

# Ekspresja $\beta$ -kateniny w utkaniu nowotworowym raka krtani oraz znaczenie w ocenie inwazyjności zmian

## The expression of $\beta$ -catenin in laryngeal carcinoma and the significance in tumor aggressiveness

KATARZYNA STARSKA<sup>1/</sup>, IWONA LEWY-TRENDA<sup>2/</sup>, JAN WOŚ<sup>3/</sup>, PAWEŁ PAPIEŻ<sup>3/</sup>, EWA FORMA<sup>4/</sup>,  
MAGDALENA BRYŚ<sup>4/</sup>

<sup>1/</sup> I Katedra i Klinika Otolaryngologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

<sup>2/</sup> Katedra Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

<sup>3/</sup> Oddział Laryngologii Szpitala Specjalistycznego im. Żeromskiego w Krakowie

<sup>4/</sup> Katedra Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi

**Wprowadzenie.** Obecność stabilnej formy  $\beta$ -kateniny w utkaniu nowotworowym związane jest z nasileniem progresji guza m.in. poprzez aktywację onkogenu c-erbB-2 i c-Myc oraz metaplazji nabłonkowo-mezenchymalnej EMT.

**Cel pracy.** Celem pracy była analiza ekspresji  $\beta$ -kateniny w raku krtani oraz ocena znaczenia ekspresji w aspekcie określenia stopnia agresywności zmian nowotworowych.

**Materiał i metody.** Badania dotyczyły grupy 71 raków płaskonabłonkowych krtani. W patomorfologicznej ocenie zastosowano kryteria pTNM oraz skalę zmian w obwodowej części guza (tumor front grading). Ekspresję mRNA  $\beta$ -kateniny oceniono metodą ilościowej analizy produktu amplifikacji w czasie rzeczywistym (real-time RT-PCR). Poziom białka oznaczono techniką Western blot.

**Wyniki.** Zwiększona ekspresja mRNA  $\beta$ -kateniny w komórkach raka krtani została potwierdzona dla guzów o wyższym zaawansowaniu zmian pT3-pT4 ( $p=0,003$ ). Raki o większej agresywności w klasyfikacji TFG charakteryzowały się większą ekspresją genu ( $p=0,002$ ). Dla guzów głębiej naciekających otaczające tkanki podścieliska, w sposób rozproszony, małymi grupami komórek (<15 komórek wpw) wykazano większą ekspresję mRNA (odpowiednio  $p=0,01$  i  $p=0,003$ ).

**Wnioski.** Wyniki przedstawionych badań potwierdzają rolę  $\beta$ -kateniny jako czynnika istotnego w determinowaniu agresywności zmian nowotworowych w raku krtani.

**Słowa kluczowe:** rak krtani,  $\beta$ -kateniny, typ i głębokość inwazji

**Introduction.** Presence of stabilized and activated form of  $\beta$ -catenin in tumor tissue is connected with increased tumor progression through activation of c-erbB-2 and c-Myc oncogene and epithelial-mesenchymal transition (EMT).

**Aim.** To assess gene and protein expression of  $\beta$ -catenin in the tumor tissues of laryngeal squamous cell carcinoma and to analyze relationships between this expression on the degree of aggressiveness of the tumor.

**Material and methods.** A group of 71 patients with squamous cell carcinoma of the larynx was analyzed. The pathological evaluation comprised pTNM classification, degree of carcinoma invasion according to tumor front grading criteria. Quantitative analysis of the amplified product in real time (real-time RT-PCR) were used for estimation of mRNA  $\beta$ -catenin expression in tumor cells. The level of protein expression was determined by Western blot analysis.

**Results.** Increased mRNA  $\beta$ -catenin expression in cells of laryngeal carcinoma was confirmed in more advanced tumors pT3-4 ( $p=0.003$ ). Tumors with higher aggressiveness identified by the classification criteria TFG were characterized by higher expression of  $\beta$ -catenin gene ( $p=0.002$ ). Deep invasion and disperse infiltration were shown to be related to higher mRNA  $\beta$ -catenin expression in tumor cells ( $p=0.01$  and  $p=0.003$ , respectively).

**Conclusions.** The study indicates a significant role of  $\beta$ -catenin in determination of aggressiveness of tumor changes in laryngeal squamous cell carcinoma.

**Key words:** laryngeal carcinoma,  $\beta$ -catenin, mode and depth of invasion

## WSTĘP

$\beta$ -katenina jest białkiem wewnątrzkomórkowym, które pełni zasadniczą rolę w adhezji międzykomórkowej oraz kluczowym ogniwem w kaskadzie sygnałowej Wingless/Wnt/ $\beta$ -katenina, mającej znaczenie w procesie embriogenezy i transformacji nowotworowej [1-4]. Onkogenne właściwości aktywacji szlaku Wingless/Wnt/ $\beta$ -katenina związane są z fosforylacją  $\beta$ -kateniny (system białka KRAS i kinazy tyrozynowej), powstawaniem stabilnej formy białka oraz zmianą lokalizacji w komórce [1,3,4].  $\beta$ -katenina przemieszczona z cytoplazmy do jądra komórkowego, wiąże się czynnikiem transkrypcyjnym Tcf (*T-cell factor*) [1,4]. Kompleks  $\beta$ -katenina/Tcf oddziałuje z miejscem promotorowym genów związanych z aktywacją proliferacji komórek i hamowaniem zjawiska apoptozy, co może prowadzić do metaplastji nowotworowej i zjawiska kancerogeny [1-9]. Obecność stabilnej i zaaktywowanej formy  $\beta$ -kateniny w utkaniu zmian nowotworowym związane jest z nasileniem progresji guza m.in. poprzez pobudzenie szlaku MAPK/ERK1/2, aktywację onkogenu c-erbB-2 i c-Myc oraz tranzycji nabłonkowo-mezenchymalnej EMT (*epithelial-mesenchymal transition*) [1-5,8]. Wielu autorów podkreśla znaczenie obecności ekspresji zmutowanej formy  $\beta$ -kateniny w komórkach nacieku nowotworowego guzów różnego pochodzenia oraz związek z nasileniem inwazyjności zmian, powstawaniem przerzutów oraz gorszą prognozą u pacjentów z chorobą nowotworową [6-9].

