

**Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii**  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

*mgr Anna Nagel*

**Wpływ mikrośrodowiska guza na komórki  
nowotworowe raka piersi w kontekście  
zmian w obrębie receptora estrogenowego**

**The influence of tumour microenvironment on breast cancer cells  
in the context of changes within oestrogen receptor**

Praca przedstawiona

Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego

celem uzyskania stopnia doktora

w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych

w dyscyplinie nauki biologiczne

Promotor: prof. dr hab. Anna Żaczek

Promotor pomocniczy: dr Aleksandra Markiewicz

Instytut Biotechnologii Medycznej i Onkologii Doświadczalnej

Zakład Onkologii Translacyjnej

GDĄŃSK 2021



## OŚWIADCZENIE

Ja, niżej podpisana oświadczam, iż przedłożona praca dyplomowa została wykonana przeze mnie samodzielnie, nie narusza praw autorskich, interesów prawnych i materialnych innych osób.

.....

data

.....

własnoręczny podpis

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy zostały przedstawione w następujących artykułach naukowych:

- Nagel, A.; Szade, J.; Iliszko, M.; Elzanowska, J.; Welnicka-Jaskiewicz, M.; Skokowski, J.; Stasiłojc, G.; Bigda, J.; Sadej, R.; Zaczek, A.; Markiewicz, A. Clinical and Biological Significance of *ESR1* Gene Alteration and Estrogen Receptors Isoforms Expression in Breast Cancer Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1881.

<https://doi.org/10.3390/ijms20081881>

- Nagel A, Popeda M, Jurek A, Sadej R, Szade J, Zielinski J, Skokowski J, Niemira M, Kretowski A, Markiewicz A, Zaczek A „ER $\alpha$ 36-high cancer-associated fibroblasts as an unfavorable factor in triple-negative breast cancer” (W recenzji czasopisma *Cancers*)

## Spis Treści

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>STRESZCZENIE</b> .....	<b>10</b>
<b>2. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW</b> .....	<b>12</b>
<b>3. WSTĘP</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1. Budowa gruczołu piersiowego</b> .....	<b>13</b>
<b>3.2. Rak piersi</b> .....	<b>14</b>
3.2.1 Epidemiologia raka piersi.....	14
3.2.1.1 Dane statystyczne.....	14
3.2.1.2 Czynniki ryzyka .....	15
3.2.2 Diagnostyka i przebieg.....	16
3.2.3 Typy morfologiczne raka piersi .....	16
3.2.3.1 Zmiany prekursorowe.....	17
3.2.3.1.1 Rak przewodowy in situ (DCIS) .....	17
3.2.3.1.2 Rak zrazikowy in situ (LCIS).....	17
3.2.3.2 Naciekający rak piersi.....	17
3.2.3.2.1 Rak bez specjalnego typu (NST) .....	17
3.2.3.2.2 Rak zrazikowy .....	17
3.2.3.2.3 Inne typy naciekających raków piersi .....	18
3.2.3.3 Zapalny rak piersi .....	18
3.2.3.4 Rak Pageta piersi .....	18
3.2.4 Typy molekularne raka piersi .....	19
3.2.4.1 Typ luminalny A .....	19
3.2.4.2 Typ luminalny B.....	20
3.2.4.3 Typ HER2-dodatni (nieluminalny).....	20
3.2.4.4 Potrójnie-negatywny rak piersi.....	20
<b>3.3 Mikrośrodowisko guza</b> .....	<b>22</b>
3.3.1 Fibroblasty związane z nowotworem .....	23
3.3.1.1 Pochodzenie i charakterystyka CAFs.....	24
3.3.1.2 Funkcje CAFs .....	25
3.3.1.3 CAFs w raku piersi .....	26

<b>3.4 Receptor Estrogenowy .....</b>	<b>26</b>
3.4.1 ER $\alpha$ w raku piersi.....	28
3.4.2 Izoforma $\alpha$ 36 receptora estrogenowego .....	29
<b>4. CELE PRACY .....</b>	<b>32</b>
<b>5. MATERIAŁY.....</b>	<b>33</b>
<b>6. METODY.....</b>	<b>37</b>
6.1. Charakterystyka chorych .....	37
6.2 Izolacja kwasów nukleinowych, odwrotna transkrypcja i analiza ekspresji genów .....	38
6.3 Analiza liczby kopii genu <i>ESR1</i> przy użyciu qPCR.....	39
6.4 Analiza liczby kopii genu <i>ESR1</i> przy użyciu metody FISH.....	40
6.5 Analiza i oznaczenie poziomu białek w tkankach metodą IHC.....	40
6.6 Standardowa procedura oceny białek ER $\alpha$ 66, PR i HER2.....	41
6.7 Ocena ekspresji genów z wykorzystaniem platformy nCounter w CAFs i próbkach FFPE guzów.....	41
6.8 Analiza danych NanoString .....	42
6.9 Izolacja i hodowla CAFs oraz przygotowanie pożywek kondycjonowanych .....	43
6.10 Hodowle komórkowe .....	43
6.11 Barwienia immunofluorescencyjne .....	44
6.12 Western blotting .....	44
6.13 Analiza cytokin wydzielanych przez CAFs .....	44
6.14 Analiza wzrostu kolonii komórkowych w 3D .....	45
6.15 Stymulacja komórek potrójnie-negatywnego raka piersi pożywką kondycjonowaną przez ER $\alpha$ 36 <sup>high</sup> CAFs i HGF .....	45
6.16 Analizy statystyczne .....	45
<b>7. WYNIKI.....</b>	<b>46</b>
7.1 Badanie aberracji w obrębie genu <i>ESR1</i> u chorych na raka piersi .....	46
7.2 Liczba kopii genu <i>ESR1</i> a poziom mRNA i białka ER $\alpha$ 36 i ER $\alpha$ 66.....	48
7.3 Badanie korelacji między izoformami ER $\alpha$ 66 i ER $\alpha$ 36 na poziomie mRNA oraz na poziomie białka .....	50
7.4 Kliniczne znaczenie ekspresji izoformy ER $\alpha$ 36 .....	53
7.5 Analiza ekspresji ER $\alpha$ 36 w zrębie guzów raka piersi .....	56

7.6 Badanie korelacji poziomu ER $\alpha$ 36 w CAFs guzów chorych na raka piersi z ekspresją genów związanych odpowiedzią immunologiczną .....	59
7.7 Izolacja i analiza <i>in vitro</i> wpływu CAFs o różnym poziomie ER $\alpha$ 36 na komórki potrójnie-negatywnego raka piersi.....	60
7.8. Analiza cytokin produkowanych przez CAFs o wysokim poziomie ER $\alpha$ 36 na inwazyjny fenotyp komórek potrójnie-negatywnego raka piersi.....	64
7.9 Znaczenie kliniczne cytokin wydzielanych przez CAFs ER $\alpha$ 36 <sup>high</sup> .....	67
<b>8. DYSKUSJA .....</b>	<b>69</b>
8.1. Metody badające amplifikację genu <i>ESR1</i> mogą wykrywać różne aberracje w jego obrębie .....	69
8.2 Izoforma ER $\alpha$ 36 jest negatywnym czynnikiem rokowniczym dla chorych na raka piersi o podtypie ER $\alpha$ 66-pozytywnym, jak i ER $\alpha$ 66-negatywnym .....	71
8.3 CAFs o wysokim poziomie białka ER $\alpha$ 36 mogą modulować środowisko immunologiczne guza .....	72
8.4 Subpopulacja CAFs o wysokim poziomie ER $\alpha$ 36 indukuje inwazyjny fenotyp komórek potrójnie-negatywnego raka piersi, a jej sekretom związany jest z gorszą prognozą chorych na raka piersi.....	74
<b>9. PODSUMOWANIE .....</b>	<b>76</b>
<b>10. LITERATURA .....</b>	<b>78</b>
<b>11. OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE.....</b>	<b>93</b>
11.1 Publikacje.....	93
11.2 Doniesienia konferencyjne .....	93
11.3 Staże naukowe .....	95

## Abstract

Breast cancer is one of the most common cancers among women worldwide. Estrogen receptor alpha ( $ER\alpha$ , also called  $ER\alpha66$ ) is a 66kDa ligand-activated transcription factor involved in cell proliferation and is encoded by the *ESR1* gene. Previously our team investigated its amplification in order to assess the prognostic value of *ESR1* copy number. Results indicated that *ESR1* amplification may occur also in  $ER\alpha66$ -negative patients and confers their poor prognosis. Observed phenomenon may indicate the presence of other  $ER\alpha$  isoforms.  $ER\alpha36$  is a 36kDa variant of  $ER\alpha$ , it is described as an unfavorable factor in breast cancer. Moreover, we observed positive staining for  $ER\alpha36$  in the stroma of breast tumors, which shifted our focus to the tumor environment. Tumor microenvironment plays an active role in the tumor size regulation and metastasis. Cancer associated fibroblasts (CAFs) are the most abundant cell type in the tumor microenvironment. Limited studies described the role of  $ER\alpha66$  in CAFs. However, the role of  $ER\alpha36$  isoform in CAFs is unknown.

Presented PhD thesis aims to analyze the expression of  $ER\alpha$  isoforms and answer the question, if the increased number of *ESR1* gene copy observed also in  $ER\alpha66$ -negative patients is related to  $ER\alpha36$  isoform expression and if  $ER\alpha36$  levels have clinical significance. The second goal of the study was to assess if CAFs with different  $ER\alpha36$  levels have a significant role in breast cancer.

For the *ESR1* gene aberrations, 418 primary breast tumor samples were used. Methods used to assess the *ESR1* gene copy number were qPCR and fluorescent in situ hybridization (FISH). Expression of two *ESR1* isoforms -  $ER\alpha36$  and  $ER\alpha66$  were assessed using qPCR in 149 samples. CAFs were isolated from fresh breast tumor samples and characterized for  $ER\alpha36$  expression using immunofluorescent staining, four representative CAFs lines were analyzed. Conditioned media from CAFs cultures were used to assess secretome components and the influence of CAFs on BC cell lines MDA-MB-231 and Hs578t using Matrigel 3D assay.

Methods used to assess gene copy number are detecting different aberrations in *ESR1* gene locus. Gene copy number tested by qPCR did not correlate with results obtained by FISH. The expression of two isoforms,  $ER\alpha66$  and  $ER\alpha36$ , showed opposite influence on the patients' survival. High  $ER\alpha66$  levels conferred good prognosis,



whereas high ER $\alpha$ 36 conferred poor prognosis in ER $\alpha$ -positive and ER $\alpha$ -negative breast cancer patients. Breast cancer associated fibroblasts represent distinct subtypes, which might be characterized also by ER $\alpha$ 36 expression. CAFs with high levels of ER $\alpha$ 36 secreted extra set of cytokines, including hepatocyte growth factor (HGF). HGF induced invasive phenotype of TNBC cells *in vitro*. Moreover, high HGF levels conferred poor prognosis of TNBC patients.

Obtained results suggests the significance of ER $\alpha$ 36 isoform in breast cancer cells as well as in breast cancer CAFs. The results shed light on the importance of different estrogen receptor isoforms and their impact on patients outcome.

## Streszczenie

Rak piersi jest jednym z najczęściej występujących nowotworów u kobiet na świecie. Receptor estrogenowy alfa ( $ER\alpha$ , nazywany również  $ER\alpha66$ ), kodowany przez gen *ESR1*, jest czynnikiem transkrypcyjnym o wielkości 66kDa aktywowanym przez ligand. We wcześniejszych badaniach wykonanych przez nasz zespół wykazano, że liczba kopii genu *ESR1* mierzona metodą qPCR jest wysoka również u chorych nie posiadających białka  $ER\alpha66$  w ocenie immunohistochemicznej oraz koreluje z ich gorszym przeżyciem. Obserwowane wyniki mogą wskazywać na obecność innych izoform  $ER\alpha$ . Jedną z nich, izoforma  $ER\alpha36$  o wielkości 36kDa opisywana jest jako niekorzystny czynnik rokowniczy w raku piersi. Ponadto, podczas prowadzonych badań zaobserwowano pozytywne barwienie zrębu guzów pod kątem  $ER\alpha36$ , co zwróciło uwagę na mikrośrodowisko guzów piersi. W kontekście biologii nowotworów litych, mikrośrodowisko guza bierze czynny udział w regulacji wzrostu nowotworu i przerzutowania. Fibroblasty związane z nowotworem (ang. *Cancer Associated Fibroblasts*, CAFs) są najliczniejszą grupą komórek w mikrośrodowisku. Nieliczne badania opisują rolę  $ER\alpha66$  w CAFs, jednak rola izoformy  $ER\alpha36$  w tym typie komórek jest jak dotąd niepoznana.

Niniejsza praca doktorska ma na celu analizę ekspresji izoform kodowanych przez gen *ESR1* i odpowiedzenie na pytanie, czy podwyższona liczba kopii genu *ESR1* obserwowana także u chorych  $ER\alpha66$ -negatywnych jest związana z ekspresją alternatywnej izoformy  $ER\alpha36$  oraz czy poziom izoformy  $ER\alpha36$  ma znaczenie rokownicze. Drugim celem pracy było zbadanie, czy CAFs raka piersi o różnym poziomie  $ER\alpha36$  odgrywają istotną rolę w chorobie.

Do analizy zmian w obrębie genu *ESR1* wykorzystano 418 próbek guzów pierwotnych pobranych od chorych na raka piersi. Zmiany w liczbie kopii genu *ESR1* badano przy pomocy metody qPCR i fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (ang. *Fluorescent In Situ Hybridization*, FISH). Poziom ekspresji obu izoform -  $ER\alpha66$  i  $ER\alpha36$  został oceniony przy użyciu qPCR w 149 próbkach klinicznych. CAFs wyizolowano z guzów chorych na raka piersi i oceniono poziom białka  $ER\alpha36$  barwieniem immunofluorescencyjnym, cztery reprezentatywne linie zostały włączone do badań.

Media kondycjonowane pobrane z hodowli CAFs zostały wykorzystane w analizach sekretomu i wpływu na komórki raka piersi w metodzie wzrostu 3D w matryzeli.

Metody wykorzystywane do badań liczby kopii genu *ESR1* wykrywają różne aberracje w jego obrębie. Liczba kopii genu *ESR1* badana qPCR nie korelowała z wynikami otrzymanymi techniką FISH. Ekspresja ER $\alpha$ 66 i ER $\alpha$ 36 była związana z przeżyciem chorych, ale efekt był odwrotny – wysoki poziom ER $\alpha$ 66 wiązał się z dobrym rokowaniem, a wysoki poziom ER $\alpha$ 36 ze złym rokowaniem zarówno u chorych ER $\alpha$ 66-pozytywnych, jak i ER $\alpha$ 66-negatywnych. CAFs pobrane od chorych na raka piersi mogą wykazywać różny poziom białka ER $\alpha$ 36. CAFs o wysokim poziomie ER $\alpha$ 36 wydzielają dodatkowy zestaw cytokin, m.in. czynnik wzrostu hepatocytów (ang. *Hepatocyte Growth Factor*, HGF), który indukował fenotyp inwazyjny komórek potrójnie-negatywnego raka piersi. Wysoki poziom HGF korelował również z gorszym rokowaniem chorych na potrójnie-negatywnego raka piersi.

Otrzymane wyniki sugerują istotność izoformy ER $\alpha$ 36 zarówno w komórkach nowotworowych jak i CAFs raka piersi oraz zwracają uwagę na złożoność izoform receptora estrogenowego i ich rolę w prognozie chorych na raka piersi.

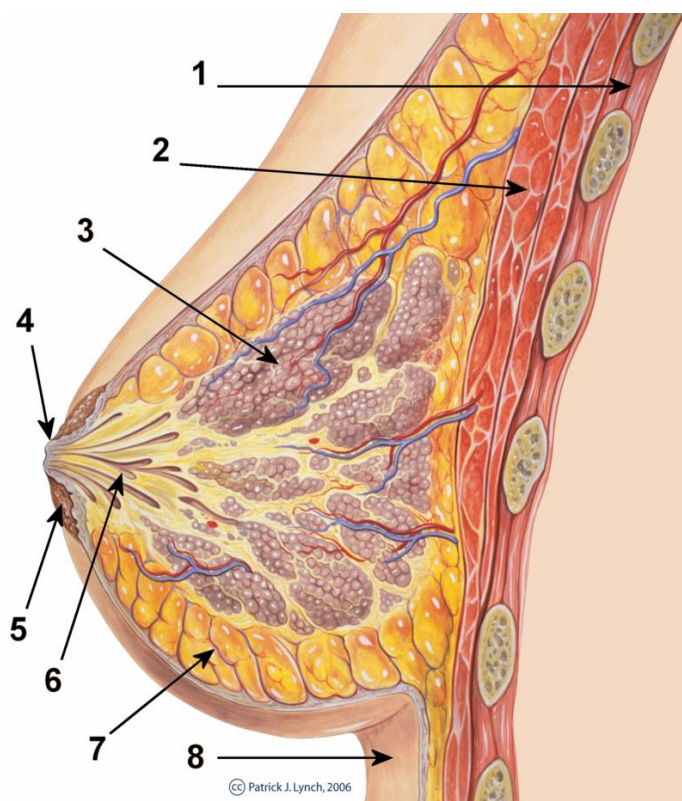
## 2. Wykaz stosowanych skrótów

- CAFs** - Fibroblasty związane z nowotworem (ang. *Cancer Associated Fibroblasts*)
- DBD** - Domena wiążąca DNA (ang. *DNA Binding Domain*)
- DCIS** - Rak przewodowy *in situ*
- DFS** - Przeżycie wolne od choroby (ang. *Disease Free Survival*)
- E2** - Estradiol
- E-CAD** - E-kadheryna (ang. *E-Cadherin*)
- ECM** - Macierz międzykomórkowa (ang. *Extracellular Matrix*)
- EMT** - Tranzycja epitelialno-mezenchymalna (ang. *Epithelial-Mesenchymal Transition*)
- ER $\alpha$**  - Receptor estrogenowy alfa (ang. *Estrogen Receptor Alpha*)
- ERE** - Elementy odpowiedzi na estrogen (ang. *Estrogen Response Elements*)
- ER $\alpha$ 36** - Receptor estrogenowy alfa 36
- ER $\alpha$ 66** - Receptor estrogenowy alfa 66
- FFPE** - Materiał utrwalony w formalinie i zatopiony w parafinie (ang. *formalin-fixed parafin embedded*)
- FISH** - Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (ang. *Fluorescent In Situ Hybridization*)
- HER2** - Receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*)
- HGF** - Czynn timer wzrostu hepatocytów (ang. *Hepatocyte Growth Factor*)
- LBD** - Domena wiążąca ligand (ang. *Ligand Binding Domain*)
- LCIS** - Rak zrazikowy *in situ*
- MAPK** - Kinazy aktywowane mitogenami (ang. *Mitogen-activated Protein Kinases*)
- MMP** - Metaloproteinazy macierzy (ang. *Matrix metalloproteinases*)
- NST** - Rak bez specjalnego typu (ang. *No Special Type*)
- OS** - Przeżycie całkowite (ang. *Overall Survival*)
- PR** - Receptor progesteronowy (ang. *Progesterone Receptor*)
- $\alpha$ SMA** - Aktyna mięśni gładkich alfa (ang. *Alpha Smooth Muscle Actin*)
- TAMs** - Makrofagi związane z nowotworem (ang. *Tumor Associated Macrophages*)
- TF** - Czynn timer transkrypcyjny (ang. *Transcription factor*)
- TNBC** - Potrójnie-negatywny rak piersi (ang. *Triple- Negative Breast cancer*)
- VIM** - Wimentyna (ang. *Vimentin*)

## 3. Wstęp

### 3.1. Budowa gruczołu piersiowego

Piersi położone są na mięśniu piersiowym większym, pokrywając względnie duży obszar u kobiet. Pojedyncza pierś rozciąga się od miejsca tuż pod obojczykiem do pachy i w poprzek do mostka. Zbudowana jest z 15-20 zrazików (płatów), które są właściwie złożonymi gruczołami pęcherzykowymi produkującymi wydzielinę charakterystyczną dla tychże gruczołów. Z każdego z nich uchodzi przewód prowadzący do zatoki, a następnie do brodawki, przez którą wydzielina wydostaje się na zewnątrz (**Rycina 1**)<sup>1,2</sup>. Zarówno zraziki, jak i przewody wyściełane są komórkami nabłonkowymi, z których może rozwinąć się nowotwór. Większość z nich wywodzi się z przewodów (rak przewodowy), a znacznie mniejsza część ze zrazików (rak zrazikowy). W bardzo małym odsetku nowotwory piersi mogą również rozwinąć się z innych tkanek wchodzących w skład budowy piersi, jak na przykład mięsaki z tkanki mięśniowej<sup>3</sup>.



*Rycina 1. Schematyczny rysunek przedstawiający budowę piersi. 1. Ściana klatki piersiowej; 2. Mięśnie piersiowe; 3. Zrazik (płat) piersi; 4. Brodawka sutkowa; 5. Otoczka brodawki sutkowej; 6. Przewód mleczny; 7. Tkanka tłuszczowa piersi; 8. Skóra.*

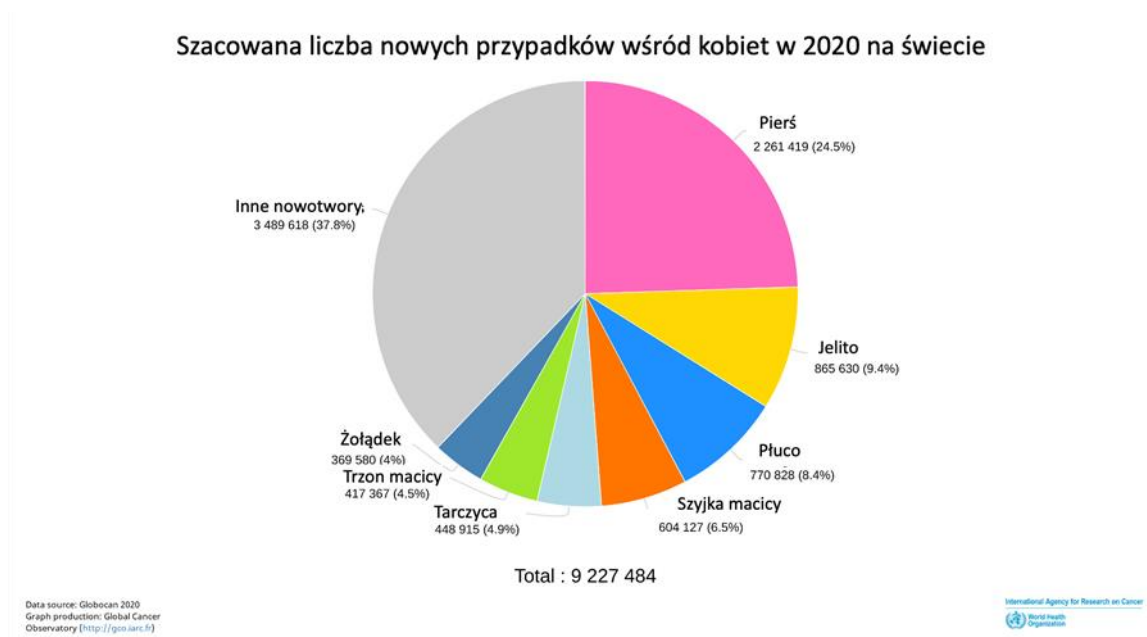
## 3.2. Rak piersi

Rak gruczołu sutkowego (rak piersi) jest nowotworem powstającym z komórek nabłonka gruczołu piersiowego, rozwijającym się miejscowo i mogącym dawać przerzuty do okolicznych węzłów chłonnych, jak i innych narządów wewnętrznych takich jak płuca, kości czy mózg<sup>4</sup>.

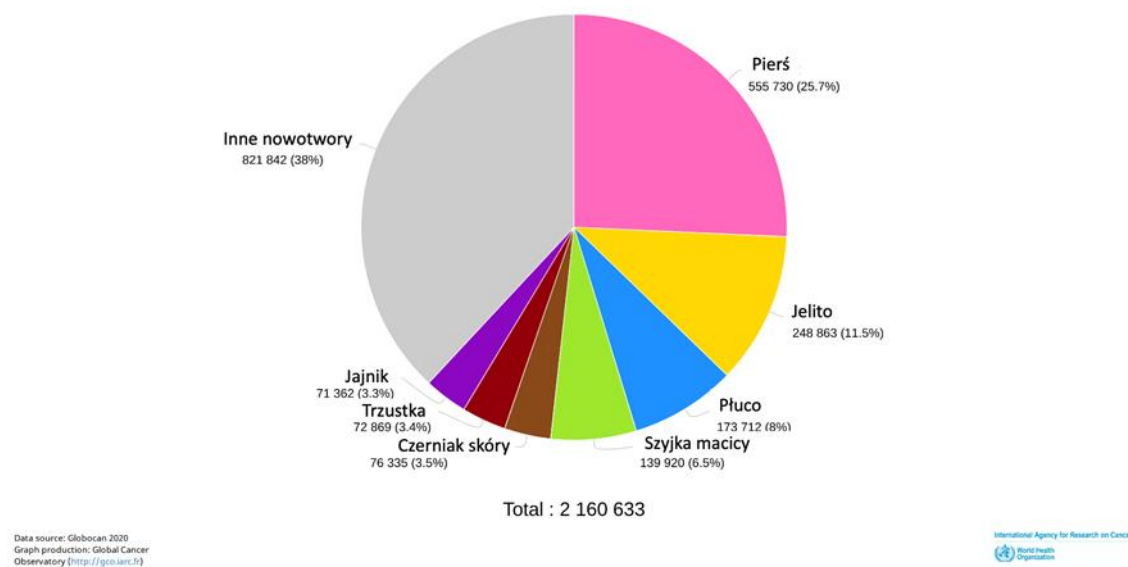
### 3.2.1 Epidemiologia raka piersi

#### 3.2.1.1 Dane statystyczne

W 2020 roku według Światowej Organizacji Zdrowia zanotowano 2 261 419 (24,5% wszystkich chorób nowotworowych) przypadków raka piersi na świecie, z czego 531 086 (25,8%) w Europie i 24 644 (24,2%) w Polsce (Globocan 2020<sup>5,6</sup>, **Rycina 2**). Dane te umiejscawiają raka piersi na pierwszym miejscu, jeśli chodzi o częstotliwość występowania wśród wszystkich chorób nowotworowych u kobiet. Rak piersi jest również jednym z najbardziej śmiertelnych nowotworów wśród kobiet na świecie i w Europie. W Polsce, w roku 2018 zachorowalność na nowotwory piersi stanowiła 22,5% co jest równe 18 869 nowym przypadkom, a nowotwory złośliwe piersi były powodem 6 895 (15%) zgonów nowotworowych u kobiet (najnowsze dane Krajowego Rejestru Nowotworów z roku 2018).



### Szacowana liczba nowych przypadków wśród kobiet w 2020 w Polsce



Rycina 2. Epidemiologia raka piersi na świecie i w Polsce, dane ze strony internetowej WHO (Baza Globocan, 2020<sup>6</sup>).

#### 3.2.1.2 Czynniki ryzyka

Jak dotąd zidentyfikowano wiele czynników predysponujących do zachorowania na raka piersi. Głównym z nich jest płeć biologiczna. Zdecydowana większość zachorowań występuje u kobiet ze względu na budowę ich gruczołu sutkowego oraz wpływ gospodarki hormonalnej, jednak sporadycznie rak piersi może występować również u mężczyzn<sup>7</sup>. Kolejnym bardzo istotnym czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia raka piersi jest wiek. Po pięćdziesiątym roku życia ryzyko wystąpienia nowotworów zdecydowanie wzrasta<sup>8</sup>. Predysponować do raka piersi może również obciążenie genetyczne. Około 5-10% nowotworów piersi ma charakter dziedziczny, a ryzyko wzrasta wraz z liczbą krewnych pierwszego stopnia, u których występowała choroba<sup>9-11</sup>. Jednymi z najlepiej poznanych genów mających znaczenie w nowotworzeniu są geny supresorowe *BRCA1* oraz *BRCA2*. U kobiet przed 70 rokiem życia posiadających wspomniane mutacje, ryzyko wystąpienia raka piersi może wzrosnąć nawet do 80%, a raka jajnika do 40%<sup>10,12</sup>. Innymi genami, których mutacje mogą zwiększać ryzyko zachorowania na raka piersi są *ATM*, *PALB2*, *TP53*, *CHEK2*, *BARD1*, *RAD51C* oraz *RAD51D*<sup>13-15</sup>. Ponadto, również styl życia ma wpływ na zachorowanie na raka piersi. Wyniki badań wskazują na związek częstotliwości występowania raka piersi z

nadmiernym spożywaniem tłuszczu, nadwagą, paleniem papierosów oraz nadmiernym spożywaniem alkoholu<sup>16-19</sup>.

### **3.2.2 Diagnostyka i przebieg**

Objawy klinicznie raka piersi zależą od stadium jego zaawansowania. W początkowych stadiach choroby przebiega ona bezobjawowo, zwykle mały guz rozpoznawany jest podczas samobadania piersi lub podczas badań przesiewowych takich jak ultrasonografia czy mammografia<sup>20</sup>. U większości chorych pierwszym objawem jest niebolesny guz zlokalizowany w kwadrancie górnym zewnętrznym (ok. 35% przypadków), a najrzadziej w kwadrancie dolnym wewnętrznym (ok. 5% przypadków), co wynika z rozmieszczenia tkanki gruczołowej<sup>21</sup>. Innymi objawami mogącymi budzić niepokój są niespodziewany wyciek z brodawki sutkowej, asymetria sutków, wciągnięcia brodawki, obraz skórki pomarańczy, świąd lub pieczenie skóry<sup>22</sup>. Rozwijającemu się nowotworowi piersi bardzo często towarzyszy powiększenie pachowych węzłów chłonnych od strony guza, a w późniejszych etapach również węzłów szyjno-nadobojczykowych<sup>23</sup>. Aby potwierdzić lub wykluczyć raka piersi należy wykonać szereg badań, do których zalicza się badanie palpacyjne, techniki obrazujące (USG, mammografia, czy rezonans magnetyczny), biopsję aspiracyjną cienkoigłową lub biopsję gruboigłową, a w przypadku wycieku z brodawki – galaktografię<sup>21</sup>. Jednym z podstawowych kryteriów klasyfikacji raka piersi jest klasyfikacja TNM stopnia zaawansowania nowotworów, określa ona wielkość guza pierwotnego (T), zajęcie węzłów chłonnych przez nowotwór (N) oraz obecności przerzutów odległych (M). Kolejnym jest ocena patomorfologiczna potwierdzająca obecność komórek nowotworowych oraz klasyfikująca je pod kątem molekularnym<sup>21,24</sup>.

### **3.2.3 Typy morfologiczne raka piersi**

W przypadku klasyfikacji morfologicznej raków piersi ogólnie przyjęta jest mikroskopowa klasyfikacja według Światowej Organizacji Zdrowia.



### 3.2.3.1 Zmiany prekursorowe

#### 3.2.3.1.1 Rak przewodowy in situ (DCIS)

W przypadku tego rodzaju raka piersi, komórki nowotworowe znajdują się jedynie w warstwie wyściełającej przewody mlekowe i nie zajmują żadnych okolicznych tkanek lub innych narządów<sup>25</sup>. DCIS jest najczęstszym rodzajem nieinwazyjnego raka piersi. Jest on niewielkich rozmiarów, przez co jest niewyczuwalny podczas badania palpacyjnego i zwykle wykrywany jest podczas badania mammograficznego w postaci mikro zwapnień. Jest on czynnikiem predysponującym do rozwoju inwazyjnego raka piersi<sup>26</sup>.

