trends Immunol* 22(3): 130-6, 2001.
15. Davio CA, Cricco GP, Bergoc RM and Rivera ES. H₁ and H₂ histamine receptors in N-nitroso-N-methylurea (NMU)-induced carcinomas with an atypical coupling to signal transducers. *Biochem Pharmacol* 50:91-96, 1995.
16. De Fabo EC, Webber LJ, Ulman EA, Broemeling LD: Dietary L-histidine regulates murine skin levels of trans-urocanic acid, an immune-regulating photoreceptor, with an unanticipated modulation: potential relevance to skin cancer. *J Nutr* 127(11): 2158-64, 1997.

17. Dotto G P, Moellmann G, Ghosh S, Edwards M, Halaban R: Transformation of murine melanocytes by basic fibroblast growth factor cDNA and oncogenes and selective suppression of the transformed phenotype in a reconstituted cutaneous environment. *J Cell Biol* 109: 3115-3128, 1989.
18. Edmondson SR, Russo VC, McFarlane AC, Wraight CJ, Werther GA: Interactions between growth hormone, insulin-like growth factor I, and basic fibroblast growth factor in melanocyte growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 May;84(5):1638-44
19. Falus A: Interleukin-6 biosynthesis is increased by histamine in human B-cell and glioblastoma cell lines. *Immunology* 78: 193-196, 1993.
20. Fiebich B L, Huell M, Lieb K, Gyufko K, Berger K, Bauer J: Prostaglandin E2 induces interleukin-6 synthesis in astrocytoma cells. *J Neurochem* 68: 704-709, 1997.
21. Fiebich B L, Lieb K, Berger M, Bauer J, van Calker D: Adenosine A2b receptors mediate an increase in interleukin (IL)-6 mRNA and IL-6 protein synthesis in human astrogloma cells. *J Neurochem* 66: 1426-31, 1996.
22. Fiebich B L, Lieb K, Berger M, Bauer J: Stimulation of the sphingomyelin pathway induces interleukin-6 gene expression in human astrocytoma cells. *J Neuroimmunol* 63: 207-211, 1995.
23. Fitzsimons C, Molinari B, Duran H, Palmieri M, Davio C, Cricco G, Bergoc R, Rivera E. Atypical association of H1 and H2 histamine receptors with signal transduction pathways during multistage mouse skin carcinogenesis. *Inflamm Res* 46(8):292-8, 1997.
24. Forslund OK, Nordqvist K: The melanoma antigen genes—any clues to their functions in normal tissues? *Exp Cell Res* 265(2): 185-94, 2001.
25. Freter CE, Lippman ME, Chevillie A, Zinn S, Gelmann EP: Alterations in phosphoinositide metabolism associated with 17 beta-estradiol and growth factor treatment of MCF-7 breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2(2):159-66, 1988
26. Godden JL, Edward M, MacKie RM.: Melanoma cell-derived factor stimulation of fibroblast glycosaminoglycan synthesis--the role of platelet-derived growth factor. *Eur J Cancer* 35(3):473-80,1999.
27. Griffiths HR, Mistry P, Herbert KE, Lunec J: Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. *Crit Rev Clin Lab Sci* 35(3): 189-237, 1998.
28. Györfi T, Herlyn M: Melanocyte and melanoma cell lines. Hay R J, Park J-G, Gazdar A (szerk). *Atlas of human tumor cell lines*. Academic Press, San Diego, pp 413-427, 1994.
29. Haak-Frendscho M, Darvas Z, Hegyesi H, Kárpáti S, Hoffman RL, László V, Bencsáth M, Szalai C, Fűrész J, Timár J, Bata-Csörgő Z, Szabad G, Pivarcsi A, Pállinger E, Kemény L, Horváth A, Dobozy A, Falus A: Histidine decarboxylase expression in human melanoma. *J Invest Dermatol* 115: 3 345-52, 2000.
30. Hachiya A, Kobayashi A, Ohuchi A, Takema Y, Imokawa G: The paracrine role of stem cell factor/c-kit signaling in the activation of human melanocytes in ultraviolet-B-induced pigmentation. *J Invest Dermatol* 2001, 116(4): 578-86
31. Hahne M, Rimoldi D, Schröter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini JC, Tschopp J: Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274: 1363-66, 1996.
32. Halaban R.: The regulation of normal melanocyte proliferation. *Pigment Cell Res* 2000 Feb;13(1):4-14

