

Wojciech Kuncman<sup>1</sup> [ORCID 0000-0003-1117-4463]

Magdalena Orzechowska<sup>2</sup> [ORCID 0000-0002-8301-8059]

Katarzyna Taran<sup>3</sup> [ORCID 0000-0002-0598-9079]

Radziśław Kordek<sup>1</sup> [ORCID 0000-0003-4724-3627]

1. Zakład Patologii, Katedra Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
2. Zakład Kancerogenezy Molekularnej, Katedra Medycyny Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
3. Zakład Patomorfologii, Pracownia Frakcjonowania Izotopowego w Procesach Patologicznych, Katedra Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

## EWALUACJA EKSPRESJI FOSFATAZY TYROZYNOWEJ 4A3 (PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE 4A3, PRL-3) – NIEZNANE ASPEKTY HETEROGENNOŚCI PIERWOTNYCH OGNISK RAKA PIERSI

Autor korespondencyjny:

Katarzyna Taran, Zakład Patomorfologii, Pracownia Frakcjonowania Izotopowego w Procesach Patologicznych, Katedra Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź, e-mail: katarzyna.taran@umed.lodz.pl

### Streszczenie

**Wstęp:** Pomimo znacznego postępu w diagnostyce i wprowadzenia nowoczesnej terapii wyniki leczenia chorych z rakiem piersi są nadal dalekie od oczekiwań. Wskazuje to konieczność poznawania przyczyn i następstw heterogenności tego nowotworu oraz potencjalnych implikacji klinicznych takiej wiedzy.

**Materiały i metody:** Immunohistochemiczna ocena ekspresji fosfatazy tyrozynowej 4A3 (PRL-3) w raku piersi oraz poszukiwanie jej potencjalnych związków z wybranymi czynnikami o znaczeniu rokowniczym.

**Wyniki:** Ujawniono heterogenność ognisk pierwotnych raka piersi pod względem ekspresji PRL-3 oraz związku z uznanymi czynnikami o znaczeniu rokowniczym, w tym korelację z siłą ekspresji receptorów progesteronowych.

**Wnioski:** Wyniki przedstawionych badań ukazują nieznaną dotychczas aspekty heterogenności pierwotnych ognisk raka piersi oraz złożoną rolę białka PRL-3 w biologii tego nowotworu. Sugerują także istnienie nowego mechanizmu udziału PRL-3 w procesach ruchomości, naciekania oraz przerzutowania komórek raka piersi poprzez oddziaływanie z receptorem progesteronowym i potencjalnie białkami SNAIL+SLUG.

**Słowa kluczowe:** rak piersi, białko PRL-3, heterogenność, przerzuty

## Wprowadzenie

Jednym z kluczowych problemów w ochronie zdrowia na świecie jest rak piersi. Każdego roku stwierdza się ponad 1 350 000 nowych przypadków tego nowotworu, w tym 500 000 zgonów [1,2]. Jednocześnie zachorowalność na ten nowotwór rośnie z roku na rok; obecnie, zgodnie z prognozami American Cancer Society, aż jedna na dziewięć kobiet w Stanach Zjednoczonych jest zagrożona jego rozwojem [3].

Pomimo znacznego postępu w diagnostyce, terapii i identyfikacji nowych czynników rokowniczych osiągnięte wyniki leczenia pozostają nadal dalekie od oczekiwania. Największe nadzieje są pokładane w terapii spersonalizowanej ukierunkowanej na pojedyncze białka. Podstawą współczesnej terapii jest podział molekularny, mający odzwierciedlenie w rokowaniu pacjentek [4]. Pierwszego podziału dokonano w 2000 roku na podstawie oznaczeń ekspresji 8102 genów badanych przy użyciu mikromacierzy. Wyróżniono 4 grupy molekularne: raki luminalne (raki wywodzące się z warstwy wewnętrznej komórek przewodowych piersi), HER2 dodatnie (z obecnością nadekspresji drugiego nabłonkowego czynnika wzrostu), „basal-like” (raki wywodzące się z komórek mioepitelialnych przewodów piersiowych) oraz „normal breast-like” (nieswoiste) [5]. Najliczniejszą grupą nowotworów piersi okazały się raki luminalne, obejmujące ok. 40–80% wszystkich przypadków [6,7].

W praktyce kliniczno-patomorfologicznej ocenie podlega także stopień złośliwości histologicznej nowotworu (ang. *grading*). Zgodnie z systemem Blooma-Richardsona (modyfikacja Elston/Nottingham) zmiany dzielone są na 3 grupy: G1, G2, G3. Ponadto wyróżniana jest grupa GX, określająca zmiany bez możliwości oceny wiarygodnego stopnia złośliwości, najczęściej w przypadku uprzedniego zastosowania terapii. Drugim przyjętym sposobem ewaluacji jest ocena stopnia zaawansowania klinicznego (ang. *staging*) zgodnie z uniwersalnym systemem TNM. W przypadku raka piersi kluczowymi jego elementami są: wielkość guza pierwotnego, naciekanie struktur sąsiadujących, obecność przerzutów w węzłach chłonnych (ze specjalnym uwzględnieniem węzłów chłonnych

pachowych), a także obecność przerzutów odległych. Wyróżnia się 4 podstawowe stadia zaawansowania klinicznego choroby.

Stopień złośliwości histologicznej oraz klinicznego zaawansowania raka piersi są uznanymi czynnikami o znaczeniu rokowniczym, jednakże złożona biologia złośliwych zmian nowotworowych gruczołu piersiowego wymaga analizy wielu innych markerów. Wraz z postępem wiedzy niektóre z nich zostają zreklasyfikowane, np. przesunięte z grupy potencjalnych do uznanych (jak HER2), znaczenie innych nadal jest ewaluowane, wreszcie znane wcześniej białka stają się po raz pierwszy przedmiotem badań o aspekcie prognostycznym.