#### 3.2.3.1.2 Rak zrazikowy in situ (LCIS)

W tym przypadku, nieprawidłowe komórki tworzą się w zrazikach piersi i nie rozprzestrzeniają się poza ich obręb. Powstaje on zwykle w różnych częściach piersi i często zajmuje obie piersi. Zwykle jest niemożliwy do rozpoznania podczas badania palpacyjnego czy mammografii, wykrywa się go głównie podczas biopsji wykonywanej z innego powodu. U wielu kobiet z LCIS nie dochodzi do rozwoju inwazyjnego raka piersi<sup>27</sup>.

### 3.2.3.2 Naciekający rak piersi

#### 3.2.3.2.1 Rak bez specjalnego typu (NST)

Zwany dawniej rakiem przewodowym inwazyjnym, stanowiąc około 80% raków piersi, jest najczęściej występującym nowotworem inwazyjnym piersi. Powstaje w przewodach mlekowych i rozprzestrzenia się poza margines tkanki, zajmując te okoliczne. Komórki nowotworowe również mogą tworzyć przerzuty do węzłów chłonnych i innych narządów.

#### 3.2.3.2.2 Rak zrazikowy

Zwany także rakiem zrazikowym naciekającym. Występuje znacznie rzadziej (ok. 10% inwazyjnych raków piersi) niż rak bez specjalnego typu. Pochodzi ze zrazików

piersi, a jego komórki nowotworowe wydostają się poza ich obręb. Może również dawać przerzuty do węzłów chłonnych i innych narządów. Może powodować wiele ognisk w jednej piersi, a w porównaniu do innych typów, jest też najczęstszym powodem obustronnego raka piersi. Nie tworzy wyraźnie odgraniczonego guza, zwykle wrasta pasmami w tkankę tłuszczową, przez co jest niezwykle trudny do wykrycia na podstawie mammografii. Badanie ultrasonograficzne bądź rezonans magnetyczny mogą być pomocne w tym przypadku<sup>28</sup>.

#### 3.2.3.2.3 Inne typy naciekających raków piersi

Postaciami naciekającego raka piersi o lepszym rokowaniu są rak cewkowy, sitowaty, śluzowy i rdzeniasty. Rozpoznaje się je w ocenie mikroskopowej, kiedy w obrazie charakterystyczne struktury dla danego typu stanowią ponad 90% utkania<sup>28,29</sup>.

#### 3.2.3.3 Zapalny rak piersi

Jest on rzadkim typem raka piersi (1-4% wszystkich przypadków nowotworu piersi) i nie jest spowodowany zakażeniem bądź stanem zapalnym. Nazwa opisuje wyłącznie wygląd piersi związany z tym typem raka. Powstaje w przewodach mlekowych, a jego komórki przedostają się do okolicznych naczyń limfatycznych, co powoduje typowe dla tego nowotworu objawy, jakimi są: i) miejscowy wzrost temperatury piersi; ii) różowe bądź czerwono-purpurowe zabarwienie skóry; iii) skórę pomarańczową; iv) tkliwość i bolesność; v) świąd piersi bądź brodawki; vi) patologiczna wydzielina z brodawki; vii) powiększone węzły chłonne pachowe. Rak ten może przypominać objawy zapalenia piersi, jeśli objawy nie ustępują po antybiotykoterapii należy wykonać dodatkowe badania<sup>30</sup>.

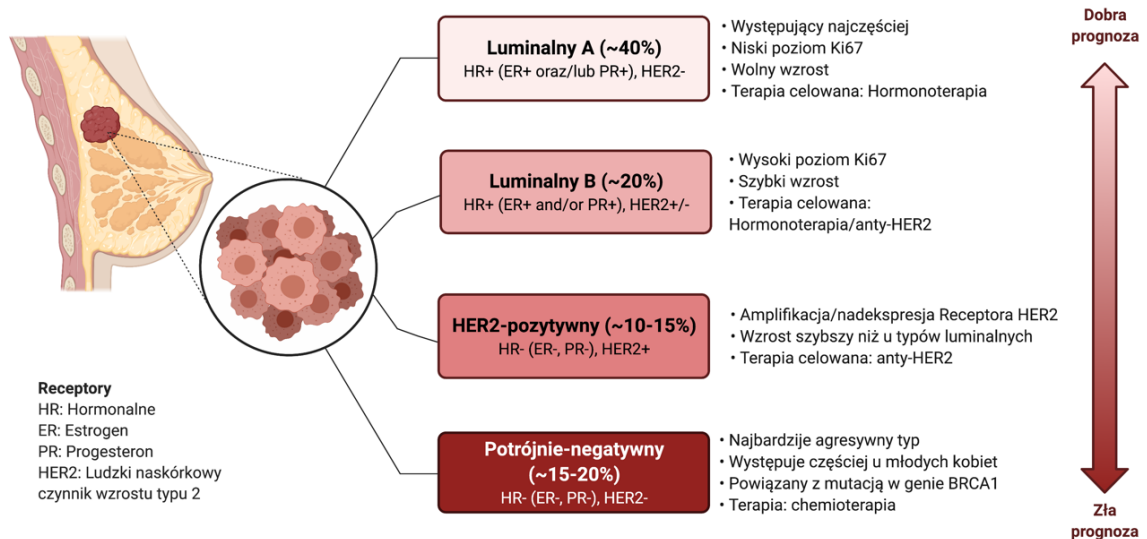
#### 3.2.3.4 Rak Pageta piersi

Choroba Pageta brodawki sutkowej jest jednym z najrzadszych rodzajów raka piersi, objawia się wysypką bądź innymi zmianami skóry brodawki sutkowej. Uważa się, że ten typ raka piersi pierwotnie powstaje w przewodach mlekowych, a jego komórki

przemieszczają się nimi do skóry brodawki sutkowej, rozprzestrzeniając się do otoczki sutkowej. Rak Pageta zwykle współistnieje z innymi nowotworami piersi<sup>31</sup>.

### 3.2.4 Typy molekularne raka piersi

Poza oceną morfologiczną, raki piersi klasyfikuje się również w oparciu o ocenę molekularną wycinka pobranego w trakcie biopsji lub operacyjnie. Na podstawie obecności lub braku markerów molekularnych wyróżnia się cztery podstawowe podtypy raka piersi: luminalny A, luminalny B, HER2, lub potrójnie-negatywny (**Rycina 3**). Głównymi markerami wykorzystywanymi w klasyfikacji molekularnej są: i) receptor estrogenowy alfa (ang. *Estrogen Receptor alpha*, ER $\alpha$ ), a konkretnie jego izoforma o wielkości 66kDa zwana inaczej ER $\alpha$ 66; ii) receptor progesteronowy (ang. *Progesterone Receptor*, PR); iii) receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *Human Epidermal Growth Factor 2*, HER2) oraz iv) współczynnik proliferacji Ki67 (ang. *Ki67 Proliferation Index*)<sup>32,33</sup>.



Rycina 3. Typy molekularne raka piersi i ich charakterystyka.

#### 3.2.4.1 Typ luminalny A

Jest najczęściej występującym typem molekularnym raka piersi. Charakteryzuje się wysokim poziomem jądrowego ER $\alpha$ 66, PR oraz brakiem HER2 i niskim

współczynnikiem Ki67 (poniżej 20% pozytywnych komórek w barwieniu immunohistochemicznym). Zwykle progresja raka piersi o tym typie zachodzi wolno, dzięki czemu rokuje on najlepiej z wszystkich typów molekularnych. Jest również względnie łatwy do kontroli dzięki zastosowaniu hormonoterapii. Chore często nie wymagają dodatkowej chemioterapii<sup>34</sup>.

#### 3.2.4.2 Typ luminalny B

Typ ten charakteryzuje się wysokim poziomem ER $\alpha$ 66 oraz różnym statusem PR, Ki67 i HER2. Wyróżnia się dwa podtypy typu luminalnego B: i) o niskiej ekspresji HER2 oraz wysokim poziomie PR i/lub Ki67; ii) o wysokiej ekspresji HER2 bez względu na poziom PR/Ki67. Rokowanie w tym przypadku jest nieco gorsze niż u chorych na typ luminalny A, a leczenie oparte jest na hormonoterapii, chemioterapii (antracykliny, taksony), jak i na terapii anty-HER2 w przypadku podtypu HER2-dodatniego<sup>35</sup>.

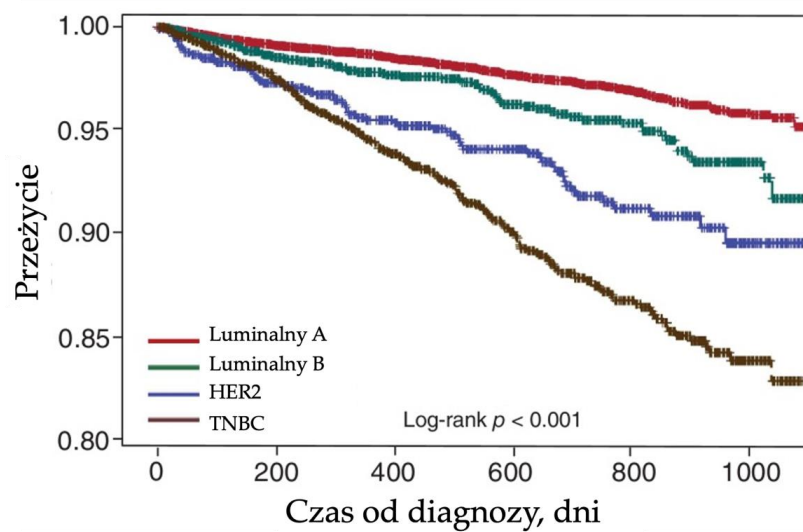
#### 3.2.4.3 Typ HER2-dodatni (nieluminalny)

Charakteryzuje się wysokim poziomem białka HER2 w ocenie immunohistochemicznej bądź amplifikacją genu *HER2* w ocenie FISH (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*; ang. *Fluorescent In Situ Hybridization*). Białko HER2 związane jest z wysoką proliferacją komórek nowotworowych, raki tego typu bez odpowiedniego leczenia rokuje niekorzystnie. Jednak najnowsza terapia polegająca na leczeniu skojarzonym anty-HER2 z chemioterapią, i/lub radioterapią pozwala na uzyskanie zadowalających rezultatów<sup>36</sup>.

#### 3.2.4.4 Potrójnie-negatywny rak piersi

Potrójnie-negatywny rak piersi (*triple-negative breast cancer*, TNBC) charakteryzuje się brakiem receptorów steroidowych (ER $\alpha$ 66 oraz PR), jak i brakiem nadekspresji/amplifikacji genu *HER2*. Wiele raków piersi zaklasyfikowanych jako potrójnie-negatywne, może być również zaklasyfikowane jako bazalne<sup>37</sup>. Rak piersi o typie bazalnym został scharakteryzowany na podstawie profilowania transkryptomowego przy użyciu mikromacierzy, cechuje się brakiem lub bardzo niską

ekspresją ER $\alpha$ 66, brakiem nadekspresji *HER2* oraz ekspresją genów występujących w komórkach podstawnych lub mioepitelialnych piersi. Bazalny i potrójnie-negatywny rak piersi występuje częściej u młodych czarnoskórych kobiet i Latynosek jak i u kobiet otyłych. TNBC stanowi około 15% inwazyjnych raków piersi, charakteryzuje się niekorzystnym przebiegiem klinicznym, wyższym stopniem zaawansowania i złym rokowaniem<sup>38</sup>. U nosicielek mutacji w genie *BRCA1*, aż 75% raków piersi posiada fenotyp potrójnie-negatywny, bazalny lub oba<sup>39</sup>.

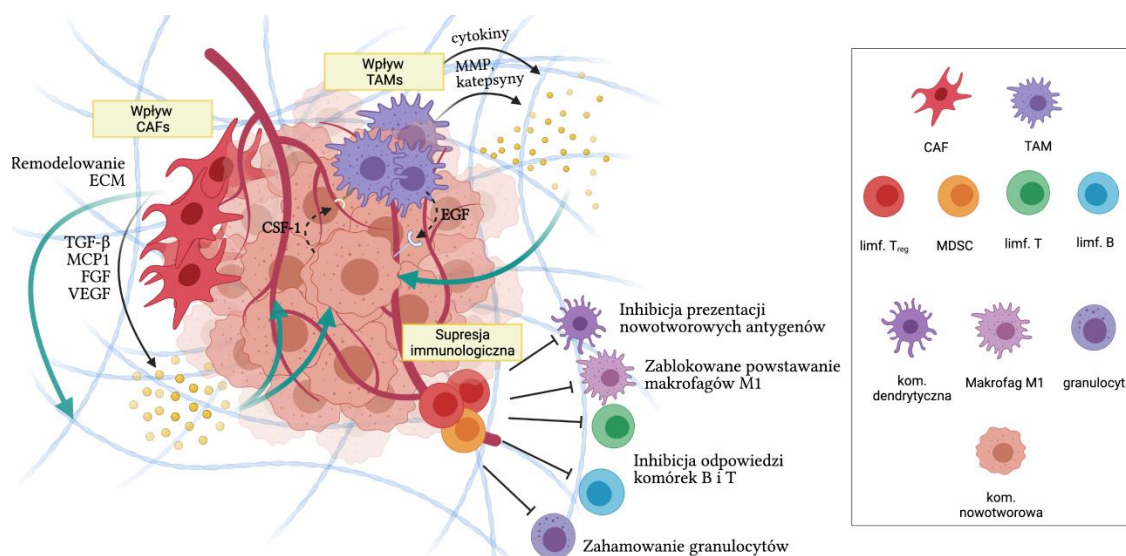


*Rycina 4.* Przeżycie po rozpoznaniu raka piersi zależnie od typu w grupie 26 532 chorych (za Fallahpour et al. 2017<sup>40</sup>).

Chore z potrójnie-negatywnym rakiem piersi rokują zdecydowanie gorzej niż chore z luminalnymi rakami piersi (**Rycina 4**). Co więcej, w odróżnieniu od chorych z HER2-pozytywnym rakiem piersi, nie mogą one czerpać korzyści z dostępnej terapii celowanej<sup>41</sup>. Jedynie chore na przerzutującego potrójnie-negatywnego raka piersi mogą od wiosny tego roku korzystać z terapii Trodelvy (przeciwciało anti-Trop-2 i inhibitor topoizomeraz).

### 3.3 Mikrośrodowisko guza

Mikrośrodowisko guza jest bardzo skomplikowanym ekosystemem, współtworzonym przez komórki o różnym pochodzeniu. Obok proliferujących komórek nowotworowych znajdują się w nim również komórki zrębu: fibroblasty, pericyty, komórki śródbłonna, infiltrujące środowisko guza komórki układu odpornościowego oraz inne komórki okolicznych tkanek<sup>42</sup> (**Rycina 5**). Przez wiele lat badania nad nowotworami skupiały się na samych komórkach nowotworowych, aczkolwiek, wraz z postępem nauki w tym obszarze, odkryto istotną rolę mikrośrodowiska guza i komunikacji w nim zachodzących<sup>43</sup>. Za pionierów badań nad mikrośrodowiskiem guza uważa się Virchowa, który jako pierwszy w 1863 roku opisał związek nowotworu i procesów zapalnych zachodzących w jego obszarze<sup>44</sup> oraz Pageta, który w 1889 roku zaproponował hipotezę „ziarna i gleby” obrazującą komórki nowotworowe jako ziarna, a ich niszę jako podatną glebę, na której mogą rosnać<sup>45</sup>. Wymiana informacji pomiędzy komórkami nowotworowymi a ich otoczeniem może wpływać pozytywnie bądź negatywnie na wzrost guza. Wykazano, że mikrośrodowisko niezaawansowanych guzów, często hamuje ich wzrost, a dopiero w miarę postępu choroby, komórki nowotworowe przeprogramowują mikrośrodowisko na wspierające ich rozrost<sup>46</sup>. W komunikacji biorą udział zarówno produkty sekrecji komórek, którymi są cytokiny, chemokiny oraz metabolity, jak i różne procesy zachodzące w mikrośrodowisku guza, włączając w to hipoksję, angiogenezę, remodelowanie macierzy międzykomórkowej, zmiany ciśnienia śródmiąższowego, jak i pH. Wszystkie wymienione sygnały i procesy mają znaczący wpływ na rozwój choroby i jej heterogenność, przez co mikrośrodowisko guza stało się istotnym źródłem dla potencjalnych celów nowych terapii antynowotworowych<sup>47</sup>.



**Rycina 5.** Schemat przedstawiający mikrośrodowisko nowotworowe. Zaznaczono trzy główne wpływy mikrośrodowiska na progresję nowotworową: i) Wpływ fibroblastów związanych z nowotworem (ang. Cancer Associated Fibroblasts, CAFs) na proliferację (transformujący czynnik wzrostu beta (ang. Transforming Growth Factor beta, TGF $\beta$ ), czynnik wzrostu fibroblastów (ang. Fibroblast Growth Factor, FGF), angiogenezę (czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)), rekrutację makrofagów (białko chemotaktyczne monocytów (ang. Monocyte Chemoattractant Protein-1, MCP1)) oraz remodelowanie macierzy międzykomórkowej (ang. Extracellular Matrix, ECM); ii) Wpływ makrofagów związanych z nowotworem (ang. Tumor Associated Macrophages, TAMs) na proliferację komórek nowotworowych (cytokiny), degradacji macierzy międzykomórkowej przez metaloproteinazy (ang. Matrix Metalloproteinases, MMP), proliferację makrofagów (katepsyny) oraz iii) Supresję immunologiczną wywołaną komórkami T<sub>reg</sub> i mieloidalnymi komórkami supresorowymi (ang. Myeloid-Derived-Suppressor cells, MDSC). (Zaadaptowane od Parayath et al., 2020).

### 3.3.1 Fibroblasty związane z nowotworem

Najliczniejszą grupą komórek w mikrośrodowisku guzów litych są fibroblasty związane z nowotworem (ang. Cancer Associated Fibroblasts, CAFs). Termin ten odnosi się do grupy komórek o właściwościach podobnych do komórek mezenchymalnych, które znajdują się w zrębie guza oraz mogą bezpośrednio oddziaływać z komórkami nowotworowymi<sup>48-50</sup>. Większość badań opisuje CAFs jako komórki produkujące cytokiny, chemokiny, enzymy oraz macierz międzykomórkową, które promują wzrost komórek nowotworowych<sup>49</sup>. Ze względu na wysoką heterogenność tych komórek, do

dziś trwa debata nad źródłami ich pochodzenia, poprawnością markerów używanych do ich identyfikacji oraz nad ich rolą w progresji nowotworów.

### 3.3.1.1 Pochodzenie i charakterystyka CAFs

Znakomita większość CAFs najprawdopodobniej wywodzi się z komórek prekursorowych pochodzenia mezodermalnego, chociaż pochodzenie CAFs w konkretnym guzie nie jest w pełni poznane i uważa się, że najprawdopodobniej są one mieszaniną CAFs pochodzących z różnych źródeł<sup>51</sup>. Jednym z nich jest okoliczna tkanka, w której rozwija się nowotwór, powodując proliferację i aktywację fibroblastów w odpowiedzi na mechanizm powstawania rany. Innym ich źródłem mogą być fibroblasty rekrutowane przez komórki nowotworowe ze szpiku kostnego<sup>49,52</sup>. Również przemiana epitelialno-mezenchymalna (*Epithelial-to-mesenchymal Transition*, EMT) lub trans-różnicowanie pericytów mogą dać początek hybrydom komórkowym przypominającym CAFs<sup>53</sup>.

Ze względu na różne pochodzenie, bardzo trudno jednoznacznie sklasyfikować CAFs. Nawet najnowsze metody mapowania genowego z wykorzystaniem modeli mysich z indukowanymi nowotworami nie dały jednoznacznych odpowiedzi<sup>54,55</sup>. Aktualnie akceptowalną metodą definiowania CAFs jest połączenie cech morfologicznych, ekspresji biomarkerów i brak mutacji genetycznych. Populacje komórek izolowane z guzów powinny mieć wydłużony, wrzecionowaty kształt, być względnie łatwe w izolacji i charakteryzować się wysokim poziomem proliferacji. W odróżnieniu od komórek nowotworowych i innych komórek w mikrośrodowisku guza, powinny być negatywne pod kątem ekspresji markerów epitelialnych, takich jak cytokeratyny oraz markerów endotelialnych czy leukocytarnych. Natomiast powinny być pozytywne pod kątem ekspresji markerów mezenchymalnych takich jak wimentyna (ang. *Vimentin*, VIM)<sup>56,57</sup>, alfa aktyna mięśni gładkich (ang. *Alpha Smooth Muscle Actin*,  $\alpha$ SMA). Kolejnymi markerami pomocnymi w identyfikacji CAFs są białko aktywacji fibroblastów (ang. *fibroblast activation protein*, FAP) czy płytkopochodny czynnik wzrostu alfa (ang. *Platelet-derived Growth Factor Alpha*, PDGF- $\alpha$ )<sup>58</sup>. Wysoka heterogenność CAFs między różnymi typami nowotworów, jak i w obrębie tej samej jednostki chorobowej, rzuca wielkie wyzwanie dla poznania ich roli w progresji



nowotworów, która najprawdopodobniej jest wielowymiarowa i zależy ściśle od typu i zaawansowania nowotworu<sup>59-61</sup>.

### 3.3.1.2 Funkcje CAFs

CAFs mogą pełnić zarówno funkcje hamujące, jak i stymulujące progresję nowotworową. Komunikacja pomiędzy CAFs a komórkami nowotworowymi powinna być rozpatrywana jako skomplikowana sieć połączeń. Właściwości CAFs promujące wzrost nowotworu głównie zależą od ich zmienionego sekretomu. Cytokiny i czynniki wzrostu takie jak CXCL12<sup>62,63</sup>, CCL7<sup>64</sup>, transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *Transforming Growth Factor beta*, TGF $\beta$ )<sup>65,66</sup>, czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *Fibroblast Growth Factor*, FGF)<sup>67,68</sup> czy czynnik wzrostu hepatocytów (ang. *Hepatocyte Growth factor*, HGF)<sup>69-71</sup> mogą bezpośrednio wpływać na komórki nowotworowe, indukując ich proliferację, macierzystość i inwazyjność, jak i powodować oporność na terapię<sup>72</sup>. CAFs są również odpowiedzialne za waskularyzację guza, wydzielając czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), FGF, czy IL-6 oraz remodelując macierz międzykomórkową za pomocą metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (ang. *Matrix Metalloproteinases*, MMP) oraz białek macierzy<sup>49,73,74</sup>. Wspomniane wcześniej cytokiny biorą również udział w sprzężeniu zwrotnym, pozytywnie regulując dalszą aktywację fibroblastów w niszy<sup>49,75</sup>. Kolejną funkcją CAFs mogącą wpływać na progresję nowotworu jest ich rola w kreowaniu swoistego mikrośrodowiska metabolicznego. Kilka badań wskazuje na to, że zarówno ciała ketonowe jak i mleczanowe wytwarzane przez CAFs mogą wspierać wzrost i proliferację nowotworu<sup>76,77</sup> oraz komórki immunologiczne w mikrośrodowisku guza, szczególnie limfocyty<sup>78,79</sup>.

Funkcje antynowotworowe CAFs w głównej mierze polegają na regulowaniu supresji nowotworowej. Eliminacja  $\alpha$ SMA-pozytywnych CAFs z mikrośrodowiska raka trzustki pokazała, że wykazują one również właściwości hamujące rozrost guza, mianowicie usunięcie  $\alpha$ SMA-pozytywnych CAFs spowodowało wzrost inwazyjności oraz hipoksji w obrębie guza<sup>80</sup>. Sekretom fibroblastów związanych z nowotworem obejmujący między innymi IL-10, TGF $\beta$ , IFN $\gamma$  i IL-6 może również wpływać na rekrutację i polaryzację makrofagów, komórek NK (ang. *Natural Killer*) i komórek T, które odpowiedzialne są za kontrolę immunologiczną nowotworu<sup>81</sup>.

### 3.3.1.3 CAFs w raku piersi

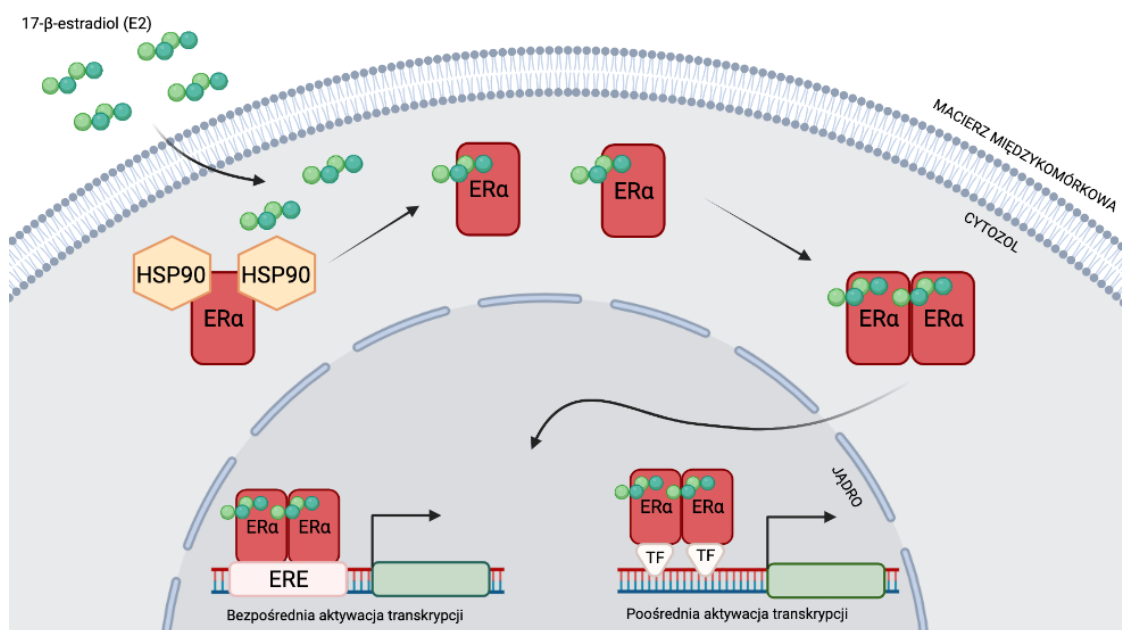
CAFs w raku piersi są przedmiotem ciągłych badań. Wysoki poziom  $\alpha$ SMA związany jest z agresywnymi postaciami choroby oraz koreluje ze złym rokowaniem<sup>82</sup>. Costa z zespołem wykazała, że CAFs w raku piersi można podzielić na cztery podtypy ze względu na obecność takich białek jak CD29 (ang. *Integrin Beta 1*), FAP, FSP1 (ang. *Fibroblast-specific Protein 1*),  $\alpha$ SMA, PDGFR $\beta$ , CAV1 (ang. *Caveolin*) czy DPP4 (ang. *Dipeptidyl Peptidase 4*). Podtypy te obserwowane były w różnych typach biologicznych raka piersi. Dwa podtypy, CAF-S1 (CD29<sup>Med</sup> FAP<sup>Hi</sup> FSP1<sup>Med</sup>  $\alpha$ SMA<sup>Hi</sup> PDGFR $\beta$ <sup>Med-Hi</sup> CAV1<sup>Low</sup>) i CAFs-S4 (CD29<sup>Hi</sup> FAP<sup>Neg</sup> FSP1<sup>Low-Med</sup>  $\alpha$ SMA<sup>Hi</sup> PDGFR $\beta$ <sup>Low-Med</sup>.CAV1<sup>Low</sup>) były częściej obserwowane w agresywnych rakach piersi (HER2-dodatnich i potrójnie-negatywnych) oraz promowały środowisko immunosupresyjne poprzez rekrutację limfocytów T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> poprzez sekrecję CXCL12<sup>83</sup>. Kolejne badania skupiające się na ocenie profilu ekspresji genów CAFs w różnych typach biologicznych raka piersi wykazały, że w typie HER2-dodatnim i potrójnie-negatywnym podwyższonej ekspresji podlegają geny związane z aktywnością integrzyn oraz z białkami cytoszkieletu<sup>84</sup>. Sugerują one rolę CAFs w indukcji migracji komórek raka piersi, co może przyczyniać się do niekorzystnej prognozy szczególnie u chorych na HER2-dodatniego i potrójnie-negatywnego raka piersi. Innym przykładem działania CAFs promującego progresję raka piersi, jest wydzielanie VEGF pod wpływem hipoksji na drodze sygnalizacji HIF-1 $\alpha$ /GPER<sup>85</sup>. Prowadzi to do waskularyzacji guza i jego progresji. Kolejne badania przeprowadzone na potrójnie-negatywnym raku piersi wykazały, że CAFs pozytywne pod kątem liganda programowanej śmierci (ang. *Programmed Death Ligand*, PD-L1) istotnie korelują z lepszym przeżyciem chorych<sup>86</sup>.

## 3.4 Receptor Estrogenowy

Klasyczna, jądrowa sygnalizacja estrogenowa pełni bardzo istotną funkcję w rozwoju organizmu zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn, obejmując układ krwionośny, mięśniowy, immunologiczny czy nerwowy<sup>87</sup>. Najbardziej aktywnym z estrogenów jest 17 $\beta$ -estradiol (E2). Estrogen, obok progesteronu, odgrywa kluczową rolę w rozwoju piersi u kobiet, stymulując wzrost gruczołów mlekowych podczas dojrzewania płciowego<sup>88</sup>. Receptor estrogenowy alfa (ER $\alpha$ ) został opisany po raz pierwszy w latach

sześćdziesiątych przez Elwooda Jensena<sup>89</sup>. ER $\alpha$  kodowany jest przez gen *ESR1* znajdujący się na chromosomie 6q25, należy do rodziny receptorów jądrowych, jest czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym przez ligand E2 i jak wiele innych białek z rodziny, posiada kilka domen o różnej strukturze: i) domena wiążąca DNA (ang. *DNA Binding Domain*, DBD), centralna i najbardziej konserwowana ewolucyjnie, posiadająca dwa palce cynkowe i odpowiedzialna za rozpoznanie i związanie się ze specyficzną sekwencją DNA; ii) domena wiążąca ligand (ang. *Ligand Binding Domain*, LBD), odpowiedzialna za wiązanie z ligandem; iii) domeny transaktywacji (ang. *Activation Function*, AF), AF-1 na końcu N' oraz AF2 na końcu C'.

E2 jako hormon steroidowy przenika przez błonę komórkową, aby połączyć się z ER $\alpha$  w cytoplazmie i tym sposobem spowodować translokację ER $\alpha$  do jądra i przyłączenie się do elementów odpowiedzi na estrogeny (ang. *Estrogen Responsive Elements*, ERE), czyli specyficznych sekwencji DNA w obrębie promotorów genów (sygnalizacja bezpośrednia) lub oddziaływać z innymi czynnikami transkrypcyjnymi (sygnalizacja pośrednia, **Rycina 6**)<sup>90,91</sup>.



