

Piotr Potemski¹, Radziław Kordek²

¹Klinika Chemioterapii Katedry Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. Mikołaja Kopernika w Łodzi

²Zakład Patologii Katedry Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. Mikołaja Kopernika w Łodzi

Znaczenie prognostyczne cykliny E w raku piersi

Prognostic significance of cyclin E in breast cancer

Adres do korespondencji:

dr med. Piotr Potemski
Klinika Chemioterapii Nowotworów
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
ul. Paderewskiego 4, 93-509 Łódź
tel.: (042) 689 54 30, faks: (042) 689 54 32
e-mail: piotrpo@mp.pl

STRESZCZENIE

Niniejsza praca jest przeglądem piśmiennictwa dotyczącego znaczenia rokowniczego cykliny E i innych elementów cyklu komórkowego u chorych na raka piersi. Przejścia komórki pomiędzy poszczególnymi fazami cyklu są kontrolowane przez kinazy białkowe regulowane przez cykliny. Cyklina E jest ważnym regulatorem progresji cyklu komórkowego z fazy G1 do fazy syntezy. Najwyższe stężenie tego białka w komórce stwierdza się w okolicy punktu restrykcyjnego w późnej fazie G1. W raku piersi obserwuje się często zaburzenia ekspresji cykliny E. W komórkach nowotworowych cząsteczka cykliny E jest degradowana przez proteolizę do małych cząsteczkowych izoform. Nadekspresja zarówno cykliny E, jak i jej izoform sprzyja procesom podziałowym komórki. Ekspresja cykliny E i innych elementów cyklu komórkowego może być oceniana metodami immunohistochemicznymi, w tym mikromacierzy tkankowych, różnymi technikami blottingu lub badaniem stężenia RNA reakcją łańcuchową polimerazy oraz przy wykorzystaniu mikromacierzy DNA.

Wyniki wielu prac wskazują, że duża ekspresja cykliny E może stanowić ważny czynnik prognostyczny, chociaż w niektórych modelach analizy wieloczynnikowej zależność tę znoszą receptory estrogenowe i inne klasyczne czynniki rokownicze.

Konieczne są kolejne badania potwierdzające tę zależność, ponieważ nadekspresja cykliny E może stanowić składową profilu genetycznego i nie być samodzielnym czynnikiem prognostycznym.

Słowa kluczowe: rak piersi, czynniki rokownicze, cyklina E, przegląd piśmiennictwa

ABSTRACT

In the present review the role of cyclin E and other cell cycle molecules as prognostic markers in breast cancer is discussed. Cell cycle transitions are controlled by cyclin-dependent protein kinases. Cyclin E is an important regulator of cell cycle progression from phase G1 to synthetic phase. The highest concentration of cyclin E in the cell is observed near restriction point in the late G1 phase. In breast cancer the aberrant expression of cyclin E has been frequently described. In breast cancer cells full-length cyclin E is degraded by proteolysis to its low molecular weight isoforms. Overexpression of both cyclin E and low molecular weight isoforms gives tumor cells growth advantage. Expression of cyclin E and other cell cycle molecules can be evaluated by immunohistochemistry, tissue microarrays, various blot assays, reverse transcription-polymerase chain reaction and DNA microarrays.

The results of numerous studies show that overexpression of cyclin E may be an important prognostic factor. However, in some models of multivariate analysis this effect was eliminated by estrogen receptors presence or other classical prognostic factors.

However, further confirmatory studies are warranted as overexpression of cyclin E may also be just a part of gene profile and not a single, independent prognostic factor.

Key words: breast cancer, prognostic factors, cyclin E, review

Praca finansowana badaniami własnymi Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr 502-11-285

Wstęp

Uznane, tak zwane klasyczne czynniki prognostyczne w raku piersi, do których zalicza się: wielkość guza pierwotnego, stan regionalnych węzłów chłonnych, typ histologiczny raka, stopień złośliwości histologicznej, wiek chorych, stan receptorów dla hormonów steroidowych oraz nasilenie proliferacji (indeks mitotyczny lub Ki-67), pozwalają na ocenę prawdopodobieństwa nawrotu choroby nowotworowej i ustalenie rokowania. Czynniki predykcyjne z kolei umożliwiają przewidywanie skuteczności poszczególnych rodzajów terapii. Poza wspomnianym już stanem receptorów dla hormonów steroidowych wymienić tu należy nadekspresję receptora 2 dla ludzkiego nabiałkowego czynnika wzrostu (HER-2, *human epidermal growth factor receptor 2*). Na podstawie analizy tych czynników dobiera się leczenie uzupełniające po radykalnej terapii miejscowej i międzynarodowe grupy ekspertów formułują swoje zalecenia, na przykład na konferencjach w St. Gallen [1]. Stan receptora HER-2 najprawdopodobniej także zostanie zaliczony do grupy istotnych czynników prognostycznych, ale nie ma jeszcze ustalonego znaczenia w wyborze leczenia adiuwantowego [2]. Obecnie trwają prospektywne badania kliniczne oceniające rolę uzupełniającego podawania trastuzumabu u chorych z nadekspresją HER-2. Istnieją już jednak poważne przesłanki wskazujące, że chore z korelacją nadekspresji HER-2 i obecnością receptorów estrogenowych lub progesteronowych mogą odnosić mniejsze korzyści z adiuwantowego stosowania tamoksyfenu [3, 4].

