PTEN -ekspressio rintasyövässä

Pro Gradu -tutkielma
Tampereen yliopisto
Lääketieteellisen teknologian instituutti
Kesäkuu 2006
Katri Köninki

PRO GRADU -TUTKIELMA

Paikka: Tampereen Yliopisto, Lääketieteellisen teknologian instituutti
Tekijä: Köninki, Katri Tuulia
Otsikko: PTEN -ekspressio rintasyövässä
Sivumäärä: 53
Ohjaajat: Professori Jorma Isola, LT Jukka Pitkänen
Tarkastajat: Professori Markku Kulomaa, Professori Jorma Isola
Aika: Kesäkuu 2006

Tiivistelmä

Tutkimuksen tausta ja tavoitteet: *HER2* on pahanlaatuista solukasvua aiheuttava syöpägeeni, jonka geenimonistumaa ja/tai sen koodaaman reseptoriproteiinin yliekspressiota esiintyy rintasyövässä sekä myös eräissä muissa syöpätyypeissä. HER2 -reseptorin aktivaation on osoitettu aktivoivan solunsisäistä PI3K-Akt -signalointireittiä ja siten edistävän rintasyöpäsolujen proliferaatiota. PI3K-Akt signalointiin vaikuttaa keskeisesti myös tuumorisuppressorigeeni *PTEN*, jonka mutaatioita tai deleetioita on havaittu sekä rintasyövässä että useissa muissa syövissä. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli kehittää kvantitatiivinen RT-PCR assay PTEN -ekspressiotasojen määrittämiseksi sekä määrittää PTEN -ekpressiotaso rintasyöpäsolulinjoissa ja arkistoiduissa potilasnäytteissä.

Tutkimusmenetelmät: Näytteiden PTEN mRNA -ekspressiotasoja määritettiin kvantitatiivisella reaaliaikaisella PCR:llä. Näytteinä oli 57 rintasyöpäjääleikenäytettä ja 12 rintasyöpäsolulinjaa. PTEN -ekspressio määritettiin suhteessa MCF-7 -solulinjan PTEN -tasoon, joka tiedettiin kirjallisuuden perusteella normaaliksi ja kontrollina käytettiin LNCap -solulinjaa, jossa on yhden *PTEN* -alleelin deleetio. Alentuneena PTEN -ekspression rajana pidettiin LNCap -solulinjan ekspressiotasoa.

Tutkimustulokset: PTEN -ekspressio oli alentunut 13,3 %:ssa potilasnäytteistä. Tarkasteltaessa erikseen HER2:n suhteen positiivisten ja negatiivisten näytteiden PTEN -ekspressiotasoja havaittiin, että HER2 -positiivisissa näytteissä PTEN -tasot olivat keskimäärin alhaisempia kuin HER2 -negatiivisissa näytteissä. Rintasyöpäsolulinjoista 25,0 %:ssa oli alentunut PTEN -ekspressio.

Johtopäätökset: Kvantitatiivinen PCR on käyttökelpoinen menetelmä PTEN -ekspressiotasojen määrittämiseen, koska se on toistettava ja tulokset saadaan ilman subjektiivista arviointia toisin kuin immunohistokemiallisia menetelmiä käytettäessä. Saadut tulokset osoittavat, että alentunut PTEN -ekspressio on yleisesti esiintyvä löydös rintasyövässä ja saattaa liittyä HER2 -positiiviseen syöpään. Tätä tutkimusta on tarkoitus jatkaa selvittämällä alentuneen PTEN -ekspression mahdollista yhteyttä *PIK3CA* -onkogeenin (PI3K.n alayksikköä koodaava geeni) mutaatioihin ja merkitystä HER2 -reseptoriin kohdistetun lääkkeen (trastutsumabi, Herceptin) resistenssissä.

MASTER'S THESIS

Place: University of Tampere, Institute of Medical Technology
Author: Köninki, Katri Tuulia
Title: PTEN expression in breast cancer
Pages: 53
Supervisors: Professor Jorma Isola, Jukka Pitkänen MD
Reviewers: Professor Markku Kulomaa, Professor Jorma Isola
Date: June 2006

Abstract

Background and Aims: *HER2* is an oncogene that is amplified and/or overexpressed in breast cancers and some other cancers. Activation of HER2 receptors has been shown to activate the PI3K-Akt signalling pathway and thus induce proliferation of breast cancer cells. *PTEN* is a tumor suppressor gene that also has a significant effect on PI3K-Akt signalling. Mutations and deletions of *PTEN* have been reported in both breast cancers and several other cancers. The aims of this study were to develop a quantitative RT-PCR assay for determining the levels of PTEN expression and to determine levels of PTEN expression in breast cancer cell lines and fresh-frozen breast carcinomas.

Methods: By using quantitative real-time RT-PCR the levels of PTEN mRNA expression were determined in 57 fresh-frozen breast carcinomas and 12 breast cancer cell lines. The results were classified by comparing to a cell line with known normal (MCF-7) and decreased (LNCap) PTEN mRNA expression. Decreased PTEN expression was defined as the mRNA level equal to or below that found in a cell line with a genomic PTEN deletion (LNCap).

Results: Levels of PTEN expression were decreased in 13.3% of the clinical tumor samples. The PTEN expression levels in HER2 positive samples were on average lower than in HER2 negative samples. Decreased PTEN expression levels were found in 25.0% of the cell lines.

Conclusions: Quantitative PCR is a useful method for determining the levels of PTEN expression. It is reproducible and interpretation of the results is not subjective as in immunohistochemical methods. The results indicate that decreased expression of PTEN is a common finding in breast cancer and may associate with HER2 positive breast cancer. Further studies are needed to find out the possible correlation of decreased PTEN expression to mutations in *PIK3CA* oncogene (the gene encoding a subunit of PI3K) and the role of PTEN expression in trastuzumab (Herceptin) resistance.