**Rycina 6.** Klasyczna sygnalizacja E2 w komórce. Estradiol przechodzi przez błonę komórkową i łączy się z ER $\alpha$ , który następnie ulega dimeryzacji i wchodzi do jądra. W jądrze komórkowym może pośrednio przy pomocy innych czynników transkrypcyjnych (ang. *Transcription Factors*, TF) lub bezpośrednio aktywować ekspresję wykorzystując elementy ERE (ang. *Estrogen Responsive Elements*). HSP90 – białko opiekuńcze.

### 3.4.1 ER $\alpha$ w raku piersi

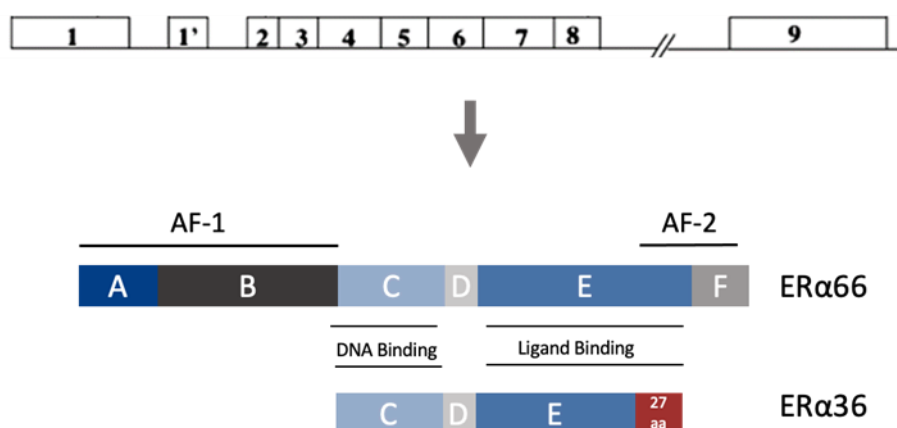
Sygnalizacja zachodząca za pośrednictwem ER $\alpha$  prowadzi do proliferacji komórek podczas rozwoju piersi. Proces ten został przechwycony przez komórki nowotworowe do indukcji niekontrolowanego wzrostu i w efekcie do progresji choroby<sup>92</sup>. Obecnie wykorzystuje się metody immunohistochemiczne, aby ocenić obecność białka ER $\alpha$  w wycinkach piersi pobranych operacyjnie lub podczas biopsji podczas diagnozy raka piersi<sup>93</sup>. Obecność ER $\alpha$ , jak opisano we wcześniejszych podrozdziałach tej pracy (3.2.4 Typy molekularne raka piersi), predysponuje do konkretnej terapii z wykorzystaniem tamoksyfenu bądź fulwestrantu blokujących sygnalizację ER $\alpha$ <sup>21</sup>.

Również zmiany w obrębie genu *ESR1*, takie jak amplifikacje lub zmiany w ekspresji genu mogą być pomocnym indykatorem w analizie obecności ER $\alpha$  w raku piersi<sup>94</sup>. Amplifikacja genu, czyli wzrost liczby kopii danego genu powoduje wzrost ilości jego produktu. W przypadku takich genów jak *ESR1*, efektem może być wzrost odpowiedzi na E2, a zatem podwyższona proliferacja komórek nowotworowych<sup>95</sup>. Holst wraz ze współpracownikami, przeprowadził badania nad amplifikacją genu *ESR1* jako czynnika rokowniczego przy użyciu techniki FISH i odkrył amplifikację u 20,6% chorych, chociaż kolejne badania przy użyciu MLPA (ang. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) wykazały, że to zaburzenie występuje zdecydowanie rzadziej (około 2%)<sup>94</sup>. Ogólnie, zależnie od użytej metody (Southern blot, FISH, mikromacierze czy MLPA) badania wykazały rozbieżność między częstością amplifikacji *ESR1* u chorych na raka piersi pomiędzy 0 a 75%<sup>96</sup>. Wydaje się, że skuteczniejszą metodą niż FISH może być PCR w czasie rzeczywistym (qPCR), która umożliwia wykrywanie dyskretniejszych zmian w obrębie genu. Markiewicz wraz ze współpracownikami, zbadali poziom kopii genu *ESR1* przy użyciu techniki qPCR i wykazali, że może ona występować również u chorych zakwalifikowanych na podstawie badania immunohistochemicznego jako ER $\alpha$ -negatywne<sup>97</sup>. Ponadto, podwyższona liczba kopii genu korelowała z czasem przeżycia wolnym od choroby w tej grupie. Wynik ten zwrócił naszą uwagę ze względu na rozbieżność między liczbą kopii genu *ESR1* a obecnością białka ER $\alpha$  będącego jego produktem. Należy w tym momencie wspomnieć o tym, że większość przeciwciał monoklonalnych używanych do detekcji ER $\alpha$  w tkankach raka piersi chorych, wykrywa „klasyczną” izoformę tego receptora o wielkości 66kDa (stąd alternatywna nazwa dla tej izoformy: ER $\alpha$ 66) i pełniącą funkcję we wcześniej opisanej klasycznej sygnalizacji. Zatem próby korelacji liczby kopii genu *ESR1* z poziomem białka ER $\alpha$ 66 mogły nie

przynosić spodziewanych wyników, ponieważ nie brały pod uwagę obecności innych izoform ER $\alpha$ .

### 3.4.2 Izofорма $\alpha$ 36 receptora estrogenowego

W 2005 Wang et. al odkryli nową izoformę ER $\alpha$ , która powstaje podczas alternatywnego składania mRNA genu *ESR1* obejmując egzon 2 do 6, omijając egzon 7 oraz 8, przez co nie posiada obu domen transaktywacji, AF-1 oraz AF-2, zachowując domenę wiązania z DNA (DBD), część domeny wiążącej ligand (LBD) i co istotne, 138 aminokwasów na końcu C, zastąpione jest przez unikalną 27-aminokwasową sekwencję na końcu, dzięki dodatkowemu egzonowi 9, co może zwiększać zakres ligandów, z którymi może się łączyć (**Rycina 7**)<sup>98</sup>.

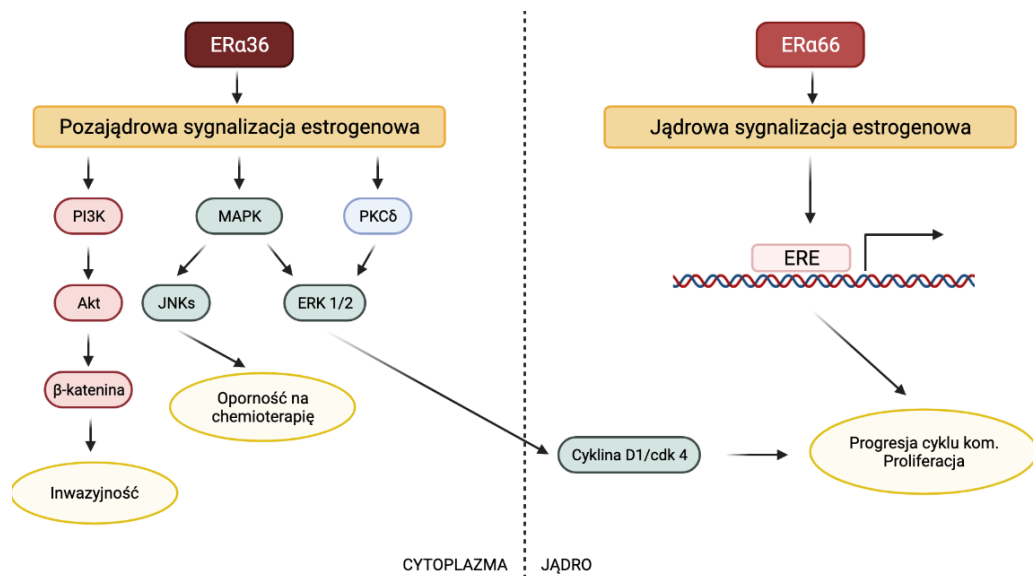


*Rycina 7. Schematyczne przedstawienie powstania izoform ER $\alpha$ 66 i ER $\alpha$ 36 na drodze alternatywnego składania transkryptu genu *ESR1*, na czerwono zaznaczono unikalny 27-aminokwasowy fragment izoformy ER $\alpha$ 36. (Zaadaptowane z Wang et al.; 2015); AF1 – domena aktywacji 1 (ang. Activation Function 1), AF-2 – domena aktywacji 2 (ang. Activation Function 2), 1-9 – schematyczne przedstawienie transkryptu mRNA, A-F – domeny białka.*

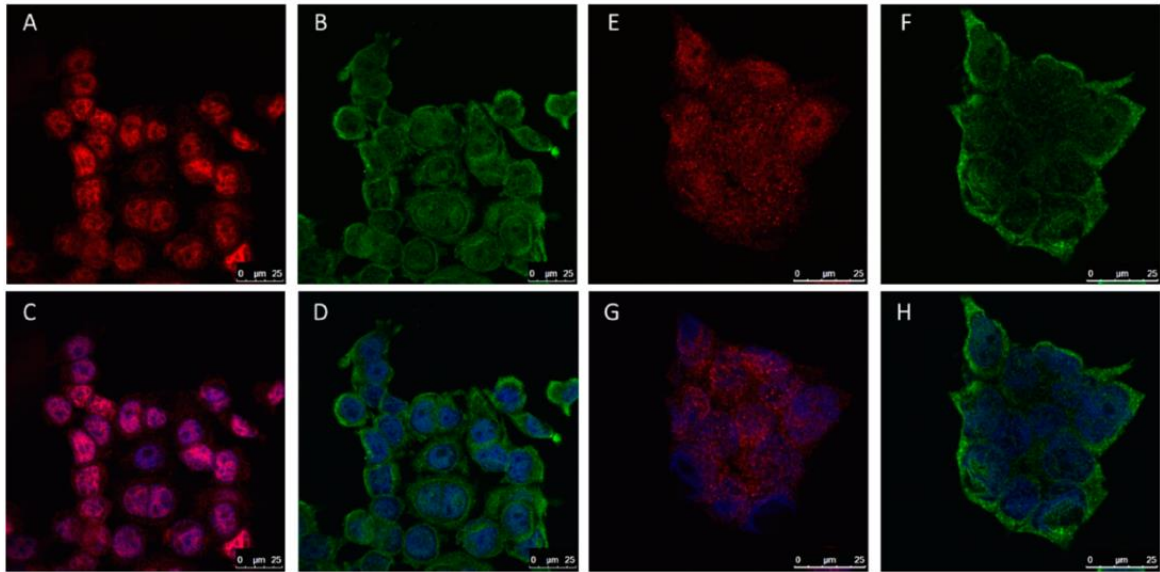
Pomimo tego, iż udowodniono, że ER $\alpha$ 36 występuje zarówno u ER-negatywnych, jak i ER-pozytywnych chorych, nadekspresji ER $\alpha$ 36 często towarzyszy spadek poziomu ekspresji ER $\alpha$ 66, co sugeruje, że obie izoformy mogą wzajemnie się regulować<sup>99,100</sup>. ER $\alpha$ 36 jest białkiem znajdującym się głównie w błonie komórkowej lub cytoplazmie, a jego unikalna struktura i lokalizacja determinują jego funkcję molekularną. Posiada tę

samą DBD co ER $\alpha$ 66, ale najprawdopodobniej nie wykazuje funkcji aktywacji transkrypcji, ER $\alpha$ 36 może rywalizować z klasyczną izoformą ER $\alpha$ 66 o miejsce wiązania i tym sposobem hamować ekspresję genów<sup>100</sup>. Poza tym, błonowy ER $\alpha$ 36 bierze udział w szybkiej, pozajądrowej estrogenowej kaskadzie sygnalizacji, która reguluje istotne funkcje komórkowe biorące udział w progresji nowotworowej. Mediatorem w tej sygnalizacji są kinazy aktywowane mitogenami (kinazy MAPK), które stanowią jeden z najważniejszych szlaków sygnałowych w komórkach nowotworowych w odpowiedzi na różne czynniki, w tym E2<sup>101</sup>. Badania przeprowadzone przed Tong et. al wykazały, że ER $\alpha$ 36 może aktywować kinazy MAPK poprzez szlak kinazy białkowej C delta (PKC $\delta$ ), prowadząc do wzrostu ekspresji cykliny D1/CDK4 i tym samym regulować cykl komórkowy, prowadząc do szybszej proliferacji<sup>102</sup> (**Rycina 8. A**). Ponadto, ER $\alpha$ 36 bierze udział w nabyciu oporności na paklitaksel przez komórki nowotworowe za pośrednictwem kinaz JNK<sup>103</sup>. Kolejnym szlakiem sygnalizacyjnym indukowanym przez ER $\alpha$ 36 jest szlak PI3k-Akt, prowadzący do progresji nowotworu, wzrostu inwazyjności komórek nowotworowych oraz do powstania i utrzymania nowotworowych komórek macierzystych (**Rycina 8**). Z tego powodu, ER $\alpha$ 36 jest obiecującym kandydatem na cel nowych terapii przeciwnowotworowych.

A



B



*Rycina 8. A. Schemat przedstawiający szybką sygnalizację pozajądrową inicjowaną przez ER $\alpha$ 36 i jądrową, klasyczną sygnalizację inicjowaną przez ER $\alpha$ 66; B. Barwienia fluorescencyjne uwidaczniające ER $\alpha$ 66 (czerwony sygnał, a i e), ER $\alpha$ 36 (zielony sygnał b i f), oraz ich kolokalizację z DNA (niebieski sygnał, c, d, g i h) w dwóch liniach komórkowych raka piersi (MCF-7 (a-d) i BT474 (e-h)) (Nagel et. al. 2019).*

## 4. Cele pracy

Pomimo tego, iż receptor estrogenowy jest jednym z najlepiej poznanych markerów w raku piersi, badania nad usprawnieniem metodologii jego oznaczania nadal trwają. W ich wyniku zauważono pewne sprzeczne dane wynikające z użycia różnym metod analizy poziomu genu *ESR1*. Wcześniejsze badania naszego zespołu wykazały znaczenie prognostyczne podwyższonej liczby kopii genu *ESR1* badanej metodą qPCR również u chorych nie sklasyfikowanych jako ER-pozytywne.

Celem niniejszej pracy doktorskiej była analiza ekspresji izoform kodowanych przez gen *ESR1* i odpowiedzenie na pytanie, czy podwyższona liczba kopii genu *ESR1*, obserwowana również u chorych z normalną ilością białka ER $\alpha$ 66, jest związana z ekspresją alternatywnej izoformy genu - ER $\alpha$ 36.

Ponadto, podczas badań skrawków guzów raka piersi barwionych przeciwciałami skierowanymi przeciwko izoformie ER $\alpha$ 36 zaobserwowano pozytywne barwienie komórek w zrębie. Wynik ten zainspirował do dalszych badań w kierunku oceny roli ER $\alpha$ 36 w CAFs ze względu na wysoki potencjał udziału mikrośrodowiska w progresji nowotworu.

Weryfikowano następujące hipotezy badawcze:

1. Podwyższona liczba kopii genu *ESR1* u chorych na raka piersi związana jest z powstawaniem różnych izoform białka ER $\alpha$ , które mają znaczenie rokownicze;

2. CAFs o wysokim poziomie izoformy ER $\alpha$ 36 są niekorzystną pod względem rokowniczym składową mikrośrodowiska guzów raka piersi.

W tym celu zrealizowano poniższe zadania badawcze:

1. Zbadanie aberracji (technikami qPCR i FISH) w obrębie genu kodującego receptor estrogenowy (*ESR1*) i analiza ekspresji izoform receptora estrogenowego ER $\alpha$ 36 i ER $\alpha$ 66 u chorych na raka piersi oraz ocena ich korelacji z danymi klinicznymi;

2. Analiza poziomu izoformy ER $\alpha$ 36 w CAFs raka piersi i jego korelacja z danymi klinicznymi;

3. Izolacja CAFs z guzów chorych na raka piersi oraz ich profilowanie pod kątem ekspresji genów i produkcji cytokin;

4. Badanie wpływu CAFs na agresywność komórek nowotworowych raka piersi.



## 5. Materiały

### 5.1 Linie komórkowe

- Linie MDA-MB-231 i Hs578t zostały zakupione z ATCC

### 5.2 Pożywki i dodatki do pożywek stosowane w hodowli komórkowej

- Sigma-Aldrich: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), FBS (Fetal Bovine Serum, płodowa surowica bydlęca), Insulina
- Czynniki wzrostu firmy PeproTech: CXCL5 (300-22); firmy STI: VEGF (CYT-10-10), IL-8 (chm-231-a), HGF (cyt-090-a), GM-CSM (cyt-221-a), CXCL1 (100-031S);
- Inhibitor c-Met firmy Selleckchem: Capmatinib (S2788)
- 100x Penicillin/Streptomycin Solution (Sigma Aldrich)
- 100x Antibiotic/Antimycotic solution (Sigma Aldrich)

### 5.3 Inne odczynniki stosowane w hodowli komórkowej

- Trypsyna (Sigma-Aldrich)
- PBS (Phosphate Buffered Saline, buforowana sól fizjologiczna) (Sigma-Aldrich)
- Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced Matrigel (mieszanina białek błony podstawnej) (BD Bioscience)
- Kolagenaza (Sigma Aldrich)
- Hialuronidaza (Sigma Aldrich)

### 5.4 Przeciwciała

#### 5.4.1 Przeciwciała pierwszorzędowe

- Cell Signaling Technology: anty-c-Met-Tyr1234/1235 (#3077), anty-c-Met (#4560), anty-Akt-Ser473 (#4058), anty-Akt (#9272), anty-ERK1/2-Thr202/Tyr204 (#9101), anty-ERK (#4695)

- Dako Agilent: anty- $\alpha$ SMA (IR611)
- Novus Biologicals: anty-Vimentin (NBP1-31327)
- Cell applications: anty-ER $\alpha$ 36 (CY-1109)
- BD: anty-E-cadherin (Clone 36, 610181)

#### 5.4.2 Przeciwciała drugorzędowe

- Sigma-Aldrich: kozie anty-królicze przeciwciała skoniugowane z peroksydazą chrzanową (HRP, horseradish peroxidase) (A9169)
- Santa Cruz Biotechnology: bydłęce anty-mysie przeciwciała skoniugowane z peroksydazą chrzanową (sc-2371),
- Jackson ImmunoResearch: kozie anty-królicze przeciwciała AffiniPure DyLight 488-conjugated (111-485-003), owcze anty-mysie przeciwciała AffiniPure DyLight 549-conjugated (515-505-003)

#### 5.5 Bufory i roztwory

- PBS, 7,4 pH (10x stężony „stock” w wodzie destylowanej, 1000 ml):
  - 80 g NaCl
  - 2 g KCl
  - 26,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O
  - 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Bufor do elektroforezy SDS-PAGE (10x stężony „stock” w wodzie destylowanej, 1000 ml):
  - 144,3 g glicyna
  - 10 g SDS
  - 30,3 g Tris-HCl
- Bufor Laemmli (4x stężony w wodzie destylowanej):
  - 8% SDS
  - 0.25 M Tris-HCl
  - 20% glicerol

- 20%  $\beta$ -merkaptoetanol
- błękit bromofenolowy (opcjonalnie)
- Bufor do transferu (w wodzie destylowanej, 1000 ml):
  - 14,43 g glicyna
  - 3,03 g Tris-HCl
  - 10% metanol
- TBS (Tris-buffer solution) (10x stężony w wodzie destylowanej, 1000 ml):
  - 60,3 g Tris-HCl
  - 87,6 g NaCl
- TBS-T:
  - TBS + 0.2% Tween20

## 5.6 Inne odczynniki

- Zestaw do pomiaru stężenia białka – BCA Protein Assay (Thermo Scientific)
- APS (ammonium persulfate), 10% roztwór wodny (Sigma-Aldrich)
- TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine) (Sigma-Aldrich)
- TGX PreCast Gels (BioRad)
- marker białkowy, zakres 7-175 kDa (BioLabs)
- BSA (bovine serum albumine, albumina surowicy bydłowej) (Roth)
- substrat do detekcji HRP - Amersham Western Blotting Substrate (GE Healthcare)
- 2% paraformaldehyd
- 1% TritonX-100 (Sigma-Aldrich)
- Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich)
- Fluoromount, mounting reagent (Sigma-Aldrich)
- Bufor RIPA 10x (Cell Signaling Technology)
- Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

- RNeasy Mini Kit (Qiagen)
- AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen)
- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)
- ZymoLight SPEC *ESR1*/CEN 6 Dual Color Probe (ZytoVision)
- Tissue Implementation Kit (ZytoVision, Niemcy)
- Novolink Max-Polymer Detection System (Leica Novocastra)
- nCounter PanCancer Immune Profiling Panel (NanoString Technologies)
- Antibody Diluent (Dako)
- Inhibitory proteaz i fosfataz (Thermo Fisher)
- Human XL Cytokine Array Kit (R&D Systems)

### 5.7 Sprzęt laboratoryjny

- komora laminarna - Heraeus HERAsafe Safety Cabinets HS18 (Thermo Fisher Scientific)
- inkubatory - Heraeus HERAcell 150, Jouan IGO150 CELLlife CO2 (Thermo Fisher Scientific)
- wirówka - Eppendorf Centrifuge 5410
- mikroskop - ZEISS PrimoVert, Olympus IX83
- mikroskop fluorescencyjny - ZEISS AxioVision 200, Olumpus
- homogenizator MagNA Lyser Instrument (Roche)
- termocyklery CFX96 (Bio-Rad),
- termocykler Mastercycler Gradient Thermal Cycler (Eppendorf)
- spektrofotometr Nano-Drop ND-1000 (Thermo Scientific)

## 6. Metody

### 6.1. Charakterystyka chorych

Czterysta osiemnaście guzów zostało pobranych od chorych w stadiach I-IV leczonych w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (GUMed) i wykorzystanych do analiz zmian w obrębie genu *ESR1*. Szczegółowa charakterystyka chorych przedstawiona została w Tabeli 1. Mediana wieku chorych wynosiła 58 lat (27-61 lat). Wszystkie badania z wykorzystaniem próbek i danych chorych zostały przyjęte i zaakceptowane przez komisję bioetyczną przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym, a chore udzieliły świadomej zgody na partycypowanie w badaniu (NKBBN/117/2014). Do izolacji CAFs, wykorzystano części guzów pobranych od chorych na raka piersi leczonych w Klinice Chirurgii Onkologicznej GUMed. Badania uzyskały zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej GUMed, a od chorych została uzyskana świadoma zgoda (NKBBN/94/2017).

Zmiany w liczbie kopii genu *ESR1* zostały zmierzone przy użyciu metody PCR w czasie rzeczywistym (qPCR) z wykorzystaniem zamrożonych próbek guzów. Dane uzyskano dla 402 próbek. Natomiast metoda FISH została wykonana we współpracy z Zakładem Genetyki GUMed. Badanie przeprowadzono na mikromacierzach tkankowych (ang. *Tissue Microarrays*, TMA) zawierających 80 tkanek

Tabela 1. Charakterystyka chorych.

Zmienna	Liczba przypadków (%)	
<b>Wiek</b>		
<50	120	(29)
>50	298	(71)
<b>Stopień T</b>		
1	140	(33)
2	194	(46)
3	40	(10)
4	39	(9)
Brak danych	5	(2)
<b>Stopień N</b>		
Negatywny	207	(49)
Pozytywny	206	(49)
Brak danych	5	(2)
<b>Stopień złośliwości histologicznej</b>		
1	30	(7)
2	171	(41)
3	135	(32)
Brak danych	82	(20)
<b>Typ Histologiczny</b>		
Przewodowy	218	(52)
Zrazikowy	54	(13)
Inny	26	(6)
Brak danych	120	(29)
<b>ER</b>		
Negatywny	164	(39)
Pozytywny	250	(59)
Brak danych	4	(2)
<b>PR</b>		
Negatywny	175	(42)
Pozytywny	239	(57)
Brak danych	4	(2)
<b>HER2</b>		
Negatywny	274	(66)
Pozytywny	59	(14)
Brak danych	85	(20)

zatopionych w formalinie utrwalonych w parafinie (ang. *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*, FFPE). Wyniki dla obu metod, qPCR oraz FISH, uzyskano dla 58 próbek. Do analizy ekspresji mRNA ER $\alpha$ 66 oraz ER $\alpha$ 36 wykorzystano 149 zamrożonych próbek guzów. Barwienia immunohistochemiczne (IHC) dla izoformy ER $\alpha$ 36 przeprowadzono na 126 skrawkach tkankowych FFPE. Izolacje fibroblastów przeprowadzono, wykorzystując łącznie dwanaście guzów, w niniejszej pracy wykorzystano cztery reprezentatywne linie CAFs.

## 6.2 Izolacja kwasów nukleinowych, odwrotna transkrypcja i analiza ekspresji genów

Izolacja DNA i RNA została przeprowadzona przy użyciu zestawu AllPrep DNA/RNA Kit (Qiagen) zgodnie z wytycznymi producenta. 30 mg zamrożonej tkanki zostało zlizowane w buforze RTL przy użyciu ceramicznych kulek i urządzenia MagNA Lyser (Roche), następnie lizaty nakładano na kolumny wiążące DNA i postępowano zgodnie z protokołem producenta. Przesącz po oczyszczaniu DNA został wykorzystany do izolacji RNA z dodatkowym etapem trawienia DNazą. Oczyszczone RNA (1000 ng) zostało przepisane na cDNA przy użyciu zestawu do odwrotnej transkrypcji (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche) oraz termocyklera Mastercycler Gradient Thermal Cycler (Eppendorf) zgodnie z protokołem producenta. Ekspresja ER $\alpha$ 66 oraz ER $\alpha$ 36 została zmierzona przy użyciu RT-qPCR z wykorzystaniem odczynnika Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems). Na jedną reakcję użyto 10 ng cDNA uzyskanego wcześniej. W celu zapewnienia jakości uzyskanym wynikiem, zdecydowano się na włączenie dwóch genów referencyjnych, *GAPDH* i *YWHAZ*, ze względu na ich stabilną ekspresję (parametr stabilności  $M < 0.5$  w teście stabilności genów referencyjnych). Każda z płytek qPCR zawierała ten sam kalibrator: cDNA przepisany z RNA izolowanego z linii komórkowej BT 474 o wysokiej ekspresji ER $\alpha$ 36. W metodzie wykorzystano następujące sekwencje starterów:

- ER $\alpha$ 36: przedni 5'-CCAAGAATGTTCAACCACAACCT-3';  
wsteczny 5'-GCACGGTTCATTAACATCTTTCTIG-3';
- ER $\alpha$ 66: przedni 5'-AAGAAAGAAC AACATCAGCAGTAAAGTC-3';  
wsteczny 5'-GGGCTATGGCTTGGTTAAACAT-3';

- *GAPDH*: przedni 5'-ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG-3';  
wsteczny 5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3';
- *YWHAZ*: przedni 5'-TGTAGGAGCCCGTAGGTCATC-3';  
wsteczny 5'-GTGAAGCATTGGGGATCAAGA-3'.

Program PCR użyty w tym doświadczeniu był następujący: 95 °C przez 10 min; 40 cykli obejmujących 95 °C przez 15 s, 60 °C przez 1 min oraz 95 °C przez 10 s. Krzywa topnienia została wykonana poprzez monitorowanie fluorescencji w próbkach, podgrzanych do 95 °C z 65 °C ze skokiem co 0,5 °C. Każda reakcja wykonana była w dwóch powtórzeniach. Próbki, których cykl progowy (C<sub>q</sub>) powtórzeń różnił się bardziej niż 0,5 były odrzucane, również próbki w których C<sub>q</sub> jakiegokolwiek genu referencyjnego wyniósł więcej niż 30 były odrzucane z dalszych analiz. Dane analizowano przy użyciu oprogramowania CFX Manager (Bio-Rad) i pakietu MS Office (Microsoft).

### 6.3 Analiza liczby kopii genu *ESR1* przy użyciu qPCR

Część danych wykorzystane w tej pracy zostały wcześniej wykonane w ramach pracy opublikowanej przez Markiewicz et. al.<sup>97</sup>. Grupę zwiększono w ramach badań w niniejszej pracy doktorskiej, co zostało opublikowane w manuskrypcie Nagel et al<sup>104</sup>. Upraszczając, liczba kopii genu *ESR1* została zmierzona w sposób relatywny, normalizując zmierzoną wartość C<sub>q</sub> genu *ESR1* do wartości C<sub>q</sub> genu referencyjnego *APP* i kalibratora (DNA z pełnej krwi) w metodzie qPCR (termocykler CFX96, Bio-Rad, sondy Universal Probe Library, Roche). Każda wartość równa lub wyższa niż dwa, była zakwalifikowana jako podwyższona liczba kopii genu *ESR1*. Startery użyte w tym doświadczeniu posiadały następujące sekwencje:

- *ESR1* (NC\_000006.11): przedni 5'-ACA TGG ACA CCT CCC AGT C-3';  
wsteczny 5'-ACA GAC TAA CAC AGC CCA TC-3';
- *APP* (NC\_000021.8): przedni 5'-AGC CCA GAA GGT GTC AAA CA-3';  
wsteczny 5'-CAT CTT CAT GTC CGT TGC AT-3').

#### 6.4 Analiza liczby kopii genu *ESR1* przy użyciu metody FISH

Badanie zostało przeprowadzone we współpracy z dr Mariolą Iliszko z Zakładu Genetyki i Biologii GUMed. Macierze tkankowe (ang. *Tissue Microarray*, TMA) zawierające próbki pobrane od 80 chorych na raka piersi przeanalizowano przy użyciu zestawu ZytoLight SPEC *ESR1*/CEN 6 Dual Color Probe (ZytoVision) oraz ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (ZytoVision) zgodnie z wytycznymi producenta. Analiza sygnału była wykonana z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego. Oceniono od dwudziestu do trzydziestu jąder w każdej próbce. Liczba sygnałów fluorescencyjnych od genu *ESR1* i centromeru 6 (CEN 6) została policzona, uśredniona i podana jako stosunek *ESR1*/CEN 6 na komórkę. Przy wyniku  $\geq 2$  chora była klasyfikowana jako posiadająca amplifikację, przy wyniku pomiędzy 1,3 a 2 jako przyrost kopii genu, natomiast za normalną wartość uznawano wynik 1-1,2 (zgodnie z danymi opublikowanymi przez Holst et. al<sup>105</sup>).

#### 6.5 Analiza i oznaczenie poziomu białek w tkankach metodą IHC

Analizy zostały wykonane we współpracy z patomorfologiem Jolantą Szade w Zakładzie Patomorfologii GUMed. Mikromacierze tkankowe przygotowano przez pobranie próbek z pięciu niesąsiadujących rdzeni tkankowych o średnicy 1 mm z każdego guza pierwotnego. Skrawki analizowano ręcznie, barwiąc je metodą immunohistochemiczną przy użyciu komercyjnie dostępnych króliczych przeciwciał monoklonalnych anty-ER $\alpha$ 36, skierowanych przeciwko unikalnej C-terminalnej sekwencji dla tego białka (nr kat CY-1109, Cell Applications), przeciwciał anty-CD163 (klon MRQ-26, Roche), anty-CD86 (klon PG-M1, Dako), anty-CXCR4 (klon 4G10, Santa Cruz) oraz anty-Ki67 (klon MIB-1, Dako). Drugorzędowe przeciwciała anty-królicze skoniugowane z peroksydazą chrzanową (ang. *Horseradish Peroxidase*, HRP) zostały użyte razem z odczynnikami Novolink Max-Polymer Detection System (Leica Novocastra) w celu detekcji sygnału. Intensywność barwienia w skali 0-3 oraz procent wybarwionych komórek (0-100%) zostały ocenione zarówno w jądrach komórkowych, jak i w cytoplazmie/błonie komórkowej, dając ostateczny wynik między 0 a 300 (iloczyn intensywności barwienia i procenta zabarwionych komórek).