Celem przeprowadzonych badań była analiza ekspresji mRNA oraz białka  $\beta$ -kateniny w utkaniu raka płaskonabłonkowego krtani oraz określenie zależności między wybranymi cechami kliniczno-morfologicznymi nacieku nowotworowego (pT, typ i głębokość inwazji nowotworowej wg klasyfikacji zaawansowania zmian we froncie guza TFG, suma punktacji w skali TFG) a wynikami oceny molekularnej.

## MATERIAŁ I METODY

### Grupa badana

Analiza kliniczno-morfologiczna objęła grupę 69 (97,2%) mężczyzn i 2 (2,8%) kobiety, w wieku 45–78 lat (średnia wieku 62,9 lat) operowanych z powodu raka krtani. U 48 (67,6%) pacjentów jako metodę postępowania terapeutycznego zastosowano całkowite usunięcie krtani a u 23 (32,4%) chorych częściowe usunięcie krtani. U 37 (52,1%) chorych z potwierdzonymi badaniem śródoperacyjnym, powiększonymi węzłami chłonnymi, wykonano ponadto operację usunięcia węzłów chłonnych szyjnych.

## Analiza patomorfologiczna materiału tkankowego

W przeprowadzonej analizie patomorfologicznej zastosowano kryteria zaawansowania miejscowego zmian nowotworowych zgodnie z kryteriami klasyfikacji TNM UICC 2003 dla raków regionu głowy i szyi [10]. W ocenie agresywności miejscowej zmian nowotworowych oraz głębokości i typu inwazji uwzględniono skalę *tumor front grading* (TFG) zaawansowania zmian morfologicznych w najbardziej inwazyjnej i najmniej zróżnicowanej części obwodowej guza [11]. Preparaty H&E oceniano w mikroskopie świetlnym Olympus AX60, w 5 polach widzenia (w pow. 200x), kierując się miejscami o najgłębszym naciekaniu do otaczających tkanek. W analizie histologicznej głębokości inwazji zastosowano skalę zaawansowania zmian: grupa A – *carcinoma in situ* oraz inwazję podśluzówkową do granicy lamina propria, grupa B – guzkowy nacieki tkanki mięśniowej oraz głęboką inwazję ściany z zajęciem chrząstki krtani. W ocenie morfologicznej typu naciekania podścieliska raków krtani uwzględniono stopnie nasilenia zmian: grupa A – dobrze odgraniczone marginesy nacieku oraz nacieki litymi sznurami i wstęgami, grupa B – nacieki małymi grupami (<15 kom.) i pojedynczymi komórkami. W podziale badanych guzów pod względem nasilenia agresywności miejscowej zmian zastosowano podział raków krtani na 4 grupy w zależności od uzyskanej liczby punktów w klasyfikacji TFG: grupa A: 6-13 punktów, grupa B: 14-21 punktów.

### Przygotowanie materiału tkankowego do badań biologii molekularnej

Bezpośrednio po całkowitym lub częściowym usunięciu krtani, pobierano aseptycznie cztery fragmenty tkankowe, o średnicy ok. 0,5 cm z materiału tkankowego: dwa z obwodowej części nacieku nowotworowego raka płaskonabłonkowego krtani, położonego przy granicy niezmiennych, w ocenie makroskopowej, nowotworowo tkanek oraz dwa fragmenty z niezmiennionej nowotworowo błony śluzowej krtani, jako kontrolę dla układów badawczych (materiał do badań kontrolnych pobierano tylko w przypadkach całkowitego usunięcia krtani, nie pobierano tkanek nabłonka prawidłowego krtani po operacjach częściowych z powodów etycznych). Otrzymane fragmenty tkankowe umieszczano w jałowych probówkach zawierających PBS bez jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  (Biomed, Lublin, Poland), z dodatkiem 1% v/v antybiotyków penicyliny, streptomycyny, gentamycyny i ketokonazolu (Sigma, Aldrich, Germany). Następnie po rozdrobnieniu tkanek na mniejsze fragmenty o średnicy 1 mm, płukano trzykrotnie (300g, 10min., 8°C)