Sisällysluettelo

LYHENTEET **5**

1. JOHDANTO **6**

2. KIRJALLISUUSKATSAUS **7**

2.1 Rintasyöpä **7**
2.1.1 Yleistä 7
2.1.2 HER2 -positiivinen rintasyöpä 7

2.2 PTEN **9**
2.2.1 Yleistä 9
2.2.2 *PTEN* -Pseudogeeni 10

2.3 PTEN-PI3K-Akt signalointireitti **11**
2.3.1 Akt 12
2.3.2 PI3K 14
2.3.3 *PIK3CA* 15
2.3.4 *PIK3CA* ja *PTEN* 16

2.4 PTEN:n toimintamekanismit **16**
2.4.1 Lipidifosfataasiaktiivisuus 17
2.4.2 Proteiinifosfataasiaktiivisuus 18
2.4.3 PTEN:n toiminta PI3K-Akt -reitin ulkopuolella 18

2.5 PTEN:n merkitys soluissa **19**
2.5.1 Solujen kasvu ja solusykli 19
2.5.2 Solujen adheesio ja migraatio 20
2.5.3 Ohjelmoitu solukuolema 21
2.5.4 Solutyyppikohtaiset erot 21

2.6 PTEN:n merkitys syövän lääkehoidossa **22**

2.7 PTEN -ekspression säätely **22**

2.8 *PTEN* -mutaatiot rintasyövässä **24**
2.8.1 PTEN:n toiminnan menetys 24
2.8.2 Haploinsufficiency 25
2.8.3 Mutaatiot 25
2.8.4 Perinnölliset mutaatiot 26
2.8.5 Epigeneettiset muutokset 26
2.8.6 Silmukoitumismuunnokset 27

2.9 *PTEN*:n mutaatioiden vaikutukset **28**

2.10 PTEN ja HER2 rintasyövässä **29**

2.10.1 PTEN ja trastutsumabi 31
2.11 Menetelmät 31
2.11.1 RNA:n eristäminen parafiininäytteistä 31
2.11.2 Kvantitatiivinen PCR 32
2.11.3 Pseudogeenin merkitys 35

3. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET 36

4. MATERIAALIT JA MENETELMÄT 37

4.1 Näytteet 37

4.2 Soluviljelmät ja reagenssit 37

4.3 FFPE -näytteet 38

4.4 RNA:n eristys ja käänteiskopiointi 38

4.5 Kvantitatiivinen PCR 39

5. TULOKSET 40

5.1 PTEN -ekspression kvantitatiivinen RT-PCR 40

5.2 PTEN -ekspressio rintasyöpäpotilaiden jääleikenäytteissä 41

5.3 PTEN -ekspressio rintasyöpäsolulinjoissa 42

5.4 PTEN -ekspressio rintasyöpäpotilaiden FFPE –näytteissä 43

6. POHDINTA 44

7. JOHTOPÄÄTÖKSET 47

Lyhenteet

CK2	Casein kinase 2
DSP	Dual-specificity protein phosphatase
EGF	Epidermal growth factor
Egr-1	Early growth response-1
FAK	Focal adhesion kinase
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
hMAST	Microtubule-associated serine-threonine kinase
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
IGF-IR	Insulin-like growth factor I receptor
LOH	Loss of heterozygosity
MAGI-2	Membrane-associated guanylate kinase inverted-2
PDK1	3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-bisphosphate
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor
PTEN	Phosphatase and tensin homologue
PTP	Protein tyrosine phosphatase
RTK	Receptor tyrosine kinase
SH2	Src-homology 2
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

1. Johdanto

HER2 on pahanlaatuista solukasvua aiheuttava syöpägeeni, jonka geenimonistumaa ja/tai sen koodaaman reseptoriproteiinin yliekspressiota esiintyy sekä rintasyövässä että myös eräissä muissa syöpätyypeissä. Monistumaan liittyy usein aggressiivinen syöpä ja huono ennuste, lisäksi tällainen syöpä on myös yleensä resistentti tavanomaisille syöpälääkkeille. HER2 -reseptorin aktivaation on osoitettu aktivoivan solunsisäistä PI3K-Akt -signalointireittiä ja siten edistävän rintasyöpäsolujen proliferaatiota. Tällä signalointireitillä on tärkeä merkitys solujen kasvun ja eloonjäämisen säätelyssä. Reitin keskeinen risteyskohta on Akt -kinaasi, jonka aktivoituminen saa aikaan mm. solujen lisääntymisen ja solusyklin nopeutumisen sekä estää apoptoosia. HER2 -positiivisen rintasyövän hoitoon on käytössä humanisoitu vasta-aine trastutsumabi (Herceptin), jonka on osoitettu alentavan PI3K-Akt -reitin aktiivisuutta.

PI3K-Akt signalointiin vaikuttaa keskeisesti myös tuumorisuppressorigeeni *PTEN*, jonka mutaatioita tai deleetioita on havaittu sekä rintasyövässä että useissa muissa syövissä. PTEN osallistuu PI3K-Akt -reitin säätelyyn estämällä Akt:n aktivoitumista ja siten hillitsemällä solujen kasvua. Häiriöt PTEN:n toiminnassa tai sen täydellinen puuttuminen johtavat syövän kehittymiseen ja etenemiseen. Lisäksi PTEN:llä on merkitystä myös eräiden syöpälääkkeiden toiminnassa, joten sen toimintahäiriöiden on osoitettu aiheuttavan lääkeresistenssiä. *PTEN*:n ekspressiota rintasyövässä on tutkittu immunohistokemiallisilla menetelmillä, mutta ekspressiotasoja ei ole selvitetty transkriptiotasolla eikä kvantitatiivisesti.

2. Kirjallisuuskatsaus

2.1 Rintasyöpä

2.1.1 Yleistä

Rintasyöpä on naisten yleisin syöpä Suomessa. Vuonna 2003 naisilla todettiin lähes 3 800 uutta rintasyöpää ja noin joka 10. nainen sairastuu rintasyöpään jossain elämänsä vaiheessa. Naisilla rintasyöpä on yleisin syövästä aiheutuva kuolinsyy, vuonna 2003 rintasyöpään kuoli 822 naista. Rintasyövän ikävakioitu ilmaantuvuus on lisääntynyt vuodesta 1957 (26.5/100 000) vuoteen 2003 (84.3/100 000) yli kolminkertaiseksi ja ilmaantuvuuden oletetaan edelleen kasvavan lähivuosina. Koko väestöä ajatellen rintasyöpä oli vuonna 2003 kolmanneksi yleisin syöpä (www.cancerregistry.fi).