PRL-3 to białko należące do rodziny białkowych fosfataz tyrozynowych oznaczonych symbolem 4A3 (ang. *protein tyrosine phosphatase 4A3*), nazywane jest również trzecią fosfatazą regenerującą wątrobę (ang. *phosphatase of regenerating liver-3*). Główną funkcją PRL-3 jest regulacja fosforylacji (defosforylacja) czynników biorących udział w cyklu komórkowym, wzroście komórki, różnicowaniu i transformacji nowotworowej. Skutkiem ekspresji PRL-3 jest także miejscowe nasilenie angiogenezy [8]. W rakach piersi nadekspresja PRL-3 stwierdzana jest w około 62–75% przypadków. W raku żołądka, jelita grubego oraz wątroby ujawniono wzrost poziomu PRL-3 w przerzutach. Białko to wydaje się być obiecującym celem terapeutycznym [9].

Heterogenność jest jednym z najbardziej istotnych zjawisk w biologii raka piersi. Odnotowuje się zarówno heterogenność wewnętrzną jednego ogniska (np. HER2 wykazuje znaczącą heterogenność wewnątrz guza pierwotnego, zarówno pod względem ekspresji immunohistochemicznej, jak i pod względem amplifikacji genu), jak i różnice pomiędzy ogniskami u jednego lub wielu chorych [10,11,12], co istotnie może zmieniać rokowanie [13]. W przypadku niektórych białek heterogenność potwierdzono badaniami genetycznymi. Dzięki zastosowaniu porównawczej hybrydyzacji genomowej (ang. *comparative genomic hybridization*, CGH) o niskiej rozdzielczości, ujawniono różnice w liczbie kopii TP53 oraz ERBB2 [14–16]. Również najbardziej precyzyjne techniki, jak sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *next generation sequencing*, NGS), potwierdzają heterogenność w różnych morfologicznie polach jednego guza [17–19]. Wyniki oceny nie są jednakże w pełni jednoznaczne, wg części autorów ogniska guza są wewnętrznie homogenne [20].

## *Cel*

Celem pracy była ocena ekspresji fosfatazy tyrozynowej 4A3 (PRL-3) w aspekcie heterogenności ognisk pierwotnych raka piersi oraz poszukiwanie potencjalnych związków z uznanymi czynnikami o znaczeniu rokowniczym.

## Materialy i metody

Na podstawie zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi RNN/12/16/KE przeprowadzono badania ekspresji fosfatazy tyrozynowej 4A3 (PRL3) u 41 pacjentek z rakiem piersi. Zgodnie z ogólnie przyjętymi standardami pooperacyjny materiał tkankowy (gruczoł piersiowy z guzem oraz węzły chłonne) utrwalano od 24 do 48 godzin w 10-procentowym roztworze zbuforowanej formaliny w temperaturze pokojowej. Podczas badania makroskopowego z guzów oraz węzłów chłonnych zostały pobrane wycinki, umieszczone następnie w procesorze tkankowym Excelsior™ AS ThermoFisher i procedowane według schematu: 8 godzin w wymienianych roztworach etanolu o rosnącym stężeniu (70–99%), 2 godziny w wymienianym roztworze ksylenu oraz 2 godziny w parafinie histologicznej o temperaturze 58°C, a następnie zatopione w bloczkach parafinowych. Materiał badany skrojono mikrotomem na skrawki o grubości 4–5µm, a następnie wykorzystano do rutynowego wykonania preparatów barwionych hematoksyliną i eozyną, badań objętych aktualnie obowiązującymi protokołami (obecność receptorów estrogenowych ER, obecność receptorów progesteronowych PGR, Ki-67 oraz HER2) oraz dodatkowo badań immunohistochemicznych ekspresji fosfatazy tyrozynowej 4A3 (PRL-3) zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta przeciwciała i danymi zawartymi w tabeli 1.

Tabela 1. Szczegóły procedury badań immunohistochemicznych ekspresji fosfatazy tyrozynowej 4A3 (PRL3)

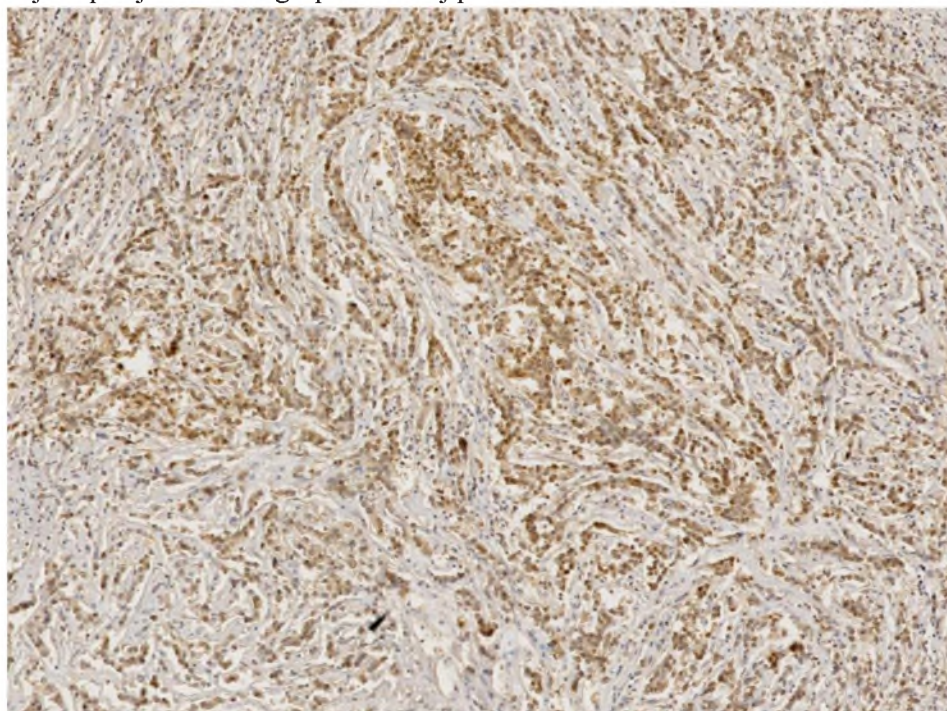
Nazwa przeciwciała	Producent	Stężenie	Czas inkubacji	Sposób odsłonięcia antygeny	Sposób oceny preparatów
PRL-3 (PTP4A3)	Abcam	1:300	30'	PT link pH 8,0 20'	Ocena intensywności (skala: od 0 do +3)