schłodzonym płynem Hanksa (Biomed Lublin, Poland). Odwirowany materiał poddawano trawieniu enzymatycznemu roztworem hialuronidazy (100U; Sigma, Aldrich, Germany) i kolagenazy (100mg/mL; Sigma, Aldrich, Germany) z dodatkiem 1% v/v antybiotyków penicyliny, streptomycyny, gentamycyny i ketokonazolu (Sigma, Aldrich, Germany) 18 godzin w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> (Cellstar Incubator). Po trawieniu enzymatycznym zawiesinę tkankową zalewano roztworem dyspazy o aktywności 1,5U/mL i inkubowano w temperaturze 37°C, 30 min. w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> (Cellstar Incubator). Po inkubacji materiał przecierano przez sito ( $\varnothing$  50  $\mu$ m) (Sigma, Aldrich, Germany). Komórki martwe usuwano metodą separacji magnetycznej z zastosowaniem komercyjnie dostępnych zestawów Dead Cell Removal Kit oraz separatora magnetycznego Magnetic Cell Sorting Separator MACS (Miltenyi Biotec, Germany). Gęstość komórek nabłonkowych doprowadzono do 1x10<sup>6</sup> komórek/mL. Czystość hodowli komórek nabłonkowych w zawiesinie komórkowej została oznaczona poprzez zastosowanie ekspresji filamentów cytokeratynowych metodą immunohistochemiczną z zastosowaniem poliklonalnych przeciwciał (NCL-C11, Multi-Cytokeratin 4/5/6/8/10/13/18, RTU-D Novostatin Universal Detection Kit, NCL-L-DAB Liquid DAB Substrate Kit; Novocastra, UK). Supernatant całkowicie usuwano a następnie dodawano RNAlater RNA Stabilization Reagent (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Komórki przechowywano w temperaturze -80°C do czasu izolacji RNA.

#### **Ocena ekspresji poziomu mRNA dla $\beta$ -kateniny – metoda ilościowej analizy produktu amplifikacji w czasie rzeczywistym (real-time RT<sup>2</sup>-PCR)**

Całkowite RNA izolowano przy użyciu odczynnika TRI Reagent (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA) zgodnie z zaleceniami producenta. Czystość otrzymanych preparatów RNA określano metodą spektrofotometryczną poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm i 280 nm. Przyjętym kryterium czystości DNA była wartość A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> mieszcząca się w granicach 1,8–2,0. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano przy użyciu zestawu PCR Kit ver. 3.0 (Takara Bio Inc. Japonia) zgodnie z zaleceniami producenta. cDNA przechowywano w temp. -20°C. Otrzymany RNA stanowił matrycę w reakcji real-time PCR dla oznaczenia liczby kopii mRNA dla genu  $\beta$ -kateniny. Użyta mieszanina reakcyjna zawierała: 0,5  $\mu$ l cDNA, 5  $\mu$ l TaqMan® Universal PCR MasterMix, 0,5  $\mu$ l 20x TaqMan® Gene Expression Assays i 4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Reakcję real-time PCR prowadzono w urządzeniu Mastercycler®ep realplex

(Eppendorf). Początkowa ilość matrycy wyznaczana była na podstawie parametru Ct (teoretyczny numer cyklu, przy którym wartość fluorescencji jest wyższa niż przyjęta arbitralnie wartość graniczna). Pomiar wartości Ct wykonano w dwóch powtórzeniach, jako gen referencyjnego wykorzystano GAPDH. Do badań zastosowano następujące sondy TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA):  $\beta$ -katenina – Hs01012685\_m1 (97 bp), GAPDH – Hs00266705\_g1.

#### **Ocena poziomu ekspresji białka $\beta$ -kateniny – analiza immunologiczna białek techniką Western blot**

Rozdzielone w żelu poliakrylamidowym białka elektrotransferowano na immobilon P (Millipore) w układzie: 20% (v/v) metanol – 0,192 M Gly – 0,025 M Tris, pH 8,3 przy natężeniu prądu 400 mA w temperaturze 4°C podczas 80 min. Unieruchomione na membranie białka identyfikowano za pomocą kompleksu streptawidyna/biotyna/peroksydaza chrzanu (StreptABC/HRP; Dako) zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Stosowano następujące przeciwciała (Santa Cruz Biotechnology):  $\beta$ -katenina – sc-8635 (M-20). Analizę densytometryczną białek techniką Western blot przeprowadzono za pomocą wideodensytometru firmy Biotec-Fischer (Niemcy) z kamerą SSC-M370CE (Sony) oraz programu komputerowego GelPro Analyzer® version 3.0 for Windows™ (Media Cybernetics, USA).

#### **Analiza statystyczna**

Analizy statystycznej wyników dokonano przy użyciu programu komputerowego STATISTICA wersja 9.0 (StatSoft, Polska). Do oceny rozkładów wykorzystano test Kolmogorova-Smirnova i po stwierdzeniu rozkładów odmiennych od normalnych do dalszych obliczeń stosowano testy nieparametryczne U Manna-Whitneya i Kruskala-Wallis. Wyliczono także współczynnik skośności i ponieważ przybierał on wartości niższe niż 1,5 stosowano do obliczeń średnia arytmetyczna oraz odchylenie standardowe (SD). Za statystycznie istotną przyjęto wartość p<0,05.

#### **WYNIKI**

W przeprowadzonej analizie morfologicznej materiału stwierdzono, że stanowiły raki krtani o średnim stopniu zróżnicowania histopatologicznego zmian nowotworowych G2 – 76,1% (54/71) przypadków. Ocena morfologiczna preparatów barwionych H&E wykazała, że wśród analizowanych raków krtani dominowały nowotwory z głęboką inwazją ściany (z zajęciem tkanki mięśniowej oraz

chrząstki narządu) – 70,4% (50/71), charakteryzujące się rozproszonym naciekiem komórek nowotworowych w podścielisko guza (naciek małymi grupami <15 komórek i pojedynczymi komórkami) – 57,8% (41/71) oraz punktacją >14 punktów wg kryteriów TFG – 63,4% (45/71). Dokładny rozkład wybranych cech dla badanej grupy raków krtani przedstawiono na ryc. 1.