2.1.2 HER2 -positiivinen rintasyöpä

HER2 (human epidermal growth factor receptor 2, tunnetaan myös nimillä ErbB2 tai neu) on solukalvon läpäisevä tyrosiinikinaasireseptori. HER2 kuuluu EGFR tyypin I kasvutekijäreseptorityrosiinikinaasiperheeseen yhdessä EGFR:n, HER3:n ja HER4:n kanssa. Kaikilla reseptoreilla paitsi HER3:lla on sytoplasminen tyrosiinikinaasialue ja kaikki paitsi HER2 sitovat spesifisesti ligandeja solun ulkoisella domainillaan. Ligandin sitoutumisen jälkeen reseptorit dimerisoituvat käyttäen HER2:ta suosituimpana sitoutumispartnerina. Tämä heterodimerisaatio saa aikaan tyrosiinikinaasiaktiivisuuden ja signaloinnin reseptorien alapuolella olevissa MAPK - ja PI3K -reiteissä (Nahta ym., 2006).

HER2:n geenimonistumaa ja/tai proteiinin yliekspressiota esiintyy 10–40%:ssa rintasyövistä ja sen on todettu olevan yhteydessä potilaiden huonoon eloonjäämiseen. Yliekspressio korreloi voimakkaasti rintasyövän patogeneesin ja ennusteen kanssa ja sitä on löydetty sekä primaarikasvaimista että metastaaseista, minkä perusteella HER2:teen kohdistettu hoito saattaa olla tehokas myös muihin kuin rintasyöpäkasvaimiin (Nahta ym., 2006).

Humanisoitu monoklonaalinen vasta-aine trastutsumabi (Herceptin) on lääke, joka on kohdistettu suoraan HER2 -reseptorien solunulkoisiin osiin. Trastutsumabi on tällä hetkellä ainoa HER2:teen kohdistettu hoito, jonka USA:n FDA on hyväksynyt metastaattisen rintasyövän hoitoon. Mekanismit, joilla trastutsumabi saa aikaan HER2 -positiivisten kasvainten regression eivät ole täydellisesti selvillä, mutta kokeellisissa *in vitro* -ja *in vivo* -malleissa on havaittu useita solu- ja molekyylitason vaikutuksia.

Trastutsumabia käytetään rintasyövän hoidossa yhdessä sytostaattien kanssa. Romond ym. (2005) vertasivat tutkimuksessaan pelkkää solunsalpaajahoitoa trastutsumabin ja solunsalpaajien yhdistelmähoitoon ja totesivat, että kahden vuoden mediaaniseurantajakson aikana kontrolliryhmässä esiintyi kaksinkertainen määrä uusiutumisia tai metastaaseja trastutsumabilla hoidettuhin verrattuna. Neljän vuoden kuluttua trastutsumabilla hoidetuista oli elossa 85 % ja kontrolliryhmästä 67,1 %. Annettaessa trastutsumabia yhdessä doketakselin tai vinorelbiinin kanssa varhaisvaiheen rintasyöpäpotilaille havaittiin, että trastutsumabi–yhdistelmähoidossa kolmen vuoden kuluttua potilaista oli elossa 96,3 % kun vastaava luku pelkillä solunsalpaajilla hoidetuilla potilailla oli 89,7 %. Merkittävämpi ero ryhmien välillä havaittiin, kun verrattiin potilaita, joiden syöpä ei ollut uusiutunut (Joensuu ym., 2006). Tutkittaessa trastutsumabin vaikutusta varhaisvaiheen rintasyövän hoidossa on vuoden pituisen hoitojakson aikana havaittu, että trastutsumabilla hoidetuilla potilailla esiintyy vähemmän metastaaseja tai rintasyövän uusiutumista kontrolliryhmään verrattuna. Myös kuolleisuus oli pienempi trastutsumabilla hoidettujen ryhmässä (Piccart-Gebhart ym., 2005).

Faasin II kliinisissä kokeissa havaittu trastutsumabivaste oli kuitenkin alhainen, 12–34% kun hoidon mediaanikesto oli 9 kk. Faasin II kokeissa trastutsumabia annettiin yhdessä kahden eri solunsalpaajan, paklitakselin tai doketakselin kanssa, minkä havaittiin lisäävän vastelukuja, hidastavan taudin etenemistä ja lisäävän eloonjäämistä monoterapiaan verrattuna. Suurin osa niistäkin potilaista, joilla havaittiin vaste trastutsumabi-pohjaiseen hoitoon kuitenkin kehittävät resistenssin vuoden kuluessa (Nahta ym., 2006). Trastutsumabi-resistenssi kehittyy yleensä lähes aina 0,5-2 vuoden kuluessa hoidettaessa etäpesäkkeitä lähettänyttä rintasyöpää (Slamon ym., 2001). Resistenssiä on kahta päätyyppiä: 1) Primaarinen resistenssi, jossa syöpäsolukko ei reagoi trastutsumabiin edes hoidon alkuvaiheessa sekä 2) Sekundaarinen eli hankittu

resistenssi, joka kehittyy aluksi tehoavan hoidon aikana. Primaariresistenssiä esiintyy arviolta 10–30 %:ssa tapauksista. Selkeimpänä esimerkkinä on potilastapaus, joka on kuvattu trastutsumabi-resistentin solulinjan yhteydessä (Tanner ym., 2004).

Toistaiseksi ei ole olemassa kliinisesti osoitettua tekijää, jonka perusteella voitaisiin ennustaa kasvainten trastutsumabi-resistenssia. Resistenssille on esitetty useita mekanismeja kuten p27:n toiminnan estyminen ja IGF-IR:n (insulin-like growth factor I receptor) aktivaatio. HER2 -reseptoria yliekspressoivissa rintasyöpäsoluissa tiedetään olevan alentunut p27 -aktivaatio. Trastutsumabi-käsittely saa aikaan solusyklin pysähtymisen G_1 -vaiheeseen, mikä edellyttää normaalia p27 -proteiinia ja sen kykyä estää cdk2:n toimintaa. Trastutsumabille resistenteissä rintasyöpäsoluissa on osoitettu olevan alentunut p27 -ekspressio ja vastaavasti cdk2:n aktiivisuus on lisääntynyt. Vastaavasti IGF-IR:n aktivoitumisen on osoitettu alentavan p27 -tasoja solussa. Myös PI3K-Akt -reitillä ja PTEN:llä on osoitettu olevan osuutta resistenssissä (Ocaña ym., 2006).

Trastutsumabi-resistenssin tutkimiseen on käytetty paljon JIMT-1 -solulinjaa, joka on ensimmäinen HER2 – positiiviselta ja trastutsumabi-resistentiltä potilaalta peräisin oleva kokeellinen malli primaariselle trastutsumabi-resistenssille. Trastutsumabin ei ole havaittu estävän JIMT-1 -solujen kasvua myöskään *in vitro* tai hiiriksenografteissa. Solulinjan on havaittu olevan resistentti myös toiselle HER2 -positiivisen syövän hoitoon kohdistetulle lääkeaineelle, pertutsimabille (Tanner ym., 2004).