Przygotowane preparaty histologiczne odparafinowano z użyciem ksylenu, ponownie nawodniono z użyciem roztworu stężonego alkoholu etylowego oraz zastosowano procedurę cieplnego odmaskowania epitopu (HIER) przy użyciu aparatu PT Link (z użyciem odczynników Dako EnVision FLEX Target Retrieval Solution oraz Dako EnVision FLEX Wash Buffer) lub łaźni wodnej w zasadowym buforze. Następnie zablokowano działanie endogennych peroksydaz za pomocą Dako Peroxidase Blocking Reagent (10'). Na tak przygotowanych preparatach dokonano barwienia immunohistochemicznego za pomocą Dako Autostainer z użyciem przeciwciał pierwotnych (30'–60'), przeciwciał wtórnych (30') oraz barwieniu enzymatycznemu DAB (10'); zgodnie z instrukcjami producenta użyto odczynników systemu Dako EnVision FLEX.

Immunoekspresję PRL-3 oceniano w umownej skali czterostopniowej (0, +1, +2, +3) na podstawie intensywności barwy. Wyniki tej ewaluacji poddano analizie statystycznej, przeprowadzonej przy użyciu pakietu statystycznego STATISTICA 12.5 (StatSoft, Tulsa, OK, USA, [JKKP501E504328AR-F]) z zasobów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W pierwszym etapie przeprowadzono test Shapiro-Wilka, w kolejnych etapach analizy wykorzystano testy nieparametryczne, dla oznaczenia istotności różnic statystycznych wykorzystano test Manna-Whitneya-Wilcoxon. Korelacje między parametrami obliczono korzystając ze współczynnika Pearsona ( $r$ ). Poziom istotności ( $p$ ) uznawano za statystycznie znamienne, gdy jego wartość wynosiła  $<0,05$ . Doboru narzędzi statystycznych dla celu pracy dokonano zgodnie z wytycznymi Casson, R. J. and Farmer, L. D. (2014).

## Wyniki

Ekspresję fosfatazy tyrozynowej 4A3 (PRL-3) stwierdzono w 36 z 41 zbadanych guzów, tj. w 88% przypadków (fot. 1). Spektrum intensywności cytoplazmatycznej ekspresji PRL-3 w grupie badanej przedstawia tabela 2.



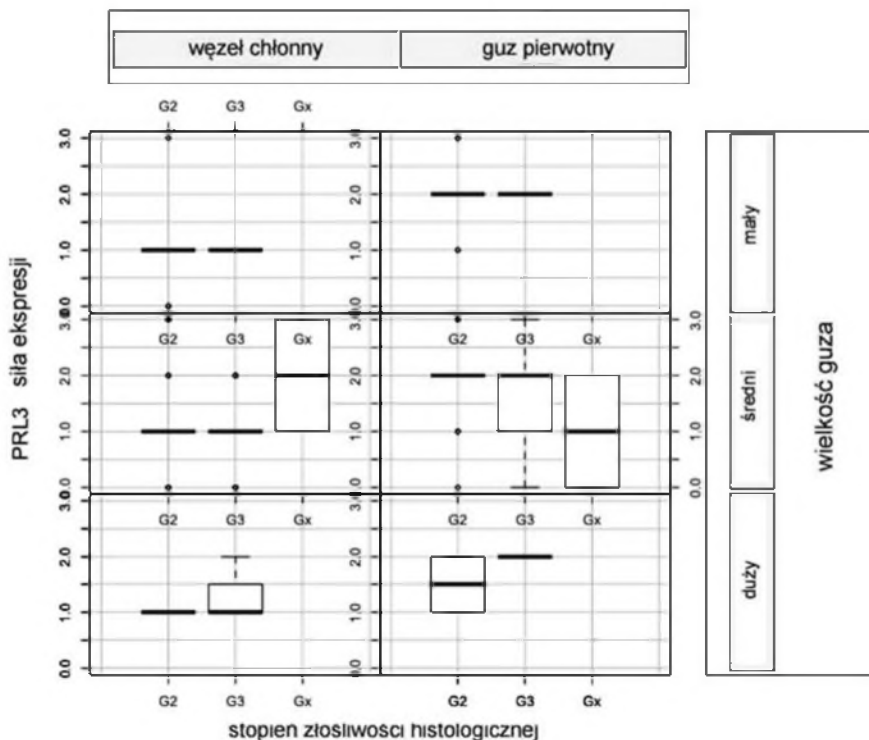
Fot. 1. Ekspresja fosfatazy tyrozynowej 4A3 (PRL-3) w ognisku pierwotnym raka piersi oceniona na +2 w skali intensywności, chora lat 47, stopień złośliwości histologicznej nowotworu 2 (G2) (powiększenie 100x)

Tabela 2. Wyniki badań intensywności ekspresji fosfatazy tyrozynowej 4A3 (PRL-3) w ogniskach pierwotnych raka piersi.

