

Molekularne wyznaczniki raka piersi. Inicjacja i promocja – część I

Katarzyna Janik-Papis, Janusz Błasiak

Rak piersi jest najczęściej diagnozowanym nowotworem złośliwym u kobiet. Oprócz powszechnie stosowanych parametrów klinicznych coraz częściej analizuje się ekspresję genów oraz stężenie substancji chemicznych w krwiobiegu lub masie guza. Substancje te, syntetyzowane przez komórki nowotworowe, nazywane są wyznacznikami (markerami) nowotworowymi. Można je podzielić na diagnostyczne, pozwalające wnioskować o wystąpieniu choroby oraz prognostyczne i predykcyjne, informujące o jej przebiegu, będące jednocześnie wskaźnikami prawidłowości i skuteczności stosowanej terapii. Podział pomiędzy tymi grupami nie jest ostry, gdyż w pewnych przypadkach wyznaczniki diagnostyczne mogą mieć także znaczenie prognostyczne/predykcyjne.

W pracy zostały opisane markery kluczowe dla procesów inicjacji i promocji raka piersi. Wyszczególniono tu antygen Ki-67, cyklinę D1, onkogen c-myc i białko p21, będące regulatorami cyklu komórkowego. Opisano białko p53 oraz kinazy ATM i Chk2, biorące udział w sygnalizacji uszkodzeń DNA, zatrzymujące cykl komórkowy i włączające systemy naprawy DNA. Wyróżniono również receptory HER-2, PR, ER α i ER β , przekazujące sygnały m.in. stymulujące podziały komórkowe.

Analiza ekspresji markerów jest jednym z narzędzi badania zarówno etapu transformacji, jak i stopnia złośliwości nowotworu piersi. Markery mogą też być celem terapii, dobieranych indywidualnie dla pacjentów, a ich regularne oznaczanie w trakcie terapii pozwala monitorować jej skuteczność. Korelacja profilu i poziomu ekspresji markerów molekularnych z parametrami klinicznymi, takimi jak: wielkość guza, stopień złośliwości histopatologicznej, obecność przerzutów do węzłów chłonnych, pozwala ocenić ryzyko wznowy lub tworzenia przerzutów oraz oszacować szansę przeżycia kobiet chorych na raka piersi.

W pracy przedstawiono obecny stan wiedzy na temat markerów inicjacji i promocji raka piersi, poddano ocenie ich wartość diagnostyczną i prognostyczną oraz przedyskutowano ich wykorzystanie w terapii.

Breast cancer markers. Part I: Initiation and promotion

Breast cancer is the most common malignancy affecting women worldwide. This disease can be characterized by several clinical-pathological parameters of diagnostic and prognostic value. Apart from them the gene expression and substances present in tumor mass, blood or urea are used as cancer markers. They can be divided into three groups: namely diagnostic, prognostic and predictive. The diagnostic markers create hope for early diagnosis of the disease, while prognostic and predictive markers may of aid in the choice of therapeutic regime and provide information as to its effectiveness. This division isn't sharp, because in some cases the tumor markers have both diagnostic and prognostic/predictive value. In the present work we have focused on key proteins responsible for breast cancer initiation and promotion. We have assessed the role of the basal regulators of cell cycle: Ki-67 antigen, Cyclin D1, c-myc oncogene product, p-21. Other proteins, Chk2, p53, responsible for DNA damage detection, cell cycle arrest and activation of DNA damage repair systems as well as HER-2, PR, ER α and ER β receptors, transducing proliferative signals, have been also described. The interest in investigating the profile of tumor marker expression in breast cancer is still increasing, as it can provide information as to the potential targets of anticancer therapy. The correlation of the profile and the expression level of tumor markers with typical clinical parameters, such as tumor grade, malignancy level, ER, PR and HER-2 receptor status and nodal metastasis, allow to estimate the risk of recurrence or metastasis and evaluate overall and disease-free survival time.

Słowa kluczowe: rak piersi, markery diagnostyczne, markery prognostyczne

Key words: breast cancer, diagnostic markers, prognostic markers

Wprowadzenie

Rak piersi jest najczęściej diagnozowanym nowotworem złośliwym u kobiet. Według Krajowego Rejestru Nowotworów w 2006 r. zdiagnozowano w Polsce 13 322 nowych przypadków zachorowania (21,57% wszystkich nowotworów) i 5212 zgonów spowodowanych tą chorobą (13% wszystkich zgonów z powodu nowotworów złośliwych u kobiet). Drugie miejsce u kobiet zajmuje nowotwór złośliwy płuca i oskrzela: 5075 zachorowań i 5108 zgonów w 2006 r. Ocenia się, że na świecie z rakiem piersi żyje więcej niż 4,4 miliony kobiet, a najczęściej przypadków raka piersi diagnozuje się u kobiet w wieku 50-60 lat (około 2100 nowych przypadków rocznie) [1].

Największą szansę na przeżycie mają kobiety, u których chorobę zdiagnozowano w jej wczesnym stadium i podjęto dobrze zaprojektowaną oraz skuteczną terapię. Bardzo ważne jest, by efektywność tej terapii monitorowano zarówno konwencjonalnymi metodami diagnostycznymi, jak i molekularnymi, ponieważ to właśnie wgląd w ekspresję genów i substancji chemicznych, obecnych w krwiobiegu i produkowanych przez komórki nowotworowe, daje duże możliwości śledzenia rozwoju/leczenia choroby nowotworowej. Z tego względu poszukiwanie molekularnych wyznaczników (markerów) raka piersi jest imperatywem. Wyznaczniki takie można podzielić na diagnostyczne i prognostyczne. Pierwszą grupę stanowią czynniki pozwalające wnioskować o wystąpieniu choroby, drugą – o jej przebiegu, będące jednocześnie wskaźnikami prawidłowości i skuteczności stosowanej terapii. Podział pomiędzy tymi grupami nie jest ostry, gdyż w pewnych przypadkach wyznaczniki diagnostyczne będą mieć także znaczenie prognostyczne.

Podstawowymi dla klinicysty wyznacznikami raka piersi są: wyniki badania przedmiotowego oraz obraz cytologiczny uzyskany w preparatach biopsji cienkoigłowej, dokonanej w zmienionym rejonie piersi oraz okolicznych węzłach chłonnych. Po operacji, zasób informacji pozwalających rokować przebieg choroby wzbogaca się o wielkość guza. Te ustalone wyznaczniki, które można nazwać klinicznymi, w obecnej chwili stanowią zamknięty zbiór, dlatego z nadzieją patrzy się na prace nad wyznacznikami molekularnymi, które mogą przyczynić się do wczesnego diagnozowania raka piersi i przewidywania rozwoju tej choroby, a tym samym decydować o włączeniu chemoterapii adjuwantowej.

Obecnie uznanymi czynnikami prognostycznymi w raku piersi są: wielkość guza (cecha T), stopień złośliwości histopatologicznej według skali Blooma-Richardsona (cecha G), stan pachowych węzłów chłonnych (cecha N) i występowanie przerzutów odległych (cecha M). Ekspresja receptora estrogenowego alfa (ER α), receptora progesteronowego (PR) oraz receptora naskórkowego czynnika wzrostu (HER-2) ma zarówno znaczenie prognostyczne, jak i predykcyjne, pozwalające przewidywać odpowiedź na leczenie hormonalne lub terapię ukierunkowaną molekularnie.

Przełomem w pracach nad wyznacznikami molekularnymi w raku piersi było odkrycie i identyfikacja

w latach 90. genów *BRCA1* i *BRCA2*, których mutacje podnoszą ryzyko zachorowania kobiet na raka piersi nawet do 80% [2]. Geny te zalicza się do genów wysokiej penetracji w tej chorobie, tj. takich, w których mutacje w jednym allelu mogą powodować jej wystąpienie. Jak dotychczas, próby identyfikacji innych takich genów nie powiodły się, co może sugerować, że wśród czynników genetycznych, pewną rolę mogą odgrywać geny niskiej penetracji, których produkty, wraz z czynnikami środowiskowymi, mogą przyczyniać się do powstania i/lub rozwoju raka piersi [3]. Zatem obecność i stężenie produktów takich genów można traktować jako potencjalne molekularne wyznaczniki raka piersi.

Obecnie uznanymi wyznacznikami molekularnymi, istotnymi na etapie inicjacji i promocji raka piersi, są: antygen proliferacyjny Ki-67, receptor estrogenowy alfa (ER α), receptor progesteronowy (PR) i receptor naskórkowego czynnika wzrostu (HER-2).

Markery biorące udział w inicjacji i promocji raka piersi

Inicjacja jest pierwszym etapem transformacji nowotworowej, w której następuje pojawienie się zmutowanej komórki. Wśród genów, w których mutacje mogą powodować powstanie nowotworu, można wyróżnić trzy zasadnicze grupy genów: protoonkogeny, geny supresorowe (antyonkogeny) hamujące transformację nowotworową (*tumor suppressor genes*) oraz geny mutatorowe, w których mutacje zwiększają częstość mutacji w genomie.

W raku piersi najczęściej spotyka się mutacje w obrębie protoonkogenów, takich jak: *c-myc*, *int-2*, *CCND1* (cyklina D1), *HER-2 (ERBB2)* i genów supresorowych, do których zaliczamy: *p53*, *BRCA1*, *BRAC2*, *CHEK2*, *Rb1*, *PTEN*, *ATM* i *CDH1* (E-kadheryna). Produkty protoonkogenów regulują procesy wzrostu, różnicowania i uczestniczą w transdukcji sygnałów międzykomórkowych. Geny supresorowe kontrolują replikację, a w momencie uszkodzenia DNA produkty tych genów zatrzymują cykl komórkowy, włączają adekwatne do uszkodzenia systemy naprawy DNA lub w razie niepowodzenia naprawy – włączają program apoptozy.

W fazie promocji zainicjowana komórka ulega klonalnej ekspansji, kumulując następne mutacje. Większość klonów ginie w wyniku nadmiernych mutacji lub są one eliminowane przez system immunologiczny gospodarza. Klony, które przeżywają, nabywają większej autonomii wzrostu, szybciej proliferują i nabywają cech nieśmiertelności. Komórka promowana w wyniku następnych mutacji jest immortalizowana przez wyłączenie programu apoptozy i nadmierną proliferację.