33. Hart PH, Grimbaldston MA, Swift GJ, Jaksic A, Noonan FP, Finlay-Jones JJ: Dermal mast cells determine susceptibility to ultraviolet B-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses in mice. *J Exp Med* 187: 2045-53, 1998.
34. Hellstrand K, Naredi P, Lindner P, Lundholm K, Rudenstam CM, Hermodsson S, Asztély M, Hafström L: Histamine in immunotherapy of advanced melanoma: a pilot study. *Cancer Immunol Immunother* 39: 416-19, 1994.
35. Heninger E, Falus A, Darvas Z, Szalai C, Zsinko M, Pos Z, Hegyesi H. Both interferon (IFN)alpha and IFNgamma inhibit histidine decarboxylase expression in the HT168 human melanoma cell line. *Inflamm Res* 49(8):393-7, 2000.
36. Hill S J, Ganellin C R, Timmerman H, Schwartz J C, Shankley N P, Young J M, Schunack W, Levi R and Haas H L: International Union of Pharmacology. XIII. Classification of Histamine Receptors. *Pharmacol Rev* 49: 253-278, 1997.
37. Horikawa T, Norris DA, Yohn JJ, Zekman T, Travers JB, Morelli JG: Melanocyte mitogens induce both melanocyte chemokinesis and chemotaxis. *J Invest Dermatol* 104(2):256-9, 1995.
38. Horváth B, Heninger E, Hegyesi H, Lázár M E, Radvány Zs, Szalai Cs, Darvas Zs, Falus A: Reciprocal inhibitory interactions between γ interferon and histamine in melanoma *Inflammation Research* 49(1): S27-S28, 2000.
39. Hough LB: Genomics meets histamine receptors: new subtypes, new receptors. *Mol Pharmacol* 59: 415-19, 2001.
40. Houghton AN, Gold JS, Blachere NE: Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Current Opinion in Immunology* 13: 134-140, 2001.
41. Igaz P, Novák I, Lázár E, Horváth B, Héninger E, Falus A.: Bidirectional communication between histamine and cytokines. *Inflammation Research* 20: 123-128, 2001.
42. Jäger D, Jäger E, Knuth A: Vaccination for malignant melanoma: recent developments. *Oncology* 60: 1-7, 2001.
43. Jansen-Olesen I, Ottosson A, Cantera L, Strunk S, Lassen LH, Olesen J, Mortensen A, Engel U, Edvinsson L: Role of endothelium and nitric oxide in histamine-induced responses in human cranial arteries and detection of mRNA encoding H1- and H2-receptors by RT-PCR. *Br J Pharmacol* 121(1):41-8, 1997.
44. Krasagakis K, Garbe C, Schrier PI, Orfanos CE: Paracrine and autocrine regulation of human melanocyte and melanoma cell growth by transforming growth factor beta in vitro. *Anticancer Res* 1994 Nov-Dec;14(6B):2565-71
45. Kunisada T, Yamazaki H, Hirobe T, Kamei S, Omoteno M, Tagaya H, Hemmi H, Koshimizu U, Nakamura T, Hayashi S I: Keratinocyte expression of transgenic hepatocyte growth factor affects melanocyte development, leading to dermal melanocytosis. *Mech Dev* 94: 1267-78, 2000.
46. Kurschat P, Mauch C: Mechanisms of metastasis. *Clin Exp Dermatol* 25(6): 482-9, 2000.
47. Lee JD, Sievers TM, Skotzko M, Chandler CF, Morton DL, McBride WH, Economou JS: Interleukin-6 production by human melanoma cell lines. *Lymphokine Cytokine Res* 11: 3161-66, 1992.
48. Leurs R, Blandina P, Tedford C, Timmerman H: Therapeutic potential of histamine H3 receptor agonists and antagonists. *TiPS* 19: 177-83, 1998.
49. Lieb K, Schaller H, Bauer J, Berger M, Schulze-Osthoff K, Fiebich B L: Substance P and histamine induce interleukin-6 expression in human astrocytoma cells by a

