

## Válasz Dr. Gyulai Rolland opponensi véleményére

### **Tisztelt Gyulai Doktor!**

Köszönöm a dolgozatom bírálatában végzett munkáját, a támogató véleményét, és az érdekes kérdéseket.

### **Válaszok a kérdésekre:**

1. A HT1080 fibroszarkómasejtek mozgására új modellt írtak le, melynek lényege, hogy új adhéziók kizárólag a sejtek frontján keletkeznek, és ezeket az adhéziós plakkokat az elmozdulás irányára merőleges, enyhén ívelt aktinszálak kötik össze. Az aktinszálak vastagsága erősödik a sejtben hátrafelé, amiknek végül a sejt oldalsó hátsó felén található adhéziók feltépésében van szerepük. **Van-e arra vonatkozóan adat, hogy az adhéziós plakkok keletkezésükkor milyen távolságra helyezkednek el egymástól, illetve ez a távolság hogyan változik (nő) a sejt mozgása során? Mi okozza az aktinszálak vastagodását a sejt hátsó felére történő áthelyeződés során? Mennyire általános ez a motilitás forma a daganatsejtek esetén?**

### **Válasz:**

Az újonnan képződő adhéziós plakkok a sejt frontján körülbelül 2  $\mu\text{m}$ -el az előző plakkosor előtt keletkeznek és ez a GRE modellnek (1) megfelelően csökken a sejt hossz tengelye felé. A fronton a plakkok nagyjából egyenletesen oszlanak meg, de nem lehet szabályszerűséget felfedezni az egymástól mért távolságukban. Ez a 2  $\mu\text{m}$ -es érték valószínűleg állandó a mozgás során, amit az aktinfilamentumok polimerizációja által előidézett maximális membránkitüremkedés (protrúzió) határoz meg (2). Ez az érték akkor is állandó, ha eltérő sebességgel mozog a sejt, csak az adhéziók felépülése-lebomlása dinamikája változik.

Az aktinszálak vastagodása több ok miatt is bekövetkezik. Az egyik, hogy a mozgás során a korábban keletkezett szálak torlódnak a hossz tengely felé. Ezen felül szerepe lehet ebben annak is, hogy a letapadási pontok mérete és ezáltal a tapadási erősségük is nő a sejt hossz tengelye felé, amit a sejt elmozdulásakor meg kell szüntetni, és ehhez nagyobb erő szükséges, amit a vastagabb aktinkábelek képesek generálni.

A modell általánosságával kapcsolatban mi azt feltételezzük, hogy ez nem csak a daganatsejtek, de valamennyi sejt mozgása esetében egyöntetű. Megkülönböztet az irodalom többféle mozgásformát (fibroblaszt, amóbid, 3-6), de szerintünk az alapelv, hogy a plakkok hogy képződnek, illetve hogy kapcsolódnak az aktinszálakhoz, illetve utóbbiak hogy „érnek” a mozgás során univerzális jelenségek, amelyek különböző eredetű sejtek esetében kicsit eltérő fenotípussal járnak. De az is igaz, hogy a modell érvényességét *in vivo* körülmények között még nem sikerült igazolni.

1. J. Lee, A. Ishihara, J.A. Theriot, K. Jacobson, Principles of locomotion for simple-shaped cells, *Nature* 362 (1993) 167–171.
  2. Ridley AJ: Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* 16 (10), 522–529 (2006)
  3. Beunk L, Bakker GJ, van Ens D, Bugter J, Gal F, Svoren M, Friedl P, Wolf K. Actomyosin contractility requirements and reciprocal cell-tissue mechanics for cancer cell invasion through collagen-based channels. *Eur Phys J E Soft Matter.* 2022 May 16;45(5):48.
  4. Odenthal J, Takes R, Friedl P. Plasticity of tumor cell invasion: governance by growth factors and cytokines. *Carcinogenesis.* 2016 Dec;37(12):1117-1128.
  5. Wolf K, Te Lindert M, Krause M, Alexander S, Te Riet J, Willis AL, et al.
  6. Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *J Cell Biol.* 2013 Jun 24;201(7):1069-84.
2. Vizsgálatai szerint a heparin és heparin-származékok antimetasztatikus hatással rendelkeznek. **Ezek alapján daganatos betegségek esetén különbséget kell-e/érdemes-e tenni az antikoagulálásra alkalmazott készítmények között? Azaz, a daganatos betegek antikoagulálására elsősorban heparin származékok ajánlhatók onkológiai szempontból?**