Dzięki obecnie obowiązującym standardom postępowania zdecydowana większość chorych otrzymuje jakiś rodzaj systemowej terapii uzupełniającej po radykalnym leczeniu miejscowym raka piersi. Z pewnością znaczna część z tych chorych jest leczona niepotrzebnie, ponieważ pacjentki te byłyby już wyleczone po samym zabiegu operacyjnym. Z drugiej strony, w praktyce klinicznej dość często stwierdza się szybkie wznowy nowotworu prowadzące do zgonu, mimo z pozoru korzystnych czynników rokowniczych. Uwzględniając dynamiczny rozwój genetyki molekularnej, nie dziwi fakt, że wielu badaczy skoncentrowało swoje wysiłki na poszukiwaniu nowych, molekularnych czynników prognostycznych w raku piersi. Najważniejsze z nich przedstawiono w tabeli 1.

Niniejsza praca jest przeglądem piśmiennictwa dotyczącego prognostycznego znaczenia elementów cyklu komórkowego, zwłaszcza cykliny E.

Cykl komórkowy

Regulacja cyklu komórkowego polega na oddziaływaniu w odpowiednim czasie czynników pobudzających i hamujących [6]. Kompleksy złożone z cyklin

Tabela 1. Najważniejsze nowe molekularne czynniki prognostyczne w raku piersi [5]

Table 1. The most important, new molecular prognostic markers in breast cancer [5]

Grupa czynników	Przykłady
Markery proliferacji	Mitozyna
Elementy cyklu komórkowego	Cykliny, kinazy cyklozależne, inhibitory kinaz
Receptory czynników wzrostu	Receptor ludzkiego czynnika naskórkowego
Aktywatory i inhibitory plazminogenu	Urokinazopodobny aktywator plazminogenu, PAI-1
Czynniki związane z angiogenezą	Śródbłonkowy naczyniowy czynnik wzrostu
Czynniki związane z apoptozą	Bcl-2

i kinaz cyklozależnych (Cdks, *cyclin-dependent kinases*) promują przechodzenie komórki w kolejne fazy cyklu, podczas gdy inhibitory kinaz cyklozależnych (Cdki, *cyclin-dependent kinases inhibitors*) działają hamująco. Cykliny pełnią rolę regulacyjnych podjednostek dla Cdks. Nazwa tej grupy białek pochodzi z cyklicznej zmiany ich stężenia w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. W tabeli 2 przedstawiono najważniejsze cykliny wraz z odpowiednimi kinazami i inhibitorami.

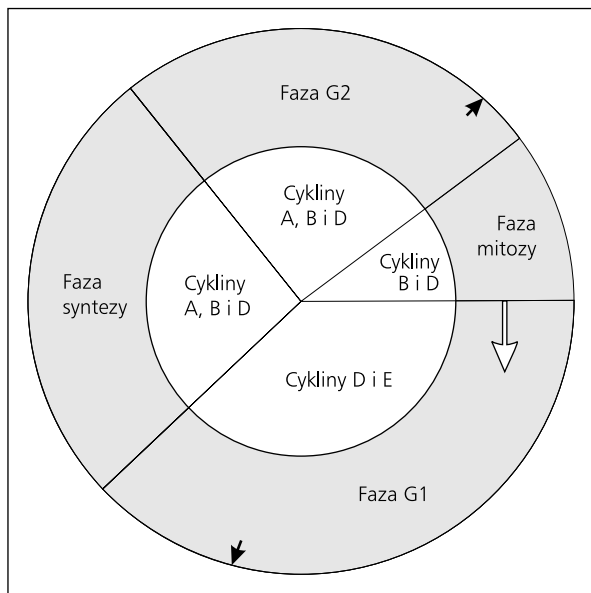
Kluczowym momentem fazy G1 cyklu komórkowego jest tak zwany punkt restrykcyjny, po osiągnięciu którego komórka może już bez udziału czynników pobudzających przejść do fazy syntezy DNA (ryc. 1). Najważniejsze cykliny obecne w fazie G1 to rodzina cyklin D oraz cykliny E. Kompleksy złożone z cyklin D i E oraz odpowiednich kinaz fosforylują białko RB (*retinoblastoma protein*). Powoduje to aktywację czynnika transkrypcyjnego E2F, który inicjuje transkrypcję genów wielu enzymów istotnych w procesie podziału komórki, takich jak: reduktaza dihydrofolianowa, kinaza tymidynowa, syntaza tymidylanowa, polimeraza DNA. Ponadto czynnik E2F zwiększa aktywność cykliny E, Cdk1 i samego siebie. W pewnym momencie trwania fazy G1 mechanizmy sprzężenia zwrotnego dodatniego powodują, że do przejścia w fazę syntezy nie są już potrzebne żadne zewnętrzne bodźce mitogenne i komórka nieodwracalnie przechodzi do fazy syntezy DNA. Podczas jej trwania dochodzi do gwałtownego obniżenia stężenia cykliny E.