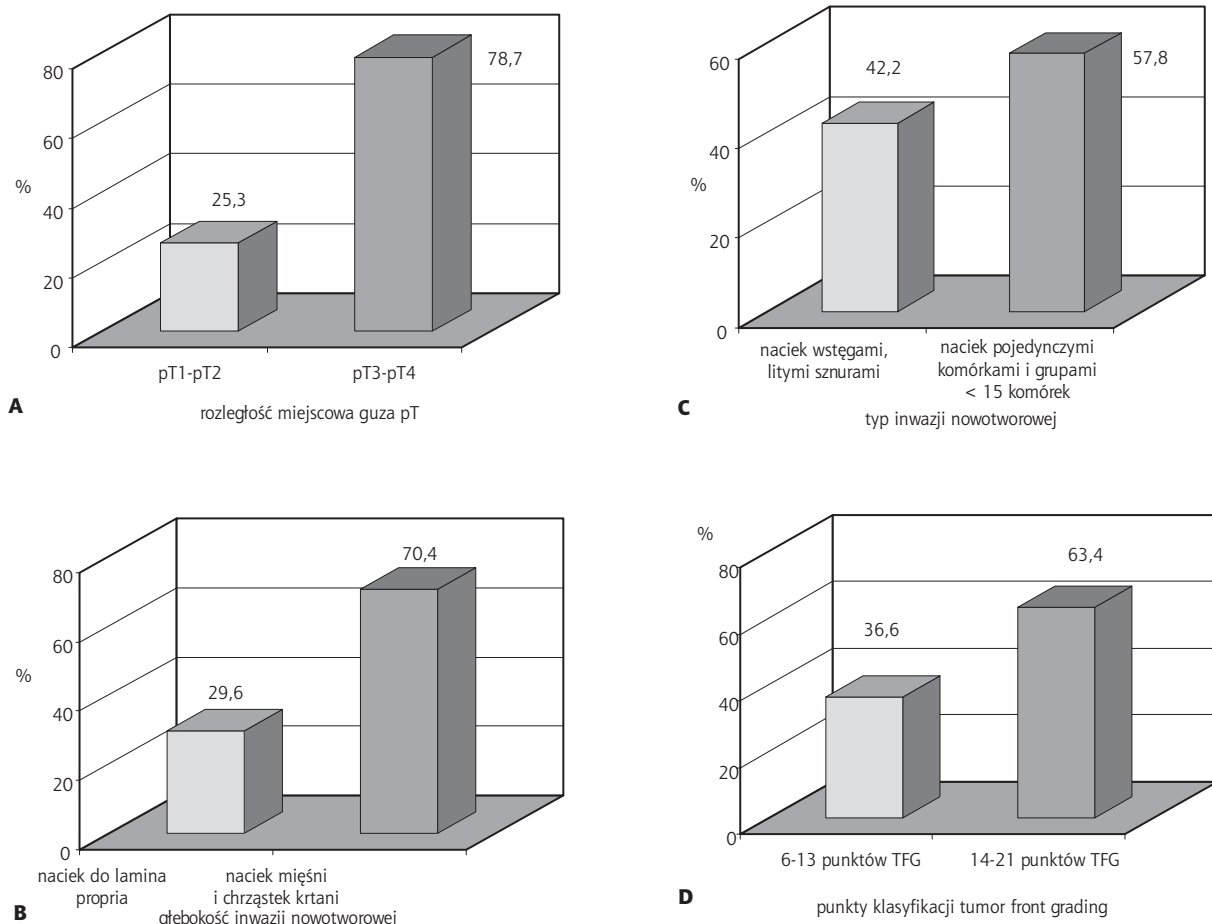
### Ocena ekspresji mRNA oraz poziomu ekspresji białek dla $\beta$ -kateniny

W przeprowadzonej ocenie molekularnej pozytywną ekspresję mRNA dla  $\beta$ -kateniny w komórkach badanych raków płaskonabłonkowych krtani oraz w komórkach niezmiennego nowotworowo nabłonka krtani wykazano odpowiednio w 78,9% (56/71) i 41,7% (20/48) przypadkach. Poziom średnich wartości ekspresji mRNA dla  $\beta$ -kateniny w komórkach nabłonka analizowanych raków i w komórkach nabłonka prawidłowego krtani wynosiły odpowiednio  $237,2 \pm 154,51$  oraz  $264,44 \pm 159,67$ . Stwierdzono występowanie znamienych różnic w poziomie ekspresji mRNA dla

$\beta$ -kateniny w analizowanych grupach ( $p < 0,05$ ). W ocenie molekularnej analizowanych cząsteczek na poziomie białka pozytywną ekspresję dla  $\beta$ -kateniny stwierdzono w 29,6% (21/71) komórek raka krtani oraz w 31,25% (15/48) komórek nabłonka prawidłowego krtani. Poziom średnich wartości ekspresji białka  $\beta$ -kateniny w komórkach nabłonka analizowanych raków i w komórkach nabłonka prawidłowego krtani wynosiły odpowiednio:  $34,69 \pm 64,44$  oraz  $14,34 \pm 28,05$ . Ze względu na małą liczebnie grupę komórek wykazujących pozytywną ekspresję analizowanych białek nie oceniono różnic w poziomie białka  $\beta$ -kateniny w obu grupach komórek.