Antygen Ki-67

Gen kodujący antygen Ki-67 (zwany również MKI67, KIA) znajduje się w *locus* 10q25-ter. Białko Ki-67 jest uniwersalnym markerem proliferacji. Przy użyciu odpowiednich IgG można wykazać jego obecność na powierzchni chromosomów w trakcie mitozy. W interfazie

znajduje się on w jądrze komórkowym, podczas gdy w trakcie fazy spoczynkowej G0 jest on praktycznie niewykrywalny. Doświadczenia z użyciem siRNA wykazały, że Ki-67 jest niezbędny do proliferacji komórek. Poziom Ki-67 oznacza się za pomocą wyznakowanych przeciwciał i na podstawie procentu pozytywnych komórek w preparacie oblicza się tzw. indeks LI antygeny Ki-67 (Ki-67 labelling index). Za prawidłowy poziom Ki-67 uważa się 3% pozytywnych komórek [4]. Poziom Ki-67 powyżej 10% jest wskaźnikiem wysokiego indeksu mitotycznego badanych komórek, a u kobiet chorych na raka piersi może świadczyć o niskich okresach przeżycia, zarówno bez wznowy nowotworu – DFS (*disease-free survival*), jak również całkowitego przeżycia – OS (*overall survival*) [5]. Dzięki temu Ki-67 jest dobrym wskaźnikiem indeksu mitotycznego, użytecznym w określeniu postępu i intensywności fazy promocji nowotworów, szczególnie prostaty i piersi.

Wysoki indeks mitotyczny (procent komórek będących w stadium podziału mitotycznego) komórek nowotworowych – wyższy od 10% – wiąże się ze złym rokowaniem dla pacjentów. Poziom ekspresji antygeny Ki-67 spada po chemioterapii, co daje podstawy do zakwalifikowania Ki-67 do grupy użytecznych markerów przebiegu i skuteczności terapii, pomimo wyników wcześniejszych badań pokazujących, że osoby z wysokim poziomem Ki-67 po chemioterapii, nawet wspomaganą tamoksyfenem, nie miały znacząco różnych prognoz od osób z niskim poziomem Ki-67, leczonych w ten sam sposób. Poziom Ki-67 daje tylko obraz aktualnego stanu, w jakim jest nowotwór, wskazując, czy w danym momencie cechuje się on intensywną proliferacją, czy też nie. Jest on tylko dobrym wskaźnikiem fazy promocji nowotworu, przydatnym do monitorowania skuteczności aktualnie prowadzonej chemioterapii. W 10. lub 21. dniu u chorych w trakcie leczenia MM(M)T {mitoksantron, mitomycyna C (metotreksat), tamoksyfen} zauważono znaczny spadek poziomu Ki-67, a po 3 miesiącach stwierdzono znaczną remisję nowotworu, co sugeruje możliwość powiązania zmian w poziomie ekspresji Ki-67 z szansą na remisję.

W przypadku raka piersi istnieje silny związek pomiędzy poziomem Ki-67 a wielkością guza, agresywnością raka piersi, poziomem angiogenezy i przeżywalnością chorych. Wysoki poziom Ki-67 jest czynnikiem świadczącym o bardzo złej prognozie chorych na raka piersi [6]. W odpowiedzi na leczenie tamoksyfenem w pierwszym tygodniu obserwuje się gwałtowny, nawet 5-krotny, spadek procentu komórek nowotworowych wykazujących ekspresję Ki-67, a jednocześnie obserwuje się nawet dwukrotny wzrost liczby komórek apoptotycznych. Na podstawie indeksu Ki-67 i indeksu apoptotycznego (AI) z agresywnie rozwijających się guzów (Ki-67=50%, AI=0,8) po leczeniu można stwierdzić, czy rozwój guza się zatrzymał (Ki-67=25%, AI=2,5%), czy nastąpiła pełna kliniczna odpowiedź na leczenie, czy też guz uległ remisji (Ki-67=10%, AI=3,6%) [7]. Ki-67 okazał się użytecznym markerem predykcyjnym, dlatego coraz więcej

oddziałów onkologicznych wykonuje badanie poziomu jego ekspresji [8].

Cyklina D1

Przejsie przez fazę G1 cyklu komórkowego jest regulowane przez cykliny i kinazy cyklinozależne (CDK, *cyclin-dependent kinase*). Jednym z kluczowych regulatorów cyklu jest cyklina D1, mogąca odgrywać rolę w transformacji nowotworowej. W komórkach prawidłowych cyklina D1 bierze udział w różnicowaniu i kontroli apoptozy.

Białko D1, wyizolowano jako produkt potencjalnego onkogenu *PRAD1* (*parathyroid adenomatosis 1*) z wielu pierwotnych guzów nowotworowych człowieka, w tym z guzów piersi. Wyniki badań nad rolą cykliny D1 w transformacji nowotworowej sugerują, że wraz z cyklinami typu E bierze ona w proliferacji komórek nowotworowych, w szczególności w przypadku raka piersi z ekspresją receptora ER α [9]. Dzieje się tak dlatego, że ER α reguluje pośrednio ekspresję genu *CCND1* (*locus 11q13*), kodującego cyklinę D1 poprzez wpływ na jego czynniki transkrypcyjne. Indukcja ekspresji genu cykliny D1 należy do najbardziej znaczących skutków działania estrogenów. Oprócz promowania przejścia cyklu komórkowego z fazy G1 do S, cyklina D1 modyfikuje wiele szlaków metabolicznych, bierze udział w różnicowaniu się komórek, a także w ich migracji [10]. Poziom cykliny D1 zależy od prawidłowego działania ER α jako pośredniego modulatora ekspresji genu *CCND1*, dlatego terapia lekami z grupy SERM (*selective estrogen receptor modulator*) lub SERD (*selective estrogen receptor downregulator*) działa również na cyklinę D1, obniżając jej ekspresję i hamując proliferację.

Nadekspresję cykliny D1 obserwowano w ponad 20% potwierdzonych klinicznie nowotworów piersi. Nadmierna ekspresja cykliny D1 podwyższa agresywność raka piersi – nowotwór może przejść z nieinwazyjnego zrazikowego raka *in situ* (CLIS, *carcinoma lobulare in situ*) lub wewnątrzprzewodowego (CDIS, *carcinoma ductale in situ*) w raka inwazyjnego, intensywnie naciekającego okoliczne tkanki. Najczęściej nadekspresja cykliny D1 w komórkach nowotworowych raka piersi jest spowodowana amplifikacją genu *CCND1* i występuje tylko w nowotworach wykazujących ekspresję receptora estrogenowego ER α [11]. Ponadto ostatnio zidentyfikowano polimorfizm 870G>A genu *CCND1*, predysponujący do wystąpienia raka piersi [12].

Podobnie do cykliny D1 działa cyklina E, której nadekspresja również koreluje ze złą prognozą chorych na raka piersi. Ludzki genom koduje dwie cykliny E. Cyklina E1 i cyklina E2 wykazują 47% homologii, a wyniki analizy mRNA obydwu wariantów sugerują, że cyklina E1, ulegająca silniejszej ekspresji w nowotworach ER(-)/PR(-), wiąże się ze złym rokowaniem [13]. W związku z tym zarówno cyklina D1, jak i cykliny E są dobrymi kandydatami na molekularne wskaźniki raka piersi, szczególnie użyteczne w monitorowaniu skuteczności hormonoterapii, której celem jest ER α .

Warto tutaj wspomnieć również o inaktywatorze kinaz CDK cyklu komórkowego – białku p27 (KIP1), regulującym cykl komórkowy. Wykazano, że obniżenie jego ekspresji koreluje ze złym rokowaniem raka piersi [14].

Kinaza Chk2

Chk2 (*Cell-cycle-checkpoint protein kinase 2*) jest kluczowym mediatorem w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. To wielofunkcyjna serynowo-treoninowa kinaza białkowa, która fosforyluje białka odpowiedzi na stres genotoksyczny, a sama jest fosforylowaną kinazą ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) w pozycji T68, dzięki której nabywa aktywności enzymatycznej oraz zdolności fosforylacji takich białek jak p53, BRCA1, Cdc25c, stymulując komórkę do naprawy DNA lub wprowadzając ją na drogę apoptozy. Chk2 wraz z białkiem p53 uczestniczy w supresji nowotworów: włącza naprawę DNA w punktach kontrolnych, zatrzymuje cykl komórkowy, aktywuje apoptozę w odpowiedzi na poważne uszkodzenie DNA [15].

Fosforylacja p53 w pozycji S20 przez Chk2 ma krytyczne znaczenie dla stabilności p53. Mutacje w genie *CHEK2* mają wpływ nie tylko na aktywność kinazy Chk2, ale także na p53 oraz na wiele innych białek utrzymujących stabilność genomu. W związku z tym mutacje genu *CHEK2* mogą odgrywać znaczącą rolę w indukcji i rozwoju transformacji nowotworowej. Mutacja o niskiej penetracji 1100delC w genie *CHEK2* odnajdywana jest w rodzinnych rakach piersi [16]. Można ją traktować jako predyspozycję genetyczną do rozwoju raka piersi, podnoszącą nawet pięciokrotnie ryzyko zachorowania u kobiet i aż dziesięciokrotnie u mężczyzn [17]. Mutacja 1100delC jest niebezpieczna dla komórki, ponieważ jest przyczyną utraty aktywności kinazowej Chk2, prowadząc do wzrostu niestabilności genomowej, co w konsekwencji może prowadzić do rozwoju wielu innych nowotworów, nie tylko raka piersi [18]. Inne mutacje w genie *CHEK2*, takie jak E161_D162delinsD, R117G, R137Q, 1214del4bp (ACCG), IVS2+1G>A, są również związane ze wzrostem ryzyka wystąpienia raka piersi u kobiet, które znacznie gorzej znoszą skutki uboczne radioterapii [19].