Ekspresja cyklin D jest uzależniona raczej od zewnętrznych bodźców mitogennych niż od fazy cyklu.

Tabela 2. Cykliny i odpowiadające im kinazy cyklozależne

Table 2. Cyclins and corresponding cyclin-dependent kinases

Cykliny	Kinazy cyklozależne	Inhibitory kinaz cyklozależnych
Cyklina D1, D2, D3	Cdk4, Cdk6 INK4 proteins	Białka INK4 (P16 ^{INK4a} , P15 ^{INK4b} , P18 ^{INK4c} , P19 ^{INK4d})
Cyklina E	Cdk2	Polipeptydy rodziny Cip/Kip (P21 ^{Cip1} , P27 ^{Kip1} , P57 ^{Kip2})
Cyklina A	Cdk2, Cdk1	Polipeptydy rodziny Cip/Kip (P21 ^{Cip1} , P27 ^{Kip1} , P57 ^{Kip2})
Cyklina B	Cdk1	Polipeptydy rodziny Cip/Kip (P21 ^{Cip1} , P27 ^{Kip1} , P57 ^{Kip2})



Rycina 1. Uproszczony schemat cyklu komórkowego. Faza syntezy DNA jest oddzielona od mitozy przerwami G1 i G2. Przedstawiono także cykliny charakterystyczne dla poszczególnych faz cyklu. Biała strzałka wskazuje początek cyklu. Czarne strzałki oznaczają: w fazie G1 — punkt restrykcyjny, którego osiągnięcie wymusza wejście komórki w fazę syntezy, w fazie G2 — najwyższe stężenie cykliny B umożliwiające wejście komórki w fazę mitozy

Figure 1. Simplified scheme of cell cycle. Phases of DNA synthesis and mitosis are separated by gap phases G1 and G2. There are also presented cyclins characteristic for each cycle phase. White arrow shows the beginning of the cycle. Black arrows show: in G1 phase — the restriction point where the cell is forced to enter synthesis phase, in G2 phase — the maximum concentration of cyclin B allows entering mitotic phase

Cykliny A i B prawdopodobnie utrzymują stan hiperfosforylacji białka RB w dalszych fazach cyklu komórkowego. Odłączenie grupy fosforanowej od białka RB następuje dopiero wtedy, gdy komórka wchodzi ponownie w fazę G1 lub w fazę spoczynkową G0 [7].

W komórkach nowotworów złośliwych, których naturalną cechą jest niekontrolowana proliferacja, z reguły obserwuje się zaburzenia funkcji genów regulujących cykl komórkowy. Można przypuszczać, że mutacje prowadzące do podwyższenia stężenia cyklin mogą pełnić istotną funkcję w mechanizmie niekontrolowanych podziałów komórkowych, czyli w procesie nowotworzenia. Takim nieprawidłowościom ostatnio przypisuje się także coraz większe znaczenie rokownicze.

Cyklina E

Cyklina E jest białkiem o masie 50 kD składającym się z 395 aminokwasów, kodowanym przez gen znajdujący się w chromosomie 19 [8]. Cyklina E jest obecna w komórce od późnej fazy G1 do wczesnej fazy syntezy [9]. Najwyższe stężenie cykliny E stwierdza się w okolicy punktu restrykcyjnego. Białko to pełni kluczową rolę w promocji komórki do fazy syntezy, ulegając zwrotnej aktywacji przez czynnik E2F. W komórkach różnych nowotworów może dochodzić do zmian w ekspresji cykliny E. Najczęściej mechanizm tych zmian polega na amplifikacji genu kodującego to białko lub zaburzeniu regulacji ekspresji cykliny E w poszczególnych fazach cyklu komórkowego [10]. Cyklina E może występować w kilku izoformach wynikających z alternatywnego składania (*splicing*) mRNA. Warianty te występują jednak z podobną częstością w komórkach nowotworowych i zdrowych, więc prawdopodobnie nie mają znaczenia rokowniczego [11]. W komórkach nowotworowych opisano jednak izoformy cykliny E o mniejszej masie cząsteczkowej (od 34 do 49 kD), pozbawione końca aminowego, cechujące się znaczną aktywnością [12]. Harwell i wsp. stwierdzili, że te izoformy powstają w wyniku potranslacyjnego działania proteaz jądrowych obecnych w komórkach nowotworowych [10]. Rzeczywiście, występowanie małych cząsteczkowych izoform cykliny E opisywano wyłącznie w obrębie jądra komórkowego [13]. Zidentyfikowano już sześć rodzajów elastazopodobnych proteaz EL1-6 odpowiedzialnych za tworzenie małych cząsteczkowych izoform cykliny E [14].

Ostatnio w guzach piersi opisano mutacje w obrębie genu *hCDC4*, który koduje białko odpowiedzialne za proteolizę cykliny E [15]. Mutacje te prowadzą do zaburzeń regulacji cyklu komórkowego przez cyklinę E, ale nie zawsze wiążą się z jej zwiększoną ekspresją.