### Analiza ekspresji mRNA dla $\beta$ -kateniny w zależności od cech kliniczno-morfologicznych

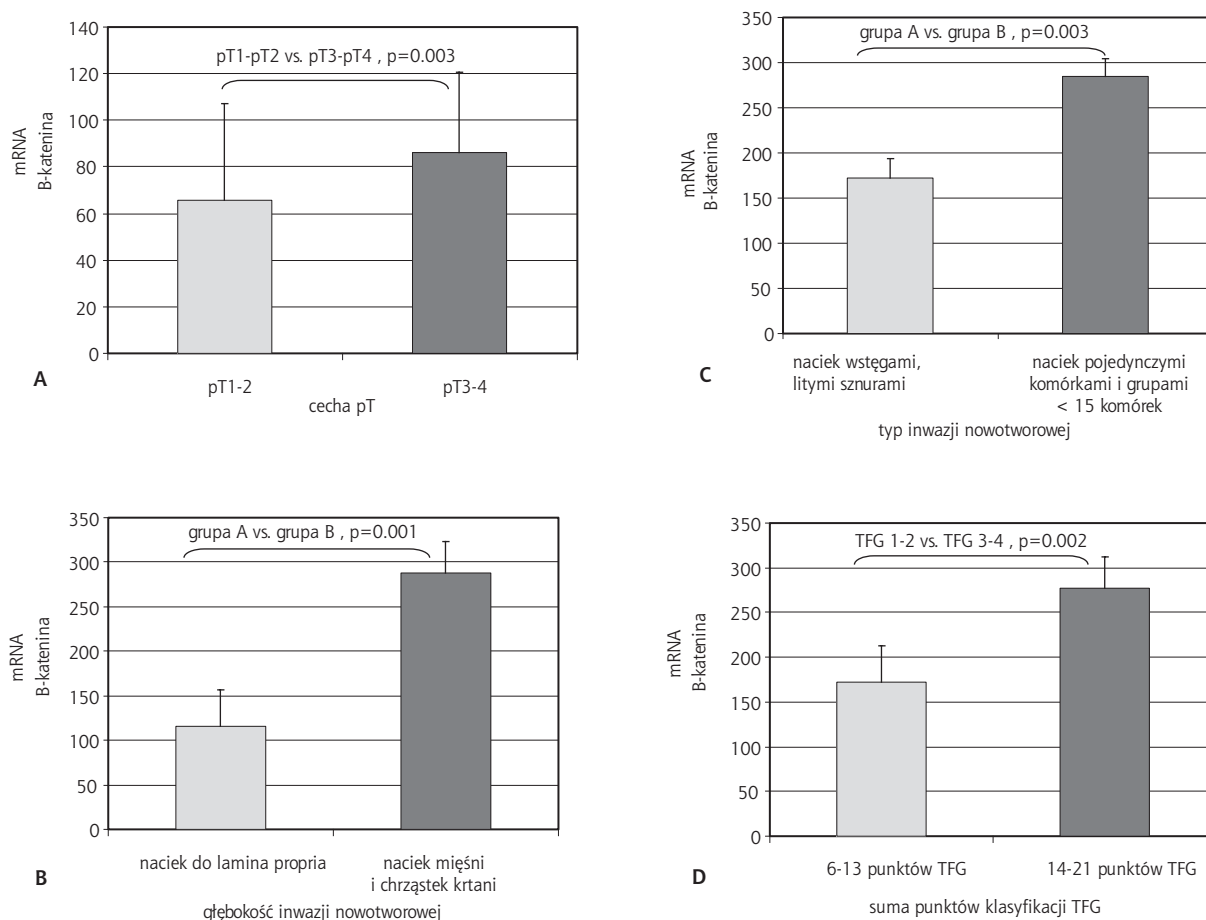
Przeprowadzona analiza statystyczna potwierdziła występowanie znamienych różnic w poziomie ekspresji mRNA dla  $\beta$ -kateniny w komórkach guzów pT1-pT2 oraz pT3-pT4 ( $p = 0,003$ ). Grupa raków krtani o wyższym stadium miejscowego zaawansowania zmian charakteryzowała



Ryc. 1. Rozkład średnich wartości ekspresji mRNA dla  $\beta$ -kateniny w komórkach raka krtani w odniesieniu do stopnia miejscowego zaawansowania zmian pT (A), głębokości inwazji (B), typu inwazji (C), punktacji TFG (D)

się wyższymi poziomami mRNA dla  $\beta$ -kateniny ( $292,58 \pm 143,42$  guzy pT3-pT4 vs.  $135 \pm 25,12$  guzy pT1-pT2). Ocena ekspresji mRNA dla badanej cząsteczki w odniesieniu do stopnia głębokości zmian nowotworowych wykazała, że średnie wartości kwasu rybonukleinowego mRNA w komórkach badanych raków płaskonabłonkowych z głębokim naciekiem ściany narządu różnią się istotnie statystycznie od raków krtani o mniej agresywnym wzroście ( $p=0,001$ ). Guzy naciekające tkankę mięśniową i chrząstki krtani wykazywały wyższy stopień ekspresji mRNA ( $288,06 \pm 139,01$  dla głębokiego nacieku vs.  $116,12 \pm 119,84$  dla nacieku do lamina propria). Statystyczna ocena wyników RT<sup>2</sup>-PCR oraz parametrów kliniczno-morfologicznych badanych raków płaskonabłonkowych krtani wykazała, że ekspresja mRNA dla  $\beta$ -kateniny w komórkach nacieku nowotworowego izolowanych z obwodowej części guza korelowała dodatnio z typem inwazji ( $p=0,003$ ). Raki krtani o rozproszonej inwazji ściany wykazywały wyższą ekspresję mRNA dla  $\beta$ -kateniny