Sila ekspresji immunohistochemicznej PRL-3	Guz pierwotny
0	5 (12%)
1	14 (34%)
2	16 (39%)
3	6 (15%)
Suma:	41 (100%)

Badany rozkład nie okazał się zgodny z rozkładem normalnym. Dalsza analiza statystyczna ujawniła istnienie ujemnej korelacji pomiędzy poziomem białka PRL-3 w ogniskach pierwotnych a siłą ekspresji receptorów progesteronowych w komórkach raka piersi – współczynnik korelacji Pearsona  $-0,44$  ( $p = 0,042$ ), nie stwierdzono natomiast istotnych statystycznie związków z innymi rutynowo ewaluowanymi czynnikami o znaczeniu prognostycznym lub predykcyjnym: ekspresją receptorów estrogenowych, HER2 ani Ki-67. W teście Manna-Whitneya-Wilcozona nie wykazano istotnych statystycznie różnic w sile ekspresji PRL-3 pomiędzy guzem pierwotnym a przerzutem do węzła chłonnego ( $p = 0,67$ ). U 8 chorych (38%) ujawniono spadek ekspresji o intensywności z  $-1$  do  $-3$ . Wzrost siły ekspresji odnotowano także u 8 pacjentek (38%), zawsze o  $+1$  punkt. W 6 przypadkach (29%) stwierdzono zanik ekspresji, natomiast pojawienie się *de novo* w przerzucie – w 2 przypadkach (10%).

Analiza uzyskanych wyników w aspekcie uznanych czynników o znaczeniu rokowniczym, tj. histoklinicznych (stopień złośliwości histologicznej oraz zaawansowania klinicznego choroby) pozwoliła zauważyć obecność różnic pod względem poziomu badanego białka pomiędzy guzami o drugim i trzecim stopniu złośliwości histologicznej (G2 i G3). Różnice widoczne były w największym stopniu w guzach o skrajnej wielkości (pT1 i pT3–4). Mała liczebność grup nie upoważniła do prowadzenia dalszej analizy statystycznej. Przedstawione związki ilustruje rycina 1.



Ryc. 1. Siła ekspresji białka PRL-3 w guzie pierwotnym oraz w przerzucie w aspekcie danych histoklinicznych – stopnia złośliwości histologicznej nowotworu (grade, GX, G2, G3) oraz wielkości guza (guzy małe: poniżej 2 cm, guzy średnie: 2–5 cm, guzy duże: powyżej 5 cm). Wyniki prezentowane jako mediana (pogrube linie poziome) ± rozrzut między 1-ym i 3-im kwartylem (prostokąty), zakres (minimum–maksimum, zwykle linie poziome uzupełnione przerywanymi liniami pionowymi)

## Dyskusja

Największym problemem diagnostyki i terapii raków piersi wydaje się być złożoność ich biologii oraz brak spójności istniejących podziałów: morfologicznego, immunohistochemicznego i molekularnego-ekspresyjnego, a tym samym brak jednoznacznego obrazu zmian oraz możliwości precyzyjnego rokowania. Na znaczeniu coraz bardziej zyskują podziały molekularne, jednak najdokładniejsze narzędzia oceniające ekspresję genów (mRNA) nadal są stosunkowo mało dostępne i kosztowne. Wybór kompromisowych rozwiązań, stający się niekiedy

koniecznością w codziennej praktyce, może natomiast przyczyniać się do obniżenia skuteczności leczenia.

Zróznicowanie komórek raka piersi oraz różnorodna ekspresja genów i obecność białek jest zjawiskiem udokumentowanym, podobnie jak jej wpływ na przebieg choroby nowotworowej w indywidualnych przypadkach. Rozpatrując heterogenność pojedynczego ogniska, stwierdza się różnice na poziomie ekspresji oraz, w mniejszym stopniu, na poziomie genetycznym. Nawet w przypadku oznaczenia wiodących markerów o znaczeniu prognostycznym i predykcyjnym (np. ER, PR, HER2, p53) stwierdza się różnice wewnątrz guza w zależności od miejsca pobrania materiału [10]. Wskazuje to na potencjalny wpływ heterogenności na wybory terapeutyczne oraz konieczność ostrożnego podejścia klinicznego do uzyskiwanych wyników, w praktyce klinicznej znajdując odzwierciedlenie w rekomendacjach dotyczących adiuwantowego leczenia raka piersi [21–23]. Istnienie zjawiska heterogenności skłania część autorów do podważania zasadności użycia biopsji gruboigłowej do oceny białek predykcyjnych, gdyż w przypadku ewaluacji jedynie niewielkiej części masy guza istnieje istotne ryzyko błędnej oceny [24]. Heterogenność nie ogranicza się do uznanych biomarkerów raka piersi – współczesne badania wskazują kolejne białka, których zróżnicowaną ekspresję ujawnia się w ogniskach pierwotnych lub pomiędzy ogniskami raka piersi. Co najistotniejsze, podobnie jak w przypadku innych nowotworów, tak i w raku piersi przypuszcza się, że to właśnie te dodatkowe, mniej dotychczas rozpoznane czynniki mają największy wpływ na rokowanie w indywidualnych przypadkach [10,25,26].