## 6.6 Standardowa procedura oceny białek ER $\alpha$ 66, PR i HER2

Standardowa ocena statusu poziomów receptorów estrogenowych u chorych na raka piersi została wykonana w rutynowym badaniu histopatologicznym guza w Zakładzie Patomorfologii GUMed. Do oceny immunohistochemicznej wykorzystano mysie przeciwciała monoklonalnych przeciwko ER $\alpha$ 66 (klon 1D5, Dako Agilent) oraz przeciwko PR (klon 636, Dako Agilent) zgodnie z wytycznymi producenta w stężeniu 1:50. Wizualizację wykonano przy użyciu systemu EnVison Dako (Dako Agilent). Do oceny ER i PR wykorzystano skalę Allred. Amplifikacja genu *HER2* oceniona była najpierw immunohistochemicznie, wynik 3+ uznawany był za dodatni, a wynik 2+ uznawany był za niejednoznaczny i potwierdzany z wykorzystaniem metody FISH (PathVision *HER2* DNA Probe Kit, Abbot Molecular) zgodnie z wytycznymi producenta. W skrócie, średni sygnał *HER2* i centromeru 17 były ocenione w każdej próbce guza. Stosunek *HER2*/CEN-17  $\geq 2$  został uznawany za amplifikację i wynik *HER2*-pozytywny.

## 6.7 Ocena ekspresji genów z wykorzystaniem platformy nCounter w CAFs i próbkach FFPE guzów

W metodzie detekcji ekspresji wielu genów jednocześnie, wykorzystuje się kolorowe „kody kreskowe” znakujące wykrywaną cząsteczkę RNA bez potrzeby amplifikacji. Po hybrydyzacji RNA i komplementarnej sondy, ich nadmiarowa ilość jest usuwana, a reszta zliczana. nCounter PanCancer Immune Profiling Panel (NanoString Technologies) umożliwia jednoczesną analizę ekspresji aż 770 genów zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną zoptymalizowaną w kontekście nowotworów. RNA został wyizolowany z CAFs pobranych od chorych na raka piersi z wykorzystaniem zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen) zgodnie z wytycznymi producenta. Czystość i stężenie RNA zostało ocenione przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Fisher). Trzysta nanogramów RNA zostało użyte do profilowania ekspresji przy użyciu nCounter PanCancer Immune Profiling Panel (NanoString Technologies) zgodnie z wytycznymi producenta. Ekstrakcja i obróbka RNA z próbek FFPE guzów piersi została opisana w pracy Popęda et al; 2019<sup>106</sup>. W skrócie, RNA zostało wyizolowane z niebarwionych próbek FFPE raka piersi przy użyciu zestawu RNeasy Mini Kit (Roche)

zgodnie z protokołem producenta. Jakość RNA została potwierdzona przy użyciu Agilent 2100 Bioanalyzer i zestawu RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies). Następnie RNA był preamplifikowany zestawem nCounter Low RNA Input Kit (NanoString Technologies), a uzyskane próbki były analizowane przy użyciu systemu nCounter (NanoString Technologies) zgodnie z wytycznymi producenta.

## 6.8 Analiza danych NanoString

RNA z CAFs i raków piersi FFPE było procesowane w osobnych grupach przez mgr Martę Popędę. Dla każdej próbki, korekcja tła i normalizacja były wykonane przy użyciu oprogramowania nSolver 4.0<sup>106</sup>. W skrócie, poziom tła został oceniony przez średnią i odchylenia zliczeń dla negatywnej kontroli. Przy czym dane były normalizowane odpowiednio dla średniej globalnej zliczeń dla kontroli pozytywnych i najbardziej stabilnych genów metabolizmu podstawowego (ocenione przez NormFinder) – czterech dla grupy FFPE (zakres SD 173,5 - 228,4 zliczeń) i 18 dla grupy CAFs (zakres SD 2,9 - 66,9 zliczeń). Po normalizacji, geny o niskiej ekspresji ( $\log_2$  ze średniej zliczeń we wszystkich próbkach  $< 4$  dla zestawu danych CAFs i  $< 6$  dla zestawu danych FFPE) zostały wykluczone. Trzysta sześćdziesiąt dwa transkrypty z grupy CAFs i 584 transkryptów z grupy FFPE było włączonych do dalszej analizy. Różnicowanie genów pomiędzy guzami ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> i ER $\alpha$ 36<sup>low</sup> było wybrane na podstawie logarytmicznej zmiany krotności ( $\log_{FC}$ ) obliczonej dla mediany znormalizowanych zliczeń dla każdej sondy w porównywanych grupach. Geny z  $\log_{FC} > 1$  uznano za geny o podwyższonej ekspresji; geny z  $\log_{FC} < -1$  za geny o obniżonej ekspresji. Różnice były estymowane przy użyciu testu U Manna-Whitneya. Wszystkie dane były analizowane przy użyciu środowiska R (3.6.1). W celu ustalenia znaczenia biologicznego transkryptów, które wykazały obniżoną lub podwyższoną ekspresję przeanalizowano je z wykorzystaniem narzędzia DAVID Functional Annotation Tool ustalającego proces, w który zaangażowane są dane geny z bazy „Gene Ontology Biological Processes”.

## 6.9 Izolacja i hodowla CAFs oraz przygotowanie pożywek kondycjonowanych

Tkanę guza wraz z otaczającym zrębem pobrano do zimnej pożywki DMEM wzbogaconej 10% FBS i mieszaniną antybiotyków i antymykotyków (Sigma Aldrich, A5955) i przechowywano w 2-8 °C do momentu obróbki, ale nie dłużej niż 4 godziny. Po rozdrobnieniu, tkanka była trawiona w roztworze 0,35 mg/ml kolagenazy i 0,35 mg/ml hialuronidazy w PBS przez 1 godzinę z obracaniem probówek w 37 °C i 5% CO<sub>2</sub>. Następnie zawiesinę wirowano w 400 x g przez 5 min, osad zawieszano w świeżej pożywce DMEM wzbogaconej w 10% FBS i roztwór antybiotyków i antymykotyków i przeniesiono na naczynie do hodowli komórkowych. CAFs izolowano przy użyciu metody seryjnych trypsynizacji komórek, wykorzystującej właściwości CAFs, które odpowiadają szybciej na traktowanie trypsyną w porównaniu do komórek nowotworowych. Po 2-3 pasażach czystość kultur była oceniona przez barwienie immunofluorescencyjne markerów CAFs - wimentyny (VIM) i aktyny alfa mięśni gładkich ( $\alpha$ -SMA) oraz markerów dla komórek nowotworowych - E-kadheryny (E-CAD), jako kontroli (marker negatywny). Wszystkie doświadczenia z wykorzystaniem CAFs były wykonane przy użyciu hodowli między trzecim a dziesiątym pasażem. Gdy komórki zarosły od 70 do 80% powierzchni hodowlanej, media wymieniono na świeże, a po 72 godzinach pobrano je z hodowli CAFs i przechowywano w -80 °C. Media kondycjonowane przez CAFs z różnych pasażów były mieszane razem w celu uniknięcia dysproporcji, następnie porcjowane i przechowywane w -80 °C do momentu wykorzystania w doświadczeniach.

## 6.10 Hodowle komórkowe

Linie komórkowe MDA-MB-231 i Hs578t zostały zakupione z American Type Culture Collection (ATCC). Komórki były hodowane i pasażowane 1-3 razy w tygodniu, do maksimum 3-4 miesięcy od rozmrożenia. Rutynowe testy na ewentualne zakażenie mykoplazmą były wykonywane przy użyciu barwienia DNA i zestawów PCR. Linia MDA-MB-231 była hodowana w pożywce DMEM z 10% dodatkiem surowicy bydlęcej (FBS), komórki linii Hs578t hodowane były w pożywce RPMI-1640 z 10% dodatkiem FBS i insuliną w stężeniu 10  $\mu$ g/ml.

### 6.11 Barwienia immunofluorescencyjne

CAFs zostały wysiane na wysterylizowane wcześniej mikroskopowe szkiełko nakrywkowe i po 24 godzinach były utrwalane i permeabilizowane z użyciem mieszaniny metanol/aceton w proporcjach 1:1 przez 15 min. Następnie próbki blokowano 5% albuminą serum bydlęcego (ang. *bovine serum albumin*, BSA) w buforze PBS. Pierwszorzędowe przeciwciała (anty-VIM, anty- $\alpha$ SMA i anty-E-CAD) zostały rozcieńczone 1:800 w roztworze Antibody Diluent (Dako Agilent) naniesiono na wcześniej blokowane próbki i inkubowano przez 30 min. Jako drugorzędowych przeciwciał użyto anty-króliczych IgG DyLight 488 oraz anty-mysich IgG DyLight 594 (Thermo Fisher Scientific, rozcieńczenia 1:2000).

### 6.12 Western blotting

Lizaty komórkowe wykonano przy pomocy buforu lizującego RIPA (Sigma Aldrich) z dodatkiem inhibitorów proteaz i fosfataz (Thermo Fisher Scientific), stężenie białka w otrzymanych próbkach zmierzono przy pomocy kwasu bis-cynchoninowego (BCA assay kit, Thermo Fisher Scientific). Po wyrównaniu stężeń w próbkach, białka rozdzielono na 12% żelu poliakrylamidowym firmy Bio-Rad (TGX FastCast Gels) w warunkach denaturujących SDS-Page przy napięciu 250 V przez 1 godzinę. Rozdzielone białka transferowano na membranę PVDF transferem półsuchym (Bio-Rad). Po godzinnym blokowaniu w 5% mleku w TBST, membrany inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędownymi przez noc, a następnego dnia przez godzinę z przeciwciałami drugorzędownymi skoniugowanymi z peroksydazą chrzanową. Western Lightning Plus-ECL (Amersham) był użyty do wizualizacji sygnału na kliszy fotograficznej.

### 6.13 Analiza cytokin wydzielanych przez CAFs

Detekcja cytokin w medium kondycjonowanym uzyskanym z hodowli różnych subpopulacji CAFs została wykonana przy użyciu zestawu Human XL Cytokine Array Kit (R&D Systems) zgodnie z protokołem producenta.

#### 6.14 Analiza wzrostu kolonii komórkowych w 3D

Tysiąc pięćset komórek MDA-MB-231 lub Hs578t zostało rozcieńczonych w 40  $\mu$ l matryzeli w proporcjach 1:1 ze standardowym medium komórkowym i naniesionych na dołek płytki 12-dołkowej. Następnie krople inkubowano w 37 °C przez 60 minut w celu stężenia matryzeli. Po tym czasie, do dołków dodano odpowiednie pożywki kondycjonowane lub wzbogacone w odpowiednie czynniki i pożywkę pełną jako kontrolę. Media były wymieniane na świeże co 3 dni. Po około 7-10 dniach wykonano zdjęcia kolonii, używając mikroskopu Olympus IX83. W celu oceny liczby rozgałęziających się kolonii, trzy niezależne pola widzenia zostały sfotografowane dla każdego powtórzenia, zatem po sześć na każdą próbkę. Każdą analizę wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach.

#### 6.15 Stymulacja komórek potrójnie-negatywnego raka piersi pożywką kondycjonowaną przez ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> CAFs i HGF

Analiza sygnalizacji indukowanej przez ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> CAFs została przeprowadzona na głodzonych przez noc przy użyciu niewzbogaconej w surowicę pożywki komórkach. Gdzie było to wymagane, dodano do pożywki inhibitor receptora dla HGF - capmatinib (50 nM) na 2 godziny przed stymulacją. Następnie komórki stymulowane były pożywką kondycjonowaną przez CAFs4 lub pożywką z dodatkiem HGF w stężeniu 50 lub 10 ng/ml w odpowiednich odstępach czasowych. Badania powtórzono trzy razy z podobnym skutkiem, w sekcji wyników znajdują się reprezentatywne wyniki.

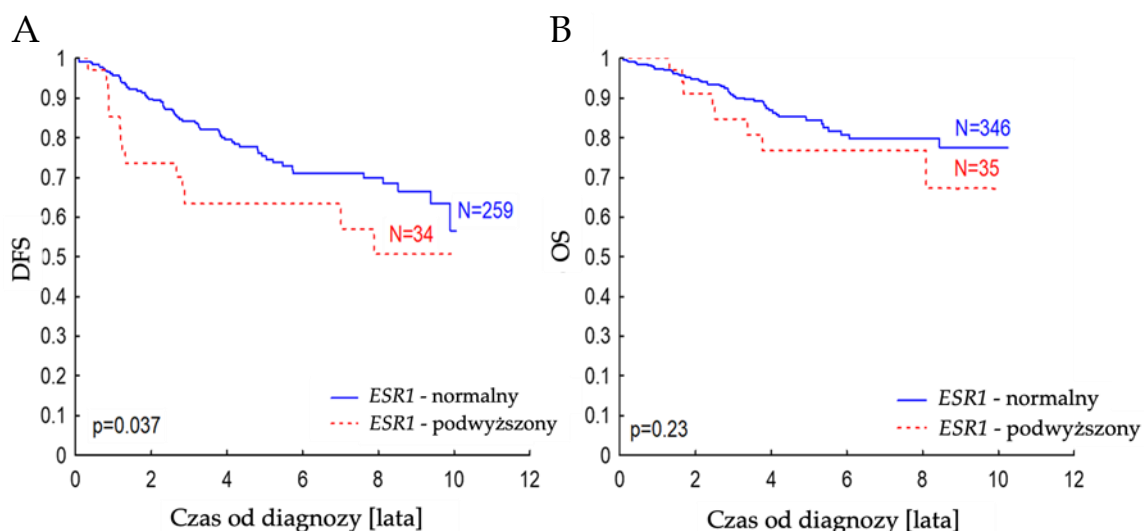
#### 6.16 Analizy statystyczne

Analizy danych klinicznych wykonane zostały przy użyciu programów Statistica ver. 12 (StatSoft) oraz SPSS (IBM). Zmienne kategoryczne były porównywane testem  $\chi^2$ , a zmienne ciągłe przy użyciu współczynnika korelacji rang Spearmana. Test Manna-Whitneya był użyty do analiz zmiennych ciągłych w dwóch grupach. Krzywe przeżycia Kaplana-Meiera były oceniane przy użyciu testu F-Cox. W przypadku analiz wyników *in vitro* użyto programu GraphPad Prism i testu t studenta.

## 7. Wyniki

### 7.1 Badanie aberracji w obrębie genu *ESR1* u chorych na raka piersi

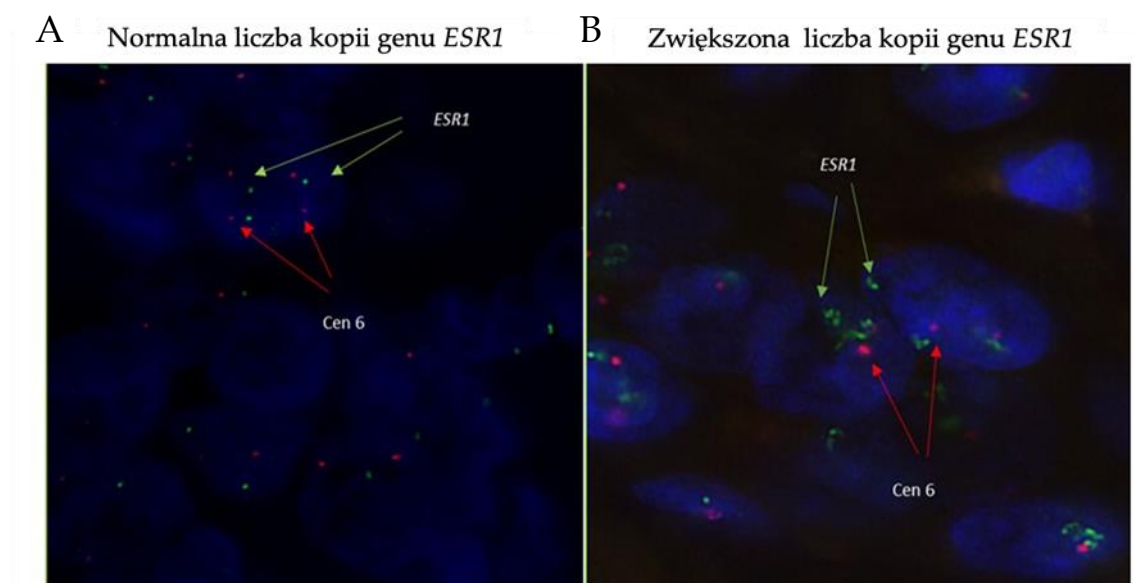
Liczba kopii genu *ESR1* została zbadana metodą qPCR w 402 próbkach guzów pierwotnych pobranych od chorych na raka piersi. Wartość mierzono poprzez ocenę stosunku *ESR1/APP* i klasyfikowano jako zwiększoną, gdy była wyższa lub równa 2. Zwiększoną liczbą kopii genu zaobserwowano u 9,2% (37/402) chorych. Zwiększona liczba kopii genu *ESR1* korelowała z gorszym przeżyciem wolnym od choroby (ang. *Disease Free Survival*, DFS) (**Rycina 10**).



**Rycina 10.** Krzywe przeżycia Kaplana-Meiera obrazujące A. przeżycie wolne od choroby (ang. *Disease Free Survival*, DFS) oraz B. przeżycie całkowite (ang. *Overall Survival*, OS) zależnie od liczby kopii genu *ESR1* (mierzonej metodą qPCR) w próbkach guzów pierwotnych chorych na raka piersi.

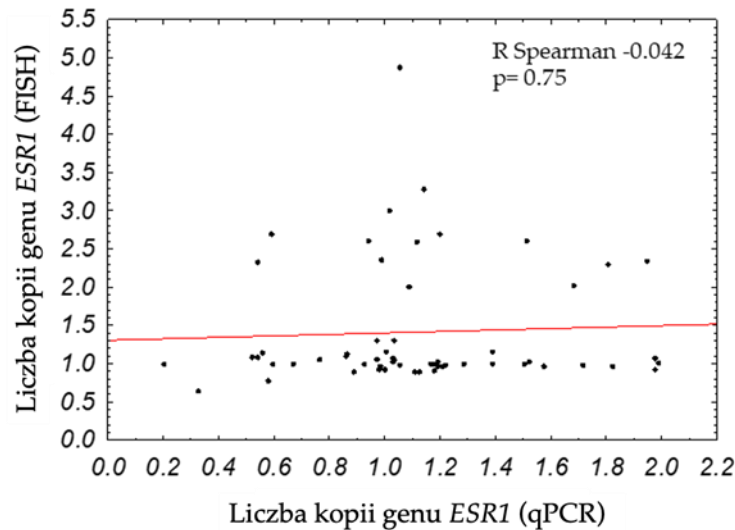
Aczkolwiek, gdy amplifikacja *ESR1* mierzona jest metodą FISH, większość danych literaturowych wskazuje na odwrotny trend. Aby odpowiedzieć na tę rozbieżność, zbadano, czy wyniki uzyskane przy użyciu obu metod ze sobą korelują. W tym celu wyselekcjonowano 58 próbek raka piersi, które poza oceną liczby kopii genu *ESR1* metodą qPCR były również ocenione przy pomocy metody FISH (**Rycina 11**).

Zwiększoną liczbę kopii genu *ESR1* ocenioną metodą FISH zaobserwowano u 26% (15/58). Wykazano, że liczby kopii genu *ESR1* mierzone obiema metodami nie korelują ze sobą ( $r=-0,042$ ;  $p=0,75$ ; **Rycina 12**), najprawdopodobniej ze względu na to, że mierzą one różne zmiany w obrębie genu *ESR1*. Sonda FISH wykrywa region o wielkości 395 kbp, natomiast qPCR wykrywa amplikon o wielkości 60 bp. Metoda FISH umożliwia wykrycie większych amplifikacji, obejmujących znaczną część lub cały gen, natomiast qPCR może wykrywać małe zmiany w obrębie genu *ESR1*, które mogły zostać pominięte przy użyciu sondy FISH.



**Rycina 11.** Analiza amplifikacji genu *ESR1* metodą FISH. Przykładowe fotografie próbek guzów piersi z normalnym poziomem genu *ESR1* (A.  $ESR1/CEN6 < 2$ ) oraz z amplifikacją genu *ESR1* (B.  $ESR1/CEN6 \geq 2$ ).

Dlatego w prezentowanych wynikach nie wykazano korelacji amplifikacji całego genu *ESR1* badanej metodą FISH z badaną metodą qPCR. W związku z tą obserwacją zdecydowano się na dalsze badania obejmujące analizę ekspresji dwóch izoform receptora estrogenowego, klasycznej  $ER\alpha_{66}$  oraz izoformy  $ER\alpha_{36}$ , która może być obecna również w rakach piersi ER-negatywnych i indukować pozajądrową odpowiedź na estrogen<sup>98</sup>.



Rycina 12. Korelacja pomiędzy liczbą kopii genu *ESR1* mierzona metodami FISH i qPCR.

## 7.2 Liczba kopii genu *ESR1* a poziom mRNA i białka ER $\alpha$ 36 i ER $\alpha$ 66

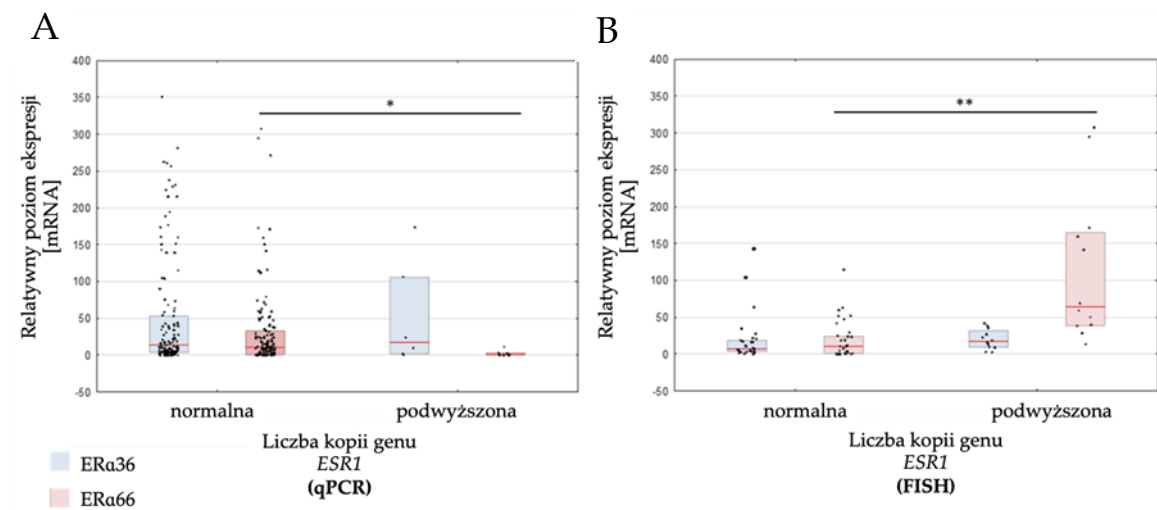
Poziomy mRNA izoform receptora estrogenowego ER $\alpha$ 66 oraz ER $\alpha$ 36 przeanalizowano metodą qPCR z odwrotną transkrypcją. Wyniki zostały skorelowane z liczbą kopii genu *ESR1* ocenianą metodą qPCR i danymi na temat amplifikacji *ESR1* otrzymanymi metodą FISH. Na poziomie mRNA, zaobserwowano obniżoną ekspresję ER $\alpha$ 66 w próbkach o wyższej liczbie kopii genu *ESR1* mierzonej qPCR (mediana ekspresji równa 10,63 w próbkach o normalnej liczbie kopii *ESR1*, mediana równa 0 w próbkach o zwiększonej liczbie kopii *ESR1*,  $p=0,01$ ; **Rycina 13A**). Natomiast w przypadku porównania z analizą metodą FISH, zaobserwowano podwyższoną ekspresję ER $\alpha$ 66 w próbkach z amplifikacją genu *ESR1* (mediana ekspresji w próbkach z amplifikacją *ESR1* - 64,14, a w próbkach normalnych - 10,28;  $p=0,00008$ , **Rycina 13B**). Jednak nie zaobserwowano korelacji między pomiarami uzyskanymi żadną z tych metod a ekspresją izoformy ER $\alpha$ 36 (**Rycina 13, A i B**). Ekspresja ER $\alpha$ 36 była obserwowana zarówno w próbkach z normalną, jak i podwyższoną liczbą kopii genu *ESR1* (**Rycina 13**), niezależnie od tego, czy próbki raka piersi zaklasyfikowane były jako pozytywne czy negatywne pod względem białka ER $\alpha$ 66. W dodatku, stosunek ekspresji izoformy ER $\alpha$ 36 do ER $\alpha$ 66 zdecydowanie różnił się między próbkami z podwyższoną liczbą kopii *ESR1* ocenianą qPCR, gdzie wyniósł 86, a próbkami z normalną liczbą kopii



*ESR1*, gdzie wyniósł zaledwie 1,4 (**Tabela 2**). W przypadku amplifikacji genu *ESR1* ocenianej metodą FISH, stosunek ER $\alpha$ 36 do ER $\alpha$ 66 nie różnił się znacząco (odpowiednio 0,3 vs. 0,7; **Tabela 2**).

*Tabela 2. Stosunek ekspresji izoformy ER $\alpha$ 36 do ER $\alpha$ 66 w różnych grupach w zależności od liczby kopii genu *ESR1*.*

	Liczba kopii genu <i>ESR1</i> (qPCR)		Liczba kopii genu <i>ESR1</i> (FISH)	
	podwyższona	normalna	podwyższona	normalna
Stosunek ekspresji ER $\alpha$ 36 do ER $\alpha$ 66	86	1,4	0,3	0,7



*Rycina 13. Poziom ekspresji izoform ER $\alpha$ 36 oraz ER $\alpha$ 66 w guzach pierwotnych względem liczby kopii genu *ESR1* A. mierzonej metodą qPCR i B. mierzonej metodą FISH. Czerwona linia reprezentuje medianę ekspresji. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.0001$ .*

Co więcej, liczba kopii genu *ESR1* oceniana metodą qPCR negatywnie korelowała ze statusem ER ocenionym podczas rutynowego badania w skrawkach guzów ( $p = 0,001$ ; **Tabela 3**). Aż sześćdziesiąt pięć procent próbek z podwyższoną liczbą kopii genu *ESR1* (badaną metodą qPCR) było ER $\alpha$ 66-negatywnych (ocenionych zgodnie ze skalą Allred), a zaledwie 37% próbek z normalną liczbą kopii *ESR1* było ER $\alpha$ 66-negatywnych w ocenie

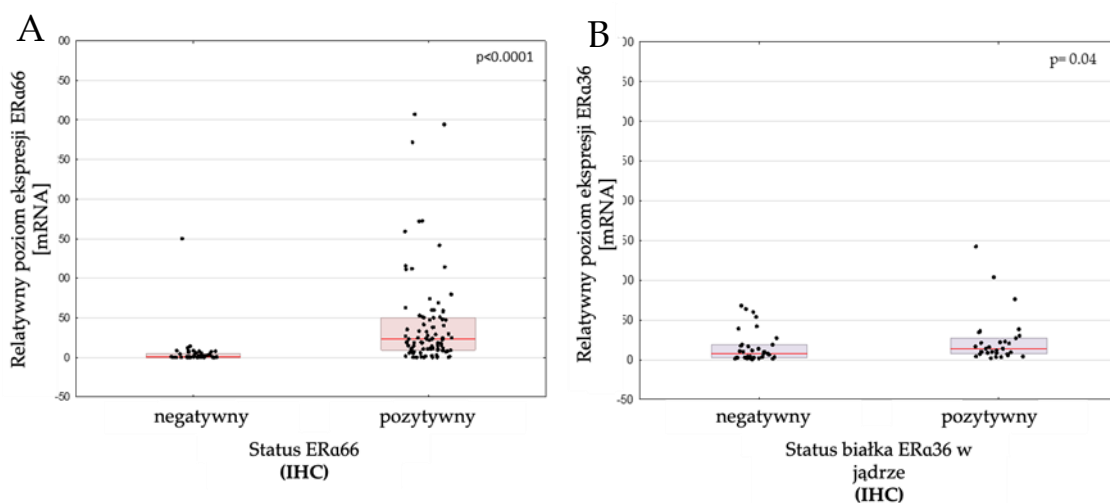
immunohistologicznej. W guzach ER-negatywnych zwiększona liczba kopii genu *ESR1* stanowiła 15% (24/158), w porównaniu do 5% w guzach ER-pozytywnych (13/240). W przypadku badania metodą FISH, guzy wykazujące wzrost liczby kopii genu *ESR1* były zawsze ER-pozytywne ( $p=0,0038$ ), co potwierdza, że amplifikacja genu jest jednym z mechanizmów prowadzących do wyższej ekspresji genu. Liczba kopii genu *ESR1* korelowała pozytywnie z ekspresją izoformy ER $\alpha$ 66 ( $p=0,00002$ ; **Tabela 3**). Aczkolwiek 64% (37/52) guzów ER-pozytywnych uzyskało wynik nie wskazujący na wzrost liczby kopii genu *ESR1*.

*Tabela 3. Korelacje między statusem białka ER $\alpha$ 66 (opartym na skali Allred w barwieniu IHC) a liczbą kopii genu ESR1 mierzonego metodą qPCR lub FISH.*

Status białka ER $\alpha$ 66 (IHC)	Liczba kopii genu <i>ESR1</i> (qPCR) [Liczba przypadków (%)]				Liczba kopii genu <i>ESR1</i> (FISH) [Liczba przypadków (%)]			
	normalna	podwyższona	całość	P	normalna	podwyższona	całość	p
<b>negatywny</b>	134 (37%)	24 (65%)	158	0,001	21 (36%)	0 (0%)	21	0,004
<b>pozytywny</b>	227 (63%)	13 (25%)	240		37 (64%)	15 (100%)	52	
<b>całość</b>	361 (100%)	37 (100%)	398		58 (100%)	15 (100%)	73	

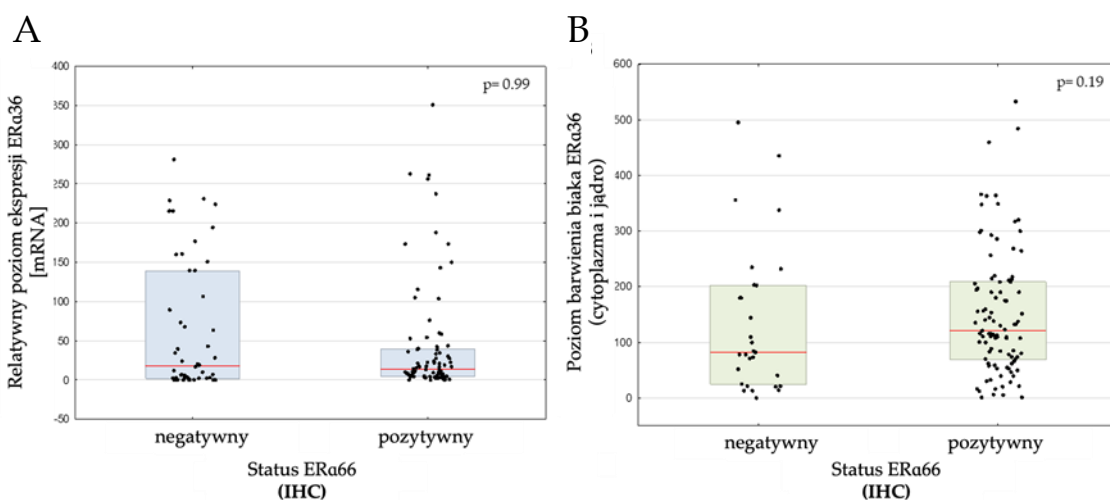
### 7.3 Badanie korelacji między izoformami ER $\alpha$ 66 i ER $\alpha$ 36 na poziomie mRNA oraz na poziomie białka

Poziom mRNA izoformy *ER $\alpha$ 66* był podwyższony w guzach ocenionych jako ER-pozytywne ( $p<0.0001$ , **Rycina 14 A**). W przypadku ER $\alpha$ 36, korelacja między poziomem mRNA a poziomem białka, była zaobserwowana tylko w przypadku lokalizacji jądrowej tegoż białka ( $p=0.04$ , **Rycina 14 B**).