w izolowanych komórkach guza ( $284,44 \pm 149,15$  dla nacieku małymi grupami <15 komórek i pojedynczymi komórkami vs.  $172,65 \pm 139,58$  dla nacieku litymi sznurami i wstęgami). W przeprowadzonych badaniach potwierdzono ponadto występowanie znamienych różnic w poziomach wartości mRNA dla  $\beta$ -kateniny w komórkach guzów wykazujących większe zaawansowanie zmian nowotworowych wg klasyfikacji TFG ( $p=0,002$ ). Raki krtani o większej ilości punktów charakteryzowały się wyższą ekspresją mRNA dla  $\beta$ -kateniny w izolowanych komórkach guzów z ilością 14-21 punktów TFG vs.  $171,83 \pm 128,30$  dla guzów z ilością 6-13 punktów TFG). Podsumowując, dla raków płaskonabłonkowych krtani, które charakteryzowały się największą agresywnością procesu nowotworowego wg zastosowanych kryteriów kliniczno-morfologicznych Wyniki analizy statystycznej poziomu mRNA dla  $\beta$ -kateniny w badanej grupie raków krtani przedstawiono na ryc. 2.



Ryc. 2. Wyniki statystycznej oceny różnic średnich wartości ekspresji mRNA dla  $\beta$ -kateniny w komórkach raka krtani w zależności od stopnia miejscowego zawansowania zmian pT (A), głębokości inwazji (B), typu inwazji (C), punktacji TFG (D)

### **Analiza ekspresji białka $\beta$ -kateniny w zależności od cech kliniczno-morfologicznych**

Ocena wyników analizy Western blot w badanej grupie raków płaskonabłonkowych krtani wykazała, że 71,4% (15/21) analizowanych nowotworów, które wykazywały pozytywną ekspresję białka  $\beta$ -kateniny, zostały zakwalifikowane w badaniu histopatologicznym jako guzy o największej rozległości zmian miejscowych (raki pT3-pT4), charakteryzujące się wysoką sumą punktów klasyfikacji *tumor front grading* (>14 punktów TFG) – 57,2% (12/21) przypadków raka krtani. Ze względu na małe liczebnie grupy komórek wykazujących pozytywną ekspresję analizowanego białka nie oceniono różnic w poziomie  $\beta$ -kateniny w badanych grupach. Należy podkreślić jednak raki płaskonabłonkowe krtani o najwyższym stopniu inwazyjności morfologicznych wg zastosowanych kryteriów histopatologicznych i jednocześnie dodatnim wynikiem ekspresji  $\beta$ -kateniny w utkaniu guza wykazywały głęboką inwazję podścieliska z naciekaniami tkanki mięśniowej i chrząstki narządu – w 90,5% (19/21) przypadkach raka krtani oraz naciekały w sposób najbardziej inwazyjny grupami pojedynczych komórek nowotworowych – w 52,4% (11/21) guzów nowotworowych.

### **DYSKUSJA**

W piśmiennictwie światowym dotyczącym roli aktywacji szlaku wewnątrzkomórkowego transdukcji Wnt/ $\beta$ -katenina i białek pośredniczących m.in. MAPK/ERK1/2, onkogenów c-erbB-2 i c-Myc oraz zjawiska metaplastji nabłonkowo-mezenchymalnej EMT liczni badacze podkreślają znaczenie  $\beta$ -kateniny jako czynnika mającego związek z determinowaniem inwazyjności zmian, powstawaniem przerzutów węzłowych oraz gorszym rokowaniem u pacjentów z chorobą nowotworową [1-9].  $\beta$ -katenina jest białkiem, które występując w formie ufosforylowanej, w mechanizmie aktywności kinazy tyrozynowej, ulega przemieszczeniu z cytozolu i kumulacji w jądrze komórkowym co nasila, poprzez wiązanie z regionem paromotorowym czynnika transkrypcyjnego Tcf, ekspresję genów kluczowych w proliferacji i hamowaniu zjawiska apoptozy w komórkach guza nowotworowego [1-9].

W prezentowanej pracy odsetek komórek raka płaskonabłonkowego krtani z potwierdzoną ekspresją  $\beta$ -kateniny, zarówno na poziomie genu jak i białka, wynosiła odpowiednio: 78,9% i 29,6%. Przedstawione wyniki pozostają zgodne z wynikami badań innych autorów [7,12]. W piśmiennictwie dotyczącym tematu badacze zanotowali, że nasilenie pozytywnego odczynu potwierdzającego aktywność

$\beta$ -kateniny w komórkach raków różnego pochodzenia jest różny w zależności od zastosowanej metody badawczej i waha się od 37% do 70% [7,12].