Protoonkogen *c-myc*

Produkt protoonkogeny *c-myc* (*locus* 8q24.1), będący homologiem wirusowego onkogeny *v-myc*, w komórkach prawidłowych odgrywa kluczową rolę w postępie cyklu komórkowego, kontroli różnicowania i indukcji apoptozy. Białko *c-Myc* z białkiem Max tworzy dimer pełniący funkcję czynnika transkrypcyjnego dla genów kontrolujących wzrost, różnicowanie, mitogenezę i apoptozę.

Onkogen *c-myc* powszechnie uważany jest za gen progresji nowotworów wielu narządów, a mutacje w nim są niekorzystnym czynnikiem rokowniczym. Wzrost ekspresji genu *c-myc* prowadzi do wzrostu aktywności anty-apoptotycznego białka Bcl-2, które hamuje apoptozę. *c-Myc* jest silnym stymulatorem promocji nowotworu: powoduje immortalizację komórek nowotworowych,

działa proproliferacyjnie, a komórki nowotworowe raka piersi z nadekspresją *c-myc* wykazują wysoki indeks proliferacyjny [20]. Nadekspresję *c-myc* w wyniku wewnątrzchromosomowej amplifikacji genu stwierdza się u 15-20% chorych na raka piersi [21]. Dodatkowo *c-Myc* razem z Bcl-2 stymuluje tworzenie przerzutów do węzłów chłonnych [22].

Zaobserwowano wzrost oporności na antyestrogeny nowotworowych linii komórkowych, wykazujących nadekspresję *c-myc* [23]. Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, że poziom białka *c-Myc* stanowi dobry czynnik prognostyczny, informujący o poziomie agresywności nowotworu i skuteczności prowadzonej terapii. Dodatkowo, określenie poziomu białka *c-Myc* pomaga w decyzji o wyborze odpowiedniej terapii, szczególnie u pacjentów chorych na nowotwory z nadekspresją *c-myc*, wykazujące oporność na terapię antyestrogenami. Pomimo, że amplifikacja onkogeny *c-myc* jest znacząco związana z agresywnym fenotypem nowotworów piersi i wiąże się ze złym rokowaniem pacjentów, *c-Myc* może stanowić dobry cel terapii „potrójnie negatywnych” („*triple negative*”) nowotworów o fenotypie ERα(-)/PR(-)/HER-2(-) [24].

Białko p53

Gen *TP53*, położony w *locus* 17p13.1, jest jednym z najczęściej ulegających mutacjom genem supresorowym w sporadycznych nowotworach u ludzi [25]. Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym, hamującym bądź aktywującym wiele genów, w tym *Gadd45*, którego produkt hamuje cykl komórkowy, dzięki czemu jest pośrednim regulatorem cyklu komórkowego i apoptozy. Aktywność p53 jako regulatora genów wynika ze zdolności specyficznego wiązania się z DNA, z sekwencją p53RE (*p53-responsive element*), którą zawierają wrażliwe na p53 geny [26].

TP53 jest aktywowany w przypadku masywnych uszkodzeń DNA, stresu oksydacyjnego, hipoksji, promieniowania stanowiącego zagrożenie dla stabilności genomu i aktywacji onkogenów. Nadmiar białka p53 bądź zbyt długi czas jego półtrwania, zaburza prawidłowe funkcjonowanie komórki.

Aktywną formą tego białka jest fosfoproteina p53, funkcjonująca w jądrze komórkowym w formie tetrameru. Przy wystąpieniu uszkodzeń DNA poziom fosfoproteiny p53 wzrasta i wpływa na dalszy los komórki – zatrzymuje ją w fazie G1, dając czas na naprawę DNA lub uruchamia program apoptozy. Zaburzenia w obrębie genu *TP53* należą do najczęściej stwierdzanych zaburzeń genetycznych u chorych na nowotwory. U chorych na raka piersi mutacje tego genu stwierdza się u około 50% wszystkich chorych. Większość mutacji genu *TP53* ma charakter punktowy, prowadząc do zaburzeń sekwencji wiążącej DNA i aktywującej geny zależne od p53. W sporadycznych rakach piersi wystąpienie mutacji *TP53* w komórkach nowotworowych ma miejsce dopiero na etapie progresji. Mutacje *TP53* rzadko są związane z dziedzicznym rakiem piersi [27]. Dodatkowo w raku

piersi zaburzona ekspresja p53 pociąga za sobą nadmierną ekspresję onkogenów *c-erbB2*, *c-myc* i *int2* [28].

Zbadano wiele mutacji genu *P53* u chorych na raka piersi. Najmniejszą przeżywalnością cechowali się chorzy z mutacjami typu nonsens. Mutacje w eksonie 7 były silnie związane z niską przeżywalnością chorych na raka piersi. Mutacje w domenach L2/L3, wiążących cynk, były związane ze złą prognozą dla chorych. Bardziej agresywne guzy występowały u osób posiadających mutacje inaktywujące fosfoproteinę p53 [29]. W badaniach, w których analizowano DNA z guza pierwotnego u 315 chorych na raka piersi, stwierdzono zależność nadekspresji cykliny E od niskiego poziomu i braku białka p53, co prowadziło do niekontrolowanej proliferacji komórek [30]. Mutacja w kodonie 72, powodująca zamianę argininy na prolinę, silnie predysponuje do raka piersi i stanowi marker złej prognozy u chorych na raka piersi [31].

Prognozyjne znaczenie zaburzeń genu *TP53* w odniesieniu do chemioterapii jest sprawą dyskusyjną. Chorzy na raka piersi z prawidłową, jak i nadmierną ekspresją p53 jednakowo reagują na chemoterapię CMF (cyklofosfamid, metotreksat, 5-fluorouracyl) [32], podczas gdy podwyższona ekspresja p53 wiąże się z opornością komórek nowotworowych na tamoksyfen, co ma związek z nadmierną proliferacją i wysokim stopniem złośliwości raka piersi [33].

Wszelkie zaburzenia inaktywujące p53 powodują, że uszkodzenia DNA nie są naprawiane, cykl komórkowy pomimo ich obecności postępuje, a komórki mają wyłączony program apoptozy, co sprzyja ich immortalizacji i progresji nowotworu. Dlatego uważa się, że inaktywujące mutacje *TP53* stanowią negatywny czynnik prognostyczny w przypadku chorób nowotworowych, jednak z drugiej strony prawidłowe działanie p53 sprzyja chemoodporności komórek, które są w stanie naprawić uszkodzenia DNA celowo wywołane chemioterapeutykami. Dlatego poszukuje się mutacji w genie *TP53*, które będą miały znaczenie prognozyjne w raku piersi. Już wiadomo, że mutacje uszkodzające domeny L2 i L3 (STOP w kodonie 204, A>G w kodonie 249, delecja 14 pz w kodonach 217-221, G>A w kodonie 248) są przyczyną oporności nowotworów na leki z grupy antracyklin. Inne mutacje genu *TP53* (C>T w kodonie 151, G>A w kodonie 273, A>G w kodonie 163, G>A w kodonie 273) mogą zwiększać wrażliwość nowotworów piersi na antracykliny. Wykazano również, że podział na nowotwory p53-negatywne i p53-pozytywne, na podstawie barwienia wyznaczonymi przeciwciałami, jest nieprzydatny w szacowaniu odpowiedzi na chemioterapię, ponieważ przeciwciała używane w tych testach nie wykrywają wszystkich mutacji *TP53*, mających wpływ na chemoodporność. W dodatku tylko 30% nowotworów, u których stwierdza się mutacje *TP53* metodami genetycznymi, w barwieniu immunocytochemicznym okazuje się nowotworami p53-negatywnymi [34]. Jednak chemioterapia guzów p53-negatywnych, w preparatach których stwierdza się mniej niż 10% komórek wykazujących ekspresję p53, jest dosyć skuteczna i często prowadzi do całkowitej klinicznej remisji, ponieważ nowotwory p53-negatywne nie są w stanie

naprawić uszkodzeń DNA spowodowanych chemioterapeutykami. Pacjenci, u których nie stwierdzono zaburzeń w ekspresji p53, gorzej odpowiadają na leczenie lekami z grupy antracyklin i taksanów, ponieważ prawidłowe działanie p53 indukuje chemoodporność nowotworów na te chemioterapeutyki. Leki z taksanów (np. paklitaksel, docetaksel) działają w fazie M cyklu komórkowego, podczas której wiążą spolimeryzowane mikrotubule, powodując zablokowanie podziału komórki. Prawidłowe działanie p53 w odpowiedzi na stres genotoksyczny powoduje, że cykl komórkowy zatrzymuje się w fazie G1, więc nie dochodzi do fazy M, w której działają leki z grupy taksanów [35]. Mutacje inaktywujące p53 mogą być przydatnym wyznacznikiem predykcyjnym dla leczenia taksanami, gdyż mogą powodować brak indukcji punktu kontrolnego G2/M, indukujący efekt cytostaticzny lub cytostatyczny taksanów.

Podobna sytuacja jest w przypadku chemioterapii nowotworów piersi antracyklinami (np. doksorubicyna, epirubicyna), które nie oddziałują z wrzeczonym mitotycznym, tylko bezpośrednio lub pośrednio z DNA. Antracykliny, interkalując DNA, powodują pęknięcia jedno- i dwuniciowe, a ulegając redukcji są źródłem wolnych rodników, powodujących uszkodzenia oksydacyjne DNA oraz uniemożliwiają naprawę uszkodzeń DNA, oddziałując z topoizomerazą II i hamując jej aktywność.

Prognozyjne znaczenie mutacji genu *TP53* jest wciąż dyskusyjne. Różne mutacje *TP53* mogą zwiększać bądź obniżać chemoodporność nowotworów, dlatego skuteczność leczenia nowotworów podnosi się dzięki połączeniu dwóch lub więcej przedstawicieli różnych grup leków, np. skojarzone leczenie paklitaksellem i doksorubicyną.

Znaczenie p53 jako wyznacznika prognozy jest sprawą dyskusyjną, ale z powodu roli, jaką to białko odgrywa w kontroli cyklu komórkowego i aktywacji genów zatrzymujących cykl komórkowy oraz pobudzających szlaki naprawy DNA, jego znaczenie jako ogólnego wyznacznika transformacji nowotworowej nie podlega dyskusji.