**Válasz:**

A heparinok és származékaik daganatellenes hatásának irodalma igen széleskörű. Ráadásul az eredmények nem csak kísérletes rendszerekből származnak (7-9), hanem klinikai vizsgálatok is alátámasztják a daganatellenes hatást (10-13). Ezek a vizsgálatok azt mutatják, hogy a heparinok hatásai többféle mechanizmus eredményei: elnyomják a daganat növekedését és metasztázisát azáltal, hogy blokkolják a tumor növekedését befolyásoló faktorokat, ezáltal gátolják az angiogenezist, a nyirokerekek képződését, visszafordítják a rezisztenciát több gyógyszerrel szemben, fokozzák a heparináz és trombin termelését, vagy gátolják a daganatsejtek kötődését a vaszkuláris endotéliumhoz. A támadáspontok között szerepel a VEGF-C/VEGFR3, VEGF-A, CXCL12/CXCR4, TGF $\beta$ , P-szelektin, integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, VLA-4/VCAM-1, de még szignálútvonalak is, például az NF- $\kappa$ B, valamint a p38 MAPK (14). A koagulációs mechanizmusoknak fontos szerepe van a tumorok disszeminációjában, különösen, amikor a metasztatizáló tumorsejt a keringésben van. Itt érdekes módon, a tumorsejtek felszíni heparán-szulfát- (HS) tartalma, ami elsősorban proteoglikánokon (HSPG) fordul elő, kettős hatással bír a véralvadásra. Egyrészt tudja serkenteni azáltal, hogy a HS kapcsolódik az antitrombinnal (AT), ezáltal blokkolja a trombin képződését. Másfelől viszont, integrineken keresztül komplexet tud alkotni a fibrinogénnel és a trombinnal, ami serkenti a koagulációt (15). Ebbe a bonyolult folyamatba avatkoznak be a heparinok, de más antikoagulánsok esetében, amelyeknek a támadáspontjai eltérők a heparinoktól, nincsenek bizonyítékok, hogy erre szintén képesek lennének. A mi vizsgálatainkban is azt találtuk, hogy a hirudinnak nincs antitumorális hatása. Ezek alapján a daganatos betegek esetében mindenképp előnyös lehet a heparinszármazékok adása antikoagulálásra, de érdemes megjegyezni, hogy a saját adataink

alapján azoknak a heparinszármazékoknak is volt antimetasztatikus hatásuk, amelyek már nem befolyásolták a véralvadást.