2.2 PTEN

2.2.1 Yleistä

PTEN (phosphatase and tensin homologue, tunnetaan myös nimillä *MMAC1* tai *TEP1*) on yksi yleisimmin mutatoituneista tuumorisuppressorigeeneistä. Se sijaitsee kromosomissa 10q23, alueella jossa on havaittu heterotsygoottisuuden menetystä (loss of heterozygosity, LOH) mm. eturauhassyövässä ja glioblastoomassa. *PTEN*:n

kuvasi yhtä aikaa kolme eri tutkimusryhmää (Maehama ym., 2001). *PTEN* -geenissä on yhdeksän eksonia ja se koodaa 5,5 kb:n kokoista mRNA:ta.

PTEN:n geenituote on 403 aminohapon pituinen ja 53kDa:n kokoinen proteiini (Leslie & Downes, 2004, Maehama ym., 2004), joka koostuu N-terminaalisesta fosfataasidomainista ja C-terminaalisesta C2-domainista. N-terminaalinen proteiinityrosiinifosfataasidomaini (PTP) muistuttaa rakenteeltaan kaksoisspesifisiä fosfataaseja (DSP) ja sillä on osoitettu olevan myös proteiinisubstraatteja. N-terminaalisen osan rakenne on samankaltainen kuin solun tukirangan proteiinien tensiinin ja auksilliinin, jotka osallistuvat solun rakenteen ylläpitämiseen. Tämän rakenteen biologista merkitystä PTEN:llä ei kuitenkaan tiedetä.

C2 -domainin tehtävänä todennäköisesti on fosfolipidien kohdistaminen ja siten proteiinin siirtäminen solukalvolle (Maehama ym., 2001). C2-domainin lisäksi PTEN:n C-terminaalisessa päässä on PDZ -sitova domaini, joka osallistuu proteiinien välisiin vuorovaikutuksiin sekä kaksi proliini-, glutamiinihappo-, seriini- ja treoniinisekvenssiä, jotka osallistuvat proteiinien hajottamiseen (Leslie & Downes, 2004). Fosfataasi- ja C2-domainien lisäksi PTEN:llä on havaittu olevan useita rakenteita, jotka saattavat toimia lokalisaatiosignaaleina (Maehama ym., 2001).

PTEN:llä on kolme eri ominaisuutta, joiden perusteella sitä voidaan pitää tuumorisuppressorigeeninä. Ensinnäkin *PTEN*:n perinnölliset mutaatiot liittyvät autosomaalisiin dominoivasti periytyviin sekä usein syövälle altistaviin sairauksiin, kuten Cowdenin sekä Bannayan-Zonana syndroomiin. Toiseksi, *PTEN*:n homotsygoottista inaktivoitumista on tavattu useissa syövissä. Kolmanneksi, PTEN -proteiini on erittäin konservoitunut. Sen rakenne on huomattavan samankaltainen eri lajeilla ja ihmisen geeni muistuttaa suuresti hiivan, hiiren ja koiran sekvenssejä (Ali ym., 1999).

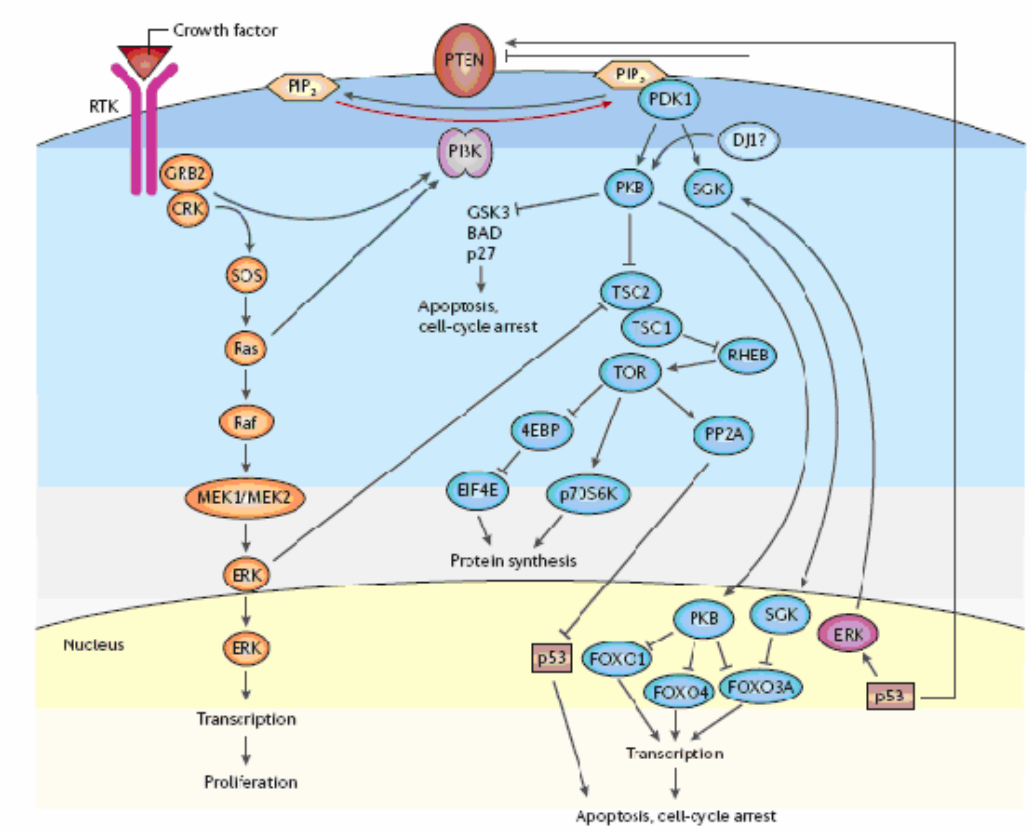
2.2.2 *PTEN*:n pseudogeeni

Kromosomista 9 on löydetty *PTEN* -pseudogeeni. Analysoitaessa sen sekvenssiä on havaittu, että pseudogeeni on 98,6 %:sesti yhdenmukainen funktionaalisen PTEN cDNA:n kanssa. Funktionaalisen PTEN cDNA:n ja pseudogeenin välillä on

ainoastaan 19 nukleiinihapon ero 1287 emäsparin kokoisessa fragmentissa, joka käsittää koko geenin koodaavan alueen (Dahia ym., 1998). Koska tässä geenissä ei ole lainkaan introneja, niin on päätelty että kyseessä on prosessoitu pseudogeeni. Prosessoidun pseudogeenin yleisiin rakenteellisiin ominaispiirteisiin kuuluu intronien täydellinen puuttumisen lisäksi poly-A -alue 3' -päässä sekä pseudogeeniä ympäröivät suorat toistoalueet. Pseudogeenien on havaittu sijaitsevan eri kromosomeissa kuin niitä vastaavien funktionaalisten geenien. Pseudogeenit syntyvät mRNA:n tai sitä vastaavan cDNA:n integraatiosta hajonneen kromosomin katkoskohtaan ja tätä tapahtumaa seuranneesta DNA:n synteesistä ja korjauksesta. Prosessoituja pseudogeenejä ei enää transkriptoida eivätkä ne siten tuota sitä toimivaa mRNA:ta, josta ne alun perin ovat lähtöisin (Vanin, 1985).