Receptor HER-2

Receptor HER-2 (*human epidermal growth factor receptor*) zwany też EGFR (*epidermal growth factor receptor*; receptor nabłonkowego czynnika wzrostu) jest homologiczny do wirusowego onkogeny *c-erbB* wirusa erytroblastozy ptaków. HER-2 jest glikoproteiną o masie 185 kD, której domena wewnątrzkomórkowa ma aktywność kinazy tyrozynowej klasy I. Pobudzenie tego receptora przez ligand (głównie EGF) uruchamia złożony szlak przekazywania sygnałów, prowadzący do replikacji DNA i proliferacji komórki nabłonkowej.

Protoonkogenowa rodzina receptorów HER ma duże znaczenie dla rozwoju, diagnozy, prognozy i terapii raka piersi. Grupa HER (c-erbB) receptorowych kinaz tyrozynowych obejmuje receptory: EGFR (nabłonkowy receptor czynnika wzrostu, c-erbB-1), HER-2/neu (c-erbB-2), HER-3 (c-erbB-3) i HER-4 (c-erbB-4). Aktywacja protoonkogeny *c-erbB-2* w komórkach nowo-

tworowych prowadzi do ciągłej proliferacji i ochrony przed apoptozą. Heterodimer HER-2/HER3 (c-erbB2/c-erbB3), przy równoczesnej nadekspresji receptora HER-2, jest jedną z najagresywniejszych onkoprotein, powodujących zaburzenie wzrostu komórek i pobudzanie ich zdolności do metastazy, głównie w rakach piersi i jelita grubego. Receptory c-erbB-1 i c-erbB-2 często charakteryzują się wzmożoną ekspresją w raku piersi i sygnalizują niekorzystny wynik diagnostyczny choroby.

W raku piersi może występować nadekspresja HER-2, związana z amplifikacją genu kodującego ten receptor. Chorych, ze względu na poziom ekspresji, można podzielić na HER-2(+) i HER-2(-). Pacjenci HER-2(+) gorzej odpowiadają na chemioterapię, a ich nowotwory są bardziej złośliwe [36]. Dlatego obecnie dla celów terapeutycznych poziom HER-2 koreluje się z poziomem ER α , dzieląc nowotwory piersi na 4 kategorie: ER(+)/HER-2(-), ER(+)/HER-2(+), ER(-)/HER-2(+) i ER(-)/HER-2(-), w celu dobrania odpowiedniej terapii do poszczególnej kategorii. Ostatnie dwie grupy stanowią nowotwory najbardziej złośliwe, a osoby chore na nowotwór ER(-)/PR(-)/HER-2(-), z równoczesnym brakiem ekspresji receptora PR, mają bardzo złą prognozę ze względu na ograniczony wybór terapii [37].

Nadmierna ilość białka kodowanego przez gen *HER-2* lub mutacja tego genu występuje u około 20-30% wszystkich chorych na raka piersi. Nadmierna ekspresja HER-2 wiąże się na ogół ze złą prognozą raka piersi, szczególnie estrogenozależnego, m.in. dlatego, że estrogeny mogą dodatkowo pobudzać proliferację komórek nowotworowych poprzez stymulację HER-2. Nowotwory z nadekspresją HER-2 i ER α są bardziej agresywne i cechują się szybszą proliferacją, ponieważ odbierają sygnały do podziału z dwóch rodzajów receptorów. Dodatkowo receptor ER α ma wpływ na szlak zależny od HER-2 na dwa sposoby; jako receptor jądrowy ER α hamuje ekspresję HER-2, ponieważ aktywny dimer ER α oddziałuje z 219 bp – fragmentem promotora genu kodującego HER-2, obniżając poziom transkrypcji mRNA *HER-2* [38], a z drugiej strony, zaktywowany ER α , obecny w lub w pobliżu błony komórkowej, stymuluje fosforylację i aktywację błonowych receptorowych kinaz tyrozynowych, takich jak receptory z rodziny EGFR, w tym HER-2. Do komórki zostaje przekazany z receptora HER-2 sygnał do proliferacji, pomimo że nie został on wygenerowany związaniem EGF przez HER-2 tylko pośrednio, przez stymulację estrogenami [39]. Dodatkowo, nowotwory HER-2(+) są mniej wrażliwe na tamoksyfen, co ma związek z niewrażliwością receptorów ER α na ten lek, poprzez stymulujący wpływ na koaktywatory ER α , w tym AIB1 (*amplified in breast cancer 1*), poprzez sygnały biegnące od HER-2 przez MAP-kinazy i białko p27 [40]. Jeszcze do niedawna osoby z metastatycznymi nowotworami piersi, wykazującymi nadekspresję HER-2, miały mniejszą szansę na wyleczenie niż osoby z nowotworami o fenotypie HER-2(-), jednak po wprowadzeniu do adjuwantowej chemioterapii trastuzumabu (herceptyny), zawierającego przeciwciała blokujące HER-2,

zaobserwowano znaczące wydłużenie okresu przeżycia chorych na nowotwory HER-2(+) [41].

Obecnie prowadzi się badania nad związkiem pomiędzy poziomem ekspresji HER-2 a rodzajem chemioterapii. W jednym z takich badań przebadano 600 pacjentów z rakiem piersi, otrzymujących zestaw chemioterapeutyków CMF (CTX+MTX+5-Fu), 600 pacjentów otrzymujących zestaw CEF (CTX+E-ADM+5-Fu) i 425 pacjentów leczonych antracyklinami i taksanami. W grupie osób z nowotworami HER-2(+) leczonych CMF 3-letni okres przeżycia DFS był krótszy w porównaniu z osobami z nowotworami HER-2(-). U chorych z nowotworami HER-2(+), leczonych antracyklinami i taksanami, uzyskano o wiele lepsze wyniki leczenia w grupie osób z przerzutami do okolicznych węzłów chłonnych, w porównaniu z chorymi bez przerzutów. Osoby z nadekspresją HER-2 cechują się nowotworami opornymi na CMF, ale wrażliwymi na leczenie antracyklinami i taksanami [42].

Dodatkowo, HER-2 jest celem terapii celowanej. Monoklonalne przeciwciała blokujące część zewnątrzkomórkową receptora, np. w trastuzumabie lub pertuzumabie, stosowane razem ze standardowymi chemioterapeutykami, przyczyniają się do skuteczniejszego leczenia i pozwalają na uzyskanie remisji u 38% chorych HER-2(+), w porównaniu z 14% osób niewspomaganych przeciwciałami skierowanymi przeciwko receptorowi HER-2. Trastuzumab przedłuża przeżycie nawet o 25 miesięcy u osób z zaawansowanym rakiem i już z odległymi przerzutami [43]. Szanse na przedłużenie okresu przeżycia DFS chorych z nowotworami HER-2(+), również tych z przerzutami do wątroby, są o wiele wyższe, kiedy stosuje się trastuzumab w połączeniu z innymi chemioterapeutykami, takimi jak: tamoksyfen, epirubicyna, cyklofosfamid, 5-fluorouracyl, paklitaksel lub docetaksel [44]. Inny preparat, stosowany w terapii celowanej przeciwko receptorom rodziny HER, EKB-569 wiąże się kowalencyjnie z receptorami HER-1, HER-2 i HER-4, blokując w ten sposób ich fosforylację i przekazanie sygnału do wnętrza komórki. Skutkiem działania tego preparatu jest zahamowanie proliferacji i stymulacja apoptozy. Działanie HER-2 można też zablokować chlorowodorkiem kwinazolinoliny (OSI-774), który konkurencyjnie z ATP wiąże się do wewnątrzkomórkowej domeny katalitycznej wszystkich receptorów z grupy HER, blokując ich sygnały pomimo aktywacji ligandem. Oprócz badania poziomu ekspresji HER-2 na komórkach nowotworowych można oznaczyć również poziom HER-2 w surowicy krwi, którego podwyższony poziom źle rokuję i może świadczyć o istnieniu przerzutów [45].

Podsumowując, receptor HER-2 jest wartościowym wyznacznikiem prognostycznym i predykcyjnym, szczególnie pomocnym w wyborze zestawu leków przeciwnowotworowych.

Receptor PR

Receptor progesteronowy należy do tej samej rodziny receptorów jądrowych, będących czynnikami transkryp-

cyjnymi, co receptory estrogenowe ER α i ER β . Poziom receptora PR w raku piersi odzwierciedla prawidłowe działanie receptora ER α , który jest aktywatorem genu *PGR* (*locus* 11q22), kodującego receptor PR. U około 60% chorych na raka sutka stwierdza się obecność zarówno receptorów estrogenowych, jak i progesteronowego. U około 20% chorych stwierdza się występowanie tylko jednego z receptorów, a u pozostałych 20% brak jest całkowicie ich ekspresji.

Występowanie receptorów ER i PR związane jest z wiekiem chorych i częściej wykrywa się je u chorych w starszym wieku. Prawdopodobieństwo uzyskania remisji jest tym większe, im wyższa jest zawartość tych receptorów w komórkach rakowych. U chorych, u których oba receptory nie występują, szansa uzyskania remisji po leczeniu hormonalnym wynosi mniej niż 10%. Zależność ta dotyczy wszystkich rodzajów hormonoterapii, stosowanych u chorych na raka piersi.

Obecność receptorów PR powoduje dodatkową stymulację proliferacji komórek nowotworowych raka piersi [46]. Jednakże z drugiej strony chorzy PR(+) lepiej odpowiadają na hormonoterapię niż osoby PR(-), a okres przeżycia tych osób jest dłuższy, dlatego oznaczanie receptorów PR jest ważnym elementem diagnostycznym w raku piersi, pomocnym w wyborze i monitorowaniu skuteczności terapii [47].

Ponieważ ER α aktywuje również transkrypcję mRNA receptora PR, stymulacja komórek estrogenami wzmacnia ekspresję PR. Podobnie dzieje się w komórkach nowotworowych raka piersi. Pojawienie się zwiększonej ekspresji PR w komórkach nowotworowych świadczy o niezaburzonej drodze działania ER α . Wynik badania, wskazujący na nowotwór ER α (-), świadczyć może o zmienionej strukturze ER α w komórkach nowotworowych, która nie została rozpoznana przez użyte w teście immunoglobuliny IgG, czyli, jeśli nowotwór okazał się ER α (+), to wniosek może być taki, że terapia z zastosowaniem leków z grupy SERM lub SERD nie odniosła zamierzonego efektu.