7. Heinmoller E, Schropp T, Kisker O, et al. Tumor cell-induced platelet aggregation in vitro by human pancreatic cancer cell lines. *Scand J Gastroenterol.* 1995;30:1008–1016.
8. Mousa SA, Petersen LJ. Anti-cancer properties of low-molecular-weight heparin: preclinical evidence. *Thromb Haemost.* 2009;102:258–267.
9. Smorenburg SM, Van Noorden CJ. The complex effects of heparins on cancer progression and metastasis in experimental studies. *Pharmacol Rev.* 2001;53:93–105.
10. Klerk CP, Smorenburg SM, Otten HM, et al. The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy. *J Clin Oncol.* 2005;23:2130–2135.
11. Kuderer NM, Khorana AA, Lyman GH, et al. A meta-analysis and systematic review of the efficacy and safety of anticoagulants as cancer treatment: impact on survival and bleeding complications. *Cancer.* 2007;110:1149–1161.
12. Altinbas M, Coskun HS, Er O, et al. A randomized clinical trial of combination chemotherapy with and without low-molecular-weight heparin in small cell lung cancer. *J Thromb Haemost.* 2004;2:1266–1271.
13. Icli F, Akbulut H, Utkan G, et al. Low molecular weight heparin (LMWH) increases the efficacy of cisplatin plus gemcitabine combination in advanced pancreatic cancer. *J Surg Oncol.* 2007;95:507–512.
14. Ma SN, Mao ZX, Wu Y, et al. The anti-cancer properties of heparin and its derivatives: a review and prospect. *Cell Adh Migr.* 2020 Dec;14(1):118-128.
15. Wang Y, Schneider SW, Gorzelanny C. Crosstalk between Circulating Tumor Cells and Plasma Proteins-Impact on Coagulation and Anticoagulation. *Cancers (Basel)* 2023 Jun 1;15(11):3025.

3. Jól ismert, hogy melanóma esetén a szérum laktát dehidrogenáz (LDH) szint fontos prognosztikai marker. Mivel az LDH és a hipoxia/HIF-1 $\alpha$  között szoros kapcsolat áll fenn, **elképzelhető-e, hogy az LDH szint-emelkedés (legalábbis részben) a melanómasejtek HIF-1 $\alpha$  mediált motilitás-növekedése révén függ össze a daganat-progresszióval? Ismert-e adat a magas/alacsony LDH szintű melanóma betegek esetén a tumorsejtek motilitásával kapcsolatban?**

#### **Válasz:**

A melanóma sejtek fokozott tejsavtermelése az aerob glikolízis, a Warburg-effektus következménye. A szekretált tejsav a tumor mikrokörnyezetében lévő fibroblasztokat HGF (hepatocyte growth factor) termelésére serkenti, mely közismerten egy parakrin, motilitást fokozó citokin (16). Peppicelli eredményei szerint a tejsav epiteliális-mesenhimalis átmenetet (EMT) generál. A csoport a melanóma tumorok mikrokörnyezetét tejsavval savanyította, ezáltal a mesenhimalis markerek (N-kadherin, vimentin) és transzkripció faktorok (Twist, NF- $\kappa$ B) fokozott kifejeződését, valamint a mátrix-metalloproteázok emelkedett aktivitását tapasztalta (17). Paradise kutatásai alapján a savas környezet az integrin  $\alpha\beta$ 3 receptor

aktiválódásához vezet (18,19). Ezek mindegyike összefüggésbe hozható a tumorsejtek motilitási képességével, így általánosan elmondható, hogy az emelkedett LDH-szint hatással lehet a HIF-1 $\alpha$ -mediált motilitásnövekedéssel, de ez nincs még bebizonyítva klinikai melanómamintákban. A szakirodalom alapján a HIF-1 $\alpha$  általi fokozott tejsavtermelés tumorprogressziót fokozó képessége a tumor-mikrokörnyezet kémhatásának csökkentésében, ezáltal immunszuppresszív folyamatok kialakításában van, hiszen a savas környezet kedvezőtlenül hat a dendritikus sejtek és a citotoxikus T-limfociták proliferációjára (20). Ezért a legtöbb klinikai vizsgálat a PD1, PD-L1, valamint a szérum LDH szint közötti összefüggéseket vizsgálja, az immuncheckpoint inhibitorokkal szemben kialakított rezisztencia felderítése érdekében (21).

Ezen felül azonban meg kell jegyezni, hogy az anyagcsere anaerob irányú eltolása oxigén jelenlétében is megtörténik a daganatsejtekben, így ez a fajta lehetséges motilitásfokozódás a hipoxiától függetlenül is megtörténhet.