Autorzy pracy zanotowali również istotną dodatnią korelację ekspresji mRNA dla  $\beta$ -kateniny ze stopniem miejscowej rozległości zmian nowotworowych oraz stopniem agresywności nacieku nowotworowego zgodnie z przyjętymi kryteriami klasyfikacji tumor front grading. Wielu autorów także podkreśla związek stopnia ekspresji mRNA i/lub poziomu białka badanej cząsteczki z cechami klinicznymi i morfologicznymi zmian nowotworowych [7,9,12-15]. Guo i wsp. [7] w badaniach nad rakiem wątroby wskazali na zwiększoną ekspresję  $\beta$ -kateniny w komórkach guza sięgającą 70% i jej znaczenie jako czynnika determinującego większą inwazyjność zmian nowotworowych. Autorzy wykazali istotną korelację poziomu  $\beta$ -kateniny z czynnikami kliniczno-morfologicznymi guza m.in. klasyfikacją pTNM, rozległością narządową nacieku nowotworowego oraz złą prognozą w badanej grupie chorych. Miao i wsp. [9] przedstawili wyniki analiz obejmujących grupę raków niedrobnokomórkowych płuca i zanotowali istotną zależność ekspresji kompleksu E-kaderyna/ $\beta$ -katenina z inwazyjnym fenotypem guza. Badacze potwierdzili pozytywny wynik ekspresji białka p130cas, będącego częścią kompleksu p130cas/E-kaderyna/ $\beta$ -katenina współdziałających w konstytutywnej aktywacji szlaku Wnt w 61,9% raków płuca, charakteryzujących się przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych oraz wysokim zaawansowaniem zmian w klasyfikacji TNM. Również Fodde i wsp. [16] analizując mechanizmy aktywacji białek szlaku transdukcji Wnt/ $\beta$ -katenina w raku jelita grubego wykazali nasiloną ekspresję zmienionej onkogenie, zmutowanej formy białka w utkaniu guza oraz wzmożoną tendencję do podobnych zmian molekularnych w komórkach podścieliska, podkreślając znaczenie oddziaływań autokrynych między komórkami nacieku nowotworowego, ale także parakrynych, z istotną rolą komórek podścieliska guza w aktywacji szlaku wewnątrzkomórkowego Wnt/ $\beta$ -katenina. Bakker i wsp. [17] przeprowadzając badania doświadczalne in vitro na modelu raka jelita wykazali rolę aktywacji  $\beta$ -kateniny w procesie formowania masy guza i wpływ na wzrost nowotworu. Również Liu i wsp. [13] analizując związek ekspresji p120-kateniny i E-kaderyny z cechami morfologicznymi zmian neoplastycznych w raku płuca wykazali ścisłą zależność nadekspresji badanych białek występujących w zmutowanej formie z niskim stopniem zróżnicowania komórkowego guza, wysokim wskaźnikiem klasyfikacji pTNM i obecnością przerzutów do węzłów chłonnych. Także Kase i wsp. [12] wskazali

na istotny związek zmniejszonej ekspresji  $\beta$ -kateniny w utkaniu nowotworowym z gorszą prognozą w badanej grupie chorych z rakiem płuca, podkreślając znaczenie zjawiska degradacji wewnątrzkomórkowej cząsteczek pełniących kluczową rolę w adhezji i integracji tkankowej komórek guza. Hu i wsp. [14] również potwierdzili większą ekspresję  $\beta$ -kateniny i E-kaderyny w utkaniu raka pęcherzyka żółciowego w porównaniu z tkanką niezmienną nowotworowo oraz pozytywną korelację poziomu badanych białek z niższym stopniem zróżnicowania histologicznego guza oraz większym zaawansowaniem miejscowym zmian i parametrami klasyfikacji stage.

W piśmiennictwie dotyczącym tematu wielu badaczy wskazuje na znaczenie interakcji  $\beta$ -kateniny i białek szlaków wewnątrzkomórkowych związanych z jej aktywnością a komórkami układu odpornościowego naciekającego podścielisko guza nowotworowego [18]. Kaler i wsp. [18] w badaniach nad wzajemnym oddziaływaniem komórek guza w raku jelita grubego a komórkami otaczającego guz podścieliska wykazali, że ekspresja onkogennej formy  $\beta$ -kateniny i aktywacja szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina w komórkach guza determinuje wzrost pobudzenia makrofagów naciekających guz do zaburzonego wydzielania cytokiny IL1 $\beta$  i zahamowania zjawiska apoptozy w mechanizmie aktywacji białek Snail i TRAIL. Na inny mechanizm oddziaływań wewnątrzkomórkowych wskazali Cho i wsp. [19]. Autorzy przedstawili wyniki wskazujące na rolę mutacji białek szlaku transdukcji Wnt/ $\beta$ -katenina we wczesnym etapie inicjacji procesu nowotworowego w guzach jelita grubego, wskazując na znaczenie w onkogenezie indukcji białka Aksyny 2 [19]. Również Le i wsp. [20] potwierdzili rolę parakrynnego oddziaływania komórek podścieliska położonych w najbliższym otoczeniu guza nowotworowego, w jego najbardziej inwazyjnej części w regulacji wewnątrzkomórkowej kumulacji białka  $\beta$ -kateniny oraz pośrednio w determinowaniu inwazyjności i powstawaniu przerzutów w raku jelita grubego.

Na znaczenie wzajemnych oddziaływań między komórkami nowotworowymi a utkaniem podścieliska wskazali także inni autorzy [21,22]. Fukuyama i wsp. [21] w badaniach nad rakiem jelita grubego wskazali na zjawisko hamowania transkrypcji i aktywności białek szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina za pośrednictwem zmutowanego białka supresorowego MCC obecnego w komórkach nowotworowych. Podobne wnioski przedstawili Huang i wsp. [22] wskazując na kluczową rolę aktywacji białek szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina w kancerogenezie badanych guzów.

Otrzymane w pracy wyniki badań oraz przedstawione wnioski, jak też przegląd aktualnego piśmiennictwa dotyczącego omawianego tematu uzasadniają konieczność dalszych badań dla praktycznego wykorzystania oznaczania ekspresji  $\beta$ -kateniny i białek szlaków wewnątrzkomórkowych związanych z jej aktywnością w komórkach raka płaskonabłonkowego krtani jako istotnych metod dla określenia zaawansowania zmian klinicznych i morfologicznych, a tym samym pośrednio wyboru właściwego leczenia.