Fosfataza tyrozynowa 4A3 – trzecia fosfataza regenerująca wątroby (PRL-3) – jest stosunkowo mało poznanym białkiem. Udokumentowano wyższą ekspresję tego białka w utkaniu raka piersi w porównaniu do zdrowej tkanki [8]. Sugeruje się zarówno heterogenność owej ekspresji, jak i możliwość jej wykorzystania w strategiach terapeutycznych. Główną fizjologiczną funkcją PRL-3 jest regulacja cyklu komórkowego oraz proliferacji poprzez regulację czynności kinazy Akt. Nadekspresję PRL-3 stwierdza się również w trakcie wzrostu i zróżnicowania komórek. Aktywność tego białka łączy się z nasileniem angiogenezy. Ponadto białko PRL-3 pełni funkcje regulacyjne w mechanizmach odpowiedzialnych za mobilność komórek nowotworowych [27]. Uważa się, że obecność nadekspresji PRL-3 wiąże się również z gorszym rokowaniem dla pacjentów [28]. W najnowszych badaniach nad rakiem wątrobowokomórkowym wskazano białko GATAD1 jako regulatora ekspresji PRL-3. Kolejną istotną obserwacją było stwierdzenie skutecznego hamowania proliferacji komórek raka wątroby dzięki zastosowaniu inhibitora BR1 oddziałującego selektywnie z PRL-3. Doniesienie to zwróciło po raz kolejny uwagę na PRL-3 jako potencjalny cel terapeutyczny w praktyce klinicznej [14]. Podjęto już próby wykorzystania PRL-3 na modelach zwierzęcych. Dotychczas wykazano skuteczność zastosowania u myszy szczepionki immunizującej przeciwko komórkom raka piersi nadekspresją PRL-3



[15]. Niestety, mechanizm tego procesu nie został dotąd wystarczająco poznany, co uniemożliwia podjęcie badań u ludzi.

W dotychczas przeprowadzonych ewaluacjach obecność PRL-3 w raku piersi stwierdzano w ok. 62–75% natomiast nadekspresję (+2 lub +3) w 34,8% przypadków, z którymi to wartościami pozostają w zgodności wyniki prezentowanych badań. Wyższe poziomy ekspresji wiąże się w literaturze z gorszym rokowaniem. Tożsamą obserwację w zakresie wzrostu ekspresji PRL-3 w guzach wtórnych odnotowano również w rakach żołądka, jelita grubego oraz w przypadku raka wątroby [16]. W rakach piersi stwierdza się nie tylko podwyższoną ekspresję PRL-3 w stosunku do zdrowej piersi, ale i to, że jej poziom w ognisku pierwotnym koreluje z ryzykiem wystąpienia przerzutów [27]. W publikacjach szczególnie mocno podkreślane jest gorsze rokowanie, obecność angioinwazji oraz częstsza obecność przerzutów w węzłach chłonnych związana z nadekspresją PRL-3 [27,28]. Ponadto większy poziom białka PRL-3 ujawniano w przerzutach do węzłów chłonnych pachowych (95,2%) niż w guzie pierwotnym (70,7%) [17,29]. Niestety, białko PRL-3 nie jest jeszcze dostatecznie poznane pod względem heterogenności jego ekspresji w guzach pierwotnych i ogniskach przerzutowych – odnaleziono jedynie dwa badania poruszające ten aspekt. Radke i wsp. opisali ekspresję immunohistochemiczną w grupie 24 pacjentów, stosując trzypostopniową skalę (0, +1, +2). Stwierdzono ekspresję w 22 przerzutach (91,7%) oraz w 16 guzach pierwotnych (66,7%), istotność statystyczną obserwacji potwierdzono testem chi-kwadrat dla prób sparowanych ( $p = 0,033$ ) [18]. Zbliżone wyniki uzyskał Hao i wsp. na grupie 63 pacjentów, wykorzystując zarówno ocenę ekspresji mRNA, jak i ocenę ilościową (0, +1, +2, +3) obecności białka z wykorzystaniem immunohistochemii. W guzach wtórnych wykazano metodami immunohistochemicznymi ekspresję PRL-3 na poziomie 95,2% (60 pozytywnych z 63 przypadków) oraz dodatnią ekspresję mRNA na poziomie 0,961 (+/- 0,110). W ogniskach pierwotnych wyniki były istotnie niższe, tj. 77,8% (49 pozytywnych z 63 przypadków,  $p = 0,003$ ) przy ocenie immunohistochemicznej oraz 0,842 (+/- 0,191;  $p = 0,022$ ) przy oznaczeniu ekspresji na poziomie mRNA. Dodatkowym atutem badania była wysoka zgodność między ekspresją na poziomie mRNA a ilością białka określaną za pomocą immunohistochemii sięgająca 91,1% oraz potwierdzenie wyższej ekspresji na poziomie mRNA u pacjentów z przerzutami do węzłów w stosunku do grupy bez przerzutów [17]. Występowanie heterogenności w przerzutach pod względem PRL-3 opisane zostało w przypadku kilku nowotworów. Xing ujawnił wyższy odsetek (76,2%) w przerzutach raków do wątroby w stosunku do guzów pierwotnych (19,4%) [19]. Również w raku jelita grubego została zaobserwowana heterogenność ekspresji PRL-3, która w przerzutach do węzłów chłonnych wynosiła 91,6%, natomiast w guzie pierwotnym jedynie 18,4%.

Stwierdzona w opisanych badaniach heterogenność ognisk pierwotnych raka piersi pod względem ekspresji PRL-3 wymaga dalszych badań ze szcze-

gólnym uwzględnieniem ewaluacji porównawczej guzów pierwotnych i ognisk przerzutowych. Już na obecnym etapie wydają się jednak niezwykle interesujące związki ekspresji PRL-3 z uznanymi czynnikami o znaczeniu rokowniczym, zaobserwowane w przytoczonych badaniach. Stopień złośliwości histologicznej (grade) oraz wielkość guza jako główny element oceny stopnia zaawansowania klinicznego (stage) są podstawowymi histoklinicznymi elementami ewaluacji raka piersi. Ujawnienie w prezentowanych badaniach tendencji zmian ekspresji białka PRL-3 w zależności od obu wymienionych czynników wskazuje na potrzebę poszerzenia badań w kierunku wpływu tej ekspresji na biologię guza i przebieg choroby.