2.3 PTEN-PI3K-Akt -signalointireitti

PTEN-PI3K-Akt -signalointireitti (Kuva 1) on yksi tärkeimmistä solujen kasvuun vaikuttavista signalointireiteistä (Alberts ym., 2002). Lisäksi se säätelee apotoosia ja solujen lisääntymistä. Se on myös yksi useimmin syövässä muuttuneista reiteistä. Reittiä aktivoi Ras -proteiini sekä sen alapuolella olevat efektorit useilla eri mekanismeilla. PTEN-PI3K-Akt -reitin toimintaan vaikuttavat monet eri signaloitireitit (Cully ym., 2006). Useat tämän reitin proteiineista (esimerkiksi PI3K:n katalyyttiset ja säätelevät alayksiköt) voivat toimia onkoproteiineina aktivoituessaan tai yliekspressoituessaan, kun taas toiset (esimerkiksi PTEN) ovat tuumorisuppressoreita. Somaattisia geneettisiä ja/tai epigeneettisiä muutoksia, jotka kohdistuva reitin proteiinejaa koodaaviin geeneihin on raportoitu useissa sporadisissa syövissä (Altomare ja Testa, 2005).



Kuva 1. **PTEN–PI3K–Akt -signalointireitti.** Reseptorityrosiinikinaasit (RTK) aktivoivat PI3K:a, joka fosforyloi PIP_2:n PIP_3:ksi. PIP_3 aktivoi PDK1:n, joka edelleen saa aikaan Akt:n (kuvassa PKB) aktiivisuuden. Akt estää FOXO -transkriptiofaktoreiden toimintaa, mikä johtaa solujen lisääntymiseen ja eloonjäämiseen. PTEN estää PI3K:n toimintaa defosforyloimalla PIP_3:n takaisin PIP_2:ksi. Kasvutekijöiden aktivoimat RTK:t käynnistävät Ras -signalointireitin, joka aktivoi PI3K:ta suorasti ja epäsuorasti. p53 on vuorovaikutuksessa FOXO -transkriptiofaktoreiden sekä ERK1:n ja ERK2:n kanssa ja siten vaikuttaa PI3K -signalointiin (Cully ym., 2006).

2.3.1 Akt

Akt -kinaasit ovat tärkeitä välittäjäaineita solun eri prosesseja säätelevissä signalointireiteissä, PTEN–PI3K–Akt -reitissä Akt on keskeinen risteyskohta. Nämä prosessit säätelevät solujen kokoa ja kasvua, lisääntymistä, eloonjäämistä, glukoosimetaboliaa, genomista stabiilisuutta ja verisuonten uudismuodostusta. Geneettisesti muokatuilla hiirillä on osoitettu, että poikkeava Akt -signalointi voi johtaa maligniteettiin, joko yksinään tai yhdessä muiden geneettisten poikkeamien kanssa (Altomare & Testa, 2005). Akt:llä on kolme erittäin homologista isoformia, joita koodaavat eri geenit. Isoformeilla on erilliset, mutta osittain päällekkäiset tehtävät (Cully ym., 2006).

Aktivoitu Akt tiedetään yleisesti selviytymistekijäksi, joka toimii apoptoosia estävästi usealla eri mekanismilla. Näitä ovat mm. sytokromi c:n vapautumisen mitokondrioista estäminen, proapoptoottisten tekijöiden BAD ja prokaspaasi-9 fosforyloiminen ja inaktivoiminen sekä FOXO -transkriptiofaktorien, jotka säätelevät apoptoosille kriittisten geenien ekspressiota, fosforyloiminen ja inaktivoiminen. Akt aktivoi myös IκB kinaasia, joka on NF-κB:n positiivinen säätelijä ja siten saa aikaan antiapoptoottisten geenien transkription. Muita apoptoosin estomekaniseja Akt:llä on edistää Mdm2:n fosforylaatiota ja kuljetusta tumaan, jossa se vähentää p53 -välitteisen solusyklin tarkastuskohtia (Altomare & Testa, 2005).

Akt:n aktivoituminen välittää solusyklin etenemistä vaikuttamalla sykliini D1:n tasoon soluissa. Akt myös estää solusyklin inhibiittoreiden p21, WAFI ja $p27^{Kip1}$ toimintaa niitä fosforyloimalla. Yksi vaikutuskohteista on myös sen alapuolella sijaitseva mTOR -kinaasi, jota Akt aktivoi estämällä tuumorisuppressoriproteiinien TSC1 ja TSC2 kompleksinmuodostusta. mTOR välittää solujen kasvua ja proliferaatiota säätelemällä ribosomaalista biogeneesiä ja proteiinien translaatiota sekä säätelee ravintovastetta rajoittamalla solusyklin etenemistä (Altomare & Testa, 2005).

Akt:n signaloinnilla on merkitystä myös muissa solun prosesseissa, joita pidetään syövän tunnusmerkkeinä. Esimerkiksi VEGF:llä (Vascular endothelial growth factor) on useita biologisia aktiivisuuksia endoteelisoluissa ja VEGF:n vaikutusten solujen selviytymiseen on osoitettu olevan Akt:n välittämiä. Myös kasvainsolujen migraatio on osittain liitetty Akt:n signalointiin. Akt:n on osoitettu osallistuvan kasvainten invaasioon ja metastaasiin edistämällä soluväliaineen metalloproteinaasien erittymistä ja epiteliaalisen mesenkymaalitransition induktiota. Muissa solun prosesseissa Akt:n on osoitettu fosforyloivan hTERT:iä (Human telomerase reverse transcriptasea), joka stimuloi telomeraasin aktiivisuutta ja replikaatiota (Altomare & Testa, 2005).