- mechanism involving protein kinase C and nuclear factor-IL-6. *J Neurochem* 70: 1577-83, 1998.
50. Loir B, Bouchard B, Morandini R, Del Marmol V, Deraemaecker R, Garcia-Borrón JC, Ghanem G: Immunoreactive α -melanotropin as an autocrine effector in human melanoma cells. *Eur J Biochem* 244:923-930,1997.
 51. Lu C, Kerbel RS: Interleukin-6 undergoes transition from paracrine growth inhibitor to autocrine stimulator during human melanoma progression. *J Cell Biol* 120: 1281-1288, 1993.
 52. Lu C, Sheehan C, Rak JW, Chambers CA, Hozumi N, Kerbel RS: Endogenous interleukin 6 can function as an in vivo growth-stimulatory factor for advanced-stage human melanoma cells. *Clin Cancer Res* 2: 1417-25, 1996.
 53. Luan J, Shattuck-Brandt R, Haghnegahdar H, Owen J D, Strieter R, Burdick M, Nirodi C, Beauchamp D, Johnson K N, Richmond A: Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *J Leukocyte Biol* 62: 588-597,1997.
 54. Maimone D, Cioni C, Rosa S, Macchia G, Aloisi F, Annunziata P: Norepinephrine and vasoactive intestinal peptide induce IL-6 secretion by astrocytes: synergism with IL-1 β and TNF α . *J Neuroimmunol* 47: 73-82, 1993.
 55. Martínez-Esparza M, Jiménez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA, García-Borrón JC: Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur J Biochem* 255: 1139-46, 1998.
 56. Merétey K, Falus A, Taga T, Kishimoto T: Histamine influences the expression of the interleukin-6 receptor on human lymphoid, monocytoid and hepatoma cell lines. *Agents and Actions*, 33: 189-91, 1991.
 57. Miglarese MR, Halaban R, Gibson NW: Regulation of fibroblast growth factor 2 expression in melanoma cells by the c-MYB proto-oncoprotein. *Cell growth & Differentiation* 8: 1199-1210, 1997.
 58. Mitsuhashi M, Mitsuhashi T, Payan DG: Multiple signaling pathways of histamine H₂ receptors. Identification of an H₂ receptor-dependent Ca²⁺ mobilization pathway in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. *J Biol Chem* 264(31):18356-62, 1989.
 59. Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K: Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol* 10:295-331, 1992.
 60. Molet S, Gosset P, Lassalle P, Czarlewski W, Tonnel A B: Inhibitory activity of loratadine and descarboxyethoxyloratadine on histamine-induced activation of endothelial cells. *Clinical and Experimental Allergy* 27: 1167-74, 1997.
 61. Montero-Julian FA, Brailly H, Sautés C, Joyeux I, Dorval T, Mosseri V, Yasukawa K, Wijdenes J, Adler A, Gorin I, Fridman WH, Tartour E: Characterization of soluble gp130 released by melanoma cell lines: a polyvalent antagonist of cytokines from the interleukin-6 family. *Clin Cancer Res* 3: 1443-51, 1997.
 62. Morelli JG, Kincannon J, Yohn JJ, Zekman T, Weston WL, Norris DA: Leukotriene C₄ and TGF-alpha are stimulators of human melanocyte migration in vitro. *J Invest Dermatol* 1992 Mar;98(3):290-5
 63. Moretti S, Pinzi C, Berti E, Spallanzani A, Chiarugi A, Boddi V, Reali U M, Gianotti B: In situ expression of transforming growth factor β is associated with melanoma progression and correlates with Ki67, HLA-DR and β 3 integrin expression. *Melanoma Res* 7: 313-321, 1997.