16. Feichtinger RG, Lang R. Targeting L-Lactate Metabolism to Overcome Resistance to Immune Therapy of Melanoma and Other Tumor Entities. *J Oncol*. 2019

17. Peppicelli S, Bianchini F, Torre E, Calorini L. Contribution of acidic melanoma cells undergoing epithelial-to-mesenchymal transition to aggressiveness of non-acidic melanoma cells. *Clin Exp Metastasis*. 2014

18. Paradise RK, Lauffenburger DA, van Vliet KJ. Acidic extracellular pH promotes activation of integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3. *PLoS ONE*. 2011.

19. Böhme I, Bosserhoff AK. Acidic tumor microenvironment in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2016 Sep;29(5):508-23

20. de la Cruz-López KG, Castro-Muñoz LJ, Reyes-Hernández DO, García-Carrancá A, Manzo-Merino J. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Front Oncol*. 2019

21. Xu J, Zhao J, Wang J, Sun C, Zhu X. Prognostic value of lactate dehydrogenase for melanoma patients receiving anti-PD-1/PD-L1 therapy: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2021

4. Vizsgálatai során igazolta, hogy az rHuEPO $\alpha$  különböző (legalább 3 féle) módon képes befolyásolni a daganatok növekedését. Feltételezhető ugyanakkor, hogy a rHuEPO $\alpha$  nem csak a már kialakult áttétekre van hatással, hanem befolyásolhatja a daganatok metasztatizáló képességét is. **Végeztek-e ezirányú vizsgálatokat? Befolyásolja-e például az rHuEPO $\alpha$  a daganatsejtek motilitását, extravazációját, kitapadási képességeit?**

**Válasz:**

A rekombináns humán eritropoetin (rHuEPO) lehetséges hatásai igen ellentmondásosak, ami az EPO-receptor (EPOR) expressziójának köszönhető. Az exogén rHuEPO fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek (VSMC) és az endoteliális sejtek proliferációját. Utóbbit a mi vizsgálatainkban is bizonyítottuk, ugyanakkor a szintén EPOR-pozitív tumorsejtek osztódását nem befolyásolta. A kérdésben említett jelenségeket nem vizsgáltuk tumorsejteken, és az irodalomban sem található erre kísérletes adat. Azonban VSMC-k esetében leírták, hogy az EPO gén túlzott

expressziója fokozta az ERK1/2 és p38MAPK szintézisét és foszforilációját, valamint indukálta a VSMC-k migrációját és invázióját az MMP-9 expresszióján keresztül az NF- $\kappa$ B és az AP-1 kötődésének aktiválásával. Ezt a hatást ki lehetett védeni a p38MAPK-ra specifikus SB203580 inhibitorral, ami az AP-1-en keresztül blokkolta az MMP-9 fokozott expresszióját (22).

Egy másik vizsgálatban megállapították, hogy az EPO-receptor expressziója fokozott az aktív betegségben szenvedő mielóma multiplexes (MM) betegek csontvelői eredetű makrofágjain (BMMA). A BMMA-k rHuEPO-val történő kezelése jelentősen megnövelte a kulcsfontosságú pro-angiogén mediátorok, például a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF), a hepatocita növekedési faktor (HGF) és a monocita kemotaktikus fehérje (MCP-1/CCL-2) expresszióját és szekrécióját. Az rHuEPO-val kezelt BMMA-kból gyűjtött kondicionált tápközeg fokozta a csontvelőből származó endoteliális sejtek vándorlást és a kapilláris morfogenezist *in vitro*, és angiogenezist indukált a csirkeembriók korioallantoiszmembránjában *in vivo*. Ezekben a folyamatokban emelkedett volt az endoteliális sejtek mozgékonyasága (23).

Tumorsejtekkel történt vizsgálatban egy cikk beszámol arról, hogy fej-nyaki daganatsejtek mozgását nem befolyásolta az exogén rHuEPO, bár meg kell jegyezni, hogy a sejt nem is expresszálta az EPOR-t (24). Egy EPOR+ emlőráksejtvonalas kísérletben módosított Boyden-kamrában tesztelve az rHuEPO nem befolyásolta a sejtek motilitását (25).