Akt:n aktivoitumisen syövässä on osoitettu liittyvän pitkälle edenneeseen sairauteen ja/tai huonoon ennusteeseen tietyissä syöpätyypeissä, kuten rintasyövässä. Useat eri mekanismit vaikuttavat Akt -reitin aktivoitumiseen syövässä, yksi näistä on sen yläpuolella sijaitsevien PTEN:n ja PI3K:n häiriöt (Altomare & Testa, 2005). Immunohistokemiallisten tutkimusten mukaan noin puolessa rintasyöpänäytteistä

Akt:n signalointi on yliaktivoitunut, mutta näistä vain 3 %:ssa on proteiinitasolla havaittavia *PTEN* -mutaatioita (Cully ym., 2006). Eräs merkittävä Akt:n yliaktivoitumisen aikaansaava tekijä on HER2 – yliekspressio (Longva ym., 2005).

2.3.2 PI3K

Koska vain pienessä osassa niistä rintasyövistä, joissa Akt on yliaktiivinen esiintyy *PTEN* -mutaatioita, on todennäköistä että PI3K-Akt -signalointireitin aktivoitumisen taustalla on muitakin mekanismeja kuin *PTEN*:n suorat mutaatiot tai deleetiot. PI3K-Akt -reittiä voidaan pitää monimutkaisen signalointireittien verkoston yhdistäjänä. Näillä kaikilla reiteillä on toisiinsa sekä suoria että epäsuoria vaikutuksia. Uusimpien tutkimusten mukaan signalointireittien välinen vuorovaikutus saattaa johtaa PI3K-Akt -signaloinnin vapautumiseen, mistä on seurauksena syövän kehittyminen (Cully ym., 2006).

Aktiivisessa muodossaan fosfatidyyli-inositoli-3-kinaasi (PI3K) koostuu säätelevästä alayksiköstä p85 sekä katalyyttisestä alayksiköstä p110. PI3K:n aktivoiduttua se fosforyloi fosfatidyyli-inositoli-4,5-bisfosfaattia (PIP_2) toisiolähetti fosfatidyyli-inositoli-3,4,5-trifosfaatiksi (PIP_3). PIP_3 vuorostaan välittää fosfatidyyli-inositoliriippuvaisen kinaasi 1:n (PDK1) ja Akt:n siirtymisen solukalvolle, missä PDK1 fosforyloi ja aktivoi Akt:n (Kuva 1) (Cully ym., 2006). PI3K tuottaa muitakin toisiolähetteinä toimivia ja membraaniin sitoutuvia fosfoinositidejä, PIP_3 on kuitenkin näistä tärkein.

PI3K:ta aktivoituu ainakin kolmen erillisen reitin vaikutuksesta, jotka kaikki alkavat kasvutekijäligandin sitoutumisella tyrosiinikinaasireseptoriin (RTK). Tämä saa aikaan reseptorin dimerisoitumisen ja tyrosiinitähteiden autofosforylaation, mikä mahdollistaa niiden vuorovaikutuksen Src homology 2 (SH2) -domainin sisältävien molekyylien kanssa (Cully ym., 2006). p85:n SH2 -domainit sitoutuvat reseptorien tai niiden substraattien fosforyloituihin tyrosiineihin. Tämä vähentää katalyyttisen alayksikön p110 inhibitiota ja saa aikaan sen siirtymisen solukalvolle. PI3K:n aktiivisuutta lisää edelleen vuorovaikutus p110:n ja GTP:hen sitoutuneen RAS -onkoproteiinin välillä (Bader ym., 2005).

Normaali p110 ei ole onkogeeninen, mutta yksinkertaisten geneettisten muutosten seurauksena sen kasvua rajoittavat funktiot saavat aikaan onkogeenisyyden. p110:n onkogeeninen muoto on läsnä solukalvolla ja sen kinaasiaktiivisuuden taso on korkea (Bader ym., 2005). PI3K:lla, jossa on mutantti p110 alayksikkö, on lisääntynyt *in vitro* lipidikinaasiaktiivisuus verrattuna villityypin PI3K:n kanssa. Molekulaariset mekanismit, joilla nämä mutaatiot lisäävät PI3K -aktiivisuutta, ovat vielä epäselvät (Isakoff ym., 2005).

Mutaatioita PI3K:n säätelyalayksikössä p85 on havaittu transformoituneissa solulinjoissa ja kasvainnäytteissä. p85:n mutanttimuodot saavat aikaan PI3K-Akt:n konstitutiivisen signaloinnin. Mutantin p85:n ekspressoiminen hiiressä aiheuttaa lymfoproliferatiivisen häiriön sekä kiinteitä kasvaimia (Bader ym., 2005).

2.3.3 *PIK3CA*

PIK3CA on onkogeeni, joka koodaa PI3K:n p110α -alayksikköä (Isakoff ym. 2005). Onkogeeni on geeni, jonka normaali aktiivisuus edistää solujen pahanlaatuisia ominaisuuksia. Gain of function -mutaatioiden seurauksena onkogeeneissä esiintyy sopimatonta tai liiallista aktiivisuutta. Toisin kuin tuumorisuppressorigeenit, onkogeenit ovat dominoivia eli vain toisen alleelin vahingoittuminen riittää. *PIK3CA*:n monistumia esiintyy useissa syövissä, mutta rintasyövässä niitä ei ole havaittu. Somaattisia *PIK3CA* -mutaatioita on löydetty muiden syöpien lisäksi myös rintasyövästä. Useissa tutkimuksissa *PIK3CA* -mutaatioita on havaittu 18 - 40 %:ssa rintasyöpänäytteistä. Vaikka *PIK3CA*:sta on löydetty yli 25 eri mutaatiota, niin suurin osa on kohdistunut kahteen hot spot -alueeseen. Näiden mutaatioiden on todettu aiheuttavan lisääntynyttä PI3K -aktiivisuutta ja transformaatiota *in vitro* kanan alkion fibroblasteissa sekä NIH3T3 -soluissa ja niillä saattaa olla myös *in vivo* -vaikutus (Isakoff ym., 2005).