Szczególnie interesująca wydaje się obecność odwrotnej korelacji (potwierdzona testem Pearsona) z siłą ekspresji receptora progesteronowego, będącego silnym czynnikiem predykcyjnym i prognostycznym.

Receptor progesteronowy (PR) należy, podobnie jak receptor estrogenowy (ER), do grupy receptorów hormonów steroidowych. Wyróżnia się dwie podstawowe jego izoformy: A oraz B (PRA i PRB). W przypadku raka piersi izoformy A i B współlistniają i współdziałają. Izolowane pobudzenie izoform przynosi odmienne efekty, jednak uważa się, że są one od siebie wzajemnie zależne i działają synergistycznie *in vivo*. Wskazuje się także, że obie izoformy biorą udział w rozprzestrzenianiu się komórek raka piersi. Niestety, pomimo że stwierdza się gorsze rokowania u pacjentek z rakiem piersi o zróżnicowanej ekspresji PRA i PRB, rutynowo dostępne metody immunohistochemiczne nie umożliwiają odróżnienia izoform PR. Według europejskich wytycznych obecność ekspresji PR powyżej 20% komórek jest charakterystyczna dla podtypu podobnego do luminalnego A [30]. Podział na raki luminalne A i B nie w pełni odzwierciedla złożoną biologię raka sutka, a ocena dokonywana na podstawie wyników badań immunohistochemicznych nie jest w oczekiwany sposób zgodna z podziałem na podstawie ewaluacji ekspresji genów. Podkreśla się, że aktywność szlaku PR zależnego jest bardziej istotna niż ekspresja białek PR. Trwają także próby wykorzystania PR jako punktu uchwytu terapii celowanej, ale i tu podkreśla się, że zastosowanie terapii winno być ograniczone do grupy z aktywowanym szlakiem PR, a nie samą obecnością receptora progesteronowego [31].

Raki piersi PR+ mają lepsze rokowanie niż raki PR-, gdyż pierwotne pobudzenie PR powoduje również zwrotne hamowanie PR. Wzajemne relacje pomiędzy ER i PR są złożone. Pobudzenie receptora ER wyzwala ekspresję PR, jeśli receptor PR nie jest pobudzony, mamy do czynienia z rakiem luminalnym A i profilem ER+, PR+, jeśli natomiast na tym etapie dojdzie do pobudzenia PR, dochodzi od sprzężenia zwrotnego z ER i autoregulacyjnego zahamowania ekspresji PR oraz zwiększenia ekspresji czynników efektorowych dla PR – w efekcie profil immunohistochemiczny przedstawia się następująco: słabsza ekspresja ER, PR- oraz efektorowo wysoki indeks Ki-67. W rakach luminalnych B cały proces jest w swoistej równowadze relacji ER i PR.

Kluczem do zrozumienia biologicznych efektów oddziaływania PR jest prześledzenie mechanizmów molekularnych. Izolowana obecność PR jest rzadka [32–34]. Pojawienie się białka PR jest zależne od ER i występuje dopiero po aktywacji jego szlaku, jednak zjawisko to nie jest w pełni poznane. Działanie PR pozostaje w dużym stopniu synergiczne z ER i w wielu aspektach wzmacnia jego efekt, izolowana aktywacja bez ER daje niewspółmiernie słabszy efekt komórkowy. Pobudzenie samego PR nie wpływa także na zmiany ruchomości czy potencjału proliferacyjnego komórek raka piersi. Oddziaływanie PR jest w dużej mierze elementem wzmacniającym i przejściowym. Wskazuje na to aktywność czynników efektorowych w stosunku do PR. Jednym z najważniejszych i najlepiej poznanych mechanizmów tego typu jest parakrynnie działanie RANKL. Komórka sama nie ulega przyspieszonym podziałom, a jedynie na skutek pobudzenia PR wydziela do mikrośrodowiska RANKL, który pobudza proliferację komórek raka otaczających aktywowaną komórkę [35]. W aspekcie klasyfikacji molekularnej raki piersi z aktywnym szlakiem PR, najczęściej nieprezentujące immunohistochemicznie wysokich poziomów PR, należą do grupy luminalnych B [32,36].

Związki ekspresji PR i PRL-3 pozostają nieznane. Ujawniona w prezentowanych badaniach korelacja pomiędzy ekspresją obu tych białek potencjalnie wydaje się wiązać z mechanizmami proliferacji oraz mobilności komórek nowotworowych, jednak wysnucie jednoznacznych wniosków jest trudne z uwagi na nie w pełni poznaną rolę w tych procesach samego PR. Potencjalny udział białka PRL-3 w mechanizmach mobilności oraz lokalnego i ogólnoustrojowego rozsiewu komórek raka piersi pozostawałby także w zgodności ze stwierdzonym związkiem pomiędzy nadekspresją PRL-3 i gorszym rokowaniem [28] oraz obiecującymi wynikami badań nad lekami zmniejszającymi ryzyko powstania przerzutów z wykorzystaniem blokowania ścieżki PRL-3 [16].