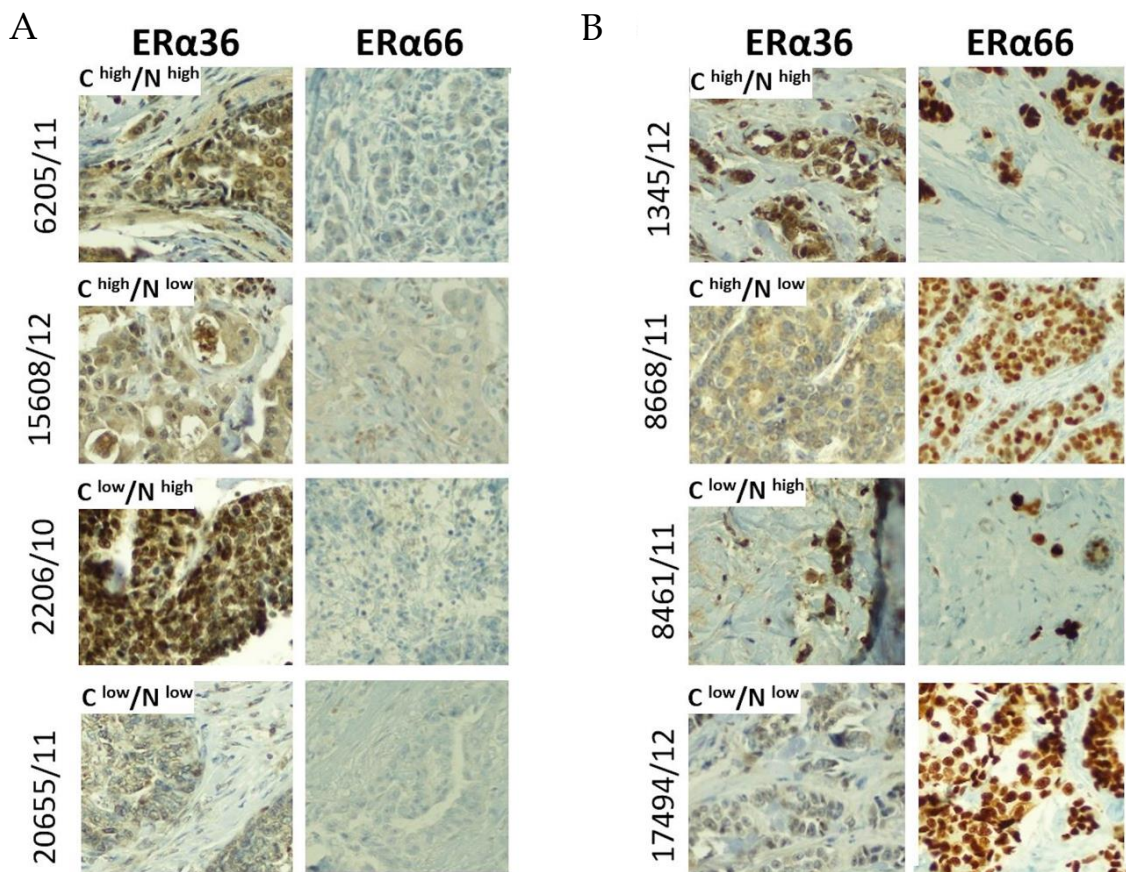
*Rycina 14. Analiza ekspresji izoform receptora estrogenowego w kontekście statusu białka dla tych izoform. A. Poziom mRNA izoformy ERα66 w odniesieniu do statusu białka ERα66; B. poziom mRNA izoformy ERα36 w kontekście statusu jądrowego białka ERα36.*

Co znaczące, mRNA ERα36 było obecne na podobnych poziomach zarówno w guzach ERα66-pozytywnych, jak i ERα66-negatywnych ocenionych podczas rutynowego badania metodą immunohistochemiczną (mediana ekspresji ERα36 równa odpowiednio 17,8 oraz 13,7;  $p=0,99$ ; **Rycina 15 A**). Również w przypadku poziomu białka ERα36, był on na podobnym poziomie w ERα66-pozytywnych i ERα66-negatywnych guzach (mediana równa odpowiednio 120 i 82;  $p=0,19$ , **Rycina 15 B**).



**Rycina 15.** Analiza ekspresji izoformy ER $\alpha$ 36 w kontekście statusu receptora estrogenowego ER $\alpha$ 66; A. poziom mRNA izoformy ER $\alpha$ 36 w kontekście statusu białka ER $\alpha$ 66; B. ilość białka ER $\alpha$ 36 w całej komórce w odniesieniu do statusu białka ER $\alpha$ 66.

Barwienia białka ER $\alpha$ 36 w skrawkach guzów wykazały inny wzór niż barwienia białka ER $\alpha$ 66, które zwykle zlokalizowane jest w jądrze komórkowym, gdzie aktywnie działa jako czynnik transkrypcyjny. Natomiast ER $\alpha$ 36 było obserwowane zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie komórek nowotworowych przy różnej intensywności niezależnie od kompartmentu komórkowego (**Rycina 16**). Obecność ER $\alpha$ 66 nie korelowała z lokalizacją ER $\alpha$ 36; oba jądrowe lub/i cytoplazmatyczne barwienia były obserwowane zarówno w ER-pozytywnych (**Rycina 16 A**), jak i w ER-negatywnych guzach (**Rycina 16 B**).



**Rycina 16.** Przykładowe fotografie barwień immunohistochemicznych próbek guzów chorych na raka piersi z różnym statusem ER $\alpha$  (panel A. ER $\alpha$ 66-negatywne, panel B. ER $\alpha$ 66-pozytywne zgodnie ze skalą Allred) oraz różnym poziomie białka ER $\alpha$ 36. Wzór barwienia ER $\alpha$ 36 był dodatkowo

podzielony ze względu na lokalizację na cytoplazmatyczny (C) i jądrowy (N). Wszystkie fotografie wykonano przy użyciu obiektywu 20x.

#### 7.4 Kliniczne znaczenie ekspresji izoformy ER $\alpha$ 36

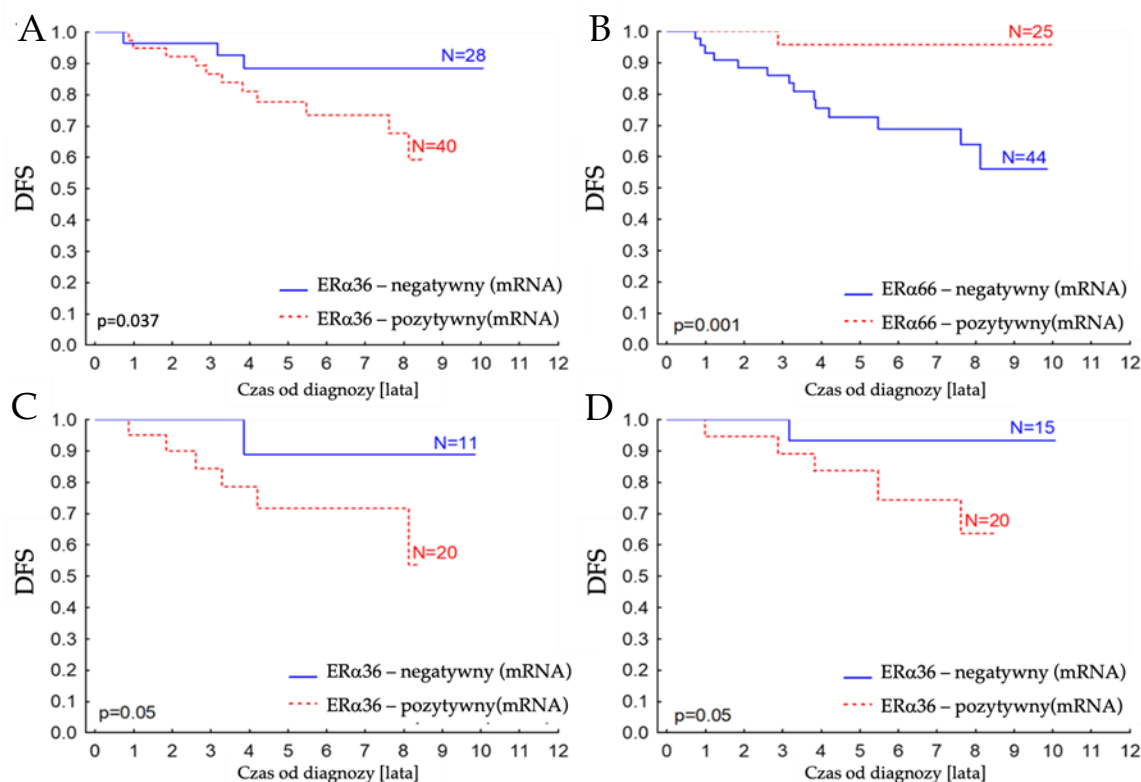
Ponieważ zaobserwowano ekspresję izoformy ER $\alpha$ 36 niezależnie od statusu ER $\alpha$ 66 czy liczby kopii genu *ESR1* mierzonego zarówno metodą qPCR, jak i FISH, zdecydowano się zbadać ER $\alpha$ 36 jako czynnik prognostyczny u chorych na raka piersi. Dane o ekspresji ER $\alpha$ 36 skorelowano z danymi kliniczno-patologicznymi (Tabela 4).

Tabela 4. Korelacje ekspresji ER $\alpha$ 36 a danymi kliniczno-patologicznymi chorych.

Zmienna	N	Mediana ekspresji ER $\alpha$ 36 (25-75 percentile)	Wartość p
<b>Stopień T</b>			0,41
T1-2	127	13,17 (3,75-42,90)	
T3-4	10	58,02 (7,37-160,88)	
<b>Stopień N</b>			0,69
Negatywny	78	17,20 (3,52-63,44)	
Pozytywny	58	9,95 (4,23-40,05)	
<b>Stopień złośliwości histologicznej</b>			0,92
1	33	18,84 (5,34-27,19)	
2	184	9,89 (3,75-37,41)	
3	142	9,97 (2,89-39,08)	
<b>Typ histologiczny</b>			0,21
Przewodowy	208	31,28 (4,1-144,7)	
Zrazikowy	53	74,39 (1,1-180,7)	
Inny	27	162,13 (78,1-205,5)	
<b>ER</b>			0,99
Negatywny	50	17,84 (1,91-139,11)	
Pozytywny	87	13,71 (4,41-39,08)	

Zmienna	N	Mediana ekspresji ER $\alpha$ 36 (25-75 percentile)	Wartość p
<b>PR</b>			0,08
Negatywny	52	10,46 (1,52-53,17)	
Pozytywny	85	15,77 (5,34-54,09)	
<b>HER2</b>			0,35
Negatywny	104	13,82 (3,94-59,45)	
Pozytywny	24	10,41 (2,56-31,21)	

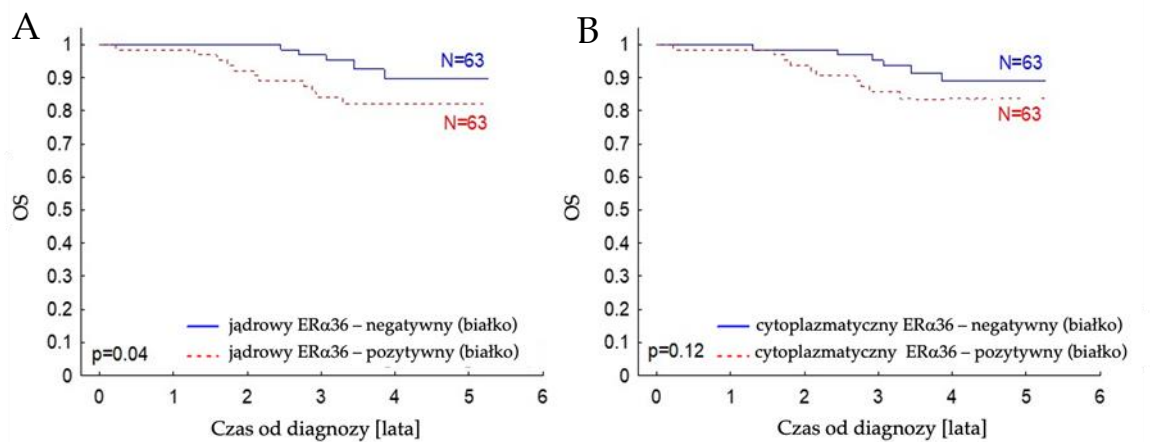
Pomimo tego, iż ekspresja ER $\alpha$ 36 nie korelowała z wielkością guza, stadium choroby, zajęciem węzłów chłonnych, czy podtypem histologicznym, wysoka ekspresja ER $\alpha$ 36 powiązana była z krótszym czasem wolnym od choroby (**Rycina 17 A**). Natomiast ekspresja izoformy ER $\alpha$ 66 wykazała odwrotny efekt (**Rycina 17 B**). Analiza przeżycia w podgrupach ER $\alpha$ 66-pozytywnej i ER $\alpha$ 66-negatywnej podtrzymała istotność korelacji ukazanej dla całej grupy (**Rycina 17 C i D**), wskazując na niezależność efektu ER $\alpha$ 36 na przeżycie wolne od choroby od poziomu ER $\alpha$ 66.



**Rycina 17.** A. Krzywe przeżycia Kaplana-Meiera prezentujące przeżycie wolne od choroby (DFS) A. zależnie od ekspresji ER $\alpha$ 36 i B. zależne od ekspresji ER $\alpha$ 66 ocenionych metodą qPCR w guzach pierwotnych raka piersi. Analiza ekspresji ER $\alpha$ 36 w podgrupach, C. u chorych ER $\alpha$ 66-negatywnych ( $p=0,05$ ) i D. u chorych ER $\alpha$ 66-pozytywnych ( $p=0,05$ ).

Analiza jednoczynnikowa poziomu ekspresji izoformy ER $\alpha$ 36 wykazała dwukrotnie wyższe ryzyko nawrotu choroby w przypadku podwyższonej ekspresji (HR 2.10, 95% CI 0.90-4.89,  $p=0.08$ ), natomiast analiza wieloczynnikowa uwzględniająca stopnie T, N, złośliwości histologicznej, ER, PR i HER2, nie była istotna (HR 3.58, 95%CI 0.63-20.29,  $p=0.15$ ).

Wysoki poziom białka izoformy ER $\alpha$ 36 oceniony metodą IHC w jądrze korelował z gorszym przeżyciem całkowitym chorych ( $p=0,04$ ; **Rycina 18 A**). Natomiast wysoki poziom ER $\alpha$ 36 w cytoplazmie, nie wykazał takiej korelacji ( $p=0,12$ ; **Rycina 18 B**).



**Rycina 18.** Znaczenie prognostyczne białka izoformy ER $\alpha$ 36. Krzywe reprezentują Przeżycie całkowite (ang. Overall Survival, OS) A. w kontekście poziomu białka ER $\alpha$ 36 w lokalizacji jądrowej i B. cytoplazmatycznej.

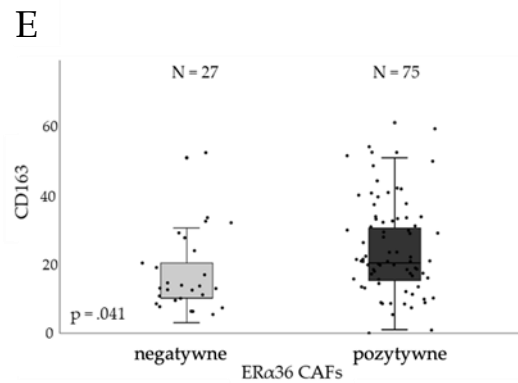
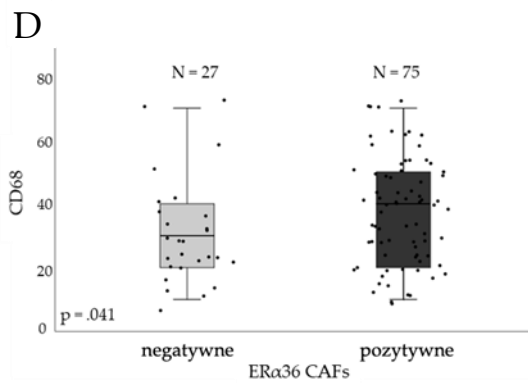
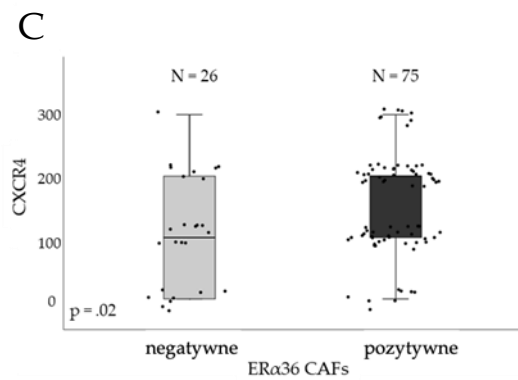
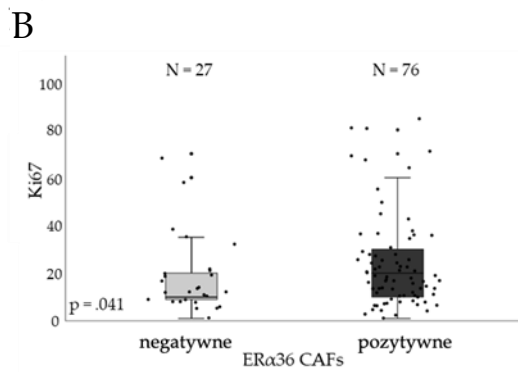
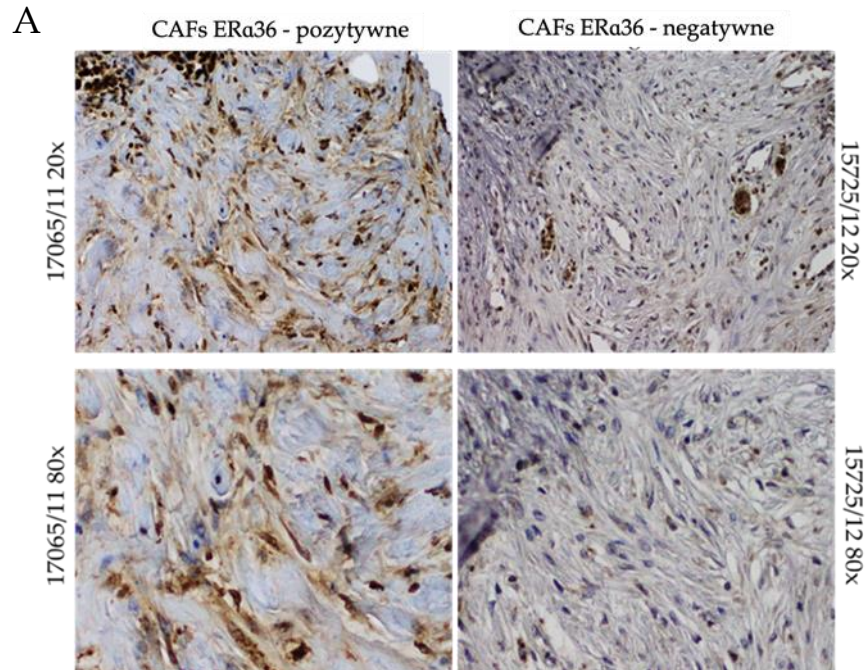
## 7.5 Analiza ekspresji ER $\alpha$ 36 w zrębie guzów raka piersi

Znając znaczenie ekspresji izoformy ER $\alpha$ 36 w komórkach nowotworowych guza piersi oraz biorąc pod uwagę rosnące zainteresowanie i odkryte w związku z tym znaczenie mikrośrodowiska nowotworu, zdecydowano się na analizę znaczenia izoformy ER $\alpha$ 36 również w fibroblastach związanych z nowotworem. Przykładem białka, które odgrywa rolę zarówno w komórkach nowotworowych, jak i w CAFs jest CD164. Brechbuhl i współpracownicy odkryli, że subpopulacja CAFs o niskim poziomie CD164 hamuje ekspresję ER $\alpha$  w ER-pozytywnych komórkach raka piersi oraz obniża ich wrażliwość na tamoksyfen. Ponadto, białko GPER (ang. *G-Protein-coupled Estrogen Receptor*) również zostało opisane w CAFs jako biorące udział w odpowiedzi na estrogen i podwyższoną proliferację CAFs<sup>107</sup>.

Chcąc wnikliwiej zbadać rolę izoformy ER $\alpha$ 36 w mikrośrodowisku guza, przeanalizowano jej poziom w fibroblastach leżących w zrębie guzów raka piersi, immunohistochemicznie barwiąc 103 próbki FFPE. Średni procent barwiących się komórek wyniósł 22,3% (zakres 5-62%), próbki były klasyfikowane jako pozytywne, jeśli procent pozytywnych komórek w zrębie wyniósł 12% lub więcej (odcięta jako pierwszy kwartyl, **Rycina 19 A**). CAFs poprzez cytokiny wydzielane w obrębie guza mogą wpływać zarówno na proliferację czy inwazyjność komórek nowotworowych, jak i na komponenty mikrośrodowiska guza. Aby to zbadać, poziom białka ER $\alpha$ 36 w fibroblastach zrębu został skorelowany z danymi kliniczno-patologicznymi, danymi na temat kompozycji zrębu i jego charakterystyki immunologicznej wcześniej oznaczonymi przez zespół<sup>108</sup>. Wyższy poziom ekspresji ER $\alpha$ 36 w zrębie korelował z poziomami następujących białek: Ki67 (mediana 10% vs 20%,  $p=0.041$ ) będącego markerem proliferacji; CXCR4 (mediana 100 vs 200,  $p=0,002$ ) będącego receptorem dla CXCL12 i związanego ze złym rokowaniem chorych na raka piersi<sup>109</sup>, CD68 (mediana 30 vs 40,  $p=0,041$ ) będącego ogólnym markerem makrofagów oraz CD163 (mediana 10 vs 20,  $p=0,041$ ), markera makrofagów spolaryzowanych w kierunku M2, które obecne w mikrośrodowisku guza, opisywane są jako korelujące z gorszym przeżyciem chorych na raka piersi<sup>110</sup> (**Rycina 19, B-E**). Nie wykazano natomiast korelacji poziomu białka ER $\alpha$ 36 w komórkach zrębu ze stadium choroby, zajęciem węzłów chłonnych, typem histologicznym czy molekularnym. (**Tabela 5**). Analiza przeżycia całkowitego (ang. *Overall Survival*, OS) i DFS nie wykazały istotnych różnic w całej grupie chorych. Ze względu na niekorzystne działanie CAFs szczególnie u chorych na potrójnie-



negatywnego raka piersi (Wstęp niniejszej pracy; Podrozdział 3.3.1.3: CAFs w raku piersi), przeprowadzono dodatkowe analizy. Jednak nie wykazały istotności, co w tym przypadku może być spowodowane niską licznnością grupy badanej (N=14).



*Rycina 19. A. Reprezentatywne fotografie przedstawiające barwienia ER $\alpha$ 36 w fibroblastach znajdujących się w zrębie guzów chorych na raka piersi; B-E . Zakresy poziomu badanych białek: Ki67, CXCR4, CD68 i CD163 w podgrupach z negatywnym i pozytywnym statusem ER $\alpha$ 36 w CAFs.*

*Tabela 5. Analiza poziomu białka ER $\alpha$ 36 w zrębie guzów chorych na raka piersi w kontekście danych kliniczno-patologicznych. W przypadku analizy dwóch prób, test U Manna-Whitneya był wykorzystany podczas analizy, natomiast w przypadku trzech lub więcej prób, test Kruskala-Wallis.*

Zmienna	N	Mediana poziomu białka		Wartość p
		ER $\alpha$ 36 w zrębie guza (25-75 percentyl)		
<b>Stopień T</b>				0,151
T1	44	22,25 (15,50-31,00)		
T2	53	18,00 (12,25-28,00)		
T3	3	11,25 (9,79-18,13)		
T4	2	7,50 (7,00-8,00)		
<b>Stopień N</b>				0,425
Negatywny	43	20,00 (13,33-30,00)		
Dodatni	53	20,00 (10,63-26,50)		
<b>Stopień złośliwości histologicznej</b>				0,356
1	14	13,33 (8,375-32,80)		
2	54	20,00 (12,50-28,00)		
3	40	21,00 (12,50-29,50)		
<b>Typ histologiczny</b>				0,960
Przewodowy	90	20,00 (11,81-28,00)		
Inny	13	17,50 (12,29-33,50)		
<b>Typ molekularny</b>				0,429
Luminalny A	30	17,75 (9,69-24,50)		
Luminalny B HER2-	25	17,50 (11,13-28,00)		
Luminalny B HER2+	22	20,00 (11,81-24,25)		
Nieluminalny HER2+	5	22,50 (18,00-45,00)		
Potrójnie-negatywny	14	23,00 (17,00-40,00)		

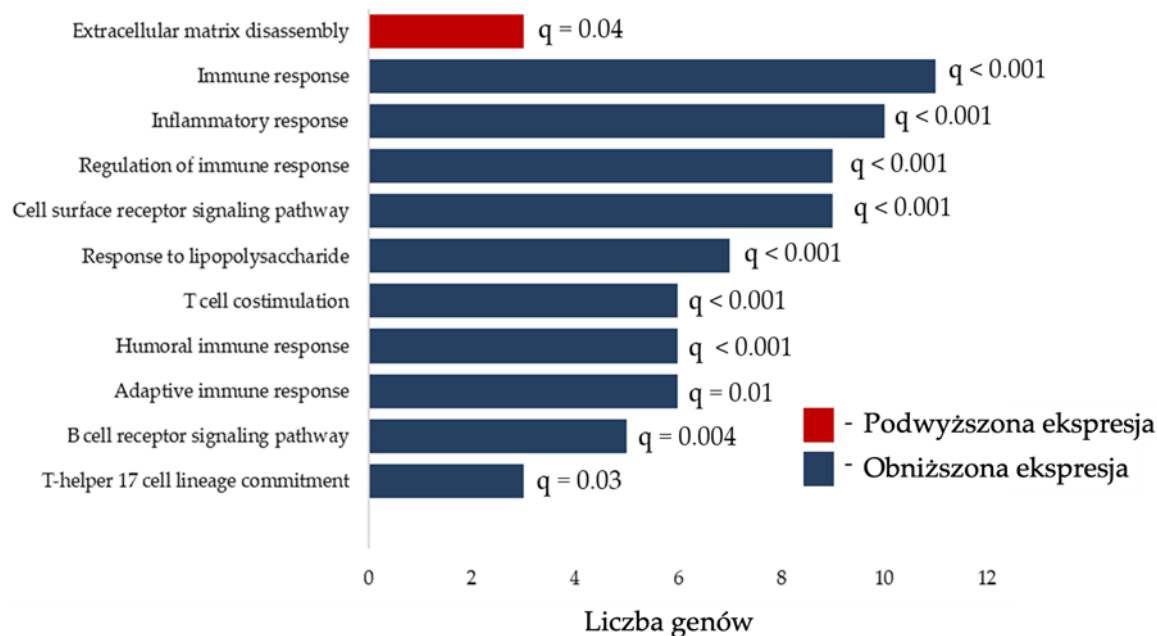
Zmienna	Mediana poziomu białka		
	N	ER $\alpha$ 36 w zrębie guza (25-75 percentyl)	Wartość p
<b>ER</b>			0,311
Negatywny	23	22,00 (18,00-40,00)	
Pozytywny	73	19,00 (11,25-26,50)	
<b>PR</b>			0,118
Negatywny	26	22,50 (19,50-40,00)	
Pozytywny	70	17,50 (11,19-28,00)	
<b>HER2</b>			0,563
Negatywny	69	20,00 (11,13-28,00)	
Pozytywny	27	20,00 (14,00-25,00)	

## 7.6 Badanie korelacji poziomu ER $\alpha$ 36 w CAFs guzów chorych na raka piersi z ekspresją genów związanych odpowiedzią immunologiczną

Ponieważ wysoki poziom ER $\alpha$ 36 w guzach korelował z wysoką ekspresją CD68 oraz CD163, które są znanymi markerami makrofagów oraz makrofagów spolaryzowanych jako M2, postanowiono przeanalizować w guzach ekspresję genów związanych z odpowiedzią immunologiczną w grupach pacjentek z niskim i wysokim poziomem ER $\alpha$ 36 w zrębie guzów. Wykorzystano w tym celu panel nCounter PanCancer Immune Profiling Panel (NanoString Technologies). Sześć transkryptów wykazało podwyższoną ekspresję w grupie o wysokim poziomie ER $\alpha$ 36 w CAFs, a 41 transkryptów charakteryzowała obniżona ekspresja. Transkrypcją o najbardziej podwyższonej ekspresji był *SPP1* (logFC=1,64, p=0,01), a o najbardziej obniżonej *CXCL13* (logFC=-2,21, p=0,02).