Dla nowotworów o fenotypie ER α (-)/PR(+) obserwuje się pożądaną reakcję na tamoksyfen, ale pacjenci z takimi nowotworami mają gorszą prognozę niż pacjenci ER α (+)/PR(+), ponieważ tamoksyfen może stymulować ekspresję PR. W jednych z badań w około połowie przypadków zaobserwowano podwyższony poziom PR w biopsjach pobranych w 13. dniu od podania tamoksyfenu, a prawie wszyscy z tej grupy odpowiedzieli pozytywnie na kontynuowaną hormonoterapię. Badano również wpływ innych chemioterapeutyków na poziom PR i po trzech jednodniowych cyklach podawania pacjentom po kolei: mitoksantronu, metotreksatu, mitomycyny C i tamoksyfenu u połowy z nich w biopsji nie zauważono zmiany w poziomie PR, w porównaniu z biopsją przed chemioterapią [48].

Warto postawić pytanie, czy receptor PR jest dobrym markerem prognostycznym, pozwalającym przewidzieć skuteczność hormonoterapii, a zarazem dobrym wyznacznikiem jej przebiegu? Obecność PR wzmacnia odpowiedź nowotworów piersi na hormonoterapię, ale to ekspre-

sja ER α jest niezbędnym warunkiem do jej zastosowania i stawiania korzystnych prognoz. Dlatego najlepsze rokowania mają osoby z rakiem piersi ER α (+)/PR(+), gorsze ER α (+)/PR(-), a najgorsze ER α (-)/PR(-). Rzyzyko wznowy nowotworu i umieralność osób z nowotworem ER α (-)/PR(+) są podobne do osób z nowotworem ER α (+)/PR(+) [49]. Receptor PR jest bardzo dobrym wskaźnikiem prognostycznym. Po pierwsze, istnieje silna odwrotna korelacja pomiędzy wielkością guza oraz stadiem rozwoju nowotworu w momencie diagnozy a poziomem PR w komórkach nowotworowych. Poziom PR spada w trakcie rozwoju raka piersi, co świadczy o utracie zróżnicowania komórek i generalnie źle rokuję, dlatego PR, będąc wskaźnikiem poziomu zróżnicowania komórek, jest dobrym markerem, mówiącym o skuteczności chemioterapii [50]. Po drugie, poziom receptora PR jest syntetyzowany w odpowiedzi na stymulację ER estrogenami i świadczy o niezakłóconej drodze przekazywania sygnałów z ER α – stanowi więc informację o skuteczności terapii hormonalnej [51]. Obniżenie poziomu ekspresji PR ma związek również z metylacją wyspy CpG w promotorze genu *PRG*, która jest stwierdzana aż u 40% guzów PR(-) [52].

Receptor PR może być również celem terapii przeciwnowotworowych – związki chemiczne, stymulujące ekspresję receptora PR lub wzmacniające jego działanie, mogłyby być pomocne w terapii nowotworów piersi. Podwyższony poziom PR wydaje się zapobiegać progresji nowotworów piersi, zarówno dzięki mechanizmom zależnym, jak i niezależnym od ligandu. Transfekcja cDNA genu *PRG* komórek raka piersi MDA-MB-231 o fenotypie ER(-)/PR(-), na drodze niezależnej od obecności progesteronu, spowodowała zatrzymanie ich wzrostu i zwiększenie ich adhezyjnych zdolności. Dodatkowo, podanie do pożywki tych komórek progesteronu zwiększyło uzyskane dzięki cDNA zróżnicowanie i zmieniło profil ekspresji genów na antyproliferacyjny i antyneoplastyczny [53].

Warto również wspomnieć o polimorfizmach genu *PGR*, predysponujących do nowotworów piersi, jak np. mutacja zmiany sensu V660L (rs1042638) w domenie o strukturze palca cynkowego, wiążącej DNA [54] lub wykazujących działanie protekcyjne, jak np. allel PROGINS, zawierający insercję elementu Alu w intronie 7, połączonej z mutacją punktową w eksonach 4 i 5) [55]. Sprawa znaczenia PR jest wciąż otwarta, dlatego obok oznaczenia poziomu ekspresji PR oznacza się inne receptory i dopiero z całości można wyciągnąć wnioski i zaprojektować schematy chemioterapii u chorych na raka piersi.

Receptor ER α

Receptory steroidowe biorą udział w regulacji transkrypcji około 100 genów uczestniczących w procesach proliferacji i różnicowania komórek. ER α reguluje nie tylko geny sterujące cyklem komórkowym, ale również ekspresję białek odgrywających rolę w budowie cytoszkieletu komórek (keratyny), białek regulujących przyleganie ko-

mórek do siebie w tkankach (klaudyna-4), regulujących interakcje międzykomórkowe i proliferację, takich jak MAP17 (*membrane-associated protein 17*) lub EMP1 (*epithelial membrane protein 1*), których nadekspresja została stwierdzona w wielu nowotworach, białek sterujących inwazją komórek (*CTSD*, ketepsyna D będąca lizosomalną proteinazą), adhezją i migracją komórek, takich jak np. tkankowy aktywator plazminogenu tPA (*tissue plasminogen activator*). Pod kontrolą ER α są także kinazy białkowe: tyrozynowa BCL-2 (*B-cell CLL/Lymphoma 2*) i serynowo-treoninowa kinaza CDK11, odgrywające rolę w kontroli przebiegu cyklu komórkowego, cytokinezie i apoptozie. Także geny kodujące białka układu odpornościowego podlegają regulacji przez ER α , który aktywuje ekspresję amyloidu surowiczego SAA1 (*serum amyloid A1*), głównego czynnika reakcji zapalnej oraz transformujących czynników wzrostu TGF- α i TGF- β (*transforming growth factor*) – silnych mitogenów stymulujących komórki do proliferacji, a wygasza ekspresję czynnika martwicy guzów TNF- α (*tumor necrosis factor- α*). Mierząc poziom TGF- α i receptora dla TGF- α można monitorować skuteczność leczenia tamoksyfenem [56]. ER α reguluje również transkrypcję własnego genu, a także wielu genów kodujących inne czynniki transkrypcyjne, takie jak CTNND1 (*catenin- δ -1*), JUN, FOS; ponadto chroni białko p53 przed inaktywacją przez białko HDM-21 (*human double minute-21*) [57]. Jedną z najważniejszych funkcji ER α jest regulacja aktywności czynnika transkrypcyjnego AP-1 (*activation protein 1*), regulującego wiele genów sterujących procesami proliferacji i różnicowania komórek. Proproliferacyjne działanie ER α polega również na aktywacji ekspresji protoonkogenów *c-jun* i *c-fos* oraz na oddziaływaniu z białkiem JUN. Indukcja ekspresji genu cykliny D1 (*CCND1*, *locus 11q13*) jest najważniejszym działaniem mitogennym estrogenów. Oprócz indukcji ekspresji cykliny D1, estrogeny indukują również ekspresję protoonkogenu *c-myc*, aktywują kinazy PI3 i MAPK poprzez stymulację ekspresji autokrynowych czynników wzrostu i przez aktywację protoonkogenu *c-src* [58]. Cyklina D1 aktywuje cyklinozależne kinazy CDK4/6, podczas gdy MYC indukują aktywację kompleksu cykliny E/CDK2, prowadzącą do przejścia cyklu komórkowego z fazy G1 do S. Dlatego szereg leków zaprojektowano z myślą o modulowaniu aktywności ER α , takich jak tamoksyfen, toremifen, raloksyfen i fulvestrant, skuteczny w inwazyjnych nowotworach piersi u kobiet w wieku przedmenopauzalnym [59]. Wartość predykcyjna statusu receptora ER α , jako celu terapii endokrynowej nowotworów piersi, nie podlega dyskusji – uzupełnienie chemioterapii nowotworów ER-pozytywnych lekami z grupy SERM lub SERD znacząco wydłuża okresy przeżycia DFS, jak i OS. Jednak wartość prognostyczna ER α jest sprawą wciąż dyskusyjną, pomimo, że guzy ER α (+) są mniej złośliwe, wykazują wyższy poziom zróżnicowania i lepiej rokują, szczególnie jeśli są również PR-pozytywne. Status receptorów ER α oraz towarzyszących mu receptorów PR i HER-2 stanowi ważny element w wyborze i w odpowiedzi na hormonoterapię, terapię neoadjuwantową lub chemioterapię.

Usunięcie guza powoduje wzrost ekspresji czynników wzrostu, co stymuluje pozostałe komórki nowotworowe, zarówno te stanowiące mikroprzerzuty, jak i te pozostawione w pobliżu guza pierwotnego, do ekspansywnego wzrostu, dlatego stosuje się przedoperacyjną terapię neoadjuwantową w celu uniknięcia szybkiego nawrotu choroby. Najlepsze efekty tej terapii uzyskuje się u osób cierpiących na nowotwory wykazujące negatywny status receptorów ER α i PR [60]. Ważnym czynnikiem predykcyjnym jest również koekspresja receptorów ER α , PR i HER2. Najczęściej w nowotworach piersi obserwuje się odwrotną korelację pomiędzy poziomem ekspresji receptorów steroidowych (HR:ER α /PR), a receptorem HER-2. Pacjenci po chemioterapii wspomaganą tamoksyfenem, u których stwierdzono nowotwór HR(+)/HER-2(+), odznaczają się krótszymi okresami przeżycia zarówno DFS, jak i OS [61]. W przypadku koekspresji receptorów ER α i HER-2 lepsze rezultaty leczenia otrzymuje się wprowadzając do terapii letrozol niż tamoksyfen, który okazuje się mniej skuteczny u pacjentów z nowotworami z nadekspresją HER-2 [62]. Blokowanie działania receptora ER lekami z grupy SERM i SERD nie tylko hamuje jego proproliferacyjne działanie, ale również obniża ryzyko chemooporności nowotworów, ponieważ stymulacja receptora ER α powoduje wzrost poziomu Bcl-2, co z kolei indukuje oporność nowotworów na antracykliny [63].