Niezwykle interesujące w aspekcie prezentowanych wyników oceny ekspresji białka PRL-3 i ujawnionej korelacji ujemnej z PR wydają się związki ekspresji PRL-3 z poziomem SLUG+SNAIL w ogniskach pierwotnych raków piersi (publikacja w toku, korelacja dodatnia,  $p = 0,011$ ). O ile funkcja PR jest złożona, ekspresja SNAIL+SLUG jednoznacznie wiąże się z rozsiewem komórek nowotworowych. Istnieją także doniesienia literaturowe o pośrednim związku ekspresji PRL-3 z przejściem nabłonkowo-mezenchymalnym [27]. Białka SNAIL (inaczej SNAIL1) oraz SLUG (SNAIL2) należą do wspólnej rodziny białek transkrypcyjnych nazywanych czynnikami transkrypcyjnymi palca cynkowego (ang. *zinc finger*) typ C2H2. Oba białka wykazują znaczne podobieństwo funkcjonalne, różni je czas aktywności w trakcie przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT). SNAIL1 głównie indukuje proces, natomiast SNAIL2 podtrzymuje fenotyp mezenchymalny [37,38]. W zdrowych tkankach u dorosłych ekspresja tych białek nie jest obecna. W procesie nowotworzenia białka SNAIL 1 i 2 hamują ekspresję E-kadheryny i warunkuje przejście nabłonkowo-mezenchy-

malne. EMT umożliwia przerzutowanie oraz pozwala na przetrwanie komórek nowotworowych poza ogniskiem pierwotnym. Zmiana fenotypu na mezenchymalny z nadekspresją SNAIL1 i SNAIL2 wiąże się z gorszym rokowaniem w raku piersi. Stwierdzenie korelacji pomiędzy ekspresją PRL-3 w pierwotnych ogniskach raka piersi a czynnikami o uznanej roli w procesie przerzutowania wskazuje na potrzebę dalszej ewaluacji mechanizmów wiążących PR, PRL-3 oraz SNAIL+SLUG. Należy rozważyć wpływ EMT na fenotyp komórki, w tym ekspresję PRL-3, ER (oraz wtórnie PR), ewentualnie samą aktywność ER w komórce o fenotypie mezenchymalnym. Lepsze poznanie tego procesu może wpływać na poprawę zrozumienia złożonych mechanizmów przerzutowania.

## Wnioski

Wyniki przedstawionych badań ekspresji fosfatazy tyrozynowej 4A3 – PRL-3 – ukazują nieznaną dotychczas aspekty heterogenności pierwotnych ognisk raka piersi oraz złożoną rolę białka PRL-3 w biologii nowotworu. Sugerują także istnienie nowego mechanizmu wpływu PRL-3 w procesach ruchomości, naciekania oraz przerzutowania komórek raka piersi poprzez oddziaływanie z receptorem progesteronowym i potencjalnie białkami SNAIL+SLUG.

## Bibliografia

1. Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. *Breast Cancer: Epidemiology and Etiology*. Cell Biochem Biophys. 2015; 72 (2): 333–338.
2. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, Stein KD, Alteri R, Jemal A. *Cancer treatment and survivorship statistics, 2016*. CA Cancer J Clin. 2016; 66 (4): 271–289.
3. DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. *Breast cancer statistics, 2013*. CA Cancer J Clin. 2014; 64 (1): 52–62.
4. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, Borresen-Dale AL. *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98 (19): 10869–10874.
5. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature. 2000; 406 (6797): 747–752.
6. Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. *Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse*. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 1 April 2010; 28 (10): 1684–1691.

7. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. *Diseases of the breast: Fifth edition*. Wolters Kluwer Health Adis (ESP) 2014; <https://miami.pure.elsevier.com/en/publications/diseases-of-the-breast-fifth-edition> [dostęp: 1.09.2019].
8. Ustaalioglu BB, Bilici A, Barisik NO, Aliustaoglu M, Vardar FA, Yilmaz BE, Seker M, Gumus M. *Clinical importance of phosphatase of regenerating liver-3 expression in breast cancer*. Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex. 2012; 14 (12): 911–922.
9. Radke I, Götte M, Smollich M, Scharle N, Kiesel L, Wülfing P. *Expression of PRL-3 regulates proliferation and invasion of breast cancer cells in vitro*. Arch Gynecol Obstet. 2017; 296 (6): 1153–1160.
10. Nassar A, Radhakrishnan A, Cabrero IA, Cotsonis GA, Cohen C. *Intratumor heterogeneity of immunohistochemical marker expression in breast carcinoma: a tissue microarray-based study*. Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM. 2010; 18 (5): 433–441.
11. Allison KH, Dintzis SM, Schmidt RA. *Frequency of HER2 heterogeneity by fluorescence in situ hybridization according to CAP expert panel recommendations: time for a new look at how to report heterogeneity*. Am J Clin Pathol. 2011; 136 (6): 864–871.
12. Andersson J, Linderholm B, Bergh J, Elmberger G. *HER-2/neu (c-erbB-2) evaluation in primary breast carcinoma by fluorescent in situ hybridization and immunohistochemistry with special focus on intratumor heterogeneity and comparison of invasive and in situ components*. Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM. 2004; 12 (1): 14–20.
13. Seol H, Lee HJ, Choi Y, Lee HE, Kim YJ, Kim JH, Kang E, Kim SW, Park SY. *Intratumor heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance*. Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc. 2012; 25 (7): 938–948.
14. Geyer FC, Weigelt B, Natrajan R, Lambros MBK, de Biase D, Vatcheva R, Savage K, Mackay A, Ashworth A, Reis-Filho JS. *Molecular analysis reveals a genetic basis for the phenotypic diversity of metaplastic breast carcinomas*. J Pathol. 2010; 220 (5): 562–573.
15. Patani N, Barbashina V, Lambros MBK, Gauthier A, Mansour M, Mackay A, Reis-Filho JS. *Direct evidence for concurrent morphological and genetic heterogeneity in an invasive ductal carcinoma of triple-negative phenotype*. J Clin Pathol. 2011; 64 (9): 822–828.
16. Navin N, Krasnitz A, Rodgers L, Cook K, Meth J, Kendall J, Riggs M, Eberling Y, Troge J, Grubor V, Levy D, Lundin P, Månér S, Zetterber A, Hicks J, Wigler M. *Inferring tumor progression from genomic heterogeneity*. Genome Res. 2010; 20 (1): 68–80.
17. Verigos J, Magklara A. *Revealing the Complexity of Breast Cancer by Next Generation Sequencing*. Cancers. 2015; 7 (4): 2183–2200.
18. Aleskandarany MA, Vandenberghe ME, Marchiò C, Ellis IO, Sapino A, Rakha EA. *Tumour Heterogeneity of Breast Cancer: From Morphology to Personalised Medicine*. Pathobiol J Immunopathol Mol Cell Biol. 2018; 85 (1–2): 23–34.
19. Nik-Zainal S, Van Loo P, Wedge DC, et al. *The life history of 21 breast cancers*. Cell. 2012; 149 (5): 994–1007.