64. Moretti S, Pinzi C, Spallanzani A, Berti E, Chiarugi A, Mazzoli S, Fabiani M, Vallecchi C, Herlyn M: Immunohistochemical evidence of cytokine networks during progression of human melanocytic lesions. *Int J Cancer* 84(2): 160-8, 1999.
65. Morse KL, Behan J, Laz TM, West RE, Greenfeder SA, Anthes JC, Umland S, Wan Y, Hipkin RW, Gonsiorek W, Shin N, Gustafson EL, Qiao X, Wang S, Hedrick JA, Greene J, Bayne M, Monsma FJ: Cloning and characterization of a novel human histamine receptor. *JPET* 296: 1058-66, 2001.
66. Mouawad R, Benhammouda A, Rixe O, Antoine EC, Borel C, Weil M, Khayat D, Soubrane C: Endogenous interleukin-6 levels in patients with metastatic malignant melanoma: correlation with tumour burden. *Clin Cancer Res* 2: 1405-1409, 1996.
67. Nagai Y, Ishikawa O, Miyachi Y, Watanabe H: Expression of autocrine motility factor receptor in cutaneous malignant melanoma. *Dermatology* 192:8-11, 1996.
68. Nestle FO, Burg G, Dummer R: New perspectives on immunobiology and immunotherapy of melanoma. *Immunology today* 20: 5-7, 1999.
69. Norris J G, Tang L, Sparacio S M, Benveniste E M: Signal transduction pathways mediating astrocyte IL-6 induction by IL-1 and tumor necrosis alpha. *J Immunol* 152: 841-50, 1994.
70. Oda T, Morikawa N, Saito Y, Masuho Y, Matsumoto S: Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 275: 36781-86, 2000.
71. Oh JW, Katz A, Harroch S, Eisenbach L, Revel M, Chebath J: Unmasking by soluble IL-6 receptor of IL-6 effect on metastatic melanoma: growth inhibition and differentiation of B16-F10.9 tumor cells. *Oncogen* 15: 569-77, 1997.
72. Oku T, Tjuvajev JG, Miyagawa T, Sasajima T, Joshi A, Joshi R, Finn R, Claffey KP, Blasberg RG.: Tumor growth modulation by sense and antisense vascular endothelial growth factor gene expression: effects on angiogenesis, vascular permeability, blood volume, blood flow, fluorodeoxyglucose uptake, and proliferation of human melanoma intracerebral xenografts. *Cancer Res* 58(18):4185-92,1998.
73. Onozaki K, Matsushima K, Aggarwal B B, Oppenheim J J: Human interleukin-1 is a cytotoxic factor for several tumor cell lines. *J Immunol* 135: 3962-3968, 1985.
74. Palmer K, Moore J, Everard M, Harris JD, Rodgers S, Rees RC, Murray AK, Mascari R, Kirkwood J, Riches PG, Fisher C, Thomas JM, Harries M, Johnston SRD, Collins MKL, Gore ME: Gene therapy with autologous, interleukin 2-secreting tumor cells in patients with malignant melanoma. *Human gene therapy* 10: 1261-68, 1999.
75. Reynolds J L, Akhter J, Morris D L: In vitro effect of histamine and histamine H1 and H2 receptor antagonists on cellular proliferation of human malignant melanoma cell lines. *Melanoma Res* 6: 95-99, 1996.
76. Richmond A, Thomas H G: Melanoma Growth Stimulatory Activity: isolation from human melanoma tumors and characterization of tissue distribution. *J Cell Biochem* 36: 185-198, 1988.
77. Rodeck U, Bossler A, Graeven U, Fox FE, Nowell PC, Knabbe C, Kari Cs: Transforming growth factor β production and responsiveness in normal human melanocytes and melanoma cells. *Cancer Res* 54: 575-581, 1994.
78. Rodeck U, Melber K, Kath R, Menssen H D, Varello M, Atkinson B, Herlyn M: Constitutive expression of multiple growth factor genes by melanoma cells but not by normal melanocytes. *J Invest Dermatol* 97:20-26, 1991.