PIK3CA -mutaatioiden yleisyys rintasyövissä osoittaa, että niillä saattaa olla merkittävä rooli rintasyövän patogeneesissä. Isakoff ym. (2005) ovat tutkiessaan *PIK3CA* -mutaatioita ihmisen epiteelisoluissa havainneet, että mutantit PI3K -proteiinit indusoivat Akt:sta riippumattomia signalointireittejä ja saavat aikaan solujen kasvun yhdessä kerroksessa ilman ulkoisia kasvutekijöitä (EGF). Niiden solujen,

jotka ekspressoivat aktivoitua Akt:tä havaittiin kuitenkin tarvitsevan EGF:n kasvaakseen kolmiuloitteisesti. Tämän signalointireitin aktivoituminen PI3K:n tasolla saa siis aikaan riittävän lisääntymissignaalin mahdollistaakseen solujen kasvun yhdessä kerroksessa ilman EGF:ää, mutta signaali ei ole riittävän vahva ylittämään rajoituksia, joita kolmiulotteinen morfogeneesisysteemi asettaa. mTOR -reittiä luultavasti tarvitaan välittämään aktivoituneen PI3K:n indusoima epänormaali morfogeneesi. Tämän perusteella mTOR:n inhiboiminen immunosuppressiivisella sirolimuusilla tai sen analogeilla saattaa olla soveltuva strategia niiden potilaiden hoitamiseen, joilla on *PIK3CA* -mutaatioita.

2.3.4 *PIK3CA* ja *PTEN*

Hyvin vähän on tutkittu sitä, esiintyykö rintasyövässä samoissa kasvaimissa sekä *PIK3CA*:n että *PTEN*:n mutaatioita. Saal ym. (2005) ovat raportoineet, että alentuneen *PTEN* -ekspression ja mutatoituneen *PIK3CA*:n välillä on negatiivinen korrelaatio. Heidän aineistonsa koostui 343:sta levinneisyysasteen II kasvaimesta, joista immunohistokemialla todettiin 55 kpl PTEN -negatiivisiksi. Negatiivisista valittiin 48 näytettä ja lisäksi 109 PTEN -positiivista kasvainta. Korrelaatioanalyysi *PIK3CA* -mutaatioiden ja PTEN -immunohistokemiatulosten välillä osoitti tilastollisesti merkitsevästi, että valtaosa *PIK3CA* -mutaatioista oli niissä kasvaimissa, joissa oli normaali PTEN -ekspressio.

2.4 PTEN:n toimintamekanismit

PTEN todennäköisesti auttaa säätelemään apoptoosia ja kasvua lipidifosfataasiaktiivisuutensa avulla, joka säätelee PIP_3:n tasoa sekä sitä kautta Akt:n aktivaatiota ja apoptoosi- ja anoikisprosesseja. Toisaalta se osallistuu solujen adheesion, migraation, kasvainsolujen invaasion, solun tukirangan organisaation ja MAP -kinaasin aktivaation proteiinityrosiinifosfataasiaktiivisuudellaan, joka kohdistuu FAK:hon ja Shc:hen. Jälkimmäiset vaikutukset saattavat olla oleellisia erityisesti syövän myöhemmässä etenemisessä ja vaiheissa, jotka liittyvät invaasioon ja metastaasiin. Näiden reittien välillä saattaa esiintyä erityyppistä vuorovaikutusta. PTEN:n kyky toimia myös solujen pinnalla erottaa sen muista

tuumorisuppressorigeeneistä kuten p53 tai Rb, jotka tyypillisesti toimivat tumassa (Tamura ym., 1999b).

2.4.1 Lipidifosfataasiaktiivisuus

PTEN:n tuumorisuppressoriominaisuuden saa aikaan sen lipidifosfataasiaktiivisuus. Sporadisissa rintasyöpäsoluissa olevien *PTEN*:n mutaatioiden on osoitettu menettävän kykynsä defosforyloida inositolifosfolipidejä säilyttäen kuitenkin proteiinifosfataasiaktiivisuutensa. Tämä osoittaa, että nimenomaan lipidifosfataasiaktiivisuus on oleellinen tuumorisuppressoriroolille (Myers ym., 1998). PTEN toimii vastakkaisella tavalla PI3K:n kanssa eli se defosforyloi PIP_3:a poistamalla spesifisesti sen D3 -fosfaatin (Di Cristofano & Pandolfi, 2000). PTEN:n tehtävä on pitää PIP_3:n taso matalana ja niissä soluissa, joissa PTEN:n toiminta on häiriintynyt, PIP_3 -pitoisuus kohoaa. Tämä johtaa Akt:n yliaktivoitumiseen, mikä suojaa solua apoptoottisilta ärsykkeiltä. Rintasyöpäsoluissa, jotka yliekspressoivat PTEN:iä seuraa Akt:n inaktivoituminen. Tämän seurauksena indusoituu spesifinen apoptoottinen reitti anoikis, jonka saa alulle solujen irtoaminen soluväliaineesta (Li ym., 1998). Useimpien normaalisolujen on kiinnityttävä solunulkoisiin komponentteihin, jotta ne pystyvät kasvamaan. Malignit solut eivät kuitenkaan tarvitse integriinivälitteistä kontaktia soluväliaineeseen, vaan ne voivat lisääntyä ilman adheesiota (Lu ym., 1999). PTEN:n rooli anoikiksen kontrolloimisessa vaikuttaa olevan erityisen tärkeä, koska *PTEN* -mutaatiot usein liitetään aggressiiviseen metastaattiseen kasvaintyyppiin (Di Cristofano & Pandolfi, 2000). Vastaavasti Akt:n aktiivisuus on koholla *PTEN* -geenimutatoiduissa glioblastoomasoluissa ja hiiren alkion fibroblasteissa (Stambolic ym., 1998).

PIP_3 on solukalvon lipidikaksoiskerroksen komponentti ja sitä esiintyy ainoastaan solujen kalvorakenteissa. Tästä syystä on esitetty, että saavuttaakseen substraattinsa PTEN:n tulisi kohdistua solukalvolle ja solukalvon saavuttamiseksi onkin tunnistettu kaksi mahdollista mekanismia. On osoitettu, että PTEN:n C2-domaini on kalsiumista riippumaton ja kykenee sitoutumaan lipidivesikkeleihin *in vitro*. lisäksi PTEN:n ulommaisin C-terminaalinen osa voi sitoa useita eri proteiineja PDZ-domainien välittämien vuorovaikutusten kautta. Nämä proteiinit ovat osallisena PTEN:n siirtämisessä solukalvolle (Leslie ym., 2001). Kasvaimiin liittyvät mutaatiot C2-

domainin tärkeällä sitoutumisalueella heikentävät tämän domainin kykyä sitoutua fosfolipidivesikkeleihin ja inhiboida solujen lisääntymistä, vaikka näiden solujen PIP_3 -fosfataasiaktiivisuus säilyykin muuttumattomana (Maehama ym., 2004).

