

Streszczenie

Wpływ białka indukowanego prolaktyną na apoptozę komórek raka gruczołu piersiowego wywołaną doksorubicyną

Anna Urbaniak

Ostatnie badania Jabłońskiej i wsp. (2016 - zespołu prof. Dzięgiela) wykazały, że białko indukowane prolaktyną (*ang. Prolactin Induced Protein, PIP*) może być pozytywnym czynnikiem rokowniczym w raku gruczołu piersiowego oraz, może mieć swój udział w odpowiedzi tego nowotworu na chemioterapię. Pokazano, że guzy pacjentek z brakiem lub niskim poziomem PIP w komórkach nowotworowych są znacznie bardziej odporne na leczenie doksorubicyną i cyklofosfamidem niż guzy od pacjentek z wysokim poziomem jego ekspresji (Jabłońska i wsp., 2016). Dodatkowo wykazano, iż poziomy ekspresji mRNA *PIP* jak i białka, zmniejszają się wraz ze wzrostem stopnia złośliwości G a jego ekspresja jest najniższa w przypadku potrójnie negatywnych raków gruczołu piersiowego (ER-, PR-, HER 2-) o złym rokowaniu (Jabłońska i wsp., 2016). Z klinicznego punktu widzenia istotny jest również fakt, iż przypadki z wyższą ekspresją PIP charakteryzowały się dłuższymi przeżyciami wolnymi od wznowy oraz wolnymi od przerzutów (Hähnel i wsp., 1996, Jabłońska i wsp., 2016).

Podsumowując, dane te sugerują iż PIP może bezpośrednio wpływać na odpowiedź raków gruczołu piersiowego, na standardową chemioterapię. W celu weryfikacji powyższej hipotezy podjęto badania, których przedmiotem było określenie wpływu tego białka na przeżywalność komórek raka gruczołu piersiowego i apoptozę indukowaną wybranymi cytostatykami tj. doksorubicyną, 4-hydroksycyklofosfamidem i paklitakselem. Badania te przeprowadzono przy użyciu komórek raka gruczołu piersiowego MDA-231/PIP z neoekspresją białka PIP reprezentującego model funkcjonalny (*ang. gain of function phenotype*) oraz komórek T47Dpuro/shPIP z wyciszoną ekspresją tego białka PIP reprezentujących model niefunkcjonalny (*ang. loss of function phenotype*).

Uzyskane wyniki *in vitro* wykazały, że komórki raka gruczołu piersiowego MDA-231/PIP z neoekspresją PIP charakteryzują się zwiększoną wrażliwością na stosowane ww. cytostatyki w porównaniu do komórek kontrolnych MDA-231/PURO bez ekspresji tego białka.

Z drugiej strony komórki T47D raka gruczołu piersiowego z wyciszoną ekspresją PIP (T47Dpuro/shPIP) były mniej wrażliwe na zastosowane cytostatyki w porównaniu do komórek kontrolnych (T47Dpuro/ctrlsh) z wysoka ekspresją PIP.

Badania te potwierdzono w wykonanym eksperymencie *in vivo* na modelu myszy bezgrasiczych. Myszy z nowotworami ortotopowymi utworzonymi przez przeszczepione ludzkie komórki (MDA-231/PIP) lepiej reagowały na leczenie doksorubicyną w porównaniu z myszami obciążonymi nowotworami utworzonymi przez komórki kontrolne (MDA-231/PURO) bez ekspresji tego białka. Podsumowując, badania te potwierdziły dane kliniczne i wykazały, że PIP jest bezpośrednio odpowiedzialny za zwiększenie wrażliwości komórek raka gruczołu piersiowego na apoptozę indukowaną przez leki cytotoksyczne.

Rola białka PIP w progresji raka gruczołu piersiowego nie została w pełni wyjaśniona. Jak dotąd większość badań koncentrowała się na zaangażowaniu PIP w mechanizm proliferacji komórek raka gruczołu piersiowego, jednak wyniki te okazały się niespójne. Dlatego przy użyciu obu modeli komórkowych przeprowadzono analizę cyklu komórkowego i nie stwierdzono różnic w proliferacji między komórkami raka gruczołu piersiowego z wysokim poziomem PIP (MDA-231/PIP i T47Dpuro/ctrlsh) a komórkami raka gruczołu piersiowego bez ekspresji PIP (MDA-231/PURO i T47Dpuro/shPIP). Dane te nie potwierdziły tezy dotyczącej kluczowej roli PIP w proliferacji komórek raka gruczołu piersiowego i są zgodne z naszą sugestią dotyczącą zaangażowania PIP w apoptozę tych komórek.

Ogólnie przyjmuje się, że PIP jest białkiem wydzielniczym i działa jako białko zewnątrzkomórkowe. Dlatego właśnie wykorzystano rekombinowane białko PIP (PIP-LEXSY), aby zademonstrować wiązanie PIP do powierzchni komórek raka gruczołu piersiowego. Za pomocą cytometrii przepływowej stwierdzono, że PIP wiąże się specyficznie z powierzchnią komórek MDA-MB-231, a stosując technikę western blot wykazano również, że PIP wiąże się z białkiem błonowym o przypuszczalnej masie cząsteczkowej około 55 kD, które prawdopodobnie reprezentuje jego specyficzny receptor. Funkcjonalną rolę PIP jako białka wydzielniczego potwierdzono również eksperymentalnie, wykazując, że rozpuszczalne białko PIP zwiększa wrażliwość komórek MDA-MB-231 na doksorubicynę. Podsumowując, po raz pierwszy wykazaliśmy, że PIP wpływa bezpośrednio na komórki raka gruczołu piersiowego w indukowaniu apoptozy przez leki cytotoksyczne. Według naszych danych rola PIP w progresji raka gruczołu piersiowego wydaje się bardziej związana z jego właściwościami proapoptotycznymi niż pro-proliferacyjnymi. Potwierdziliśmy również, że PIP działa jako białko wydzielnicze i po raz pierwszy wykazaliśmy jego wiązanie ze specyficznym białkiem

błony komórkowej. Jednak zrozumienie dokładnego mechanizmu molekularnego działania PIP wymaga jeszcze dalszych badań.