79. Rodeck U: Growth factor independence and growth regulatory pathways in human melanoma development. *Cancer Metast Rev* 12: 219-26, 1993.
80. Sarasin A: The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis. *Mutat Res* 428(1-2): 5-10, 1999.
81. Schadendorf D, Moller A, Algermissen B, Worm M, Sticherling M, Czarnetzki BM: IL-8 is Produced by Human Malignant Melanoma Cells in Vitro Is an Essential Autocrine Growth Factor. *The Journal of Immunology* 151: 2667-2675, 1993.
82. Shih I, Herlyn M: Role of growth factors and their receptors in the development and progression of melanoma. *J Invest Dermatol* 100:196S-203S, 1993.
83. Shinoda S, Kameyoshi Y, Hide M, Morita E, Yamamoto S: Histamine enhances UVB-induced IL-6 production by human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 290: 429-34, 1998.
84. Sosman JA, Aronson FR, Sznol M, Atkins MB, Dutcher JP, Weiss GR, Isaacs RE, Margolin KA, Fisher RI, Ernest ML, Mier J, Oleksowicz L, Eckhardt JR, Levitt D, Doroshow JH: Concurrent phase I trials of intravenous interleukin 6 in solid tumor patients: reversible dose-limiting neurological toxicity. *Clin Cancer Res* 3: 39-46, 1997.
85. Sporn MB, Roberts AB: Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 313: 745-47, 1985.
86. Sun WH, Kreisle RA, Phillips AW, Ershler WB: In vivo and in vitro characteristics of interleukin 6-transfected B16 melanoma cells. *Cancer Res* 52: 5412-15, 1992.
87. Swope VB, Abdel-Malek Z, Kassem LM, Nordlund JJ: Interleukins 1 alpha and 6 and tumor necrosis factor-alpha are paracrine inhibitors of human melanocyte proliferation and melanogenesis. *J Invest Dermatol* 1991 Feb;96(2):180-5
88. Tada A, Suzuki I, Im S, Davis MB, Cornelius J, Babcock G, Nordlund JJ, Abdel-Malek ZA: Endothelin-1 is a paracrine growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and participates in their responses to ultraviolet radiation. *Cell Growth Differ* 9: 7575-84, 1998.
89. Tardivel-Lacombe J, Rouleau A, Héron A, Morisset S, Pillot C, Cochois V, Schwartz JC, Arrang JM: Cloning and cerebral expression of the guinea pig histamine H3 receptor: evidence for two isoforms. *Molecular Neuroscience* 11: 755-59, 2000.
90. Thody AJ, Graham A: Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans? *Pigment Cell Res* 11: 5265-74, 1998.
91. Tilly BC, Tertoolen L G J, Remorie R, Ladoux A, Verlaan I, de Laat S W, Moolenaar W H: Histamine as a growth factor and chemoattractant for human carcinoma and melanoma cells: action through Ca²⁺-mobilizing H1 receptors. *J Cell Biol* 110: 1211-1215, 1990.
92. Timar J, Csuka O, Orosz Z, Jeney A, Kopper L: Molecular pathology of tumor metastasis. I. Predictive pathology. *Pathol Oncol Res* 7(3):217-30, 2001.
93. Torisu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, Nishioka Y, Sone S, Kuwano M.: Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNFalpha and IL-1alpha. *Int J Cancer* 85(2):182-8, 2000.
94. Triggiani M, Gentile M, Secondo A, Granata F, Oriente A, Taglialatela M, Annunziato L, Marone G: Histamine induces exocytosis and IL-6 production from human lung macrophages through interaction with H1 receptors. *J Immunol* 166: 4083-91, 2001.

95. Ucar K: The effects of histamine H2 receptor antagonists on melanogenesis and cellular proliferation in melanoma cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 177: 545-50, 1991.
96. Wang E, Marincola FM: A natural history of melanoma: serial gene expression analysis. *Immunology Today*, 21: 619-23, 2000.
97. Wang Y, Becker D: Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth. *Nature Med.* 3: 887-893,1997.
98. Watanabe T, Yamatodani A, Maeyama K, Wada H: Pharmacology of α -fluoromethylhistidine, a specific inhibitor of histidine decarboxylase. *TiPS* 11: 363-67, 1990.
99. Weimer L K, Gamache D A, Yanni J M: Histamine-stimulated cytokine secretion from human conjunctival epithelial cells: inhibition by the histamine H1 antagonist emedastine. *Int Arch Allergy Immunol* 115: 288-93, 1998.
100. Whitehead RJ, Taylor DJ, Evanson JM, Hart IR, Woolley DE: Demonstration of histamine H2 receptors on human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 151(1):518-23, 1988.
101. Yayon A, Ma Y-S, Safran M, Klagsbrun M, Halaban R: Suppression of autocrine cell proliferation and tumorigenesis of human melanoma cells and fibroblast growth factor transformed fibroblasts by a kinase deficient FGF receptor 1: evidence for the involvement of Src-family kinases. *Oncogene* 14: 2999-3009, 1997.
102. Yoshida M, Takahashi Y, Inoue S: Histamine induces melanogenesis and morphologic changes by protein kinase A activation via H2 receptors in human normal melanocytes. *J Invest Dermatol* 114(2): 334-42, 2000.
103. Yue FY, Dummer R, Geertsen R, Hofbauer G, Laine E, Manolio S, Burg G: Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer* 71: 630-37, 1997.
104. Zachariae COC, Thestrup-Pedersen K, Matsushima K: Expression and secretion of leukocyte chemotactic cytokines by normal human melanocytes and melanoma cells. *J Invest Dermatol* 97: 593-599, 1991.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AGP-2 = angiopoietin-2