A tumorsejtek adhéziójával kapcsolatosan egy negatív kimenetelű publikációt találtam mindösszesen. Ebben azt írták le, hogy gliómákban pozitív korreláció volt az EPO/EPOR expresszió és a vérlemezke/endotél adhéziós molekula (PECAM) megjelenése között. Ráadásul az exogén rHuEPO-kezelés fokozta a kísérletes daganatok terjedését (26).

Az extravazációra egyáltalán nem találtam adatot, és az említett cikkek többsége is elég régi, minimum 10 éves. Igaz ez a dolgozatban bemutatott saját eredményekre is, és sajnos nem nagyon látszik több ismeret megszerzése azóta. Talán a téma ellentmondásossága és a klinikai érdeklődés hiánya állhat a kísérletes munkák intenzitásának hanyatlásában.

22. Park SL, Won SY, Song JH, et al. EPO gene expression promotes proliferation, migration and invasion via the p38MAPK/AP-1/MMP-9 pathway by p21WAF1 expression in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*. 2015 Mar;27(3):470-8.

23. De Luisi A, Binetti L, Ria R, et al. Erythropoietin is involved in the angiogenic potential of bone marrow macrophages in multiple myeloma. *Angiogenesis*. 2013 Oct;16(4):963-73.

24. Sasaki Y, Kjellén E, Mineta H, Wennerberg J, Ekblad L. No direct effects of erythropoietin beta on a head and neck squamous cell carcinoma cell line which is growth stimulated *in vivo*. *Acta Oncol*. 2009;48(7):1062-9.

25. LaMontagne KR, Butler J, Marshall DJ, et al. Recombinant epoetins do not stimulate tumor growth in erythropoietin receptor-positive breast carcinoma models. *Mol Cancer Ther*. 2006 Feb;5(2):347-55.

26. Torregrossi F, Aguenouz M, La Torre D, Sfacteria A, Grasso G. Role of Erythropoietin in Cerebral Glioma: An Innovative Target in Neuro-Oncology. *World Neurosurg*. 2019 Nov;131:346-355.

5. A humán tüdőrák tumormintákban észlelt magasabb EPOR-expresszió a betegek hosszabb átlagos túlélésével korrelált. **Mi lehet ennek a magyarázat? Illetve mi magyarázhatja, hogy bizonyos esetekben a rHuEPO $\alpha$  alkalmazása a daganatos túlélés rosszabbodását eredményezte humán klinikai vizsgálatokban?**

**Válasz:**

Az rHuEPO-kezelés negatív terápiás kimenetele magyarázható az EPO-receptor tumorsejteken való megjelenésével. Logikus feltételezés, hogy ha a receptor a sejteken megjelenik, akkor a ligandum adása után beindul a megfelelő jelátvitel, és ezáltal kialakul a biológiai hatás is, ami leggyakrabban a sejtosztódás fokozódása. Ezt több kísérletes rendszerben is leírták, a citokin-jelátviteli rendszer elősegítheti a daganatok növekedését (27-29). Van olyan vizsgálat is, ahol az eritropoetin-jelátvitel útvonal gátlása gátolta a kísérletes petefészek- és méhnyakrák-xenograftok növekedését (30). Sőt, klinikai megfigyelés is azt támasztja alá, hogy áttétes emlőrák esetében, ahol a betegek rHuEPO-t kaptak a vérszegénység megelőzésére a kemoterápiájuk során, magasabb volt a halálozási arány, mint a placebóval kezelt csoportban (31). Ezek az eredmények magyarázhatók a receptor jelenlétével, és ezáltal a jelpálya aktivitásával. Ugyanakkor több kísérletes és klinikai tanulmány is azt állította, hogy a receptor jelenléte nem befolyásolta a daganatok progresszióját, a kezelések kimenetelét, sőt, néha még javította is azokat (32-34).