Receptor ER β

Dotychczas grupę chorych na raka piersi dzieliło się na osoby cierpiące na nowotwór ER(+), wykazujący ekspresję ER α i nowotwór ER(-), który w badaniach immunochemicznych tej ekspresji nie wykazywał. Odkrycie receptora estrogenowego β ten podział bardziej skomplikowało. ER β ulega ekspresji zarówno w nowotworach ER(+), jak i ER(-), dlatego obecnie nowotwory piersi pod względem ekspresji receptorów estrogenowych dzieli się na nowotwory ER α (+)/ER β (+), ER α (-)/ER β (+), ER α (+)/ER β (-) oraz ER α (-)/ER β (-), które różnią się od siebie fenotypem i wrażliwością na terapię antynowotworowe. Ponadto działanie ER β , ulegającego ekspresji w komórkach ER α (-), jest całkowicie inne niż w przypadku komórek posiadających oba te receptory. Dalsze skomplikowanie oznaczenia profilu ER β jest wynikiem obecności co najmniej trzech, różniących się działaniem i zdolnością do wiązania ligandu, izoform ER β . Obecnie poznane są trzy izoformy ER β : ER β 1 (530 aa., 59,2 kDa), będąca kompletną formą receptora ER β , powstała z pełnego transkryptu; ER β 2/cx (495 aa., 55,5 kDa) i ER β 5 (472 aa., 53 kDa), które powstały w wyniku alternatywnego składowania mRNA z pominięciem eksonu 8. Jednakże tylko ER β 1 posiada zdolność wiązania ligandu, co umożliwia jego aktywację i działanie w roli czynnika transkrypcyjnego, regulującego aktywność genów z modulem odpowiedzi na estrogeny – ERE (*estrogen response element*) [64].

Istnienie co najmniej trzech form, różniących się budową i działaniem, wymaga czulszych metod ich detek-

cji w komórkach, z użyciem monoklonalnych przeciwciał, skierowanych przeciwko C-terminalnym fragmentom izoform ER β . Użycie przeciwciał przeciwko innym epitopom ER β daje nam tylko informację o całkowitym poziomie ER β , generalnie mało mówiącą o aktywności ER β , kiedy już wiadomo, że tylko ER β 1 jest formą aktywną, wrażliwą na ligandy. Dodatkowo sprawę oznaczania poziomu ER β komplikuje fakt, że zarówno komórki prawidłowe, jak i neoplastyczne produkują wszystkie izoformy ER β [65]. Dlatego trudno immunohistochemicznie lub za pomocą hybrydyzacji typu *Western* wykazać ilościowo ekspresję poszczególnych izoform ER β tylko w komórkach nowotworowych.

Izoforma ER β 2/cx powstaje w wyniku alternatywnego składowania mRNA, w konsekwencji którego C-terminalny koniec receptora ER β zostaje zamieniony na fragment 26 dodatkowych aminokwasów, kodowanych w części 3' mRNA (nazwanej cx). Zamiana 26 aminokwasów w domenie LBD (wiążącej ligand) zniósła zdolność wiązania ligandu, ale nie zdolność wiązania się z sekwencjami ERE i aktywowania wrażliwych na estrogeny promotorów. Forma ER β 2/cx nie jest w stanie związać się z głównym aktywatorem receptorów estrogenowych, TIF1 α , ale jest w stanie utworzyć heterodimer z ER α (z mniejszą preferencją z ER β), hamując wiązanie się ER α z DNA. ER β 2/cx wycisza aktywację transkrypcji z promotorów z modułem ERE tylko w połączeniu z aktywowanym ER α . W ten sposób izoforma ER β 2/cx jest ważnym negatywnym regulatorem ER α i może być dobrym sużuznikiem hormonoterapii.

Są dwie grupy nowotworów piersi wykazujących ekspresję ER β : jedna z ekspresją ER α i druga bez ekspresji ER α . Około 58% to nowotwory ER α (+)/ER β (+), podczas gdy nowotwory ER α (-)/ER β (+) stanowią około 18% nowotworów raka piersi. Nowotwory te różnią się fenotypowo, ponieważ ER β wykazuje odmienne działanie w przypadku obecności lub braku ER α . Ulegając ekspresji razem z ER α , hamuje on proproliferacyjne działanie ER α , działając jako supresor nowotworów. Natomiast w przypadku braku ekspresji ER α – ER β przejmuje częściowo aktywność proproliferacyjną i może stać się celem terapii prowadzonej u osób z nowotworami ER α (-) [66].

Wszystkie trzy izoformy ER β ulegają ekspresji w komórkach raka piersi, jednak jest sprawą dyskusyjną, która z tych izoform przeważa. Jedne źródła podają, że większą ekspresję wykazują formy ER β 2/cx i ER β 5 w porównaniu z ER β , zaś inne, że poziomy mRNA ER β 1 i ER β 5 nie różnią od siebie w nowotworach ER α (+), jak i w ER α (-) [67]. W innych badaniach poziom białka ER β 1 i ER β 2/cx był znacząco wyższy w nowotworach ER α (+), w porównaniu z nowotworami ER α (-) [68]. Pojawiająca się tutaj różnica między poziomem białka a poziomem mRNA, w oznaczeniach poziomu ekspresji poszczególnych izoform ER β , była już wcześniej opisana [69], jednakże jej przyczyny nie zostały wyjaśnione. Możliwe, że wynika ona z regulacji ekspresji na poziomie translacji bądź modyfikacji potranslacyjnych, bądź też z dużej heterogenności tkankowej materiału pobranego

do badań, w którym oprócz komórek nowotworowych są prawidłowe komórki nabłonkowe, śródbłonkowe, leukocyty i inne. Dodatkowo sprawę oznaczenia kompletnego białka ER β 1 utrudnia fakt, że jest ono trawione przez macierzowe metaloproteazy (np. MMP-26) [70], więc niezastosowanie inhibitorów MMPs podczas izolacji ER β grozi ujemnie fałszywymi wynikami.

Około 58% nowotworów o fenotypie ER α (-) wykazuje ekspresję całkowitego (wszystkich izoform) ER β , w tym 57% wykazuje ekspresję ER β 2/cx. Poziom całkowitego ER β i poziom ER β 1 wykazuje pozytywną korelację z poziomem antygenu Ki-67, świadczącym o wysokim indeksie proliferacyjnym nowotworu. Związku takiego nie stwierdzono w przypadku ER β 2/cx. Sugeruje to, że z całej puli ER β głównie ER β 1 ma najsilniejsze działanie stymulujące proliferację komórek nowotworowych o fenotypie ER α (-) i że ER β działa całkowicie inaczej w nowotworach ER α (-) niż w ER α (+) [71]. Około 30% nowotworów raka piersi nie wykazuje ekspresji ER α , przez co rolę stymulatora proliferacji odgrywa ER β , stając się celem takich leków, jak np. tamoksyfen. Terapia tamoksyfenem osób cierpiących na nowotwory ER α (-)/ER β (+) spowodowała wydłużenie okresów przeżycia, zarówno DFS, jak i OS [66]. Rola ER β jako czynnika predykcyjnego jest dyskusyjna, a ponadto, pomimo że receptor ER β hamuje proproliferacyjne działanie ER α , wysoki jego poziom wydaje się być negatywnym czynnikiem prognostycznym. Wysoki poziom ekspresji receptora ER β często stwierdza się w agresywnych guzach, przerzutujących do węzłów chłonnych, przeważnie o fenotypie ER(-)/PR(-), czyli niewrażliwych na hormonoterapię. Dodatkowo podejrzewa się, że u podstaw oporności nowotworów ER(+) na tamoksyfen leży m.in. ER β [72]. Z drugiej strony, badania *in vitro* na liniach komórkowych wykazały, że ER β hamuje proliferację komórek nowotworowych poprzez hamowanie transkrypcji genów kodujących takie białka jak: c-myc, cykliny D1 i A, jednocześnie stymulując ekspresję białek zatrzymujących cykl komórkowy: p21 i p27 [73].

Pomimo tego, że nadal zbyt mało wiadomo o działaniu poszczególnych izoform ER β , w zależności od obecności bądź braku ER α , jest on nadzieją na hormonoterapię osób z nowotworami ER α (-). Jednakże konieczne są dalsze badania w tym kierunku.

Estrogeny – ligandy receptorów ER α i ER β

Kluczowym czynnikiem, stymulującym rozwój raka piersi po menopauzie, są estrogeny: 17 β -estradiol (E2), estron (E1) i estriol. Dodatkowo okazało się, że estrogeny w wyniku przemian metabolicznych mogą uszkadzać DNA, przez co są potencjalnymi mutagenami i kancerogenami [74].

Estrogeny biorą udział w kaskadzie sygnałów dla proliferacji, aktywując receptory estrogenowe ER α i ER β , które są czynnikami transkrypcyjnymi dla genów mających w swych sekwencjach regulatorowy moduł ERE. Wiele genów z taką sekwencją koduje białka sterujące proliferacją i różnicowaniem komórek oraz

tkanek biorących udział w reprodukcji (komórki nabłonka pochwowego, endometrium, przewodów gruczołu sutkowego). Estrogeny stymulują proliferację komórek nie tylko przez aktywację receptorów ER, PR, ale także przez aktywację receptorów z rodziny HER. Dlatego w raku piersi bez ekspresji receptora ER α , ale z obecnym HER-2, estrogeny mogą pobudzać proliferację komórek nowotworowych.

Można rozważać dwa mechanizmy udziału estrogenów w kancerogenezie raka piersi. Po pierwsze, estrogeny poprzez ER α stymulują proliferację, zwiększają liczbę podziałów komórek i akumulację uszkodzeń DNA powstałych podczas replikacji, prowadząc do fenotypu złośliwego. Po drugie, metabolizm estrogenów prowadzi do powstania związków genotoksycznych [74]. Oksydacja estrogenów do katecholestrogeneru i DES (dietylostilbestrolu), które dalej są utleniane do semiquinonów i quinonów przez peroksydazową aktywność cytochromu P-450, powoduje tworzenie kowalencyjnych wiązań pomiędzy DNA a quinonowymi metabolitami estrogenów [75].