AMF = autokrin motilitási faktor

ANG = angiogenin

APC = antigén prezentáló sejtek (antigen presenting cells)

bFGF = bázikus fibroblaszt növekedési faktor (basic fibroblast growth factor)

BSA = bovine serum albumine

cAMP = ciklikus adenzin-3', 5'-monofoszfát

CDK = ciklin dependens kináz

cDNS = komplementer DNS

cGMP = ciklikus guanozin-3', 5' monofoszfát

CHS = kontakt hiperszenzitivitás (contact hypersensitivity)

CNTF = ciliáris neurotrofikus faktor

CT-1 = kardiotrofin-1

DAG = diacil-glicerol

DAO = diamino-oxidáz

DEPC = dietil-pirokarbonát

DMSO = dimetil-szulfoxid

dNTP = dezoxi-nukleozid-trifoszfát

DPPE = N, N-dietil-2-[4-(fenil-metil) fenoxi] etánamin

DTH = késői típusú hiperszenzitivitás (delayed-type hypersensitivity)

ECL = enhanced chemiluminescence

ECM = extracelluláris mátrix

EDAC = 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid klorid

EGF = epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)

ET-1 = endotelin-1

FGF = fibroblaszt növekedési faktor (fibroblast growth factor)

FITC = fluoreszcein izotiocianát

FLICE = Fas-associated death domain-like interleukin-1 beta-converting enzyme

FLIP = FLICE inhibitory protein

α -FMH = α -fluoro-metil-hisztidin

GAPDH = glicerináldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GH = növekedési hormon (growth hormone)
GM-CSF = granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor (granulocyte-macrophage colony stimulating factor)
gp = glikoprotein
H1R = hisztamin H1 receptor
H2R = hisztamin H2 receptor
HDC = hisztidin dekarboxiláz
HGF = hepatocita növekedési faktor (hepatocyte growth factor)
HLA = humán leukocita antigén
HNMT = hisztamin N-metil transzferáz
IBMX = 3-izobutil-1-metil-xantin
ICAM-1 = intercellular adhesion molecule
IFN = interferon
Ig = immunglobulin
IGF = inzulinszerű növekedési faktor (insulin-like growth factor)
IL = interleukin
IL-1Ra = interleukin-1 receptor antagonist
IP3 = inozitol-1,4,5-trifoszfát
IRF-1 = interferon regulatory factor 1
KIR = központi idegrendszer
LFA-3 = leukocita funkcionális antigén
LIF = leukémia inhibitor faktor
LPS = bakteriális lipopoliszacharid
LTC4 = leukotrién C4
MART-1 = melanoma antigen recognized by T cells 1
MC1R = melanokortin-1 receptor
MCP1 = monocita kemotaktikus protein 1 (monocyte-chemotactic protein 1)
MGSA = melanoma növekedést fokozó aktivitás (melanoma growth stimulatory activity)
MHC = fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex)
MIA = melanoma inhibitory activity