Znaczenie prognostyczne cykliny E

Keyomarsi i wsp. badali czynniki rokownicze w grupie 395 chorych na raka piersi [16]. Wykorzystując technikę *Western blot*, oceniono między innymi ekspresję cykliny E i jej małowcząsteczkowych izoform. Mediana czasu obserwacji chorych wynosiła 6,4 roku. Stwierdzono silną zależność między ekspresją cykliny E a czasem przeżycia. Korelacja ta była szczególnie wyraźna u chorych z najwcześniejszymi stopniami zaawansowania nowotworu. W podgrupie 114 chorych w stopniu zaawansowania I według systemu TNM u 12 osób stwierdzono nadekspresję cykliny E. Wszystkie te chore zmarły, a mediana czasu przeżycia wynosiła 4,1 roku. W grupie pozostałych 102 pacjentek nie zanotowano w okresie obserwacji ani jednego zgonu. Podobną zależność obserwowano u chorych w II i III stopniu zaawansowania nowotworu. Jedynie u chorych w IV stopniu zaawansowania ekspresja cykliny E nie miała znaczenia rokowniczego. Duża ekspresja cykliny E i jej małowcząsteczkowych izoform była najistotniejszym niezależnym czynnikiem ryzyka zgonu z powodu raka piersi (tab. 3).

W innym doniesieniu określono ekspresję cykliny E przy użyciu techniki *Western blot* u 114 chorych z rakiem piersi w różnych stopniach zaawansowania [17]. Analiza przeżycia obejmowała grupę 100 pacjentek z operacyjnym nowotworem, a mediana czasu obserwacji wynosiła 53 miesiące. Jednoczynnikowa analiza przeżycia związanej z chorobą (*disease-specific survival*) wykazała, że grupa chorych z dużą ekspresją cykliny E charakteryzowała się znamienne większym ryzykiem zgonu z powodu nowotworu w porównaniu z chorymi z małą ekspresją tego białka ($p = 0,0002$). Istotniejszym czynnikiem rokowniczym był tylko stan receptora estrogenowego ($p < 0,0001$). Nadekspresja cykliny E miała większe niekorzystne znaczenie rokownicze u chorych bez przerzutów do węzłów chłonnych niż u pacjentek z zajętymi węzłami pachowymi (wartości p , odpowiednio: 0,001 i 0,0037). W analizie wieloczynnikowej znaczenie rokownicze miały jednak tylko zajęcie węzłów chłonnych i obecność receptora estrogenowego. Zdając sobie sprawę z ograniczeń takich modeli, można jednak wysnuć hipotezę, że duża ekspresja cykliny E wiąże się z małą ekspresją receptorów steroidowych, co wpływa na wyniki analiz.

Kühling i wsp. zbadali, wykorzystując metodę immunohistochemiczną, tkanki guzów pochodzące od 332 chorych na raka piersi bez przerzutów do węzłów chłonnych [18]. Stwierdzono znamiennej statystycznie korelację nadmiernej ekspresji cykliny E z brakiem receptora estrogenowego i większym stopniem złośliwości raka. W analizie statystycznej oceniono czas przeżycia związanego z chorobą oraz przeżycia wolnego od przerzutów (*metastasis-free survival*). Po medianie czasu obser-

Tabela 3. Niezależne czynniki ryzyka zgonu z powodu raka piersi według Keyomarsi i wsp. [16]

Table 3. Independent factors predictive of death from breast cancer according to Keyomarsi et al. [16]

Czynnik rokowniczy	Współczynnik ryzyka	Wartość p
Wysokie stężenie cykliny E i jej izoform małowcząsteczkowych	13,3	< 0,001
Wysokie stężenie izoform małowcząsteczkowych cykliny E	2,1	0,02
Przerzuty w pachowych węzłach chłonnych	1,8	0,007
Ujemne receptory estrogenowe	1,8	0,001
Stadium IIIB i IV	1,7	0,01

wacji wynoszącej 99 miesięcy chore, u których wykazano ekspresję cykliny E w więcej niż 10% komórek guza, charakteryzowały się znamienne większym ryzykiem zarówno zgonu z powodu nowotworu, jak i wystąpienia przerzutów (prawdopodobieństwo przeżycia związane z chorobą i wolnego od przerzutów, odpowiednio: 0,56 vs. 0,84 oraz 0,00 vs. 0,61, $p < 0,0001$) w porównaniu z pozostałymi. Jednak po uwzględnieniu markera proliferacji Ki-67 w modelu oceny ryzyka cykliny E straciła znaczenie prognostyczne [19].

Podobne wyniki uzyskali Lindahl i wsp., określając immunohistochemicznie cyklinę E w 270 guzach piersi ze znaną ekspresją genu *P53* [20]. Nadekspresja cykliny E okazała się jednak istotnym niekorzystnym czynnikiem rokowniczym w analizie zarówno jednoczynnikowej, jak i wieloczynnikowej. Stwierdzono ponadto, że wysokie stężenie cykliny E korelowało z obecnością mutacji w obrębie genu *P53*.