Ezek az ellentmondó eredmények származhatnak abból is, hogy a kísérletek végzése idejében komoly kihívás volt az EPOR-expresszió valós kimutatása (35). A leggyakrabban használt antitestekkel számos publikáció számolt be EPOR+ tumorokról, de a legtöbb olyan vizsgálatokból származtak, amelyekben nem használtak elegendő mennyiségű antitestet az EPOR kimutatására, vagy problémák voltak a kontrollok alkalmazásával (36,37). Így biztos, hogy több vizsgálatban álopozitív eredményeket kaptak (37,38). Ráadásul, amikor kötődési tesztekkel végeztek jelzett EPO-val, kiderült, hogy a hematopoetikus sejtek esetében akár 100-as nagyságrendben is erősebb a receptor kötése, mint a vizsgált tumorsejtekénél, és egy 61 fajta tumorsejtes panelt vizsgálva csak egyben találtak valódi sejtfelszíni expressziót (abban is csak alacsony, 39-44). Hasonló eredményeket kaptak, amikor a szignalizációs útvonalak aktiválódását nézték: szintén sokkal gyengébb volt a daganatsejtek esetében a szignál, mint amit a vérképző sejtekben mértek. Még akkor is, amikor a fiziológiás dózis akár 1000-szeresét adták a sejteknek (45-47).

Érdeemes megemlíteni az endotélsejteken kifejeződő EPOR lehetséges szerepét a daganatok progressziójában, ami közvetetten, az angiogenezis befolyásolásán keresztül hathat. Ezt erősítik a mi megfigyeléseink is, ahol az EPOR+ endotélsejtek fokozott proliferációval válaszoltak az rHuEPO-kezelésre, és nagyobb átmérőjű erek keletkeztek intratumorálisan, amik jobb gyógyszer-penetrációt, ezáltal hatékonyabb kemoterápiát eredményeztek.

Mindezek alapján nem egyértelmű, hogy az egyes fehérjedetekciós módszerekkel kapott EPOR-expressziós eredmények mennyire helytállóak, és mi játszódik le azokból a folyamatokból a betegekben, amiket kísérletes rendszerekben tapasztalunk. Ugyanakkor azt a megfigyelésünket, hogy a klinikai mintákban az éphez viszonyított alacsonyabb EPOR-szint a

daganatokban jobb prognózissal társul, kísérletesen is igazolni tudtuk. A H1975 humán tüdőadenokarcinóma xenograft növekedését az rHuEPO-kezelés egyedül is csökkentette, nem csak fokozta a kemoterápia hatását kombinációban. De ennek a biológiai hátterét nem tudtuk megfejteni, és az irodalomban is csak olyan eredményeket lehet találni, amik ezzel megegyezők, de a jelenség hátterét nem tudták megadni (48).

