

Wpływ białka HAX1 na ścieżkę sygnałową estrogenu i progresję w luminalnym raku piersi.

Słowa kluczowe: białko HAX1, luminalny rak piersi, receptor estrogenowy, receptor progesteronowy

Streszczenie

Wstęp: Rak piersi pozostaje najczęściej wykrywanym nowotworem złośliwym wśród kobiet w Polsce i na świecie. Nadal poszukiwane są optymalne wskaźniki prognostyczne i predykcyjne, mające na celu poprawę rokowania w tym rozpoznaniu. Celem badania było sprawdzenie użyteczności oznaczenia białka HAX1 jako prognostyka nawrotu raka piersi pod postacią przerzutów odległych oraz ocena jego roli pełnionej w komórkach luminalnego raka piersi.

Chorzy i Metody: Przeprowadzono retrospektywny przegląd dokumentacji medycznej dwóch grup chorych z rozpoznaniem raka piersi. Oceniono związek między wartościami takich punktów końcowych jak czas przeżycia całkowitego (*overall survival*, OS) i czas przeżycia wolny od nawrotu odległego (*distant recurrence free survival*, DRFS) a poziomem białka HAX1 w komórkach guza pierwotnego. Przeanalizowano wybrane czynniki kliniczne i patomorfologiczne wobec poziomu i komórkowej lokalizacji HAX1. Wykonano ocenę wpływu ekspresji genu *HAX1* na stymulację hormonalną i aktywność cytotoksyczną związków o działaniu antyestrogenowym. Badano wpływ ekspresji genu *HAX1* na status genów zależnych od aktywacji receptora estrogenowego.

W części klinicznej pracy materiał stanowiły dwie grupy chorych leczonych w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowym Instytucie Badawczym w Warszawie: pilotażowa i rozszerzona. W grupie pilotażowej znalazło się 46 chorych operowanych między styczniem a majem 2007 roku, w grupie rozszerzonej 90 chorych operowanych w latach 1999-2008. Grupa pilotażowa objęła chore z różnymi podtypami biologicznymi raka piersi, grupa rozszerzona jedynie te z rozpoznaniem luminalnego, HER2 negatywnego nowotworu. Obydwie grupy zostały podzielone na dwie populacje: chore u których w okresie obserwacji po radykalnym zabiegu operacyjnym, niepoprzedzonym leczeniem systemowym, stwierdzono obecność nawrotu pod postacią przerzutów odległych oraz te, u których nie doszło do nawrotu choroby. Okres obserwacji w grupie pilotażowej wyniósł 9 lat, w grupie rozszerzonej 12.

W części eksperymentalnej pracy materiał stanowiła wyprowadzona z luminalnego raka piersi, ludzka linia komórkowa MCF-7. Analizy doświadczalne przeprowadzono na

dwóch liniach z wyciszeniem genu *HAX1*, wyprowadzonych różnymi metodami oraz odpowiadającym im liniom kontrolnym. Wykonano testy żywotności komórek po stymulacji roztworami β - estradiolu, progesteronu, tamoksyfenu oraz ICI 182,780. Za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy z zastosowaniem sond Taqman oceniono ekspresję genów zależnych od receptora estrogenowego w komórkach linii wyciszonych i kontrolnych przed i po stymulacji β - estradiolem.

Wyniki: W grupie pilotażowej poziom cytoplazmatycznego oraz całkowitego białka *HAX1* w komórkach raka piersi okazał się istotnie wyższy u chorych, u których w okresie obserwacji stwierdzono wystąpienie nawrotu pod postacią przerzutów odległych w porównaniu z chorymi bez nawrotu. Tego wyniku nie potwierdzono dla lokalizacji jądrowej białka. Poziom całkowity i cytoplazmatyczny korelowały ze stopniem histologicznej złośliwości nowotworu. W wykonanych analizach jednoczynnikowych dowiedziono, że cytoplazmatyczny poziom *HAX1* wynoszący $> 1,02$ oraz całkowity wynoszący $> 1,49$ były związane z istotnym statystycznie skróceniem OS ($p = 0,0134$ oraz $p = 0,0097$, odpowiednio). Jądrowy poziom wybarwienia *HAX1* wynosił $> 1,05$ i nie był w sposób istotny związany ze skróceniem OS. Istotne statystyczne wydłużenie DRFS potwierdzono u chorych z cytoplazmatycznym poziomem *HAX1* $\leq 1,02$ w porównaniu z chorymi z poziomem *HAX1* $> 1,02$ ($p = 0,012$). W grupie chorych z wyższym wynikiem barwienia IHC, odsetek chorych, którzy doświadczyli progresji pod postacią przerzutów odległych w 9. roku obserwacji wyniósł 89% w porównaniu z 43% chorych w grupie z niższym wynikiem barwienia dla *HAX1*. Statystycznie istotne wydłużenie DRFS uzyskano w grupie chorych z całkowitym poziomem *HAX1* $\leq 1,49$ w stosunku do grupy z poziomem wynoszącym $> 1,49$ ($p = 0,0074$). Podobnie jak w przypadku OS, niższy poziom wybarwienia jąder komórkowych dla *HAX1* nie miał istotnego statystycznie wpływu na wydłużenie DRFS w tej grupie chorych. W analizie wieloczynnikowej, podwyższony poziom *HAX1* w cytoplazmie okazał się być niezależnym, negatywnym czynnikiem prognostycznym związanym z podwyższonym ryzykiem progresji pod postacią przerzutów odległych (HR 2,832, 95% CI 1,207-6,644, $p = 0,017$). Podobnie, całkowita ekspresja białka *HAX1* była istotnie związana ze skróceniem DRFS (HR 4,249, 95% CI 1,404-12,86, $p = 0,010$). Nie wykazano wpływu ekspresji jądrowej *HAX1* na żaden z wymienionych czynników przeżyciowych.