Han i wsp. zbadali za pomocą techniki mikromacierzy tkankowych guzy pochodzące od 175 chorych na raka piersi bez przerzutów do węzłów chłonnych [21]. Wszystkie chore były poddane chemioterapii uzupełniającej według schematu CMF (cyklofosfamid, metotreksat, fluorouracyl). Chore z ekspresją receptorów estrogenowych otrzymywały po jej zakończeniu jeszcze tamoksifen. Mediana czasu obserwacji wynosiła prawie 6 lat. Czas przeżycia chorych z ekspresją cykliny E stwierdzoną w co najmniej 10% komórek guza był znamienne krótszy. Ekspresja cykliny E była najistotniejszym niezależnym niekorzystnym czynnikiem rokowniczym (ryzyko względne wynosiło 2,74).

Opublikowano także doniesienia kwestionujące znaczenie rokownicze ekspresji cykliny E.

Donnellan i wsp. przeanalizowali materiał pooperacyjny 157 chorych poddanych mastektomii z powodu in-

wazyjnego przewodowego raka piersi [22]. Ekspresję cykliny E oznaczano immunohistochemicznie, a okres obserwacji wynosił w przypadku każdej pacjentki przynajmniej 3 lata. Wprawdzie w analizie jednoczynnikowej ekspresja cykliny E była niekorzystnym czynnikiem rokowniczym, ale obserwacji tej nie potwierdzono w analizie wieloczynnikowej.

Bukholm i wsp. ocenili immunohistochemicznie ekspresję cykliny E w materiale pochodzącym od 170 chorych operowanych z powodu raka piersi [23]. Średni czas trwania obserwacji wynosił 4,9 roku. Nie stwierdzono korelacji ekspresji tego białka z czasem przeżycia.

Po analizie tych doniesień powstaje pytanie, czy nadekspresja cykliny E lub jej małowcząsteczkowych izoform jest sama w sobie niezależnym czynnikiem prognostycznym, czy też tylko współwystępuje z jakimś innym stanem rzeczywiście wpływającym na rokowanie.

Ostatnio grupa z *MD Anderson Cancer Center* kierowana przez Keyomarsi opublikowała wyniki niezwykle interesującej pracy doświadczalnej przeprowadzonej na linii komórkowej ludzkiego raka piersi MCF-7 [24]. W komórkach linii MCF-7 małowcząsteczkowe izoformy cykliny E występują w niewysokim stężeniu, natomiast komórki te wykazują ekspresję receptorów estrogenowych i są wrażliwe na tamoksyfen. Komórki MCF-7 transfekowano genami kodującymi elastazopodobne proteazy odpowiedzialne za tworzenie małowcząsteczkowych izoform cykliny E. Stwierdzono korelację ekspresji pełnej cząsteczki cykliny E i białek P53 i P21. Kiedy komórki wykazywały również ekspresję małowcząsteczkowych izoform cykliny E, aktywność kompleksu Cdk2-małowcząsteczkowe izoformy cykliny E była niezależna od inhibitorów cyklinozależnych kinaz P21 i P27, a same komórki wykazywały oporność na działanie antyestrogenów i niestabilność chromosomalną. Inhibitor P27 preferencyjnie łączy się z izoformami cykliny E i w ten sposób nie może hamować aktywności kompleksu Cdk2-cyklina E. Doniesienie to może tłumaczyć mechanizm, w jaki korelacja nadekspresji cykliny E i jej małowcząsteczkowych izoform wpływa na zwiększenie proliferacji komórek i w konsekwencji na pogorszenie rokowania. Na podstawie tych danych przeanalizowano ponownie materiał będący przedmiotem wcześniejszego doniesienia [16], dotyczący 331 chorych na raka piersi w stadiach zaawansowania I–III. Stwierdzono korelację obecności małowcząsteczkowych izoform cykliny E z poliploidią i brakiem odpowiedzi na antyestrogeny. Bardzo ciekawe okazało się spostrzeżenie, że poliploidia komórek guza u chorych z niskim stężeniem cykliny nie wpływała na pogorszenie rokowania. Natomiast w grupie 90 chorych z nadekspresją cykliny E i jej izoform odsetek przeżyć 5-letnich był znamiennej niż diploidalnymi (p = 0,02). Jednak po 8 latach obserwacji okazało się, że śmiertelność w obu grupach wynosi blisko 100%. Tak

więc ploidia u chorych wykazujących nadekspresję cykliny E i jej małowcząsteczkowych izoform może pełnić rolę dodatkowego czynnika rokowniczego, choć rokowanie dotyczące wyleczenia w tej grupie pacjentek jest bardzo złe i to niezależnie od klasycznych czynników prognostycznych. W grupie 150 chorych ze współistnieniem ekspresji cykliny E i obecnością receptorów estrogenowych uzupełniająca hormonoterapia antyestrogenowa nie wpływała na poprawę rokowania.

Doniesienie to może wyjaśnić obserwację Spana i wsp., którzy oceniając ekspresję cykliny E przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy odwrotnej transkrypcji (RT-PCR, *reverse transcription-polymerase chain reaction*) w materiale 277 operacyjnych raków piersi, nie potwierdzili jej znaczenia prognostycznego w całej grupie chorych [25]. Badacze stwierdzili jednak silną korelację pomiędzy cykliną E a skutecznością terapii hormonalnej. Grupa chorych z nadekspresją tego białka leczona uzupełniająco tamoksyfenem charakteryzowała się znacznie gorszym rokowaniem. Może to wskazywać, że cyklina E jest nie tyle samodzielnym czynnikiem prognostycznym, ile predykcynym i jej ekspresja wiąże się z mniejszą skutecznością adiuwantowego leczenia antyestrogenami.