MIF = makrofág migrációt gátló faktor (macrophage migration inhibitory factor)
MLR = kevert limfocita reakció (mixed lymphocyte reaction)
mRNS = messenger (hírvivő) ribonukleinsav
 α -MSH = melanocita stimuláló hormon
MTT = 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difenil tetrazólium bromid
NGF = idegi növekedési faktor (nerve growth factor)
NK sejt = természetes ölő sejt (natural killer cell)
NO = nitrogén-oxid
OSM = onkosztatin M
PA = poliamin
PCR = polimeráz láncreakció
PDGF = vérlemezke növekedési faktor (platelet-derived growth factor)
pIRE = palindromic interferon regulated element
PKA = proteinkináz A
PKC = proteinkináz C
PLC = foszfolipáz C
PMA = forbol-mirisztol-acetát (12-O-tetradekanoil-forbol-13-acetát, TPA)
POMC = proopiomelanokortin
RANTES = regulation on activation, normal T cell expressed and secreted
RGP = radial growth primary melanoma
RIA = radioimmunoassay
RT = reverz transzkripció
SCF = őssejt növekedési faktor (stem cell factor)
SCID = severe combined immunodeficiency syndrome
STAT = signal transducer and transcriptional activator
TAP = transporter associated with antigen processing
TGF = transzformáló növekedési faktor (transforming growth factor)
TNF = tumor nekrozis faktor
TRP-1 = tyrosinase-related protein 1
VEGF = vaszkuláris endotél növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)
VGP = vertical growth primary melanoma
VIP = vazoaktív intesztinális peptid

PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A dolgozat témájában megjelent publikációk

1. Lázár-Molnár E, Hegyesi H, Tóth S, Falus A: Autocrine and paracrine regulations by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 2000, 12: 547-554.
2. Molnár L. E, Hegyesi H, Tóth S, Darvas Zs, László V, Szalai Cs, Falus A: Biosynthesis of interleukin-6, an autocrine growth factor for melanoma is regulated by melanoma derived histamine. *Seminars in Cancer Biology* 2000, 10: 25-28.
3. Molnár L. E, Cricco G, Martin G, Darvas Zs, Hegyesi H, Fitzsimons C, Bergoc R, Falus A, Rivera E: Histamine as a potential autocrine regulator of melanoma. *Inflammation Research* 50 Supplement 2, S102-103, 2001.
4. Falus A, Hegyesi H, Lázár-Molnár E, Pós Z, László V, Darvas Zs.: Duality of paracrine/autocrine interactions around melanoma; histamine is a relevant player in local regulation. *Trends in Immunology* 22: 648-52, 2001.
5. Lázár-Molnár E, Hegyesi H, Pállinger É, Kovács P, Tóth S, Fitzsimons C, Cricco G, Martin G, Rivera E., Falus A.: Inhibition of human primary melanoma cell proliferation by histamine is enhanced by interleukin-6. *Elfogadva: Eur J Clin Invest.*
6. Hegyesi H, Somlai B, Varga VL, Tóth Gy, Lázár-Molnár E, László V, Kárpáti S, Rivera E, Falus A, Darvas Zs.: High histidine decarboxylase level in melanoma; suppression of melanoma cell proliferation by specific antisense oligonucleotides. *J Invest Dermatol* 117(1):151-3, 2001.
7. Igaz P, Novák I, Lázár E, Horváth B, Héninger E, Falus A.: Bidirectional communication between histamine and cytokines. *Inflammation Research* 20: 123-128, 2001.

Más témában megjelent publikációk

I. Kohidai L, Kovács P, Lázár-Molnár E, Csaba Gy: Presence, uptake and localization of an immunoreactively interleukin-6 (IL-6)-like molecule in *Tetrahymena pyriformis*. *Cell Biology International* 2000, 24: 749-755.

II. Horváth B, Heninger E, Hegyesi H, Lázár M E, Radvány Zs, Szalai Cs, Darvas Zs, Falus A: Reciprocal inhibitory interactions between γ interferon and histamine in melanoma *Inflammation Research* 49(1): S27-S28, 2000.

III. Fitzsimons CP, Lazar-Molnar E, Tomoskozi Zs, Buzás E, Rivera SE, Falus A.: Histamine deficiency induces tissue-specific down-regulation of histamine H2 receptor expression in histidine decarboxylase knockout mice. *FEBS Lett* 508(2):245-8, 2001.

IV. Horvath BV, Falus A, Toth S, Szalai C, Lazar-Molnar E, Holub MC, Buzas E, Nagy A, Fulop AK: Inverse regulation of interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor in histamine deficient histidine decarboxylase-knock-out mice. *Immunol Lett* 80(3):151-4, 2002.