Następnie, aby oszacować znaczenie odmiennie regulowanych genów, przeprowadzono analizę procesów biologicznych Gene Ontology przy użyciu narzędzia do adnotacji funkcji DAVID (David Functional Annotation Tool). Procesem, który był znacząco podwyższony u chorych z wysokim poziomem ER $\alpha$ 36 był rozkład macierzy międzykomórkowej (GO:0022617, q=0,04 (wartość q uwzględnia wartość p po poprawce

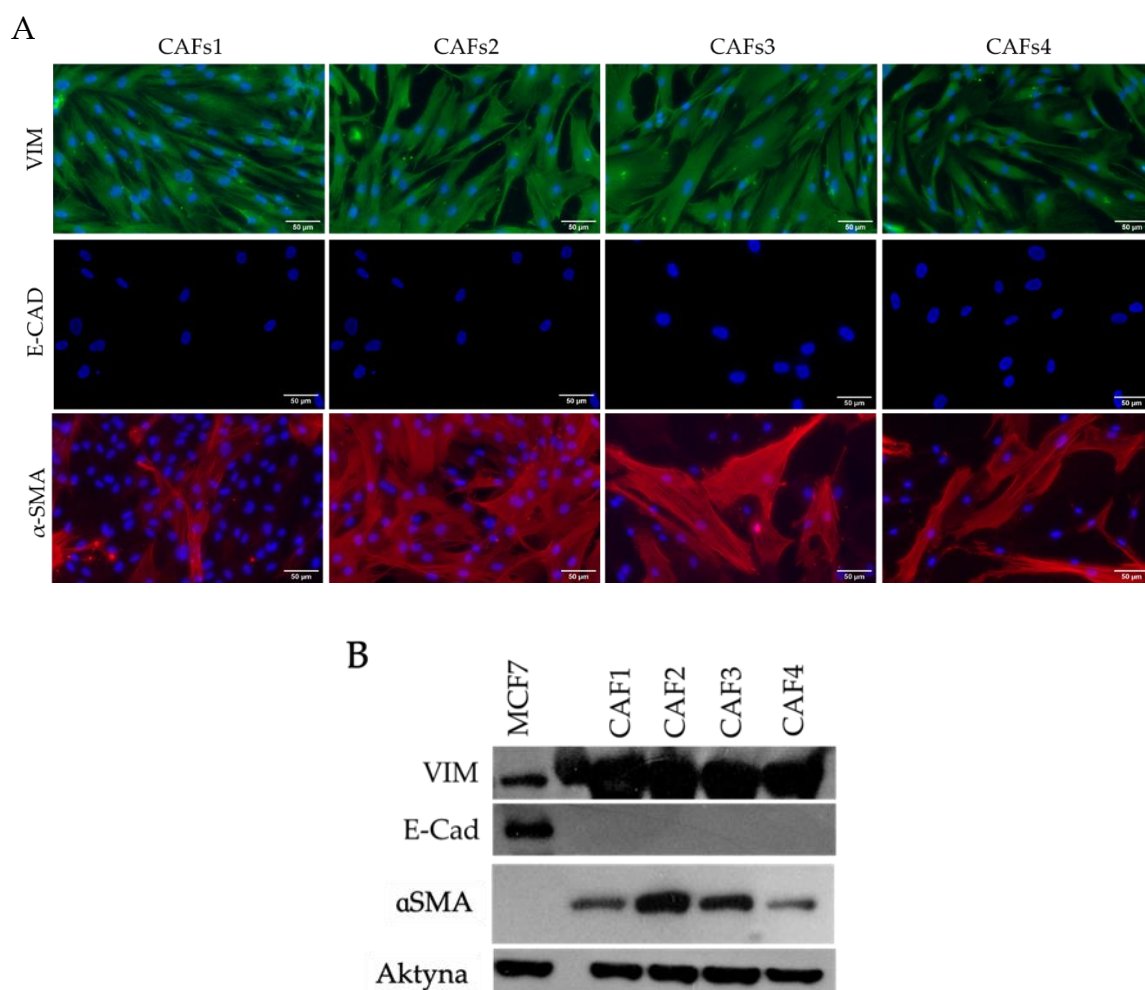
na testowanie wielokrotne)), a najbardziej obniżonym procesem była regulacja odpowiedzi immunologicznej (GO:0050776,  $q < 0,001$ , **Rycina 20**).



**Rycina 20.** Znacząco zmienione procesy biologiczne u chorych ze zrębem guza bogatym w ER $\alpha$ 36 przedstawione jako liczba genów zaangażowanych w konkretny proces.

### 7.7 Izolacja i analiza *in vitro* wpływu CAFs o różnym poziomie ER $\alpha$ 36 na komórki potrójnie-negatywnego raka piersi

Cztery linie fibroblastów związanych z nowotworem zostały wyizolowane z guzów pierwotnych pobranych operacyjnie od chorych. Po trzech pasażach z wykorzystaniem trypsyny, komórki zostały sprawdzone pod kątem markerów: wimentyny (VIM), alfa aktyny mięśni gładkich ( $\alpha$ -SMA) oraz E-kadheryny (E-CAD) z wykorzystaniem immunofluorescencji i metody Western blot. Wszystkie uzyskane linie komórkowe barwiły się pozytywnie na marker fibroblastów VIM i negatywnie na E-CAD. W przypadku  $\alpha$ -SMA zauważono heterogenność w obrębie badanych linii komórkowych, jak i w obrębie samych komórek (**Rycina 21**).



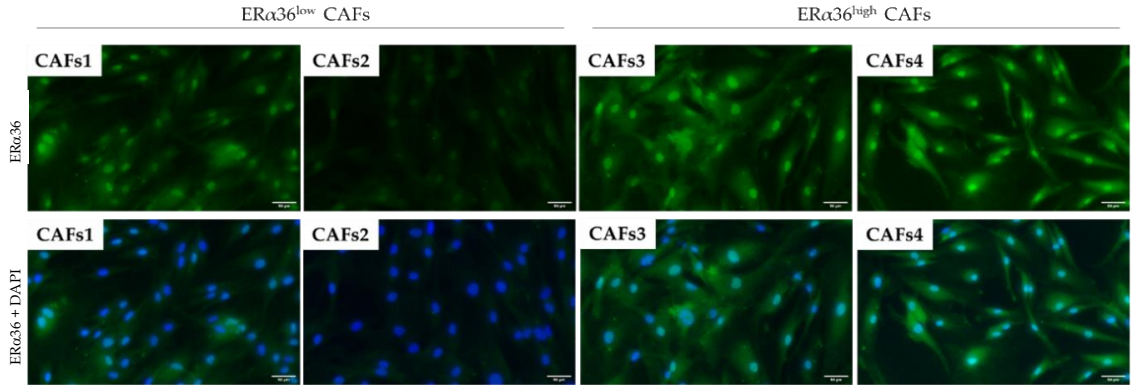
**Rycina 21.** A. Analiza markerów molekularnych wykorzystywanych w identyfikacji CAFs metodą barwienia immunofluorescencyjnego; B. Analiza markerów metodą Western blot. Wimentyna (VIM), E-kadheryna (E-CAD) i aktyna alfa mięśni gładkich ( $\alpha$ -SMA).

Uzyskane linie CAFs były następnie barwione przy użyciu przeciwciała przeciwko ER $\alpha$ 36. Zaobserwowano, że dwie linie, CAFs3 i CAFs4 mają znacząco wyższy poziom ER $\alpha$ 36 niż CAFs1 oraz CAFs2 (**Rycina 22 A**). Dlatego sklasyfikowano CAFs1 i CAFs2 jako ER $\alpha$ 36<sup>low</sup>, a CAFs3 i CAFs4 jako ER $\alpha$ 36<sup>high</sup>. Wiedząc, na podstawie danych literaturowych<sup>84,111</sup>, że różne subpopulacje CAFs różnią się pod kątem ekspresji genów, jak i pod kątem modulacji charakterystyki immunologicznej mikrośrodowiska guza, zdecydowano się przeanalizować obie subpopulacje korzystając z panelu profilującego nCounter PanCancer Immune Profiling Panel (NanoString Technologies). Podczas analizy wykryto, że subpopulacje ER $\alpha$ 36<sup>low</sup> oraz ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> znacząco różnią się pod

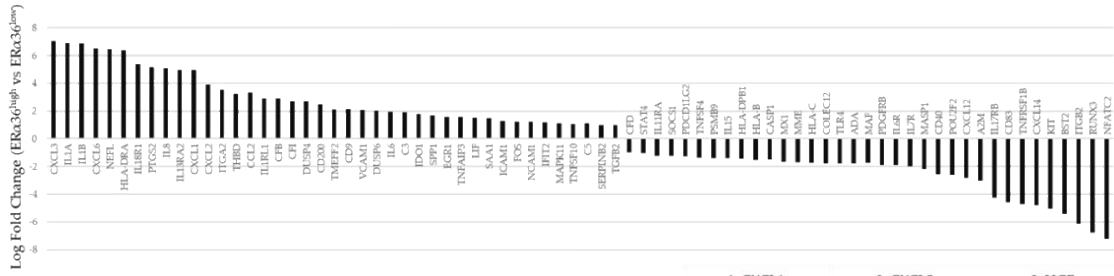
kątem ekspresji badanych genów. Czterdzieści jeden z nich posiadało podwyższoną ekspresję ( $\log_{FC} > 1$ ), a 35 obniżoną ( $\log_{FC} < -1$ ) w subpopulacji ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> w porównaniu do ER $\alpha$ 36<sup>low</sup>. Genami o najwyższej ekspresji w ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> w stosunku do subpopulacji ER $\alpha$ 36<sup>low</sup> były *CXCL3*, *IL1A*, *IL1B*, *CXCL6* oraz *NEFL*, a tymi o najbardziej obniżonej: *NFATC2*, *RUNX3*, *ITGB2*, *BST2* i *KIT* (**Rycina 22 B**).

Obserwowane różnice w ekspresji badanych genów sugerowały, że obie subpopulacje CAFs wykazują się różnym profilem wydzielanych czynników. Dlatego kolejnym krokiem było zbadanie sekretomu CAFs z użyciem zestawu Human Cytokine XL Profiler, który ocenia obecność cytokin wydzielanych przez komórki do medium, w którym się znajdują. Wykazano, że CAFs ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> wydzielają większe ilości takich cytokin jak *CXCL1*, *CXCL5*, *HGF*, *IL-8*, *GM-CSF* oraz *VEGF* (**Rycina 22 C**). Szereg z tych cytokin produkowanych przez ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> CAFs powiązany jest w badaniach z progresją i inwazją nowotworów<sup>112</sup>, dlatego zdecydowano się zbadać ich wpływ na komórki potrójnie-negatywnego raka piersi. W tym celu hodowano komórki linii MDA-MB-231 i Hs578t w warunkach 3D, czyli zanurzone w mieszaninie matryzeli (naśladującego macierz międzykomórkową) w pożywce kondycjonowanej pobranej podczas hodowli poszczególnych CAFs i obserwowano fenotyp komórek MDA-MB-231 i Hs578t przy użyciu mikroskopu świetlnego. Media kondycjonowane pobrane od CAFs ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> istotnie indukowały powstawanie kolonii rozgałęziających się, co wskazuje na możliwości inwazyjne komórek (średnia liczba rozgałęziających się kolonii linii MDA-MB-231 na pole widzenia równa 3 oraz 3,8 dla CAFs ER $\alpha$ 36<sup>low</sup> (odpowiednio CAFs1 i CAFs2) vs 16,6 oraz 19,7 dla ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> (odpowiednio CAFs i CAFs4);  $p < 0,001$ ). Natomiast, dla linii Hs578t równa 7,5 oraz 6,2 dla CAFs ER $\alpha$ 36<sup>low</sup> (odpowiednio CAFs1 i CAFs2) vs 15,8 oraz 15,9 dla ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> (odpowiednio CAFs i CAFs4);  $p < 0,001$ ; **Rycina 22 D**).

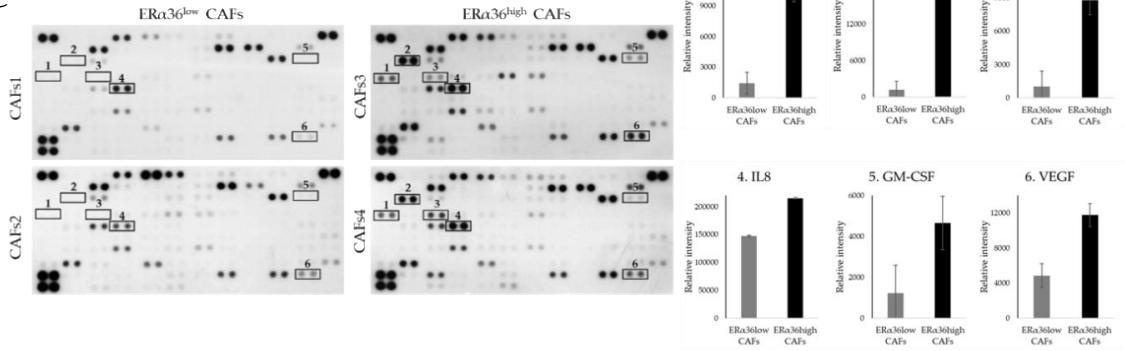
A



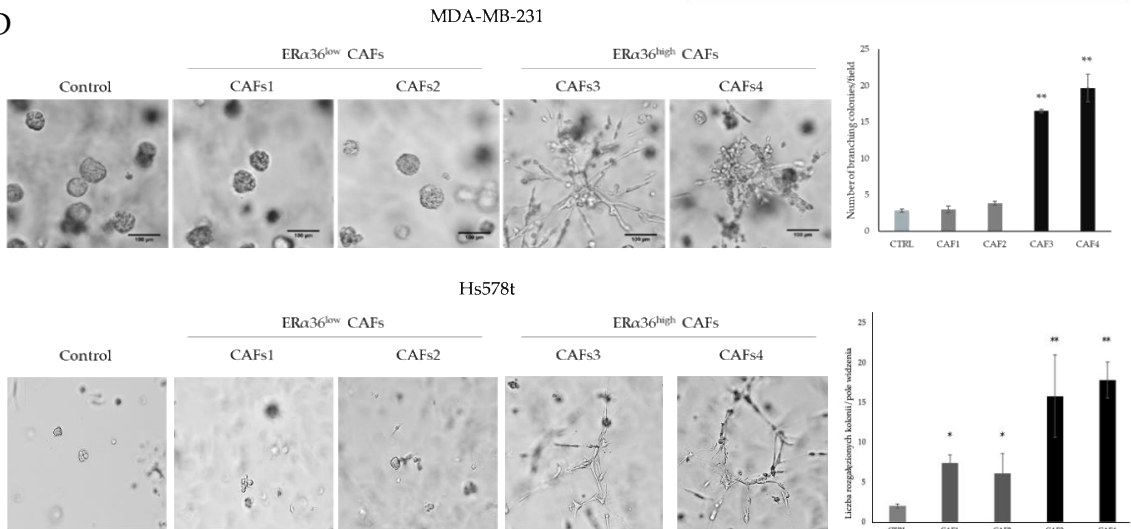
B



C



D

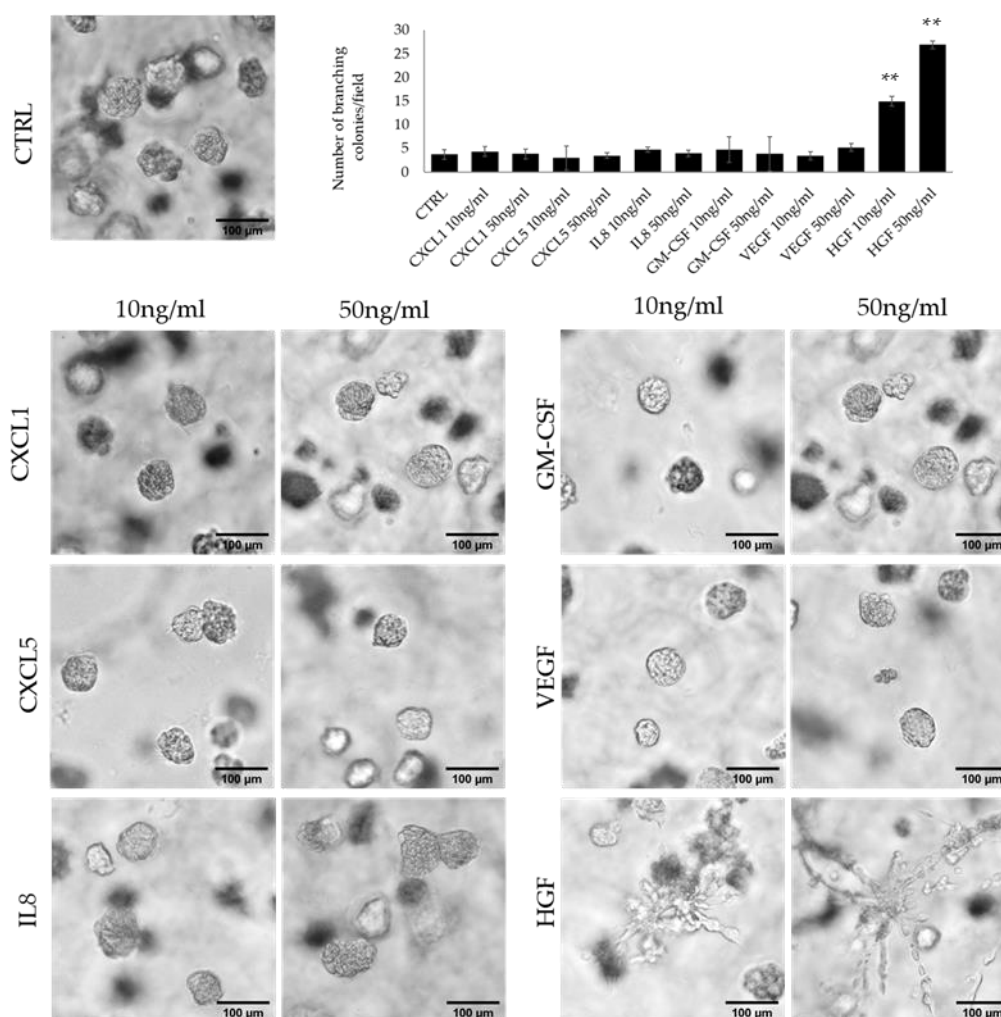


*Rycina 22. Charakterystyka hodowli CAFs od chorych na raka piersi. A. Barwienie ER $\alpha$ 36 (zielony) metodą immunofluorescencyjną oraz barwienie DAPI (niebieski) otrzymanych hodowli; B. Analiza ekspresji genów przy pomocy zestawu nCounter PanCancer Immune Profiling panel w subpopulacjach ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> CAFs vs ER $\alpha$ 36<sup>low</sup> CAFs, geny z logFC > 1 były uznane za geny o podwyższonej ekspresji, a geny z logFC < -1 były uznane za geny o obniżonej ekspresji; C. Analiza cytokin wydzielanych przez subpopulacje CAFs z wykorzystaniem zestawu Human Cytokine XL Profiler, panele na górze przedstawiają sekretom ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> i ER $\alpha$ 36<sup>low</sup> CAFs, a wykresy poniżej przedstawiają pomiary ilości wybranych cytokin wykazujących różnice między subpopulacjami; D. hodowle 3D w Matryzeli komórek potrójnie-negatywnego raka piersi (linie MDA-MB-231 i Hs578t) inkubowanych z pożywkami kondycjonowanymi z CAFs. Pożywki pobrane od ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> CAFs istotnie indukowały wzrost rozgałęziających się kolonii (wykresy po prawej stronie fotografii); \*p<0,001 \*\* p<0,0001 obliczone względem kontroli; fotografie wykonane przy użyciu obiektywu 10x.*

### **7.8. Analiza cytokin produkowanych przez CAFs o wysokim poziomie ER $\alpha$ 36 na inwazyjny fenotyp komórek potrójnie-negatywnego raka piersi**

Biorąc pod uwagę obserwowane wcześniej różnice w charakterystyce CAFs ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> oraz ER $\alpha$ 36<sup>low</sup> obejmującej produkcję różnych cytokin oraz ich różny wpływ na komórki potrójnie-negatywnego raka piersi, zdecydowano się sprawdzić, które z wydzielanych cząsteczek mogą być odpowiedzialne za indukcję inwazyjnego fenotypu komórek w hodowli 3D. Wpływ sześciu cytokin obserwowanych jako charakterystyczne dla ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> CAFs w porównaniu do ER $\alpha$ 36<sup>low</sup> (CXCL1, CXCL5, IL-8, GM-CSF, VEGF oraz HGF) został zbadany w dwóch stężeniach, 10 ng/ml oraz 50 ng/ml, pod kątem indukcji tworzenia się kolonii rozgałęzionych linii MDA-MB-231. Zaobserwowano, że jedynie HGF w obu stężeniach istotnie indukował tworzenie się rozgałęzionych kolonii w porównaniu do kontroli (średnia 3,7 kolonii/pole widzenia dla kontroli vs odpowiednio 14,9 oraz 26,9 dla 10 ng/ml i 50 ng/ml HGF; p<0,001; **Rycina 23**). Co więcej, efekt ten był zależny od stężenia HGF, 50 ng/ml istotnie zwiększało liczbę rozgałęzionych kolonii w porównaniu do 10 ng/ml (14,9 vs 26,9; p<0,001).



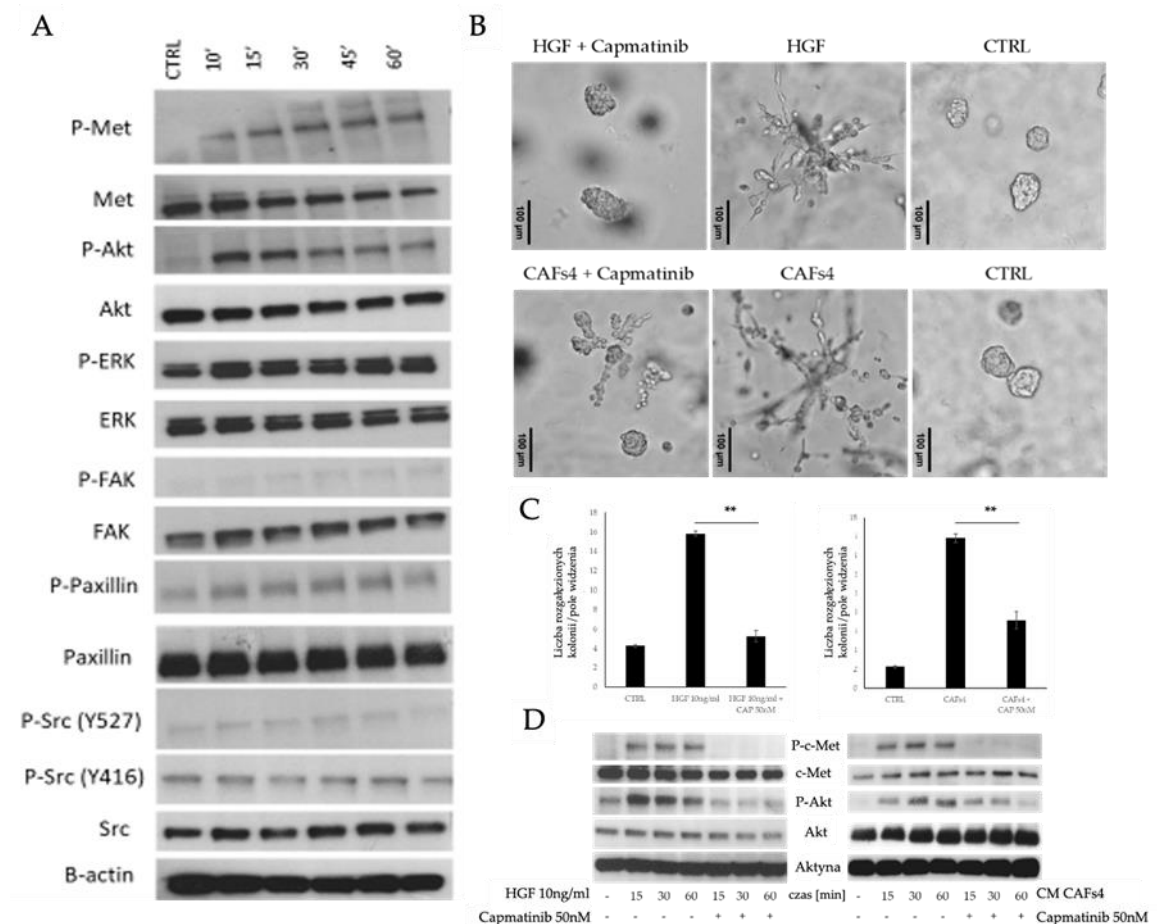


*Rycina 23. Hodowle 3D komórek linii MDA-MB-231 z wybranymi cytokinami w stężeniach 10 i 50 ng/ml. HGF jako jedyny indukował tworzenie się rozgałęzionych kolonii. \*\* $p < 0,001$  obliczane względem kontroli; fotografie wykonano przy użyciu obiektywu 10x. Wykres reprezentuje średnią liczbę rozgałęziających się kolonii na pole widzenia.*

Następnie sprawdzono, czy receptor dla HGF (c-Met, HGFR) jest zaangażowany w stymulację komórek MBA-MB-231 wywołaną mediami kondycjonowanymi pobranymi z ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> CAFs. W celu inhibicji receptora c-Met użyto capmatinibu<sup>113</sup>, który jest inhibitorem drobnocząsteczkowym receptora c-Met. W hodowli 3D, zarówno media kondycjonowane pobrane z linii ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> CAFs<sup>4</sup>, jak i medium z dodatkiem HGF stymulowały rozgałęzianie się kolonii MDA-MB-231 (11,75 kolonii dla HGF oraz 15,83 kolonie dla CAFs<sup>4</sup>) w porównaniu do kontroli (2,25 kolonii). Efekt ten był zniesiony po dodaniu do hodowli capmatinibu (spadek z 11,75 do 1,92 dla HGF  $p=0,002$  oraz spadek

z 15,83 na 7,17 dla CAFs4,  $p=0,003$ ; **Rycina 24 B i C**). Powyższe wyniki silnie sugerują zaangażowanie ścieżki sygnalizacyjnej receptora c-Met w indukcję rozgałęziania się kolonii MBA-MB-231, dlatego kolejnym etapem było zbadanie białek ścieżek sygnalizacyjnych zależnych od receptora c-Met. Zbadano fosforylację białek Akt, FAK, paksyliny, Src jak i samego receptora c-Met. Białka te zaangażowane są m.in. w indukcję inwazyjności komórek nowotworowych. Wykazano, że HGF oraz medium kondycjonowane z CAFs4 indukują fosforylację zarówno receptora c-Met, jak i białka Akt (**Rycina 24 A i D**).

Uzyskane wyniki, przedstawione w tej części pracy wskazują, że fibroblasty związane z nowotworami o wysokiej ekspresji ER $\alpha$ 36 indukują inwazyjność *in vitro* komórek potrójnie-negatywnego raka piersi poprzez ścieżkę c-Met-Akt.



**Rycina 24.** Analiza ścieżki sygnalizacyjnej receptora dla HGF (c-Met) zaangażowanej w indukcję fenotypu inwazyjnego komórek MDA-MB-231. A. Analiza Western blot aktywacji białek ścieżki sygnalizacyjnej receptora HGF; B. Reprezentatywne fotografie kolonii w hodowli 3D podczas indukcji

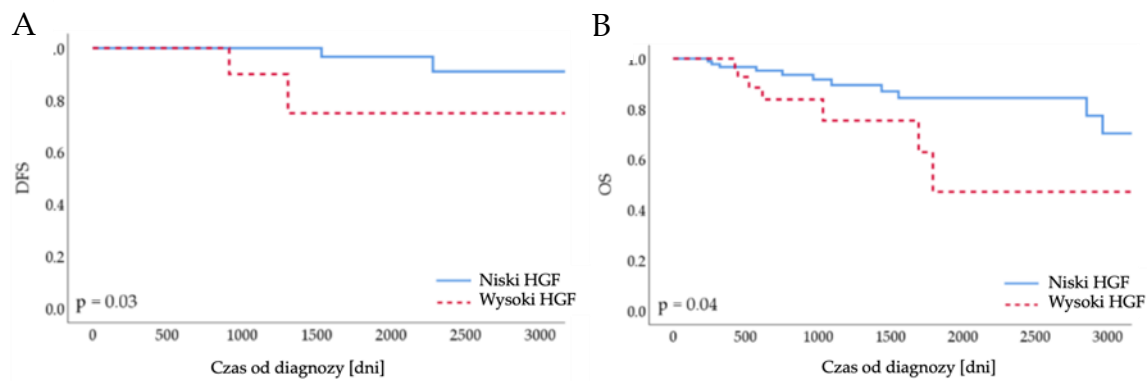
HGF lub medium kondycjonowanym (CM) z ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> CAFs w obecności bądź bez inhibitora c-Met (capmatinib), obiektyw 10x; C. wykresy przedstawiające pomiary ilości rozgałęzionych kolonii w próbkach, \*p<0.05; D. Analiza Western blot ścieżki sygnalizacyjnej c-Met po indukcji HGF lub CM.

### 7.9 Znaczenie kliniczne cytokin wydzielanych przez CAFs ER $\alpha$ 36<sup>high</sup>

Biorąc pod uwagę, że dane dotyczące ekspresji izoformy ER $\alpha$ 36 w raku piersi nie są dostępne w udostępnianych bazach danych, zdecydowano się przeanalizować wpływ cytokin produkowanych przez ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> CAFs na całkowite przeżycie i przeżycie wolne od nawrotów chorych na TNBC, wykorzystując z tym celu bazę TCGA. Dla wszystkich poziomów ekspresji genów użyto górnego kwartyla jako wartości odcinającej. Wysoka ekspresja HGF była niekorzystnym czynnikiem rokowniczym, zarówno dla całkowitego czasu przeżycia (OS) jak i przeżycia wolnego od nawrotów choroby (DFS) u chorych na potrójnie-negatywnego raka piersi (N=121, p=0,03 i p=0,04 dla DFS i OS, odpowiednio, **Tabela 6, Rycina 25 A i B**).

*Tabela 6. Przeżycie wolne od nawrotów choroby (DFS) i całkowite przeżycie (OS) chorych na raka piersi w odniesieniu do poziomu ekspresji badanych cytokin nadprodukowanych przez ER $\alpha$ 36<sup>high</sup>CAF. Pogrubiono wyniki znaczące statystycznie. CI – przedział ufności (ang. Confidence Interval).*

Cytokina	DFS				OS			
	HR	95% dolny CI	95% górnny CI	Log-rank [p]	HR	95% dolny CI	95% górnny CI	Log- rank [p]
CXCL1	1,496	0,155	14,44	0,7	0,823	0,2375	2,855	0,8
CXCL5	3,98 x10 <sup>-9</sup>	0	∞	0,3	1,321	0,4677	3,731	0,6
IL-8	4,43	0,6219	31,56	0,1	<b>3,157</b>	<b>1,226</b>	<b>8,133</b>	<b>0,03</b>
GM-CSF	3,83 x10 <sup>-9</sup>	0	∞	0,3	0,456	0,1046	1,992	0,3
VEGF	1,292	0,1339	12,46	0,8	1,121	0,3651	3,441	0,8
HGF	<b>7,159</b>	<b>0,9431</b>	<b>54,34</b>	<b>0,03</b>	<b>2,697</b>	<b>1,025</b>	<b>7,094</b>	<b>0,04</b>



*Rycina 25. Krzywe przeżycia Kaplana – Meiera dla A. DFS i B. OS zależnie od poziomu ekspresji HGF w guzach pierwotnych u chorych na TNBC zebranych w bazie TCGA.*

## 8. Dyskusja

### 8.1. Metody badające amplifikację genu *ESR1* mogą wykrywać różne aberracje w jego obrębie

Ze względu na charakterystykę i pochodzenie raka piersi, receptor estrogenowy jest jednym z kluczowych czynników wpływających na tę chorobę. Dogłębne poznanie i zrozumienie jego roli pozwoli na skuteczniejsze leczenie i diagnostykę chorych, jak również na optymalizację przewidywania przebiegu choroby.