Dotychczas opublikowane prace dotyczące profilów genetycznych raka piersi i ich znaczenia rokowniczego wykorzystujące technologię mikromacierzy DNA mogą wskazywać, że ekspresja cykliny E czasami ściśle koreluje z ekspresją innych genów. Na obecnym etapie wiedzy nie wiadomo, jaki jest rzeczywisty wpływ na rokowanie poszczególnych składowych takiego profilu genetycznego. Na przykład, w fenotypie „podstawnym” z obecnością cytokeratyn 5/6 i/lub 17 obserwuje się często nadekspresję cykliny E i małą ekspresję receptorów steroidowych [26]. Fenotyp „podstawny”, zdaniem większości autorów, charakteryzuje się gorszym rokowaniem i z uwagi na odmienny profil molekularny powinien być wyróżniany jako oddzielny typ raka piersi [27, 28].

Znaczenie prognostyczne innych elementów cyklu komórkowego

Kenny i wsp. ocenili metodą *Northern blot* gen cykliny D1 w 253 guzach piersi [29]. Mediana czasu obserwacji chorych wynosiła 75 miesięcy. Znaczenie prognostyczne nadekspresji cykliny D1 stwierdzono jedynie w podgrupie chorych z obecnością receptorów estrogenowych. W warunkach doświadczalnych zaobserwowano, że ekspresja cykliny D wiąże się z wystąpieniem oporności na tamoksyfen [30].

Bukholm i wsp., wykorzystując metodę immunohistochemiczną, oznaczyli ekspresję cyklin A, D1 i D3 w 170 inwazyjnych rakach piersi [23]. W analizie jednoczynnikowej stwierdzono, że ekspresja cyklin D3 i A koreluje z wystąpieniem przerzutów odległych w okresie obser-

wacji oraz zajęciem regionalnych węzłów chłonnych w chwili rozpoznania. W analizie wieloczynnikowej zaobserwowano zależność pomiędzy ekspresją cykliny D3, A i zajęciem regionalnych węzłów chłonnych a wystąpieniem przerzutów odległych. Podczas analizy zgonów wywołanych chorobą nowotworową jedynie ekspresja cykliny A okazała się mieć znaczenie rokownicze.

Rudolph i wsp. w cytowanej wcześniej pracy stwierdzili, że cyklina B miała znaczenie rokownicze nawet po uwzględnieniu w modelu oceny ryzyka markera proliferacji Ki-67 [19]. Takiej zależności nie stwierdzono dla cykliny A.

Michalides i wsp., oceniając przy użyciu metody immunohistochemicznej ekspresję cykliny A w 394 wczesnych rakach piersi, stwierdzili, że białko to ma znaczenie prognostyczne [31]. Na szczególną uwagę zasługuje obserwacja, że w podgrupie chorych z obecnością receptorów estrogenowych leczonych uzupełniająco tamoksyfenem cyklina A była jedynym niezależnym czynnikiem rokowniczym.

Jirstrom i wsp., wykorzystując technologię mikromacierzy tkankowych, ocenili znaczenie rokownicze cykliny E i D1 oraz białek P16 i P27 w 167 przypadkach raka przewodowego *in situ* [32]. Okazało się, że niskie stężenie cykliny D1 korelowało z dużą ekspresją cykliny E i było niezależnym czynnikiem ryzyka wznowy miejscowej.

Pewne znaczenie rokownicze przypisuje się także inhibitorom cyklinozależnych kinaz. Najwięcej doniesień dotyczy białka P27, które hamuje aktywność kompleksów cyklin A, B i E z odpowiednimi kinazami (patrz tab. 2 i ryc. 1).

Mutacje w obrębie genu *P27* w komórkach raka piersi spotyka się rzadko. Jednak dość często dochodzi do upośledzonej aktywności tego białka w wyniku jego proteolizy lub przemieszczenia z jądra komórkowego do cytoplazmy. Ważną rolę pełni także tworzenie kompleksów P27 z cyklinami D, co powoduje zmniejszenie puli inhibitora dostępnej dla innych cyklin [33].

Tan i wsp. określili immunohistochemicznie ekspresję P27 w 202 przypadkach wczesnego raka piersi o średnicy guza do 1 cm [34]. Mediana czasu obserwacji wynosiła 66 miesięcy. Chore z wysokim stężeniem P27 miały lepsze rokowanie w porównaniu z grupą, gdzie dodatnią reakcją stwierdzono w mniej niż 50% jąder komórkowych (mediana czasu przeżycia, odpowiednio: 174 i 139 miesięcy, $p = 0,0042$). W analizie wieloczynnikowej niekorzystne znaczenie rokownicze miały tylko: zajęcie węzłów chłonnych, brak receptorów progesteronowego i estrogenowego oraz mała ekspresja P27.