## WNIOSKI

1. Zwiększona ekspresja mRNA dla  $\beta$ -kateniny w komórkach raka krtani została potwierdzona dla guzów o wyższym stopniu zaawansowania zmian nowotworowych pT3-pT4.
2. Raki krtani o większej agresywności nacieku według kryteriów klasyfikacji TFG charakteryzowały się większą ekspresją genu dla  $\beta$ -kateniny.
3. Dla guzów nowotworowych głęboko naciekających otaczające tkanki podścieliska, w sposób rozproszony małymi grupami komórek (<15 komórek wpw) stwierdzono wyższe poziomy mRNA dla  $\beta$ -kateniny w komórkach raka krtani.

\* *Badania wykonano w ramach grantu MNiSzW nr N403 043 32/2326*

## Piśmiennictwo

1. Fuchs SY, Ougolkov AV, Spiegelman VS, Minamoto T. Oncogenic beta-catenin signaling networks in colorectal cancer. *Cell Cycle* 2005; 4(11): 1522-39.
2. Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* 2003; 94(7): 575-81.
3. Macheda ML, Stacker SA. Importance of Wnt signaling in the tumor stroma microenvironment. *Curr Cancer Drug Targets* 2008; 8(6): 454-65.
4. Janssen KP, Alberici P, Fsihi H, Gaspar C, Breukel C, Franken P i wsp. APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression. *Gastroenterology* 2006; 131(4): 1096-109.
5. Liu Z, Li Q, Li K, Chen L, Li W, Hou M i wsp. Telomerase reverse transcriptase promotes epithelial-mesenchymal transition and stem cell-like traits in cancer cells. *Oncogene* 2012; doi: 10.1038/onc.2012.441.
6. Bremnes RM, Veve R, Hirsch FR, Franklin WA. The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. *Lung Cancer* 2002; 36(2): 115-24.
7. Guo C, Liu QG, Yang W, Zhang ZL, Yao YM. Relation among p130Cas, E-cadherin and beta-catenin expression, clinicopathologic significance and prognosis in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008; 7(5): 490-6.
8. Kriegl L, Vieth M, Kirchner T, Menssen A. Up-regulation of c-MYC and SIRT1 expression correlates with malignant transformation in the serrated route to colorectal cancer. *Oncotarget* 2012 Oct 3 [Epub ahead of print].
9. Miao Y, Li AL, Wang L, Fan CF, Zhang XP, Xu HT i wsp. Expression of p130cas, E-cadherin and  $\beta$ -catenin and their correlation with clinicopathological parameters in non-small cell lung cancer: p130cas over-expression predicts poor prognosis. *Folia Histochem Cytobiol* 2012; 50(3): 392-7.
10. O'Sullivan B, Shah J. New TNM staging criteria for head and neck tumors. *Semin Surg Oncol* 2003; 21: 30-42.
11. Starska K, Kulig A, Łukomski M. Tumor front grading in prediction of survival and lymph node metastases in patients with laryngeal carcinoma. *Adv Med Sci* 2006; 51: 200-204.
12. Kase S, Sugio K, Yamazaki K, Okamoto T, Yano T, Sugimachi K. Expression of E-cadherin and beta-catenin in human non-small cell lung cancer and the clinical significance. *Clin Cancer Res* 2000; 6(12): 4789-96.
13. Liu Y, Wang Y, Zhang Y, Miao Y, Zhao Y, Zhang PX i wsp. Abnormal expression of p120-catenin, E-cadherin, and small GTPases is significantly associated with malignant phenotype of human lung cancer. *Lung Cancer* 2009; 63(3): 375-82.
14. Hu X, Ruan Y, Cheng F, Yu W, Zhang X, Larré S. p130Cas, E-cadherin and  $\beta$ -catenin in human transitional cell carcinoma of the bladder: expression and clinicopathological significance. *Int J Urol* 2011; 18(9): 630-7.
15. Vincan E, Barker N. The upstream components of the Wnt signalling pathway in the dynamic EMT and MET associated with colorectal cancer progression. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25(6): 657-63.
16. Fodde R, Brabletz T. Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19(2): 150-8.
17. Bakker ER, Hoekstra E, Franken PF, Helvensteijn W, van Deurzen CH, van Veelen W i wsp.  $\beta$ -Catenin signaling dosage dictates tissue-specific tumor predisposition in Apc-driven cancer. *Oncogene* 2012 Oct 8. doi: 10.1038/onc.2012.449.
18. Kaler P, Augenlicht L, Klampfer. Activating Mutations in  $\beta$ -Catenin in Colon Cancer Cells Alter Their Interaction with Macrophages; the Role of Snail. *PLoS One* 2012; 7(9): e454-62.
19. Cho KH, Baek S, Sung MH. Wnt pathway mutations selected by optimal beta-catenin signaling for tumorigenesis. *FEBS Lett* 2006; 580(15): 3665-70.
20. Le NH, Franken P, Fodde R. Tumour-stroma interactions in colorectal cancer: converging on beta-catenin activation and cancer stemness. *Br J Cancer* 2008; 98(12): 1886-93.
21. Fukuyama R, Nicolaita R, Ng KP, Obusez E, Sanchez J, Kalady M i wsp. Mutated in colorectal cancer, a putative tumor suppressor for serrated colorectal cancer, selectively represses beta-catenin-dependent transcription. *Oncogene* 2008; 27(46): 6044-55.
22. Huang D, Du X. Crosstalk between tumor cells and microenvironment via Wnt pathway in colorectal cancer dissemination. *World J Gastroenterol* 2008; 14(12): 1823-7.