20. Turashvili G, Brogi E. *Tumor Heterogeneity in Breast Cancer*. *Front Med*. 2017; 4: 227.
21. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. *Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer*. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1999; 17 (5): 1474–1481.
22. Bardou V-J, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. *Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases*. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2003; 21 (10): 1973–1979.
23. Hammond MEH, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S. *American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer*. *J Oncol Pract*. 2010; 6 (4): 195–197.
24. Kurbasic E, Sjöström M, Krogh M, Folkesson E, Grabau D, Hansson K, Rydén L, Waldemarson S, James P, Niméus E. *Changes in glycoprotein expression between primary breast tumour and synchronous lymph node metastases or asynchronous distant metastases*. *Clin Proteomics*. 2015; 12 (1): 13.
25. Taran K, Kobos J, Sporny S. *Examination of expression of WT1 gene product and CD44 adhesive molecule in nephroblastoma histologic types*. *Pol J Pathol*. 2008; 59 (3): 177–182.
26. Taran K, Owecka A, Kobos J. *Prognostic importance of Cyclin E1 expression in neuroblastic tumors in children*. *Pol J Pathol*. 2013; 64 (2): 149–152.
27. Glöckner S, Buurman H, Kleeberger W, Lehmann U, Kreipe H. *Marked intratumoral heterogeneity of c-myc and cyclinD1 but not of c-erbB2 amplification in breast cancer*. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. 2002; 82 (10): 1419–1426.
28. Focke CM, Decker T, van Diest PJ. *Intratumoral heterogeneity of Ki67 expression in early breast cancers exceeds variability between individual tumours*. *Histopathology*. 2016; 69 (5): 849–861.
29. Hao R-T, Zhang X-H, Pan Y-F, Liu H-G, Xiang Y-Q, Wan L, Wu XL. *Prognostic and metastatic value of phosphatase of regenerating liver-3 in invasive breast cancer*. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010; 136 (9): 1349–1357.
30. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, Zalcrisson S, Cardoso F, ESMO Guidelines Committee. *Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2015; 26 Suppl 5: v8–30.
31. Jonat W, Bachelot T, Ruhstaller T, Kuss I, Reimann U, Robertson JFR. *Randomized phase II study of lonaprisan as second-line therapy for progesterone receptor-positive breast cancer*. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2013; 24(10): 2543–2548.
32. Knutson TP, Lange CA. *Tracking progesterone receptor-mediated actions in breast cancer*. *Pharmacol Ther*. 2014; 142 (1): 114–125.
33. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Powe DG, Gee J, Nicholson RI, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. *Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype*. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007; 25 (30): 4772–4778.

34. Brisken C. *Progesterone signalling in breast cancer: a neglected hormone coming into the limelight*. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13 (6): 385–396.
35. Schramek D, Leibbrandt A, Sigl V, Kenner L, Pospisilik JA, Lee HJ, Hanada R, Joshi PA, Aliprantis A, Glimcher L, Pasparakis M, Khokha R, Ormandy CJ, Widschwendter M, Schett G, Penninger JM. *Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progesterin-driven mammary cancer*. *Nature*. 2010; 468 (7320): 98–102.
36. Lim E, Palmieri C, Tilley WD. *Renewed interest in the progesterone receptor in breast cancer*. *Br J Cancer*. 2016; 115 (8): 909–911.
37. Peinado H, Portillo F, Cano A. *Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis*. *Int J Dev Biol*. 2004; 48 (5–6): 365–375.
38. Papiewska-Pająk I, Kowalska MA, Boncela J. *Expression and activity of SNAIL transcription factor during Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in cancer progression*. *Postepy Hig Med Doswiadczalnej Online*. 2016; 70 (0): 968–980.

## **Evaluation of protein tyrosine phosphatase 4A3 (PRL-3) expression – the unknown aspects of breast cancer primary foci heterogeneity**

### **Abstract**

**Introduction:** Despite significant progress in the diagnosis and introduction of modern therapy, the results of treatment of patients with breast cancer are still far from expectations. This indicates the need to find out the causes and consequences of the heterogeneity of breast cancer and the potential clinical implications of such knowledge.

**Materials and methods:** Immunohistochemical assessment of 4A3 tyrosine phosphatase (PRL-3) expression in breast cancer and search for its potential relations to selected prognostic parameters.

**Results:** There was heterogeneity of primary breast cancer foci in terms of PRL-3 expression and relation to the established prognostic parameters. The inverse correlation of the strength of progesterone receptor expression and PRL-3, were revealed. There was no significant correlation in straight of expression between primary foci and synchronous metastasis to the lymph node.

**Conclusions:** The results of the presented research show previously unknown aspects of heterogeneity of primary breast cancer foci and the complex role of the PRL-3 protein in the biology of this cancer. There was shows need for further research of the role of PRL-3 in EMT.

**Key words:** breast cancer, PRL-3 protein, heterogeneity, metastases