Porter i wsp. oznaczyli P27 w materiale pooperacyjnym 278 chorych na raka piersi poniżej 45 roku życia [35]. Zmniejszona ekspresja tego inhibitora miała znaczenie rokownicze w analizie wieloczynnikowej (współczynnik ryzyka 2,7, $p = 0,01$). Szczególnie duże ryzyko zgonu

cechowało chore, u których stwierdzono niskie stężenie P27 towarzyszące dużej ekspresji cykliny E.

Podobne wyniki uzyskali Nohara i wsp., oceniając 216 przypadków raka piersi [36]. Mała ekspresja P27 okazała się niezależnym czynnikiem rokowniczym (współczynnik ryzyka 4,1, $p < 0,05$).

Catzavelos i wsp. w grupie 168 chorych stwierdzili, że mała ekspresja P27 ma znaczenie prognostyczne w odniesieniu do czasu przeżycia bez wznowy nowotworu [37].

W grupie 739 chorych poniżej 56 roku życia z przerzutami do 4 lub więcej węzłów chłonnych pachowych wykazano, że niskie stężenie P27 było czynnikiem ryzyka wznowy [38].

Mimo to wydaje się, że znaczenie rokownicze P27 nie zostało potwierdzone w sposób niebudzący wątpliwości na podstawie doniesień dotyczących dużej liczby chorych [33]. Należy pamiętać, że zmniejszona ekspresja P27 często towarzyszy zmianom w aktywności cyklin i może być zjawiskiem wtórnym do nich. Mała ekspresja P27 jest też składową podtypu „podstawnego” raka piersi charakteryzującego się gorszym rokowaniem [26].

Wnioski

Podczas analizy doniesień dotyczących elementów cyklu komórkowego nasuwa się wniosek, że niewątpliwie ich ekspresja ma znaczenie rokownicze. Najwięcej nadziei budzi cyklina E, zwłaszcza u chorych z wczesnymi stopniami zaawansowania, które na podstawie klasycznych czynników prognostycznych charakteryzują się małym prawdopodobieństwem wznowy. Jednak, jak się okazuje, nie wystarczy już oznaczenie pełnej cząsteczki tego białka, ponieważ równie duże znaczenie biologiczne mają jego małowcząsteczkowe izoformy. Poza tym kontrowersje budzi wybór metody oznaczania ekspresji genów kodujących elementy cyklu komórkowego. Większość badaczy wykorzystywała techniki immunohistochemii, badając materiał z blozków parafinowych. Półilościowa i subiektywna ocena ekspresji oraz brak standaryzacji powodują, że wnioski pochodzące z takich doniesień należy traktować bardzo ostrożnie. Obecnie możliwe jest jednak ilościowe oznaczenie zawartości dowolnych sekwencji mRNA w komórce, a tym samym ekspresji poszczególnych genów przy wykorzystaniu na przykład RT-PCR czasu rzeczywistego czy mikromacierzy DNA.

Ponadto trudno przypuszczać, aby zmiany w ekspresji pojedynczych genów były samodzielnie odpowiedzialne za przebieg biologiczny choroby nowotworowej. Tak więc konieczne staje się równoczesne oznaczanie wielu genów i badanie korelacji między nimi oraz wpływu takich profili genowych na rokowanie.

Na szczęście dostępna już technologia mikromacierzy DNA oraz wielogenowa RT-PCR stwarzają takie możliwości. Wydaje się więc, że następne lata przyniosą rozstrzygnięcie, jakie jest rzeczywiste znaczenie nowych, molekularnych czynników prognostycznych i czy mogą one zastąpić czynniki klasyczne oparte na danych patomorfologiczno-klinicznych, czy też będą tylko ich cennym uzupełnieniem w niektórych grupach chorych.