27. Acs G, Acs P, Beckwith SM, Pitts RL, Clements E, Wong K, Verma A: Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res.* 61 (9), 3561–3565 (2001).
28. Batra S, Perelman N, Luck LR, Shimada H, Malik P: Pediatric tumor cells express erythropoietin and a functional erythropoietin receptor that promotes angiogenesis and tumor cell survival. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 83 (10), 1477–1487 (2003).
29. Arcasoy MO, Jiang X, Haroon ZA: Expression of erythropoietin receptor splice variants in human cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307 (4), 999–1007 (2003).
30. Yasuda Y, Musha T, Tanaka H, Fujita Y, Fujita H, Utsumi H, Matsuo T, Masuda S, Nagao M, Sasaki R, Nakamura Y: Inhibition of erythropoietin signalling destroys xenografts of ovarian and uterine cancers in nude mice. *Br. J. Cancer.* 84 (6), 836–843 (2001).
31. Leyland-Jones B, BEST Investigators and Study Group: Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. *Lancet Oncol.* 4 (8), 459–460 (2003).
32. Gołab J, Olszewska D, Mróz P, Kozar K, Kamiński R, Jalili A, Jakóbisiak M: Erythropoietin restores the antitumor effectiveness of photodynamic therapy in mice with chemotherapy-induced anemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 8 (5), 1265–1270 (2002).
33. Thews O, Kelleher DK, Vaupel P: Erythropoietin restores the anemia-induced reduction in cyclophosphamide cytotoxicity in rat tumors. *Cancer Res.* 61 (4), 1358–1361 (2001).
34. Mittelman M, Neumann D, Peled A, Kanter P, Haran-Ghera N: Erythropoietin induces tumor regression and antitumor immune responses in murine myeloma models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (9), 5181–5186 (2001).
35. Elliott S, Sinclair A, Collins H, Rice L, Jelkmann W. Progress in detecting cell-surface protein receptors: the erythropoietin receptor example. *Ann Hematol.* 2014 Feb;93(2):181-92.
36. Elliott S, Swift S, Busse L, Scully S, Van G, Rossi J, Johnson C (2013) Epo receptors are not detectable in primary human tumor tissue samples. *PLoS One* 8(7):e68083
37. Sinclair AM, Todd MD, Forsythe K, Knox SJ, Elliott S, Begley CG (2007) Expression and function of erythropoietin receptors in tumors: implications for the use of erythropoiesis-stimulating agents in cancer patients. *Cancer* 110(3):477–488
38. Elliott S, Busse L, Bass MB, Lu H, Sarosi I, Sinclair AM, Spahr C, Um M, Van G, Begley CG (2006) Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression. *Blood* 107(5):1892–1895
39. Broudy VC, Lin N, Brice M, Nakamoto B, Papayannopoulou T (1991) Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood* 77(12):2583–2590
40. vanZoelen EJ (1989) Receptor-ligand interaction: a new method for determining binding parameters without a priori assumptions on nonspecific binding. *Biochem J* 262(2):549–556
41. Komatsu N, Yamamoto M, Fujita H, Miwa A, Hatake K, Endo T, Okano H, Katsube T, Fukumaki Y, Sassa S et al (1993) Establishment and characterization of an erythropoietin-dependent subline, UT-7/ Epo, derived from human leukemia cell line, UT-7. *Blood* 82(2):456–464

42. Sawada K, Krantz SB, Sawyer ST, Civin CI (1988) Quantitation of specific binding of erythropoietin to human erythroid colony-forming cells. *J Cell Physiol* 137(2):337–345
43. Ohigashi T, Yoshioka K, Fisher JW (1996) Autocrine regulation of erythropoietin gene expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Life Sci* 58(5):421–427
44. Gewirtz DA, Di X, Walker TD, Sawyer ST (2006) Erythropoietin fails to interfere with the antiproliferative and cytotoxic effects of antitumor drugs. *Clin Cancer Res* 12(7:Pt 1):2232–2238
45. Laugsch M, Metzen E, Svensson T, Depping R, Jelkmann W (2008) Lack of functional erythropoietin receptors of cancer cell lines. *Int J Cancer* 122(5):1005–1011
46. Swift S, Ellison AR, Kassner P, McCaffery I, Rossi J, Sinclair AM, Begley CG, Elliott S (2010) Absence of functional EpoR expression in human tumor cell lines. *Blood* 115:4254–4263
47. Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF (2001) The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell* 8(6):1327–1338
48. Zhang Y, Wang S, Han S, Feng Y. Pan-Cancer Analysis Based on EPOR Expression With Potential Value in Prognosis and Tumor Immunity in 33 Tumors. *Front Oncol.* 2022; 12: 844794.

Végezetül még egyszer köszönöm a bírálatot, a kérdéseket, és kérem, fogadja el a válaszaim!

2023. 06.05.



Dr. Tóvári József