Amplifikacja genu *ESR1* została opisana nie tylko w raku piersi i mastopatiach<sup>114</sup>, ale również w raku trzonu macicy<sup>115</sup>, gdzie była obecna w zmianach przednowotworowych nabłonka, co wskazuje na zaangażowanie genu *ESR1* już na etapie pierwszych zmian w komórkach nabłonka prowadzących do powstania nowotworu. Warto nadmienić, że w raku piersi liczba kopii genu *ESR1* badana metodą FISH często koreluje z dobrą prognozą chorych leczonych tamoksyfenem<sup>116</sup>. Związane jest to z tym, że guzy z podwyższoną liczbą kopii genu *ESR1* wykazują wysoki poziom jego produktu, receptora ER $\alpha$ 66 i tym samym zależne są od sygnalizacji i proliferacji indukowanej przez estrogen, która w momencie stosowania tamoksyfenu staje się nieaktywna. Jednak badania z wykorzystaniem innych metod, takich jak na przykład qPCR, wykazują znaczne zróżnicowanie w zakresie częstości występowania podwyższonej liczby kopii genu *ESR1* u chorych (0-75%)<sup>117</sup>, co zależne jest od użytej metody i wybranej wartości odcięcia. Wyniki badań podających korelacje między liczbą kopii genu *ESR1* a poziomem białka ER $\alpha$ 66 również nie są jasne, a korelacje te występują częściej w przypadku takich metod jak FISH<sup>118,119</sup>. Podobny trend zaobserwowano również w tej pracy. Podwyższona liczba kopii genu *ESR1* oceniana metodą FISH korelowała z poziomem mRNA izoformy ER $\alpha$ 66, który odzwierciedlał poziom jej białka badany metodą IHC.

Podwyższona liczba kopii genu *ESR1* badana metodą qPCR korelowała z gorszym przeżyciem wolnym od choroby. Podwyższoną liczbę kopii genu *ESR1* badaną metodą qPCR zaobserwowano u 9,4% chorych. Co interesujące, większość z nich zaobserwowano u chorych ocenionych jako ER $\alpha$ 66-negatywne (15% u chorych ER $\alpha$ 66-negatywnych vs 5% u ER $\alpha$ 66-pozytywnych). Ponieważ wzrost liczby kopii genu jest

jednym z podstawowych mechanizmów produkcji zwiększonej ilości białka, spodziewać by się można, że liczba kopii genu *ESR1* mierzona metodą qPCR również powinna korelować z poziomem mRNA ER $\alpha$ 66, co nie zostało zaobserwowane. Należy jednak pamiętać, że dany gen może być informacją do powstania wielu różnych izoform białka, a w jego obrębie może znajdować się wiele miejsc regulacji ekspresji genu. W dodatku, nie wykazano korelacji między liczbą kopii genu mierzoną metodą FISH a qPCR, co sugeruje, że obie metody mierzą inny rodzaj aberracji w obrębie genu *ESR1*. W przypadku qPCR używa się zwykle starterów wykrywających znacznie krótsze fragmenty DNA niż w przypadku sond FISH, co zwiększa prawdopodobieństwo wykrycia dyskretnych zmian w obrębie genu, pozostających niewidocznymi dla metody FISH. Ponadto, w metodzie qPCR wykorzystywano zhomogenizowane fragmenty tkanki zawierające guz, a w przypadku metody FISH ocenie podlegają wyłącznie obserwowane komórki nowotworowe. Może w tym wypadku dojść do "rozcieńczenia" sygnału, aczkolwiek próbki włączane do analiz w niniejszej pracy zostały ocenione jako składające się głównie z komórek nowotworowych, więc założono, że ewentualne "rozcieńczenie" nie miało znaczącego wpływu na wynik.

Jednym z wyników takich dyskretnych zmian mogą być różnice w poziomach mRNA izoform powstających na matrycy danego genu. W niniejszej pracy przedstawiono analizy poziomów mRNA dwóch izoform receptora estrogenowego: klasycznej ER $\alpha$ 66 i nowopoznanej, krótszej izoformy ER $\alpha$ 36. Zwiększona liczba kopii genu *ESR1* mierzona metodą qPCR była związana z niższym poziomem izoformy ER $\alpha$ 66 (mierzonym jako mRNA oraz białko), a w przypadku poziomu izoformy ER $\alpha$ 36 nie uzyskano statystycznie istotnego wyniku. Te różnice, jak również to, że liczba kopii genu *ESR1* mierzona metodą FISH koreluje z wyższym poziomem izoformy ER $\alpha$ 66, ale nie z ER $\alpha$ 36, zwracają uwagę na istotność lokalizacji sond i starterów wykorzystywanych do tego typu badań. Użyte w niniejszej pracy startery qPCR wykrywają fragment genu *ESR1* o wielkości 60 bp zlokalizowany w pierwszym intronie, natomiast sonda FISH wykrywa fragment o wielkości 395 kbp obejmujący cały gen *ESR1*. Dyskretne aberracje pojawiające się w miejscach regulatorowych genów mogą znacząco wpływać na jego ekspresję, lub na powstanie różnych izoform białka na drodze alternatywnego składania mRNA<sup>120</sup>. Zatem możliwe jest, że podczas badania zmian w liczbie kopii genu *ESR1* metodą qPCR wykrywano warianty, które powodowały obniżenie ekspresji izoformy ER $\alpha$ 66, a nie miały wpływu na izoformę

ER $\alpha$ 36, bądź warianty, gdzie ER $\alpha$ 36 był nadeksprymowany, a ER $\alpha$ 66 nie. Co więcej, transkrypcja izoformy ER $\alpha$ 36 inicjowana jest z alternatywnego promotora znajdującego się w pierwszym intronie genu *ESR1*<sup>121</sup>. Przyglądając się stosunkom poziomu ekspresji izoform ER $\alpha$ 36/ER $\alpha$ 66, rzeczywiście zauważono, że w przypadku próbek o wyższej liczbie kopii genu *ESR1* mierzonym metodą qPCR stosunek ER $\alpha$ 36/ER $\alpha$ 66 był 60-krotnie wyższy niż w przypadku próbek o normalnym poziomie *ESR1*. Mogło zatem dojść do wzrostu liczby kopii tylko części genu *ESR1* wpływającej na wzrost ekspresji ER $\alpha$ 36, która pozostała niewykryta przez sondę FISH.

## 8.2 Izofорма ER $\alpha$ 36 jest negatywnym czynnikiem rokowniczym dla chorych na raka piersi o podtypie ER $\alpha$ 66-pozytywnym, jak i ER $\alpha$ 66-negatywnym

Biorąc pod uwagę wyniki analizy poziomów ekspresji dwóch izoform receptora estrogenowego w odniesieniu do zmian w obrębie genu *ESR1*, w przedstawionej pracy skupiono się na ich analizie w kontekście znaczenia rokowniczego w raku piersi, a konkretnie na niedawno odkrytej izoformie - ER $\alpha$ 36. Jej rola prognostyczna była znamienna zarówno u chorych ER $\alpha$ 66-pozytywnych, jaki i u chorych ER $\alpha$ 66-negatywnych. Efekt ten obserwowano również w próbkach o bardzo wysokiej ekspresji ER $\alpha$ 66, co sugeruje, że może ona znosić efekt terapii hormonalnej. Podobne rezultaty otrzymano w pracy Wang et al., gdzie izofорма ER $\alpha$ 36 korelowała z gorszym przeżyciem chorych w obu grupach (ER $\alpha$ 66 -pozytywnej i ER $\alpha$ 66-negatywnej), włączając w to chore leczone tamoksyfenem<sup>122</sup>. Natomiast badania przeprowadzone przez Shi et al. wykazały rolę prognostyczną specyficzną u chorych ER $\alpha$ 66-pozytywnych leczonych tamoksyfenem<sup>123</sup>. Badania pokazały, że ER $\alpha$ 36 uruchamia niezależną od klasycznej ER $\alpha$ 66 ścieżkę sygnalizacyjną obejmującą szlak kinaz MAP<sup>124</sup>. Mechanizm ten może tłumaczyć, dlaczego w próbkach z wysoką ekspresją ER $\alpha$ 66, izofорма ER $\alpha$ 36 koreluje z gorszym przeżyciem. Sygnalizacja MAPK prowadząca do wzmożonej proliferacji, jest szybkim mechanizmem, który wiele rodzajów komórek nowotworowych wykorzystuje do niekontrolowanej proliferacji<sup>125</sup>. Co więcej, komórka podlegająca temu mechanizmowi staje się niewrażliwa na terapie hormonalne takie jak tamoksyfen czy fulwestrant<sup>126</sup>. Proponuje się, że izofорма ER $\alpha$ 36 odgrywa ważną rolę w

oporności na standardowe leczenie luminalnych raków piersi<sup>122,127</sup>. Kolejnym mechanizmem mogącym wpływać na oporność na terapię hormonalną jest obniżenie ekspresji ER $\alpha$ 66 spowodowane przez izoformę ER $\alpha$ 36, przez co komórka nowotworowa stanie się niezależna od klasycznej, jądrowej sygnalizacji estrogenowej, tym samym nie będzie podlegała celowi terapii hormonalnej<sup>128</sup>. Powyższe dane zwracają uwagę na istotność kliniczną izoformy ER $\alpha$ 36. Natomiast wyniki dla poziomu mRNA klasycznej izoformy ER $\alpha$ 66 przedstawione w tej pracy, są zgodne z naukowym konsensusem na temat receptora estrogenowego i jego roli w raku piersi. Wysoki poziom ER $\alpha$ 66 znamienne korelował ze statusem ER $\alpha$ 66 ocenionym immunohistochemicznie podczas rutynowych badań. Zauważono również związek z dobrą prognozą, najprawdopodobniej ze względu na skuteczną terapię raków hormonozależnych.

### 8.3 CAFs o wysokim poziomie białka ER $\alpha$ 36 mogą modulować środowisko immunologiczne guza

Podczas oceny tkanek guzów pobranych od chorych na raka piersi pod kątem obecności białka ER $\alpha$ 36, zauważono, że komórki zrębu guza również wykazują dodatni odczyn podczas barwienia ER $\alpha$ 36. Według danych literaturowych, wcześniej nie została opisana rola białka ER $\alpha$ 36 w komórkach mikrośrodowiska guza piersi. A dane dostępne na temat roli izoformy ER $\alpha$ 66 w CAFs raka prostaty wskazują na istotność receptora estrogenowego w mikrośrodowisku<sup>129,130</sup>. Dlatego zdecydowano się poruszyć ten problem, a szczególnie znaczenie ER $\alpha$ 36 w CAFs.

Heterogenność CAFs i innych komórek mikrośrodowiska guza, ze względu na ich wielomodalny wpływ na komórki nowotworowe, jest przedmiotem aktualnych badań. Jest ona również jednym z czynników wpływających na oporność na terapię<sup>60,131,132</sup>. Najnowsza praca opublikowana przez Friedman i zespół, zwraca uwagę na wysoki poziom heterogenności w obrębie CAFs, badacze wykazali zmienność w liczebności CAFs charakteryzujących się różnymi markerami wraz z progresją choroby<sup>133</sup>. W początkowych stadiach przeważały CAFs o profilu immunomodulującym, a w zaawansowanych postaciach choroby CAFs związane z gojeniem ran i prezentacją



antygenów. Inne badania opublikowane przez grupę z Francji, skupiły się na modulacji środowiska immunologicznego przez różne typy CAFs. Jeden z nich, charakteryzujący się wysokim poziomem takich białek jak FAP,  $\alpha$ SMA, PDGFR $\beta$ , był częściej spotykany w guzach potrójnie-negatywnego raka piersi oraz promował środowisko immunosupresyjne w guzie poprzez sekrecję CXCL12<sup>83</sup>.

W niniejszej pracy zaobserwowano korelację między fibroblastami wykazującymi wysoki poziom ER $\alpha$ 36 a wysokim poziomem białek CD68 i CD163 w zrębie guzów. Oba te białka (CD68 i CD163) związane są z obecnością makrofagów związanych z nowotworem (ang. *Tumor-associated Macrophages*, TAMs). Białko CD68 związane jest z obecnością makrofagów w tkance, a CD163 z obecnością makrofagów spolaryzowanych jako M2<sup>134</sup>. TAMs rekrutowane są przez komórki nowotworowe i pomagają tworzyć mikrośrodowisko immunosupresyjne. Poza tym mogą wspomagać angiogenezę, przebudowę macierzy międzykomórkowej oraz indukować migrację komórek nowotworowych<sup>135</sup>. Makrofagi M1 odpowiedzialne są głównie za działanie prozapalne, a M2 za działanie przeciwzapalne<sup>136</sup>. W mikrośrodowisku guza za niekorzystne rokowniczo uznaje się makrofagi spolaryzowane w kierunku M2, a makrofagi M1 za sprzyjające dobremu rokowaniu<sup>137</sup>. Aczkolwiek, badania przeprowadzone w 2020 roku opierające się na klasyfikacji transkryptomicznej makrofagów M1 i M2 wykazały, że raki piersi o wysokim stopniu infiltracji makrofagami M1 wykazywały wyższy stopień agresywności i proliferacji komórek nowotworowych<sup>138</sup>. Ponadto, badania Takahashi et al. wykazały, że CAFs są zdolne do edukowania makrofagów CD14-pozytywnych uzyskanych od zdrowych dawców, do makrofagów pronowotworowych o wysokiej ekspresji CD68, CD14, CD63, CD200R i CD206<sup>139</sup>. A obecność makrofagów CD163-pozytywnych w mikrośrodowisku TNBC została niedawno skorelowana z gorszym rokowaniem chorych<sup>140</sup>. Powyższe dane sugerują istotność komunikacji między CAFs i TAMs w mikrośrodowisku nowotworowym. Proponuje się, że ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> CAFs odgrywają rolę w polaryzacji makrofagów, a dalsze badania nad tym zjawiskiem mogą potwierdzić ich rolę w immunomodulacji mikrośrodowiska guzów raka piersi. Ponadto, zaobserwowano również wysoką ekspresję Ki67 i CXCR4 w komórkach nowotworowych chorych z ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> CAFs ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> CAFs, co sugeruje wpływ ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> CAFs na proliferację i migrację komórek nowotworowych raka piersi.

Analiza ekspresji genów panelu immunologicznego z wykorzystaniem modelu ontologii (GO) procesów biologicznych zwróciła uwagę na geny eksprymowane w

guzach chorych z CAFs o wysokim poziomie ER $\alpha$ 36. Podwyższonym procesem w tej grupie był rozkład macierzy międzykomórkowej, który jest charakterystycznym dla aktywowanych fibroblastów. Ponadto, dane literaturowe wskazują, że CAFs są znanym modulatorem macierzy międzykomórkowej<sup>141</sup>. Natomiast najbardziej obniżony proces był związany z odpowiedzią i regulacją immunologiczną i zapalną. Wynik ten potwierdza wcześniejsze dane sugerujące zaangażowanie CAFs o wysokiej ekspresji ER $\alpha$ 36 w proces rekrutacji makrofagów i polaryzacji do formy M2. Badania Yavus et al. porównujące normalne fibroblasty i CAFs w tym procesie wykazały, że CAFs efektywnie rekrutowały makrofagi. Efekt ten tłumaczono działaniem cytokin MCP-1 i SDF-1. Natomiast indukcja polaryzacji do formy M2 makrofagów przez CAFs powodowała wyższą ekspresję CD163 i CD206 jak również PD-1, która związana jest z tolerancją immunologiczną. Natomiast ekspresja białka CD68 nie różniła się między grupami<sup>142</sup>. Odpowiedź immunologiczna i ucieczka immunologiczna nowotworów są tematem szeroko badanym, dzięki czemu dają nadzieję na nowe, skuteczne terapie<sup>143,144</sup>.

#### **8.4 Subpopulacja CAFs o wysokim poziomie ER $\alpha$ 36 indukuje inwazyjny fenotyp komórek potrójnie-negatywnego raka piersi, a jej sekretom związany jest z gorszą prognozą chorych na raka piersi**

W niniejszej pracy wykazano po raz pierwszy, że CAFs również wykazują ekspresję izoformy ER $\alpha$ 36, a subpopulacja cechująca się wysokim poziomem tego białka wydziela zestaw cytokin, który może być związany z progresją nowotworową. Cytokiny produkowane przez fibroblasty ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> takie jak CXCL1, CXCL5, HGF, IL-8, GM-CSF czy VEGF działają głównie pronowotworowo. W badaniach Zou et al. ekspresja CXCL1 w fibroblastach zrębu raka piersi korelowała z wyższym zaawansowaniem guza, nawrotem choroby i gorszym przeżyciem<sup>145</sup>, jak również z opornością na chemioterapię i przerzutami<sup>146</sup>. CXCL5 został opisany po raz pierwszy przez zespół Romero-Moreno jako główny czynnik wpływający na kolonizację komórek raka piersi w kości na modelu

mysim<sup>147</sup>. Natomiast IL-8 jest jednym z czynników wpływających na promowanie wzrostu kolonii potrójnie-negatywnego raka piersi i jako czynnik predykcyjny odnośnie czasów przeżycia<sup>148</sup>. W przedstawionej pracy, wysoki poziom IL-8 również korelował z gorszym przeżyciem chorych na potrójnie-negatywnego raka piersi w analizie z wykorzystaniem bazy TCGA. Kolejna z cytokin produkowanych przez ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> CAFs, VEGF, jest znanym induktorem angiogenezy i niekorzystnym czynnikiem rokowniczym w raku piersi<sup>149,150</sup>. Wszystkie wymienione czynniki mogą według danych literaturowych niekorzystnie wpływać na rokowania chorych na raka piersi. W niniejszych badaniach podczas oceny działania pojedynczych cytokin, jedynie HGF znacząco wpływał na wzrost inwazyjnych kolonii komórek potrójnie-negatywnego raka piersi w hodowlach 3D, indukując ścieżkę sygnalizacyjną Akt. HGF jest znanym modulatorem proliferacji i mobilności komórek epitelialnych, jak również czynnikiem prognostycznym w raku piersi<sup>151</sup>. Jego ekspresja związana jest ze wzrostem inwazyjności i mobilności komórek nowotworowych, co przekłada się na niekorzystne rokowanie chorych i większe prawdopodobieństwo wystąpienia przerzutów<sup>152-154</sup>. Kuang et al. wykazali, że HGF podwyższa ekspresję COX2, co skutkuje wzrostem poziomu MMP-9, a tym samym inwazyjności komórek linii MBA-MB-231, co miało związek z sygnalizacją ścieżki PI3K/Akt i p38<sup>155</sup>. Inny zespół wykazał, że HGF indukuje ekspresję CXCR4 poprzez aktywację PKC $\zeta$ , co prowadzi do inwazyjności komórek raka piersi<sup>156</sup>. Natomiast w kontekście mikrośrodowiska guza, komórki nowotworowe raka piersi indukowały CAFs do produkcji HGF, co związane było ze wzrostem guzów u myszy<sup>71</sup>. Fibroblasty wyizolowane z raka wątroby, wydzielają HGF, prowadząc do wzrostu poziomu białka Ki67, a przeciwciała anti-HGF skutecznie hamowało ten proces<sup>157</sup>. Przedstawiona praca również wskazuje na taki związek, zaobserwowano korelację ER $\alpha$ 36<sup>high</sup> CAFs, które wydzielają HGF a wysokim poziomem Ki67. Co więcej, opublikowane dane również sugerują związek sygnalizacji HGF/c-Met z odpowiedzią immunologiczną, jednak nie jest do końca jasne, czy jest to wpływ hamujący, czy indukujący<sup>158</sup>. Powyższe dane literaturowe wskazują na to, że HGF może być produkowany przez CAFs, jednak żadne z badań nie łączyło jego ekspresji z konkretnym typem CAFs.

## 9. Podsumowanie

Celem niniejszej pracy doktorskiej była analiza zmian w liczbie kopii genu *ESR1* w kontekście powstawania dwóch izoform receptora estrogenowego: ER $\alpha$ 66 i ER $\alpha$ 36 oraz ocena znaczenia klinicznego ER $\alpha$ 36 w raku piersi i jej roli w fibroblastach mikrośrodowiska raka piersi. Projekt obejmował analizy materiału klinicznego badanego przy pomocy metody qPCR, FISH i IHC. CAFs wyizolowano z usuniętych guzów i oceniono poziom białka ER $\alpha$ 36. Cztery reprezentatywne linie CAFs zostały włączone do badań molekularnych. Wpływ CAFs na komórki nowotworowe badany był z wykorzystaniem mediów kondycjonowanych w metodzie wzrostu komórek 3D w matryzeli.

Analizując pierwszą hipotezę badawczą, wskazano na złożoność aberracji mogących występować w obrębie genu *ESR1* w kontekście zmian ekspresji klasycznej izoformy ER $\alpha$ 66, jak i alternatywnej izoformy ER $\alpha$ 36. Niniejsza praca jako pierwsza łączy nierozstrzygające wyniki badania poziomu genu *ESR1* metodą qPCR z możliwymi zmianami w obrębie promotora i powstawaniem innych izoform. Liczba kopii genu *ESR1* odwrotnie korelowała z poziomem ekspresji izoformy ER $\alpha$ 66, a stosunek ekspresji ER $\alpha$ 36/ER $\alpha$ 66 w próbkach z podwyższoną liczbą kopii genu *ESR1* badaną metodą qPCR był znacząco wyższy niż w próbkach z normalną liczbą kopii genu *ESR1* (86 vs 1,4). Obie obserwacje mogą wskazywać na to, że wysoka liczba kopii genu *ESR1* badana metodą qPCR jest zaangażowana w powstawanie innych izoform receptora estrogenowego, między innymi ER $\alpha$ 36. Co więcej, analizy ekspresji izoformy ER $\alpha$ 36 wykazały, że koreluje ona ze złym rokowaniem chorych na raka piersi.

Podczas weryfikowania drugiej hipotezy badawczej wykazano, że fibroblasty o wysokim poziomie ER $\alpha$ 36 mogą być niekorzystną składową mikrośrodowiska guzów raka piersi. CAFs o wysokim poziomie ER $\alpha$ 36 w próbkach klinicznych, korelowały z wysokim poziomem białek CD163 i CD68 w zrębie guza, jak i z podwyższonym poziomem Ki67 w komórkach nowotworowych, co może wpływać na niekorzystną prognozę i przeżycie chorych. Profil ekspresji genów w guzach chorych u których występowały CAFs o wysokim poziomie ER $\alpha$ 36, wskazywał na reorganizację macierzy międzykomórkowej oraz obniżoną zdolność do odpowiedzi immunologicznej. W analizach *in vitro* wykazano, że CAFs o wysokim poziomie ER $\alpha$ 36 posiadają unikalny

profil sekretomu, którego składniki znane są z działania pronowotworowego. Jeden z nich, HGF znacząco indukował fenotyp inwazyjny komórek potrójnie-negatywnego raka piersi na drodze sygnalizacyjnej cMet/Akt w badaniach *in vitro*. W analizach klinicznych z wykorzystaniem bazy TCGA, potwierdzono istotność HGF w potrójnie-negatywnym raku piersi.

Podsumowując uzyskane dane, można stwierdzić istotność izoformy ER $\alpha$ 36 nie tylko w komórkach nowotworowych, ale również w fibroblastach związanych z nowotworem w raku piersi. Zwraca to uwagę na znaczenie badań obejmujących zarówno same komórki nowotworowe, jak również ich mikrośrodowisko. CAFs będące jedną ze składowych mikrośrodowiska guza wykazują istotne role w progresji choroby, dlatego dalsze badania nad terapiami celowanymi powinny je uwzględniać. Nowy typ CAFs opisany w niniejszej pracy, dla którego charakterystycznym jest wydzielanie HGF, może stać się w przyszłości celem terapii bądź przyczynić się do skuteczniejszego planowania już dostępnego leczenia.

## 10. Literatura

- 1 Hassiotou, F. & Geddes, D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat* **26**, 29-48, doi:10.1002/ca.22165 (2013).
- 2 Cristea, S. & Polyak, K. Dissecting the mammary gland one cell at a time. *Nat Commun* **9**, 2473, doi:10.1038/s41467-018-04905-2 (2018).
- 3 Polyak, K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest* **117**, 3155-3163, doi:10.1172/JCI33295 (2007).
- 4 Feng, Y. *et al.* Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis* **5**, 77-106, doi:10.1016/j.gendis.2018.05.001 (2018).
- 5 Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **71**, 209-249, doi:10.3322/caac.21660 (2021).
- 6 Globocan Database, gco.iarc.fr, data dostępu: 15.06.2021
- 7 Anderson, W. F., Jatoi, I., Tse, J. & Rosenberg, P. S. Male breast cancer: a population-based comparison with female breast cancer. *J Clin Oncol* **28**, 232-239, doi:10.1200/JCO.2009.23.8162 (2010).
- 8 Lee, A. *et al.* BOADICEA: a comprehensive breast cancer risk prediction model incorporating genetic and nongenetic risk factors. *Genet Med* **21**, 1708-1718, doi:10.1038/s41436-018-0406-9 (2019).
- 9 Armstrong, K., Eisen, A. & Weber, B. Assessing the risk of breast cancer. *N Engl J Med* **342**, 564-571, doi:10.1056/NEJM200002243420807 (2000).
- 10 Kaminska, M., Ciszewski, T., Lopacka-Szatan, K., Miotla, P. & Staroslawska, E. Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny* **14**, 196-202, doi:10.5114/pm.2015.54346 (2015).
- 11 Brentnall, A. R., Cuzick, J., Buist, D. S. M. & Bowles, E. J. A. Long-term Accuracy of Breast Cancer Risk Assessment Combining Classic Risk Factors and Breast Density. *JAMA Oncol* **4**, e180174, doi:10.1001/jamaoncol.2018.0174 (2018).

- 12 Venkitaraman, A. R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* **108**, 171-182, doi:10.1016/s0092-8674(02)00615-3 (2002).
- 13 Couch, F. J. *et al.* Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer. *JAMA Oncol* **3**, 1190-1196, doi:10.1001/jamaoncol.2017.0424 (2017).
- 14 Hu, C. *et al.* A Population-Based Study of Genes Previously Implicated in Breast Cancer. *N Engl J Med* **384**, 440-451, doi:10.1056/NEJMoa2005936 (2021).
- 15 Dorling, L. *et al.* Breast Cancer Risk Genes - Association Analysis in More than 113,000 Women. *N Engl J Med* **384**, 428-439, doi:10.1056/NEJMoa1913948 (2021).
- 16 Ruder, E. H., Dorgan, J. F., Kranz, S., Kris-Etherton, P. M. & Hartman, T. J. Examining breast cancer growth and lifestyle risk factors: early life, childhood, and adolescence. *Clin Breast Cancer* **8**, 334-342, doi:10.3816/CBC.2008.n.038 (2008).
- 17 McCormack, V. A. & Boffetta, P. Today's lifestyles, tomorrow's cancers: trends in lifestyle risk factors for cancer in low- and middle-income countries. *Ann Oncol* **22**, 2349-2357, doi:10.1093/annonc/mdq763 (2011).
- 18 Kispert, S. & McHowat, J. Recent insights into cigarette smoking as a lifestyle risk factor for breast cancer. *Breast Cancer (Dove Med Press)* **9**, 127-132, doi:10.2147/BCTT.S129746 (2017).
- 19 Escala-Garcia, M. *et al.* Breast cancer risk factors and their effects on survival: a Mendelian randomisation study. *BMC Med* **18**, 327, doi:10.1186/s12916-020-01797-2 (2020).
- 20 Elmore, J. G., Armstrong, K., Lehman, C. D. & Fletcher, S. W. Screening for breast cancer. *JAMA* **293**, 1245-1256, doi:10.1001/jama.293.10.1245 (2005).
- 21 Jacek Jassem, M. K. Breast cancer. *Oncology of Clinical Practice* **14**, 171-215, doi:10.5603/OCP.2018.0027 (2018).
- 22 Linsell, L., Burgess, C. C. & Ramirez, A. J. Breast cancer awareness among older women. *Br J Cancer* **99**, 1221-1225, doi:10.1038/sj.bjc.6604668 (2008).
- 23 Albertini, J. J. *et al.* Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. *JAMA* **276**, 1818-1822 (1996).

- 24 Welnicka-Jaśkiewicz, M. Primary Therapy of Early Breast Cancer XIII Breast Cancer Conference, St. Gallen 2013. *Nowotwory. Journal of Oncology* **63** 432-435, doi:10.5603/NJO.2013.0043 (2013).
- 25 Muggerud, A. A. *et al.* Molecular diversity in ductal carcinoma in situ (DCIS) and early invasive breast cancer. *Mol Oncol* **4**, 357-368, doi:10.1016/j.molonc.2010.06.007 (2010).
- 26 Narod, S. A., Iqbal, J., Giannakeas, V., Sopik, V. & Sun, P. Breast Cancer Mortality After a Diagnosis of Ductal Carcinoma In Situ. *JAMA Oncol* **1**, 888-896, doi:10.1001/jamaoncol.2015.2510 (2015).
- 27 Christgen, M. & Derksen, P. Lobular breast cancer: molecular basis, mouse and cellular models. *Breast Cancer Res* **17**, 16, doi:10.1186/s13058-015-0517-z (2015).
- 28 Carlson, R. W. *et al.* Invasive breast cancer. *J Natl Compr Canc Netw* **9**, 136-222, doi:10.6004/jnccn.2011.0016 (2011).
- 29 Page, D. L. Special types of invasive breast cancer, with clinical implications. *Am J Surg Pathol* **27**, 832-835, doi:10.1097/00000478-200306000-00016 (2003).
- 30 Jaiyesimi, I. A., Buzdar, A. U. & Hortobagyi, G. Inflammatory breast cancer: a review. *J Clin Oncol* **10**, 1014-1024, doi:10.1200/JCO.1992.10.6.1014 (1992).
- 31 Dubar, S. *et al.* Paget's Breast Disease: A Case Report and Review of the Literature. *Front Surg* **4**, 51, doi:10.3389/fsurg.2017.00051 (2017).
- 32 Stathopoulos, G. P. *et al.* The role of Ki-67 in the proliferation and prognosis of breast cancer molecular classification subtypes. *Anticancer Drugs* **25**, 950-957, doi:10.1097/CAD.000000000000123 (2014).
- 33 Hennigs, A. *et al.* Prognosis of breast cancer molecular subtypes in routine clinical care: A large prospective cohort study. *BMC Cancer* **16**, 734, doi:10.1186/s12885-016-2766-3 (2016).
- 34 Ignatiadis, M. & Sotiriou, C. Luminal breast cancer: from biology to treatment. *Nat Rev Clin Oncol* **10**, 494-506, doi:10.1038/nrclinonc.2013.124 (2013).
- 35 Ades, F. *et al.* Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives. *J Clin Oncol* **32**, 2794-2803, doi:10.1200/JCO.2013.54.1870 (2014).



- 36 Loibl, S. & Gianni, L. HER2-positive breast cancer. *Lancet* **389**, 2415-2429, doi:10.1016/S0140-6736(16)32417-5 (2017).
- 37 Foulkes, W. D., Smith, I. E. & Reis-Filho, J. S. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* **363**, 1938-1948, doi:10.1056/NEJMra1001389 (2010).
- 38 Boyle, P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Ann Oncol* **23 Suppl 6**, vi7-12, doi:10.1093/annonc/mds187 (2012).
- 39 Reis-Filho, J. S. & Tutt, A. N. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* **52**, 108-118, doi:10.1111/j.1365-2559.2007.02889.x (2008).
- 40 Fallahpour, S., Navaneelan, T., De, P. & Borgo, A. Breast cancer survival by molecular subtype: a population-based analysis of cancer registry data. *CMAJ Open* **5**, E734-E739, doi:10.9778/cmajo.20170030 (2017).
- 41 Tan, D. S. *et al.* Triple negative breast cancer: molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. *Breast Cancer Res Treat* **111**, 27-44, doi:10.1007/s10549-007-9756-8 (2008).
- 42 Whiteside, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* **27**, 5904-5912, doi:10.1038/onc.2008.271 (2008).
- 43 Weber, C. E. & Kuo, P. C. The tumor microenvironment. *Surg Oncol* **21**, 172-177, doi:10.1016/j.suronc.2011.09.001 (2012).
- 44 Balkwill, F. & Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357**, 539-545, doi:10.1016/S0140-6736(00)04046-0 (2001).
- 45 Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* **8**, 98-101 (1989).
- 46 Maman, S. & Witz, I. P. A history of exploring cancer in context. *Nat Rev Cancer* **18**, 359-376, doi:10.1038/s41568-018-0006-7 (2018).
- 47 Hanahan, D. & Coussens, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **21**, 309-322, doi:10.1016/j.ccr.2012.02.022 (2012).