Piśmiennictwo

- Pierńkowski T. Rak piersi. W: Krzakowski M. (red.). Onkologia kliniczna. Borgis Wydawnictwo Medyczne, Warszawa 2001; 87–139.
- Kaptain S., Tan L.K., Chen B. Her-2/neu and breast cancer. *Diagn. Mol. Pathol.* 2001; 10: 139–152.
- Shou J., Massarweh S., Osborne C.K. i wsp. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2004; 96: 926–935.
- Climent M.A., Segui M.A., Peiro G. i wsp. Prognostic value of HER-2/neu and p53 expression in node-positive breast cancer. HER-2/neu effect on adjuvant tamoxifen treatment. *Breast* 2001; 10: 67–77.
- Esteva F., Hortobagyi G. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2004; 6: 109–118.
- Sherr C. The Pezcoller Lecture: Cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* 2000; 60: 3689–3695.
- Sherr C. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274: 1672–1677.
- Donnellan R., Chetty R. Cyclin E in human cancers. *FASEB J.* 1999; 13: 773–780.
- Keyomarsi K., O'Leary N., Molnar G., Lees E., Fingert H.J., Pardee A.B. Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res.* 1994; 54: 380–385.
- Harwell R.M., Porter D.C., Danes C., Keyomarsi K. Processing of cyclin E differs between normal and tumor breast cells. *Cancer Res.* 2000; 60: 481–489.
- Akli S., Keyomarsi K. Low-molecular-weight cyclin E: a missing link between biology and clinical outcome. *Breast Cancer Res.* 2004; 6: 188–191.
- Porter D., Zhang N., Danes C. i wsp. Tumor-specific proteolytic processing of cyclin E generates hyperactive low-molecular weight-forms. *Mol. Cell. Biol.* 2001; 21: 6254–6269.
- Ohtsubo M., Theodoras A.M., Schumacher J., Roberts J.M., Pagano M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell. Biol.* 1995; 15: 2612–2624.
- Wingate H., Bedrosian I., Akli S., Keyomarsi K. The low molecular weight (LMW) isoforms of cyclin E deregulate the cell cycle of mammary epithelial cells. *Cell Cycle* 2003; 2: 461–466.
- Ekholm-Reed S., Spruck C.H., Sangfelt O. i wsp. Mutation of hCDC4 leads to cell cycle deregulation of cyclin E in cancer. *Cancer Res.* 2004; 64: 795–800.
- Keyomarsi K., Tucker S.L., Buchholz T.A. i wsp. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347: 1566–1575.
- Nielsen N.H., Arnerlöv C., Emdin S.O., Landberg G. Cyclin E overexpression, a negative prognostic factor in breast cancer with strong correlation to oestrogen receptor status. *Br. J. Cancer* 1996; 74: 874–880.
- Kühling H., Alm P., Olsson H., Fernö M., Baldetorp B., Parwaresch R. Expression of cyclins E, A, and B, and prognosis in lymph node-negative breast cancer. *J. Pathol.* 2003; 199: 424–431.
- Rudolph P., Kühling H., Alm P. i wsp. Differential prognostic impact of the cyclins E and B in premenopausal and postmenopausal women with lymph node-negative breast cancer. *Int. J. Cancer* 2003; 105: 674–680.
- 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: 375–380.
- Han S., Park K., Bae B.N. i wsp. Prognostic implication of cyclin E expression and its relationship with cyclin D1 and p27Kip1 expression on tissue microarrays of node negative breast cancer. *J. Surg. Oncol.* 2003; 83: 241–247.
- Donnellan R., Kleinschmidt I., Chetty R. Cyclin E immunoperoxidation in breast ductal carcinoma: pathologic correlations and prognostic implications. *Human Pathol.* 2001; 32: 89–94.
- Bukholm I.R.K., Bukholm G., Nesland J.M. Over-expression of cyclin A is highly associated with early relapse and reduced survival in patients with primary breast carcinomas. *Int. J. Cancer* 2001; 93: 283–287.
- Akli S., Zheng P.J., Multani A.S. i wsp. Tumor-specific low molecular weight forms of cyclin E induce genomic instability and resistance to p21, p27, and antiestrogens in breast cancer. *Cancer Res.* 2004; 64: 3198–3208.
- Span P.N., Tjan-Heijnen V.C., Manders P., Beex L.V., Sweep C.G. Cyclin-E is a strong predictor of endocrine therapy failure in human breast cancer. *Oncogene* 2003; 22: 4898–4904.
- Foulkes W.D., Brunet J.S., Stefansson I.M. i wsp. The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Cancer Res.* 2004; 64: 830–835.
- Abd El-Rehim D.M., Pinder S.E., Paish C.E. i wsp. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J. Pathol.* 2004; 203: 661–671.
- van de Rijn M., Perou C.M., Tibshirani R. i wsp. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am. J. Pathol.* 2002; 161: 1991–1996.
- Kenny F.S., Hui R., Musgrove E.A. i wsp. Overexpression of cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5: 2069–2076.
- Hui R., Finney G.L., Carroll J.S., Lee C.S.L., Musgrove E.A., Sutherland R.L. Constitutive overexpression of cyclin D1 but not cyclin E confers acute resistance to antiestrogens in T47-D breast cancer cells. *Cancer Res.* 2002; 62: 6916–6923.
- Michalides R., van Tinteren H., Balkenende A. i wsp. Cyclin A is a prognostic indicator in early stage breast cancer with and without tamoxifen treatment. *Br. J. Cancer* 2002; 86: 402–408.
- Jirstrom K., Ringberg A., Ferno M., Anagnostaki L., Landberg G. Tissue microarray analyses of G1/S-regulatory proteins in ductal carcinoma in situ of the breast indicate that low cyclin D1 is associated with local recurrence. *Br. J. Cancer* 2003; 89: 1920–1926.
- Alkarain A., Slingerland J. Deregulation of p27 by oncogenic signaling and its prognostic significance in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2004; 6: 13–21.
- Tan P., Cady B., Wanner M. The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas. *Cancer Res.* 1997; 57: 1259–1263.
- Porter P.L., Malone K.E., Heagerty P.J. i wsp. Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat. Med.* 1997; 3: 222–225.
- Nohara T., Ryo T., Iwamoto S., Gon G., Tanigawa N. Expression of cell-cycle regulator p27 is correlated to the prognosis and ER expression in breast carcinoma patients. *Oncology* 2001; 60: 94–100.
- Catzavelos C., Bhattacharya N., Ung Y.C. i wsp. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat. Med.* 1997; 3: 227–230.
- Faneyte I.F., Peterse J.L., Van Tinteren H. i wsp. Predicting early failure after adjuvant chemotherapy in high-risk breast cancer patients with extensive lymph node involvement. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 4457–4463.