Estrogeny powstają w wyniku aromatyzacji testosteronu i androstendionu w tkankach obwodowych (głównie w tkance tłuszczowej) i jajnikach przez kompleks enzymatyczny, zawierający m.in. oksydazę P-450 o mieszanej funkcji. U kobiet po menopauzie, gdy estrogeny nie są już produkowane przez jajniki, powstają w tkance tłuszczowej z androgenów. Dlatego wskaźnik masy ciała jest m.in. czynnikiem ryzyka zachorowania na raka piersi. Kobiety z nadwagą mają wysoki poziom estrogenów we krwi, a w wieku pomenopauzalnym jest on istotnym wskaźnikiem wysokiego ryzyka zachorowania na raka piersi, szczególnie ER(+) [76]. W komórkach raka piersi obserwować można 10 razy wyższe stężenie estradiolu niż w surowicy tych samych pacjentów, co sugeruje zdolności intrakrynowej syntezy estrogenów przez komórki rakowe *in situ*. Może być to związane z nadekspresją enzymów syntetyzujących estrogeny: aromatazy (CYP19), przekształcającej androstendion i testosteron odpowiednio w: estron i estradiol oraz 17 β -hydroksysteroidowej dehydrogenazy typu 1 (17 β HSDI), przekształcającej estron w estradiol, w komórkach rakowych, prowadząc do szybkiej ekspansji nowotworu (autostymulacja do mitoz). Po menopauzie większość estrogenów jest syntetyzowanych w tkance tłuszczowej przez aromatazę, dlatego w hormonoterapii raka piersi stosuje się dodatkowo inhibitory aromatazy.

Markery jako cele terapii antynowotworowej

Dziś jednym z najczęstszych celów terapii jest receptor ER α , ponieważ większość nowotworów złośliwych u kobiet, szczególnie po menopauzie, jest zaindukowana i pobudzana do promocji przez estrogeny. Uznane i rozważane wyznaczniki molekularne raka piersi pomagają w doborze leków przeciwnowotworowych, dawki, czasu leczenia oraz ocenie szansy wznowy nowotworu [77]. ER α jest wrażliwy na estrogeny, jednakże poprzez zmienioną konformację białka w wyniku mutacji bądź alter-

natywnego składania mRNA, może być niewrażliwy na leki z grupy SERM i SERD. Wówczas można wybrać za cel wcześniejszy etap całej kaskady transdukcji sygnału, mianowicie etap syntezy estrogenów, stosując inhibitory aromatazy, jak np aminoglutetymid. Także ekspresja innych białek może być celem terapii; obecnie dostępne są preparaty hamujące działanie czynników wzrostu VEGF i EGF. Receptor HER-2 daje podstawę do zastosowania monoklonalnych przeciwciał w postaci leku Trastuzumab (herceptyna) lub do wprowadzenia leków stosowanych w I fazie: 2C4, Pertuzumab, Omnitarg, EKB-569, a w III fazie OSI-774, Tarceva, Erlotinib. Jednakże należy brać pod uwagę, że w komórkach nowotworowych, zmienne w wyniku mutacji lub alternatywnego składania, białka markerowe mogą być nierozpoznawalne przez monoklonalne przeciwciała, używane w diagnostyce i mogą dawać wynik fałszywie ujemny. Dlatego powinno się wprowadzić do diagnostyki raka piersi mikromacierze cDNA, które powinny zawierać cDNA z kombinacji wszystkich możliwych transkryptów, powstałych z alternatywnego składania mRNA i transkrypcji z różnych promotorów. Niestety, w dniu dzisiejszym jest to niemożliwe ze względu na zbyt wysoki koszt tego typu badań. Sam gen kodujący ER α ma 7 promotorów i wiadomo, że transkrypcja jest inicjowana z innych promotorów w komórkach nowotworowych niż w komórkach prawidłowych [78].

Podsumowanie

Zmiana informacji genetycznej w komórce zainicjowanej może być wynikiem mutacji powstałej w genach odpowiedzialnych za procesy detekcji i naprawy DNA, kontrolę cyklu komórkowego, zarówno na poziomie punktów kontrolnych (Chk2, p53), jak i transdukcji sygnału do proliferacji (Ki-67, p21, c-myc, cyklina D1) z konkretnych receptorów (PR, HER-2, ER α i ER β). Defekty w wyżej wymienionych systemach prowadzą do utrwalenia uszkodzeń DNA, spowodowanych endogennymi bądź egzogennymi czynnikami genotoksycznymi lub kancerogenami przez podział komórki, na który pozwala niedokładna kontrola cyklu komórkowego. Całość uzupełnia niekontrolowana proliferacja i immortalizacja, dzięki upośledzonej bądź całkowicie wyłączonej apoptozie.

W zależności od tego, jaki gen został zmutowany, inaktywowany bądź utracony – efekt fenotypowy jest różny. Mutacja może zmienić aktywność lub swoistość receptora dla określonego stymulatora proliferacji albo zmienić białko pośredniczące w kaskadzie transdukcji sygnałów do jądra. Taka zmutowana komórka może otrzymywać nadmiernie dużą ilość sygnałów stymulujących podział, może dzielić się niezależnie od stymulacji przez receptor i może być niewrażliwa na sygnały hamujące jej podział. Komórka zainicjowana może również dzielić się niekontrolowanie, przekraczając punkty kontrolne cyklu komórkowego bez jakiegokolwiek kontroli uszkodzeń DNA. Dzieje się tak w przypadku, gdy mutacja uszkodzi gen kodujący białko, biorące udział w wykrywaniu uszkodzeń DNA, wskutek czego nie następuje

przekazanie sygnału do zatrzymania cyklu komórkowego i uruchomienia naprawy uszkodzenia. Inicjacja może również objawiać się nieśmiertelnością komórek, wskutek inaktywacji programu apoptozy lub białek decydujących o jej włączeniu.

Wydaje się, że opisane tutaj markery molekularne powinny być połączone z uznanymi wyznacznikami klinicznymi, a całość powinna być wzbogacona o metodologię bioinformatyczną. Rak piersi może być indukowany, promowany i może ulegać progresji z jednoczesnymi zmianami w ekspresji wielu genów, dlatego najlepiej byłoby badać profil ich ekspresji stosując mikromacierze cDNA. Obecnie dostępne są komercyjne zestawy mikromacierzy cDNA w postaci testów Oncotype DX i MammaPrint. Zestaw Oncotype DX pozwala na analizę ekspresji 21 genów (16 genów związanych z transformacją nowotworową i 5 genów referencyjnych) na podstawie mRNA, wyizolowanego z komórek nowotworowych utrwalonych w postaci parafinowych bloczków, co daje możliwość badania preparatów archiwalnych. Z kolei drugi test, MammaPrint, pozwala na analizę ekspresji genów tylko w świeżych lub świeżo zamrożonych preparatach, ale dzięki zastosowaniu tego zestawu możliwa jest analiza profilu ekspresji aż 70 genów [79]. Zastosowanie mikromacierzy cDNA oraz analiz proteomicznych może znacznie wzmocnić siłę prognozowania w raku piersi.

Mgr Katarzyna Janik-Papis
Katedra Genetyki Molekularnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