- 48 Ishii, G., Ochiai, A. & Neri, S. Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment. *Adv Drug Deliv Rev* **99**, 186-196, doi:10.1016/j.addr.2015.07.007 (2016).
- 49 Kalluri, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* **16**, 582-598, doi:10.1038/nrc.2016.73 (2016).
- 50 LeBleu, V. S. & Kalluri, R. A peek into cancer-associated fibroblasts: origins, functions and translational impact. *Dis Model Mech* **11**, doi:10.1242/dmm.029447 (2018).
- 51 Madar, S., Goldstein, I. & Rotter, V. 'Cancer associated fibroblasts'--more than meets the eye. *Trends Mol Med* **19**, 447-453, doi:10.1016/j.molmed.2013.05.004 (2013).
- 52 Shiga, K. *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers (Basel)* **7**, 2443-2458, doi:10.3390/cancers7040902 (2015).
- 53 Yeon, J. H. *et al.* Cancer-derived exosomes trigger endothelial to mesenchymal transition followed by the induction of cancer-associated fibroblasts. *Acta Biomater* **76**, 146-153, doi:10.1016/j.actbio.2018.07.001 (2018).
- 54 LeBleu, V. S. *et al.* Identification of human epididymis protein-4 as a fibroblast-derived mediator of fibrosis. *Nat Med* **19**, 227-231, doi:10.1038/nm.2989 (2013).
- 55 Ozdemir, B. C. *et al.* Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell* **25**, 719-734, doi:10.1016/j.ccr.2014.04.005 (2014).
- 56 Sugimoto, H., Mundel, T. M., Kieran, M. W. & Kalluri, R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther* **5**, 1640-1646, doi:10.4161/cbt.5.12.3354 (2006).
- 57 Quail, D. F. & Joyce, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* **19**, 1423-1437, doi:10.1038/nm.3394 (2013).
- 58 Ping, Q. *et al.* Cancer-associated fibroblasts: overview, progress, challenges, and directions. *Cancer Gene Ther*, doi:10.1038/s41417-021-00318-4 (2021).

- 59 Yin, Z. *et al.* Heterogeneity of cancer-associated fibroblasts and roles in the progression, prognosis, and therapy of hepatocellular carcinoma. *J Hematol Oncol* **12**, 101, doi:10.1186/s13045-019-0782-x (2019).
- 60 Kanzaki, R. & Pietras, K. Heterogeneity of cancer-associated fibroblasts: Opportunities for precision medicine. *Cancer Sci* **111**, 2708-2717, doi:10.1111/cas.14537 (2020).
- 61 Mhaidly, R. & Mechta-Grigoriou, F. Fibroblast heterogeneity in tumor micro-environment: Role in immunosuppression and new therapies. *Semin Immunol* **48**, 101417, doi:10.1016/j.smim.2020.101417 (2020).
- 62 Orimo, A. *et al.* Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* **121**, 335-348, doi:10.1016/j.cell.2005.02.034 (2005).
- 63 Yu, Y. *et al.* Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF-beta signalling. *Br J Cancer* **110**, 724-732, doi:10.1038/bjc.2013.768 (2014).
- 64 Jung, D. W. *et al.* Tumor-stromal crosstalk in invasion of oral squamous cell carcinoma: a pivotal role of CCL7. *Int J Cancer* **127**, 332-344, doi:10.1002/ijc.25060 (2010).
- 65 Calon, A., Tauriello, D. V. & Batlle, E. TGF-beta in CAF-mediated tumor growth and metastasis. *Semin Cancer Biol* **25**, 15-22, doi:10.1016/j.semcancer.2013.12.008 (2014).
- 66 Zhuang, J. *et al.* TGFbeta1 secreted by cancer-associated fibroblasts induces epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through lncRNA-ZEB2NAT. *Sci Rep* **5**, 11924, doi:10.1038/srep11924 (2015).
- 67 Bai, Y. P. *et al.* FGF-1/-3/FGFR4 signaling in cancer-associated fibroblasts promotes tumor progression in colon cancer through Erk and MMP-7. *Cancer Sci* **106**, 1278-1287, doi:10.1111/cas.12745 (2015).
- 68 Sun, Y. *et al.* Cancer-associated fibroblasts secrete FGF-1 to promote ovarian proliferation, migration, and invasion through the activation of FGF-1/FGFR4 signaling. *Tumour Biol* **39**, 1010428317712592, doi:10.1177/1010428317712592 (2017).

- 69 De Wever, O. *et al.* Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J* **18**, 1016-1018, doi:10.1096/fj.03-1110fje (2004).
- 70 Jedeszko, C., Victor, B. C., Podgorski, I. & Sloane, B. F. Fibroblast hepatocyte growth factor promotes invasion of human mammary ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* **69**, 9148-9155, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1043 (2009).
- 71 Tyan, S. W. *et al.* Breast cancer cells induce cancer-associated fibroblasts to secrete hepatocyte growth factor to enhance breast tumorigenesis. *PLoS One* **6**, e15313, doi:10.1371/journal.pone.0015313 (2011).
- 72 Linares, J., Marin-Jimenez, J. A., Badia-Ramentol, J. & Calon, A. Determinants and Functions of CAFs Secretome During Cancer Progression and Therapy. *Front Cell Dev Biol* **8**, 621070, doi:10.3389/fcell.2020.621070 (2020).
- 73 Gascard, P. & Ilstiy, T. D. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev* **30**, 1002-1019, doi:10.1101/gad.279737.116 (2016).
- 74 Han, Y., Zhang, Y., Jia, T. & Sun, Y. Molecular mechanism underlying the tumor-promoting functions of carcinoma-associated fibroblasts. *Tumour Biol* **36**, 1385-1394, doi:10.1007/s13277-015-3230-8 (2015).
- 75 Rasanen, K. & Vaheri, A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res* **316**, 2713-2722, doi:10.1016/j.yexcr.2010.04.032 (2010).
- 76 Martinez-Outschoorn, U., Sotgia, F. & Lisanti, M. P. Tumor microenvironment and metabolic synergy in breast cancers: critical importance of mitochondrial fuels and function. *Semin Oncol* **41**, 195-216, doi:10.1053/j.seminoncol.2014.03.002 (2014).
- 77 Yang, L. *et al.* Targeting Stromal Glutamine Synthetase in Tumors Disrupts Tumor Microenvironment-Regulated Cancer Cell Growth. *Cell Metab* **24**, 685-700, doi:10.1016/j.cmet.2016.10.011 (2016).
- 78 Ghesquiere, B., Wong, B. W., Kuchnio, A. & Carmeliet, P. Metabolism of stromal and immune cells in health and disease. *Nature* **511**, 167-176, doi:10.1038/nature13312 (2014).

- 79 Molon, B., Cali, B. & Viola, A. T Cells and Cancer: How Metabolism Shapes Immunity. *Front Immunol* **7**, 20, doi:10.3389/fimmu.2016.00020 (2016).
- 80 Rhim, A. D. *et al.* Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* **25**, 735-747, doi:10.1016/j.ccr.2014.04.021 (2014).
- 81 Gieniec, K. A., Butler, L. M., Worthley, D. L. & Woods, S. L. Cancer-associated fibroblasts-heroes or villains? *Br J Cancer* **121**, 293-302, doi:10.1038/s41416-019-0509-3 (2019).
- 82 Toullec, A. *et al.* Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. *EMBO Mol Med* **2**, 211-230, doi:10.1002/emmm.201000073 (2010).
- 83 Costa, A. *et al.* Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell* **33**, 463-+, doi:10.1016/j.ccell.2018.01.011 (2018).
- 84 Tchou, J. *et al.* Human breast cancer associated fibroblasts exhibit subtype specific gene expression profiles. *BMC Med Genomics* **5**, 39, doi:10.1186/1755-8794-5-39 (2012).
- 85 De Francesco, E. M. *et al.* HIF-1 $\alpha$ /GPER signaling mediates the expression of VEGF induced by hypoxia in breast cancer associated fibroblasts (CAFs). *Breast Cancer Res* **15**, R64, doi:10.1186/bcr3458 (2013).
- 86 Yoshikawa, K. *et al.* Prognostic significance of PD-L1-positive cancer-associated fibroblasts in patients with triple-negative breast cancer. *BMC Cancer* **21**, 239, doi:10.1186/s12885-021-07970-x (2021).
- 87 Bondesson, M., Hao, R., Lin, C. Y., Williams, C. & Gustafsson, J. A. Estrogen receptor signaling during vertebrate development. *Biochim Biophys Acta* **1849**, 142-151, doi:10.1016/j.bbagr.2014.06.005 (2015).
- 88 Howard, B. A. & Gusterson, B. A. Human breast development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **5**, 119-137, doi:10.1023/a:1026487120779 (2000).
- 89 Jensen, E. V. On the mechanism of estrogen action. *Perspect Biol Med* **6**, 47-59, doi:10.1353/pbm.1963.0005 (1962).

- 90 Klinge, C. M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* **29**, 2905-2919, doi:10.1093/nar/29.14.2905 (2001).
- 91 Pakdel, F. Molecular Pathways of Estrogen Receptor Action. *Int J Mol Sci* **19**, doi:10.3390/ijms19092591 (2018).
- 92 Hua, H., Zhang, H., Kong, Q. & Jiang, Y. Mechanisms for estrogen receptor expression in human cancer. *Exp Hematol Oncol* **7**, 24, doi:10.1186/s40164-018-0116-7 (2018).
- 93 Orlando, L. *et al.* Molecularly targeted endocrine therapies for breast cancer. *Cancer Treat Rev* **36 Suppl 3**, S67-71, doi:10.1016/S0305-7372(10)70023-2 (2010).
- 94 Holst, F. *et al.* Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. *Nat Genet* **39**, 655-660, doi:10.1038/ng2006 (2007).
- 95 Albertson, D. G. Gene amplification in cancer. *Trends Genet* **22**, 447-455, doi:10.1016/j.tig.2006.06.007 (2006).
- 96 Moelans, C. B., Holst, F., Hellwinkel, O., Simon, R. & van Diest, P. J. ESR1 amplification in breast cancer by optimized RNase FISH: frequent but low-level and heterogeneous. *PLoS One* **8**, e84189, doi:10.1371/journal.pone.0084189 (2013).
- 97 Markiewicz, A. *et al.* Prognostic significance of ESR1 amplification and ESR1 PvuII, CYP2C19\*2, UGT2B15\*2 polymorphisms in breast cancer patients. *PLoS One* **8**, e72219, doi:10.1371/journal.pone.0072219 (2013).
- 98 Wang, Z. *et al.* Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha66. *Biochem Biophys Res Commun* **336**, 1023-1027, doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.226 (2005).
- 99 Wang, T. T., Milner, M. J., Milner, J. A. & Kim, Y. S. Estrogen receptor alpha as a target for indole-3-carbinol. *J Nutr Biochem* **17**, 659-664, doi:10.1016/j.jnutbio.2005.10.012 (2006).
- 100 Soltysik, K. & Czekaj, P. ERalpha36--Another piece of the estrogen puzzle. *Eur J Cell Biol* **94**, 611-625, doi:10.1016/j.ejcb.2015.10.001 (2015).
- 101 Chaudhri, R. A., Schwartz, N., Elbaradie, K., Schwartz, Z. & Boyan, B. D. Role of ERalpha36 in membrane-associated signaling by estrogen. *Steroids* **81**, 74-80, doi:10.1016/j.steroids.2013.10.020 (2014).

- 102 Tong, J. S. *et al.* ER-alpha36, a novel variant of ER-alpha, mediates estrogen-stimulated proliferation of endometrial carcinoma cells via the PKCdelta/ERK pathway. *PLoS One* **5**, e15408, doi:10.1371/journal.pone.0015408 (2010).
- 103 Omarjee, S. *et al.* The molecular mechanisms underlying the ERalpha-36-mediated signaling in breast cancer. *Oncogene* **36**, 2503-2514, doi:10.1038/onc.2016.415 (2017).
- 104 Nagel, A. *et al.* Clinical and Biological Significance of ESR1 Gene Alteration and Estrogen Receptors Isoforms Expression in Breast Cancer Patients. *Int J Mol Sci* **20**, doi:10.3390/ijms20081881 (2019).
- 105 Holst, F. & Singer, C. F. ESR1-Amplification-Associated Estrogen Receptor alpha Activity in Breast Cancer. *Trends Endocrinol Metab* **27**, 751-752, doi:10.1016/j.tem.2016.08.002 (2016).
- 106 Popeda, M. *et al.* NF-kappa B Signaling-Related Signatures Are Connected with the Mesenchymal Phenotype of Circulating Tumor Cells in Non-Metastatic Breast Cancer. *Cancers (Basel)* **11**, doi:10.3390/cancers11121961 (2019).
- 107 Luo, H. *et al.* GPER-mediated proliferation and estradiol production in breast cancer-associated fibroblasts. *Endocr Relat Cancer* **21**, 355-369, doi:10.1530/ERC-13-0237 (2014).
- 108 Bednarz-Knoll, N. *et al.* Stromal expression of ALDH1 in human breast carcinomas indicates reduced tumor progression. *Oncotarget* **6**, 26789-26803, doi:10.18632/oncotarget.4628 (2015).
- 109 Zhang, Z. *et al.* Expression of CXCR4 and breast cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* **14**, 49, doi:10.1186/1471-2407-14-49 (2014).
- 110 Shabo, I., Stal, O., Olsson, H., Dore, S. & Svanvik, J. Breast cancer expression of CD163, a macrophage scavenger receptor, is related to early distant recurrence and reduced patient survival. *Int J Cancer* **123**, 780-786, doi:10.1002/ijc.23527 (2008).
- 111 Navab, R. *et al.* Prognostic gene-expression signature of carcinoma-associated fibroblasts in non-small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 7160-7165, doi:10.1073/pnas.1014506108 (2011).

- 112 Kikuchi, K. *et al.* Effects of cytokines derived from cancer-associated fibroblasts on androgen synthetic enzymes in estrogen receptor-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* **166**, 709-723, doi:10.1007/s10549-017-4464-5 (2017).
- 113 Baltshukat, S. *et al.* Capmatinib (INC280) Is Active Against Models of Non-Small Cell Lung Cancer and Other Cancer Types with Defined Mechanisms of MET Activation. *Clinical Cancer Research* **25**, 3164-3175, doi:10.1158/1078-0432.Ccr-18-2814 (2019).
- 114 Soysal, S. D. *et al.* Status of estrogen receptor 1 (ESR1) gene in mastopathy predicts subsequent development of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **151**, 709-715, doi:10.1007/s10549-015-3427-y (2015).
- 115 Lebeau, A. *et al.* Oestrogen receptor gene (ESR1) amplification is frequent in endometrial carcinoma and its precursor lesions. *J Pathol* **216**, 151-157, doi:10.1002/path.2405 (2008).
- 116 Tomita, S. *et al.* Estrogen receptor alpha gene ESR1 amplification may predict endocrine therapy responsiveness in breast cancer patients. *Cancer Sci* **100**, 1012-1017, doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01145.x (2009).
- 117 Holst, F. Estrogen receptor alpha gene amplification in breast cancer: 25 years of debate. *World J Clin Oncol* **7**, 160-173, doi:10.5306/wjco.v7.i2.160 (2016).
- 118 Laenkholm, A. V. *et al.* ESR1 gene status correlates with estrogen receptor protein levels measured by ligand binding assay and immunohistochemistry. *Mol Oncol* **6**, 428-436, doi:10.1016/j.molonc.2012.04.003 (2012).
- 119 Lin, C. H. *et al.* Clinical significance of ESR1 gene copy number changes in breast cancer as measured by fluorescence in situ hybridisation. *J Clin Pathol* **66**, 140-145, doi:10.1136/jclinpath-2012-200929 (2013).
- 120 Pagani, F. & Baralle, F. E. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev Genet* **5**, 389-396, doi:10.1038/nrg1327 (2004).
- 121 Zou, Y., Ding, L., Coleman, M. & Wang, Z. Estrogen receptor-alpha (ER-alpha) suppresses expression of its variant ER-alpha 36. *FEBS Lett* **583**, 1368-1374, doi:10.1016/j.febslet.2009.03.047 (2009).



- 122 Wang, Q. *et al.* Tamoxifen enhances stemness and promotes metastasis of ERalpha36(+) breast cancer by upregulating ALDH1A1 in cancer cells. *Cell Res* **28**, 336-358, doi:10.1038/cr.2018.15 (2018).
- 123 Shi, L. *et al.* Expression of ER- $\alpha$ 36, a novel variant of estrogen receptor  $\alpha$ , and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer. *J Clin Oncol* **27**, 3423-3429, doi:10.1200/JCO.2008.17.2254 (2009).
- 124 Lin, S. L. *et al.* ER-alpha36, a variant of ER-alpha, promotes tamoxifen agonist action in endometrial cancer cells via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. *PLoS One* **5**, e9013, doi:10.1371/journal.pone.0009013 (2010).
- 125 Zhang, W. & Liu, H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* **12**, 9-18, doi:10.1038/sj.cr.7290105 (2002).
- 126 Zhang, X., Ding, L., Kang, L. & Wang, Z. Y. Estrogen receptor-alpha 36 mediates mitogenic antiestrogen signaling in ER-negative breast cancer cells. *PLoS One* **7**, e30174, doi:10.1371/journal.pone.0030174 (2012).
- 127 Zhao, Y. *et al.* let-7 microRNAs induce tamoxifen sensitivity by downregulation of estrogen receptor alpha signaling in breast cancer. *Mol Med* **17**, 1233-1241, doi:10.2119/molmed.2010.00225 (2011).
- 128 Li, G. *et al.* Estrogen receptor-alpha36 is involved in development of acquired tamoxifen resistance via regulating the growth status switch in breast cancer cells. *Mol Oncol* **7**, 611-624, doi:10.1016/j.molonc.2013.02.001 (2013).
- 129 Da, J., Lu, M. & Wang, Z. Estrogen Receptor Alpha (ERalpha)-Associated Fibroblasts Promote Cell Growth in Prostate Cancer. *Cell Biochem Biophys* **73**, 793-798, doi:10.1007/s12013-015-0700-y (2015).
- 130 Yeh, C. R. *et al.* Estrogen receptor alpha in cancer associated fibroblasts suppresses prostate cancer invasion via reducing CCL5, IL6 and macrophage infiltration in the tumor microenvironment. *Mol Cancer* **15**, 7, doi:10.1186/s12943-015-0488-9 (2016).
- 131 Murtaza, M. *et al.* Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. *Nature Communications* **6**, doi:ARTN 8760 10.1038/ncomms9760 (2015).

- 132 Lambert, G. *et al.* An analogy between the evolution of drug resistance in bacterial communities and malignant tissues. *Nature Reviews Cancer* **11**, 375-U138, doi:10.1038/nrc3039 (2011).
- 133 Friedman, G. *et al.* Cancer-associated fibroblast compositions change with breast cancer progression linking the ratio of S100A4(+) and PDPN+ CAFs to clinical outcome. *Nat Cancer* **1**, 692-+, doi:10.1038/s43018-020-0082-y (2020).
- 134 Jayasingam, S. D. *et al.* Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice. *Front Oncol* **9**, 1512, doi:10.3389/fonc.2019.01512 (2019).
- 135 Pollard, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* **4**, 71-78, doi:10.1038/nrc1256 (2004).
- 136 Yunna, C., Mengru, H., Lei, W. & Weidong, C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol* **877**, 173090, doi:10.1016/j.ejphar.2020.173090 (2020).
- 137 Parisi, L. *et al.* Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? *J Immunol Res* **2018**, 8917804, doi:10.1155/2018/8917804 (2018).
- 138 Oshi, M. *et al.* M1 Macrophage and M1/M2 ratio defined by transcriptomic signatures resemble only part of their conventional clinical characteristics in breast cancer. *Sci Rep* **10**, 16554, doi:10.1038/s41598-020-73624-w (2020).
- 139 Takahashi, H. *et al.* Cancer-associated fibroblasts promote an immunosuppressive microenvironment through the induction and accumulation of protumoral macrophages. *Oncotarget* **8**, 8633-8647, doi:10.18632/oncotarget.14374 (2017).
- 140 Jamiyan, T., Kuroda, H., Yamaguchi, R., Abe, A. & Hayashi, M. CD68- and CD163-positive tumor-associated macrophages in triple negative cancer of the breast. *Virchows Arch* **477**, 767-775, doi:10.1007/s00428-020-02855-z (2020).
- 141 Lugo-Cintrón, K. M. *et al.* Breast Fibroblasts and ECM Components Modulate Breast Cancer Cell Migration Through the Secretion of MMPs in a 3D Microfluidic Co-Culture Model. *Cancers (Basel)* **12**, doi:10.3390/cancers12051173 (2020).

- 142 Gokyavuz, B. *et al.* Cancer associated fibroblasts sculpt tumour microenvironment by recruiting monocytes and inducing immunosuppressive PD-1(+) TAMs. *Sci Rep-Uk* **9**, doi:ARTN 3172 10.1038/s41598-019-39553-z (2019).
- 143 Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**, 1565-1570, doi:10.1126/science.1203486 (2011).
- 144 Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* **29**, 235-271, doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101324 (2011).
- 145 Zou, A. *et al.* Elevated CXCL1 expression in breast cancer stroma predicts poor prognosis and is inversely associated with expression of TGF-beta signaling proteins. *BMC Cancer* **14**, 781, doi:10.1186/1471-2407-14-781 (2014).
- 146 Acharyya, S. *et al.* A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell* **150**, 165-178, doi:10.1016/j.cell.2012.04.042 (2012).
- 147 Romero-Moreno, R. *et al.* The CXCL5/CXCR2 axis is sufficient to promote breast cancer colonization during bone metastasis. *Nat Commun* **10**, 4404, doi:10.1038/s41467-019-12108-6 (2019).
- 148 Hartman, Z. C. *et al.* Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8. *Cancer Res* **73**, 3470-3480, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4524-T (2013).
- 149 Schirosi, L. *et al.* VEGF and TWIST1 in a 16-biomarker immunoprofile useful for prognosis of breast cancer patients. *Int J Cancer* **141**, 1901-1911, doi:10.1002/ijc.30868 (2017).
- 150 Tawara, K. *et al.* Co-Expression of VEGF and IL-6 Family Cytokines is Associated with Decreased Survival in HER2 Negative Breast Cancer Patients: Subtype-Specific IL-6 Family Cytokine-Mediated VEGF Secretion. *Transl Oncol* **12**, 245-255, doi:10.1016/j.tranon.2018.10.004 (2019).
- 151 Yamashita, J. *et al.* Immunoreactive Hepatocyte Growth-Factor Is a Strong and Independent Predictor of Recurrence and Survival in Human Breast-Cancer. *Cancer Research* **54**, 1630-1633 (1994).

- 152 Chin, Y. R. & Toker, A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cell Signal* **21**, 470-476, doi:10.1016/j.cellsig.2008.11.015 (2009).
- 153 Casbas-Hernandez, P. *et al.* Role of HGF in epithelial-stromal cell interactions during progression from benign breast disease to ductal carcinoma in situ. *Breast Cancer Res* **15**, R82, doi:10.1186/bcr3476 (2013).
- 154 Deying, W. *et al.* CAF-derived HGF promotes cell proliferation and drug resistance by up-regulating the c-Met/PI3K/Akt and GRP78 signalling in ovarian cancer cells. *Biosci Rep* **37**, doi:10.1042/BSR20160470 (2017).
- 155 Kuang, W. *et al.* Hepatocyte growth factor induces breast cancer cell invasion via the PI3K/Akt and p38 MAPK signaling pathways to up-regulate the expression of COX2. *Am J Transl Res* **9**, 3816-3826 (2017).
- 156 Huang, S. *et al.* HGF-induced PKCzeta activation increases functional CXCR4 expression in human breast cancer cells. *PLoS One* **7**, e29124, doi:10.1371/journal.pone.0029124 (2012).
- 157 Jia, C. C. *et al.* Cancer-associated fibroblasts from hepatocellular carcinoma promote malignant cell proliferation by HGF secretion. *PLoS One* **8**, e63243, doi:10.1371/journal.pone.0063243 (2013).
- 158 Papaccio, F. *et al.* HGF/MET and the Immune System: Relevance for Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci* **19**, doi:10.3390/ijms19113595 (2018).

## 11. Osiągnięcia naukowe

### 11.1 Publikacje

Nagel, A.; Szade, J.; Iliszko, M.; Elzanowska, J.; Welnicka-Jaskiewicz, M.; Skokowski, J.; Stasiłojc, G.; Bigda, J.; Sadej, R.; Zaczek, A.; Markiewicz, A. Clinical and Biological Significance of *ESR1* Gene Alteration and Estrogen Receptors Isoforms Expression in Breast Cancer Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1881. (IF=5,9; Punkty wg MNiSW: 100)

A. Markiewicz, J. Topa, A. Nagel, J. Skokowski, B. Seroczynska, T. Stokowy, M. Welnicka-Jaskiewicz, A. J. Zaczek, „Spectrum of Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotypes in Circulating Tumour Cells from Early Breast Cancer Patients”, *Cancers* 2019, 11, 59. (IF=6,6; Punkty wg MNiSW: 140)

A. Markiewicz, A. Nagel, J. Szade, H. Majewska, J. Skokowski, B. Seroczynska, T. Stokowy, M. Welnicka-Jaskiewicz, A. J. Zaczek, "Aggressive phenotype of cells disseminated via haematogenous and lymphatic route in breast cancer patients", *Translational Oncology* 2018, 11, 722–731. (IF=4,2; Punkty wg MNiSW: 100)

G. Stasiłojć, A. Nagel, P. Koszałka and J. Bigda; „Defective apoptosis of U937 cells induced by benzyl isothiocyanate (BITC)”; *Acta biochimica Polonica*, Vol. 66 No. 4 (2019): 66(4)Part I and Part II – FEBS.( IF=1,4; Punkty wg MNiSW: 40)

### 11.2 Doniesienia konferencyjne

A. Nagel, M. Popeda, A. Jurek, J. Skokowski, J. Zielinski, N. Bednarz-Knoll, A. Markiewicz, A. Zaczek. „Cancer associated fibroblasts subtypes play a dual role in different molecular subtypes of breast cancer” EACR-AACR-ASPIC 2020 Conference: Tumour Microenvironment; Lizbona, Portugalia, 03.2020

J. Topa, A. Markiewicz, A. Nagel, J. Szade, H. Majewska, J. Skokowski, B. Seroczynska, M. Welnicka-Jaskiewicz, A.J. Żaczek, The translational aspect of CTCs aggressive phenotype in breast cancer patients, Congress BIO2018, Gdańsk, Polska, 09.2018

Aleksandra Markiewicz, Anna Nagel, Jolanta Szade, Hanna Majewska, Jaroslaw Skokowski, Barbara Seroczynska, Tomasz Stokowy, Marzena Welnicka-Jaskiewicz, Anna J Żaczek, Phenotypic plasticity of primary and metastatic breast cancer cells in the context of epithelial mesenchymal transition program, Congress BIO2018, Gdańsk, Polska, 09.2018

Nagel A., Jurek A., Popeda M., Topa J., Skokowski J., Zielinski J., Zaczek A.J. "Cancer associated fibroblasts role in breast cancer progression", YSA PhD Symposium, Vienna, Austria 2018

Popeda, M. Nagel, A., Jurek, A., Topa, J., Markiewicz, A., Seroczynska, B., Skokowski, J., Zaczek, A.J. "Clinical significance and biological role of plakoglobin expression in CTC-enriched blood fraction in early breast cancer patients", YSA PhD Symposium, Wiedeń, Austria 2018

Jurek, A., Nagel, A., Popeda, M., Topa, J., Zaczek, A.J., "Influence of tumor-associated macrophages on breast cancer aggressiveness", YSA PhD Symposium, Wiedeń, Austria 2018

Topa, J., Markiewicz, A., Nagel, A., Szade, J., Majewska, H., Skokowski, J., Seroczynska, B., Stokowy, T., Welnicka-Jaskiewicz, M., Popeda, M., Jurek, A., Zaczek, A.J., "The analysis of cadherin switch and epithelial mesenchymal transition activation in circulating tumour cells from breast cancer patients" YSA PhD Symposium, Wiedeń, Austria 2018

Anna Nagel, Mariola Iliszko, Jolanta Szade, Marzena Welnicka-Jaskiewicz, Jarosław Skokowski, Rafał Sądej, Anna J. Żaczek, Aleksandra Markiewicz, Prognostic role of oestrogen receptor alpha isoforms in breast cancer, Bioinnovation International Summit 2017, Gdańsk, Polska, 2017

Aleksandra Markiewicz, Anna Nagel, Jolanta Szade, Hanna Majewska, Jaroslaw Skokowski, Barbara Seroczynska, Tomasz Stokowy, Marzena Welnicka-Jaskiewicz, Anna J Żaczek, Significance of molecular profiling of circulating tumour cells in breast cancer patients, Bioinnovation International Summit 2017, Gdańsk, Polska, 2017

A. Nagel, A. Markiewicz<sup>1</sup>, J. Szade, H. Majewska, J. Skokowski, B. Seroczynska, M. Welnicka-Jaskiewicz<sup>5</sup>, A. Zaczek, Expression of stem cell and mesenchymal markers in circulating tumour cells is associated with poor prognosis of early breast cancer patients, 3rd Molecular Analysis for Personalised Therapy (MAP) Conference, Annals of Oncology, Volume 28, Issue suppl\_7, 1 October 2017, mdx510.005, Zurych, Szwajcaria, 2017,

Joanna Bidzińska, Magdalena Leszczyńska-Wiloch, Wojciech Krzyczkowski, Anna Nagel, Alicja Ołdak, Neli Kachamakova-Trojanowska, Alicja Józkowicz, Krzysztof Lemke, BVC-03 plant extracts combination inhibits IgE mediated allergic responses in vitro and in allergis asthma mouse model. ICSFTA 2016, Supercritical Fluids - the Current State and Outlook, Puławy, Polska, 2016

A. Nagel, A. Żaczek, M. Iliszko, J. Szade, M. Welnicka-Jaskiewicz, J. Skokowski, R. Sądej, A. Markiewicz, Kliniczne znaczenie aberracji w obrębie genu kodującego receptor estrogenowy (ESR1) u chorych na raka piersi, IV Kongres Onkologii Polskiej, Łódź, Polska, 2016

Joanna Bidzińska, Magdalena Leszczyńska-Wiloch, Wojciech Krzyczkowski, Anna Nagel, Alicja Ołdak, Neli Kachamakova-Trojanowska, Alicja Józkowicz, Krzysztof Lemke, BVC-03 plant extracts combination inhibits IgE mediated allergic responses in vitro and in allergis asthma mouse model, Vitafoods Europe, Genewa, Szwajcaria, 2016

### **11.3 Staże naukowe**

Lessard Laboratory, Genes and Human Disease Program, Oklahoma Medical Research Foundation 01.09.2020-31.08.2021; Staż w ramach programu BioLab Polsko-Amerykańskiej Komisji Fulbrighta