W grupie rozszerzonej potwierdzono statystycznie istotną różnicę między całkowitym poziomem białka *HAX1* w grupie kontrolnej i badanej. Wyższe poziomy białka w komórkach guza pierwotnego obserwowano w grupie chorych, u których stwierdzono pojawienie się przerzutów odległych w okresie obserwacji. Ponownie, znamienne statystycznie wydłużenie

OS uzyskano dla populacji chorych u których stwierdzono poziom HAX1 równy 0 dla lokalizacji cytoplazmatycznej ($p = 0,0012$) oraz całkowity ($p = 0,0029$). Statystycznie istotnej różnicy w OS nie stwierdzono dla poziomu jądrowego ($p = 0,406$). Odsetki 12-letnich OS w grupie chorych z cytoplazmatycznym poziomem HAX1 równym 0 w porównaniu do chorych z poziomem > 0 wyniosły odpowiednio - 89,6% oraz 49,2%. Odsetki 12-letnich OS dla poziomu całkowitego wyniosły odpowiednio 89,6% oraz 49,2%. Istotne statystyczne wydłużenie DRFS potwierdzono u chorych z cytoplazmatycznym ($p < 0,0001$) i całkowitym ($p < 0,0001$) poziomem HAX1 równym 0 w porównaniu z chorymi z poziomem HAX1 > 0 . W przypadku poziomu jądrowego nie potwierdzono istotnego wydłużenia DRFS u chorych z HAX1 wynoszącym 0 ($p = 0,476$). W grupie chorych z oznaczalnym cytoplazmatycznym poziomem HAX1 odsetek chorych, którzy doświadczyli progresji pod postacią przerzutów odległych do 12 roku obserwacji wyniósł 68,85% w porównaniu z 13,8% chorych w grupie z HAX1 równym 0. Dla poziomu całkowitego odsetki chorych, którzy doznali progresji pod postacią przerzutów odległych do 12. roku obserwacji wyniosły – odpowiednio - 66,6% i 14,8%. W analizach wieloczynnikowych wykazano, że cytoplazmatyczny i całkowity poziom HAX1 > 0 są niezależnymi, niekorzystnymi czynnikami prognostycznymi dla zarówno dla OS jak i DRFS, czego nie uzyskano dla poziomu jądrowego.

W wykonanych testach żywotności komórek (MTT) w obydwu liniach kontrolnych i wyciszonych, wykazano istotną statystycznie odpowiedź na stymulację β -estradiolem. Stymulacja progesteronem zastosowana w jednej linii kontrolnej i wyciszonej doprowadziła do statystycznie znamiennej zmiany wzrostu odczytu MTT w linii kontrolnej, czego nie uzyskano w przypadku linii wyciszonej zarówno przy stymulacji wyłącznie progesteronem jak i dwoma hormonami jednocześnie. Zastosowanie antyestrogenów ICI 182,780 oraz tamoksyfenu doprowadzało do obniżenia redukcji MTT w porównaniu z warunkami kontrolnymi, pomimo wcześniejszej stymulacji β -estradiolem. W porównaniu do linii kontrolnych efekt zastosowania substancji cytotoksycznych był silniej wyrażony w liniach z wyciszeniem genu *HAX1*.

W ocenie ekspresji genów związanych ze ścieżką sygnałową estrogenu, w zależności od statusu genu *HAX1* najsilniej wyrażone zmiany wykazano w grupie około 10 genów. Pomimo powtarzalności, żaden z uzyskanych wyników nie okazał się być istotny statystycznie. Wyodrębniono i przeanalizowano geny, dla których różnica w ekspresji dla linii wyciszonych była co najmniej dwukrotnie wyższa lub niższa w porównaniu z liniami kontrolnymi. Znaczące podwyższenie ekspresji w liniach wyciszonych w stosunku do kontrolnych potwierdzono dla genów *GABARAPL1*, *ERG* oraz *HSPB8*. Stałe obniżenie

ekspresji zaobserwowano w przypadku genów *ERG*, *MPG*, *PGR*, *TSKU* oraz *TFF1*. Do genów wykazujących wzrost ekspresji po stymulacji β -estradiolem zaliczono *ERG*, *HSPB8*, *CCND1* oraz *TSKU*. Gen w przypadku, których wykazano wyraźny spadek ekspresji po stymulacji β -estradiolem to *MPG*.

Wnioski: Podwyższony poziom białka HAX1 w komórkach raka piersi wskazuje na wyższe ryzyko związane z nawrotem choroby, wystąpieniem przerzutów odległych a także skróceniem OS. Ekspresja genu *HAX1* wpływa na ekspresję genów biorących udział w ścieżce estrogenowej, proliferację komórek oraz odpowiedź na substancje o działaniu antyestrogenowym. Konieczne są dalsze i pogłębione badania, pozwalające na dokładniejsze określenie roli białka HAX1 w komórkach luminalnego raka piersi.