Piśmiennictwo

- Jemal A, Siegel R, Ward E i wsp. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2007; 57: 43-66.
- Antoniou A, Pharoah PD, Narod S i wsp. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 1117-30.
- Pharoah PD, Antoniou A, Bobrov M i wsp. Polygenic susceptibility to breast cancer and implication for prevention. *Nat Genet* 2002; 31: 33-36.
- Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation Marker Ki-67 in Early Breast Cancer. *J Clin Onc* 2005; 23: 7212-20.
- Jung S-Y, Han W, Lee JW. Ki-67 Expression Gives Additional Prognostic Information on St. Gallen 2007 and Adjuvant! Online Risk Categories in Early Breast Cancer. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 1112-21.
- Obondo C, Tannahill C, Murri A. The relationship between Ki-67 labeling index, angiogenesis, nuclear factor, kappa B and survival in primary invasive breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2008; 34: 1182-83.
- Cleator S, Parton M, Dowsett M. The biology of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2002; 9: 183-95.
- de Azambuja E, Cardoso F, de Castro Jr G i wsp. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a metaanalysis of published studies involving 12 155 patients. *Br J Cancer* 2007; 96: 1504-13.
- Sutherland RL, Musgrove EA. Cyclins and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004; 9: 95-104.
- Arnold A, Papanikolaou A. Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4215-24.
- Elsheikh S, Green AR, Paish EC i wsp. CCND1 amplification and cyclin D1 expression in breast cancer and their relation with proteomic subgroups and patient outcome. *EJC Supplements* 2007; 5: 24-25.
- Yu CP, Yu JC, Sun CA i wsp. Tumor susceptibility and prognosis of breast cancer associated with the G870A polymorphism of CCND1. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 107: 95-102.
- Sieuwert AM, Look MP, Meijer-van Gelder ME i wsp. Which cyclin E prevails as prognostic marker for breast cancer? Results from a retrospective study involving 635 lymph node-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3319-28.
- Alkarain A, Jordan R, Slingerland J. p27 deregulation in breast cancer: prognostic significance and implications for therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004; 9: 67-80.
- Ahn J, Urist M, Prives C. The Chk2 protein kinase. *DNA Repair* 2004; 3: 1039-47.
- Sodha N, Wilson Ch, Bullock SL i wsp. Analysis of familial male breast cancer for germline mutations in CHEK2. *Cancer Lett* 2004; 215: 187-9.
- Weischer M, Bojesen SE, Ellervik C i wsp. CHEK2*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls. *J Clin Oncol* 2008; 26: 542-8.
- Bahassi M, Penner CG, Robbins SB i wsp. The breast cancer susceptibility allele CHEK2*1100delC promotes genomic instability in a knock-in mouse model. *Mutat Res* 2007; 616: 201-9.
- Meyer A, Dörk T, Sohn C i wsp. Breast cancer in patients carrying a germ-line CHEK2 mutation: Outcome after breast conserving surgery and adjuvant radiotherapy. *Radiother Oncol* 2007; 82: 349-53.
- Naidu R, Wahab NA, Yadav M i wsp. Protein expression and molecular analysis of c-myc gene in primary breast carcinomas using immunohistochemistry and differential polymerase chain reaction. *Int J Mol Med* 2002; 9: 189-96.
- Deming SL, Nass SJ, Dickson RB i wsp. c-Myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. *Br J Cancer* 2000; 83: 1688-95.
- Sierra A, Castellsague X, Escobedo A i wsp. Synergistic cooperation between c-Myc and Bcl-2 in lymph node progression of T1 human breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 1999; 54: 39-45.
- Chrzan P, Skokowski J, Karmolinski A i wsp. Amplification of c-myc gene and overexpression of c-Myc protein in breast cancer and adjacent non-neoplastic tissue. *Clin Biochem* 2001; 34: 557-62.
- Chen Y, Olopade OI. MYC in breast tumor progression. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; 8:1689-98.
- Lerebours F, Lidereau R. Molecular alterations in sporadic breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 44: 121-41.
- Zhan Q, Gadd45a, a p53- and BRCA1 – regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutat Res* 2004; 569: 133-43.
- Gasco M, Yulug IG, Crook T. TP53 mutations in familial breast cancer: functional aspects. *Hum Mutat* 2003; 21: 301-6.
- Duffy MJ. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. *Clin chem* 2002; 48: 1194-7.
- Lai H, Ma F, Trapido E i wsp. Spectrum of p53 tumor suppressor gene mutations and breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 83: 57-66.
- Lindahl T, Landberg G, Ahlgren J i wsp. Overexpression of cyclin E protein is associated with specific mutation types in the p53 gene and poor survival in human breast cancer. *Carcinogenesis* 2004; 25: 375-80.
- Xu Y, Yao L, Zhao A i wsp. Effect of p53 codon 72 genotype on breast cancer survival depends on p53 gene status. *Int J Cancer* 2008; 122: 2761-6.
- Millesi DW, Harris WH, Gillett CF i wsp. The effect of c-erbB2 and estrogen receptor status on survival of women with primary breast cancer treatment with adjuvant CMF. *Int J Cancer* 1999; 84: 3054-9.
- Elledge RM, Allred DC. Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52: 79-98.
- Geisler S, Lønning PE, Aas T. Influence of TP53 Gene Alterations and c-erbB-2 Expression on the Response to Treatment with Doxorubicin in Locally Advanced Breast Cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 2505-12.
- Anelli A, Brentani RR, Gadelha AP. Correlation of p53 status with outcome of neoadjuvant chemotherapy using paclitaxel and doxorubicin in stage IIIB breast cancer. *Ann Oncol* 2003; 14: 428-32.
- Lange A, Dłubek D. Biologiczne uwarunkowania wysokodawkowanej chemioterapii w rakach piersi, jajnika, raku drobnokomórkowym płuc. *Współczes onkol* 2000; 4: 203-6.
- Cleator S, Heller W, Coombes RC. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol* 2007; 8: 235-44.
- Antoniotti S, Taverna D, Maggiora P i wsp. Oestrogen and epidermal growth factor down-regulate erbB-2 oncogene protein expression in breast cancer cells by different mechanisms. *Br J Cancer* 1994; 70: 1095-101.
- Razandi M, Pedram A, Park ST i wsp. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem* 2003; 278: 2701-12.

40. Schiff R, Masserweh S, Shou J i wsp. Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 447-54.
41. Ferretti G, Felici A, Papaldo P i wsp. Trastuzumab combined with paclitaxel after doxorubicin and cyclophosphamide for operable HER2-positive breast cancer. *Oncologist* 2006; 11: 533-4.
42. Zhang Y, Shankaran H, Opreko L i wsp. System theoretical investigation of human epidermal growth factor receptor-mediated signaling. *IET Syst Biol* 2008; 2: 273-84.
43. Slamon D, Clark G, Wong S i wsp. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-82.
44. Nishimura R, Okumura Y, Arima N. Trastuzumab monotherapy versus combination therapy for treating recurrent breast cancer: time to progression and survival. *Breast Cancer* 2008; 15: 57-64.
45. Souder C, Leitzel K, Ali SM i wsp. Serum Epidermal Growth Factor Receptor/HER-2 Predicts Poor Survival in Patients With Metastatic Breast Cancer. *Cancer* 2006; 107: 2337-45.
46. Shousha S. Issues in the interpretation of breast core biopsies. *Int J Surg Pathol* 2003; 11: 167-77.
47. Osborne CK, Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1616-22.
48. Makris A, Powles TJ, Allred DC i wsp. Quantitative changes in cytological molecular markers during primary medical treatment of breast cancer: a pilot study. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 53: 51-9.
49. Elledge RM, Green S, Pugh R i wsp. Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Int J Cancer* 2000; 20: 111-7.
50. Coyle YM, Xie XJ, Hardy DB. Progesterone receptor expression is a marker for early stage breast cancer: Implications for progesterone receptor as a therapeutic tool and target. *Cancer Lett* 2007; 258: 253-61.
51. Kasami M, Uematsu T, Honda M. Comparison of estrogen receptor, progesterone receptor and Her-2 status in breast cancer pre- and post-neoadjuvant chemotherapy. *The Breast* 2009; 17: 523-7.
52. Mc Cormack O, Chung WY, Fitzpatrick P. Progesterone receptor B (PRB) promoter hypermethylation in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 111: 45-53.
53. Leo JCL, Wang SM, Guo CH. Gene regulation profile reveals consistent anticancer properties of progesterone in hormone-independent breast cancer cells transfected with progesterone receptor. *Int J Cancer* 2005; 117: 561-8.
54. Pooley KA, Healey CS. Association of the Progesterone Receptor Gene with Breast Cancer Risk: A Single-Nucleotide Polymorphism Tagging Approach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 675-82.
55. Wang-Gohrke S, Chang-Claude J, Becher H i wsp. Progesterone receptor gene polymorphism is associated with decreased risk for breast cancer by age 50. *Cancer Res* 2000; 60: 2348-50.
56. Buck MB, Collier JK, Mürdter TE i wsp. TGFbeta2 and TbetaRII are valid molecular biomarkers for the antiproliferative effects of tamoxifen and tamoxifen metabolites in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 107: 15-24.
57. Liu G, Schwartz JA, Brooks SC. Estrogen Receptor Protects p53 from Deactivation by Human Double Minute-21. *Cancer Res* 2000; 60: 1810-14.
58. Mawson A, Lai A, Carroll JS i wsp. Estrogen and insulin/IGF-1 cooperatively stimulate cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells through differential regulation of c-Myc and cyclin D1. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 229: 161-73.
59. Young OE, Renshaw L, Macaskill EJ i wsp. Effects of fulvestrant 750 mg in premenopausal women with oestrogen receptor-positive primary breast cancer. *Eur J Cancer* 2008; 44: 391-9.
60. Colleoni M, Viale G, Zahrieh D. Chemotherapy is More Effective in Patients With Breast Cancer Not Expressing Steroid Hormone Receptors: A Study of Preoperative Treatment. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6622-28.
61. Gago FE, Fanelli MA, Ciocca DR. Co-expression of steroid hormone receptors (estrogen receptor α and/or progesterone receptors) and Her2/neu (c-erbB-2) in breast cancer: Clinical outcome following tamoxifen-based adjuvant therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; 98: 36-40.
62. Ellis MJ, Coop A, Singh B. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3795-7.
63. Teixeira C, Reed JC, Pratt MA. Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1995; 55: 3902-7.
64. Peng B, Lu B, Leygue E i wsp. Putative functional characteristics of human estrogen receptor-beta isoforms. *J Mol Endocrin* 2003; 30: 13-29.
65. Forster C, Makela S, Warri A i wsp. Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15578-83.
66. Grubberger-Saal SK, Bendahl PO, Saal LH i wsp. Estrogen receptor beta expression is associated with tamoxifen response in ERalpha-negative breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1987-94.
67. Poola I, Fuqua SA, DeWitty RL i wsp. Estrogen receptor alpha-negative breast cancer tissues express significant levels of estrogen-independent transcription factors, ERbeta1 and ERbeta5: potential molecular targets for chemoprevention. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7579-85.
68. Skliris GP, Leygue E, Watson PH i wsp. Estrogen receptor alpha negative breast cancer patients: Estrogen receptor beta as a therapeutic target. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 109: 1-10.
69. Saji S, Hirose M, Toi M. Clinical significance of estrogen receptor beta in breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 56: 21-26.
70. Savinov AY, Remacle AG, Golubkov VS i wsp. Matrix metalloproteinase 26 proteolysis of the NH2-terminal domain of the estrogen receptor beta correlates with the survival of breast cancer patients. *Cancer Res* 2006; 66: 2716-24.
71. Skliris GP, Leygue E, Curtis-Snell L i wsp. Expression of oestrogen receptor-beta in oestrogen receptor-alpha negative human breast tumours. *Br J Cancer* 2006; 95: 616-26.
72. Mann S, Laucirica R, Carlson N. Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer. *Hum Pathol* 2001; 32: 113-8.
73. Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V. Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res* 2004; 64: 423-8.
74. Kenemas P, Verstraeten RA, Verheijen RHM. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas* 2004; 49: 34-43.
75. Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas* 2001; 38: 103-16.
76. Missmer SA, Eliassen AH, Barbieri RL i wsp. Endogenous estrogen, androgen, and progesterone concentrations and breast cancer risk among postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1856-65.
77. Jones SE. A new estrogen receptor antagonist – an overview of available data. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 75: 19-22.
78. Kos M, Reid G, Denger S i wsp. Genomic Organization of the Human ER α Gene Promoter Region. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 2057-63.
79. Dobbe E, Gurney K, Kiekow S. Gene-expression assays: new tools to individualize treatment of early-stage breast cancer. *Am J Health Syst Pharm* 2008; 65: 23-8.

Otrzymano: 9 lutego 2009 r.
Przyjęto do druku: 12 października 2009 r.