2.4.2 Proteiinifosfataasiaktiivisuus

Vaikka lipidifosfataasiaktiivisuus onkin tärkein edellytys PTEN:n tuumorisuppressorifunktiolle, on olemassa todisteita myös sen proteiinifosfataasiaktiivisuuden merkityksestä. PTEN:llä on todettu olevan ainakin kaksi proteiinisubstraattia: FAK (focal adhesion kinase) ja adaptoriproteiini Shc (Maehama ym., 2001). PTEN:n on havaittu inhiboivan integriinivälitteistä solujen leviämistä glioblastoomasoluissa fosforyloimalla FAK:ta. Tämä on todistettu myös lipidifosfataasi-inaktiivisilla soluilla, jotka myös kykenivät estämään solujen leviämisen eli kyse on proteiinifosfataasiaktiivisuuden aikaansaamasta toiminnasta (Kim & Mak, 2006). Lisäksi *PTEN* -mutanttien joiden fosfataasiaktiivisuus on poistettu, on osoitettu menettävän tuumorisuppressoriaktiivisuutensa. Yksi mutantti, G129, jota esiintyy yleisesti Cowdenin syndroomassa ja satunnaisesti sporadisissa rintasyövissä ei omaa lainkaan lipidifosfataasiaktiivisuutta, mutta sen proteiinifosfataasiaktiivisuus on normaali. Tämän mutantin on osoitettu kykenevän estämään integriinivälitteistä solujen migraatiota, leviämistä ja kasvainsolujen invaasiota sekä osoittavan että nämä ominaisuudet olisivat FAK:n defosforylaation seurausta (Liu ym., 2005). PTEN:n proteiinifosfataasiaktiivisen toimintaa on soluissa havaittu keskittyvän tumaan (Chung & Eng, 2005).

2.4.3 PTEN:n toiminta PI3K-Akt -reitin ulkopuolella

PTEN:iä ekspressoituu useissa kasvainsoluissa pääasiassa solulimassa. Vastaavasti normaalisoluissa sitä ekspressoituu sekä solulimassa että tumassa, erilaistuvissa tai lepäävissä soluissa PTEN on keskittynyt tumaan. Kohonneen PTEN -ekspression tumassa on todettu MCF-7 -soluissa liittyvän G_0-G_1 -vaiheeseen ja onkin esitetty, että tumassa oleva PTEN osallistuisi suoraan solusyklin etenemisen säätelyyn. Tumassa olevalla PTEN:llä saattaa siis olla erilaisia kasvua sääteleviä rooleja kuin soluliman PTEN:llä. Glioblastoomasoluilla, jotka eivät ekspressoi lainkaan PTEN:iä, Liu ym. (2005) havaitsivat, että tumassa aikaansaatu PTEN -aktiivisuus kykenee yksin

estämään syöpäsoluille ominaista kiinnittymisestä riippumatonta kasvua (anchorage-independent growth) sekä edesauttamaan solusyklin pysähtymistä G_1 -vaiheeseen Akt:n aktiivisuuden ollessa normaali. Tumassa sijaitsevan PTEN:n aikaansaama kasvun estäminen välittäyy ainakin osittain AMP -aktivoidun proteiinikinaasin (AMPK) fosforyloinnin/aktivoinnin estämisestä, mikä on Akt:stä riippumatonta. Myös toimiva lipidifosfataasidomaini on välttämätön tuman PTEN:lle, jotta se voi täydellisesti toimia solujen kasvua estävästi. Liu ym. (2005) ehdottavat, että sytoplasman PTEN:n vaikutus tapahtuu PI3K-Akt -reitin kautta, mutta tuman PTEN toimii lisäksi Akt:sta riippumattomalla tavalla tuumorisuppressiivisesti. Tuman PTEN:n on osoitettu estävän mTOR:n ja p70S6K:n aktiivisuutta Akt:stä riippumattomasti ja aktivoidulla AMPK:lla saattaa olla oleellinen osa mTOR:n vaikutuksen estämisessä. Se ei kuitenkaan poista muiden Akt:stä riippumattomien signalointireittien merkitystä.

2.5 PTEN:n merkitys soluissa

PTEN -ekspression vaikutusten on havaittu vaihtelevan eri olosuhteissa. PTEN:n vaikutukseen PI3K -signalointikaskadiin vaikuttaa solun ulkoinen ympäristö ja riippuen altistuksesta kasvutekijöille ja muille eksogeenisille ärsykkeille PTEN voi saada aikaan joko solusyklin pysähtymisen, apoptoosin tai anoikiksen rintasyöpäsoluissa (Mills ym., 2003).

2.5.1 Solujen kasvu ja solusykli

PTEN:n osuutta solujen kasvun säätelyssä on tutkittu solulinjoissa ja hiiren alkioissa. Kun PTEN:iä on ekspressoitu mutatoiduissa glioomasoluissa, sen on havaittu estävän solujen kasvua. Vastaavanlaista tuumorisuppressiivista vaikutusta on raportoitu myös alkion kantasoluissa. $PTEN^{-/-}$ hiiren alkioissa esiintyy huomattavaa solujen lisääntymistä, mutta alkiot kuolevat varhaisessa vaiheessa (Tamura ym., 1999). PTEN:llä on vielä osittain epäselvä merkitys sikiönkehityksessä. On esitetty, että sitä tarvittaisiin endodermin, mesodermin ja ektodermin erilaistumiseen (Di Cristofani ym., 1998). Toinen ehdotus on, että sitä tarvitaan sikiön kefaalisen ja kaudaaliseen alueiden oikeaan asettumiseen sekä istukan kehittymiseen (Suzuki ym., 1998). Nämä

molemmat mallit kuitenkin osoittavat, että PTEN:n tehtävä normaalikudoksessa saattaisi olla solujen välisten vuorovaikutusten kehittymisen ohjaaminen siten, että solut, kudokset ja elimet muodostuvat oikein suhteessa toisiinsa (Tamura ym., 1999). PTEN voi toimia kahdessa vaiheessa solujen kasvua estävästi, vaikuttaen FAK:hon, joka säätelee PI3K -aktiivisuutta tai suoraan PIP_3 substraattinaan (Li ym., 1998).

PTEN:n mutaatiot voivat vaikuttaa maligniteettiin myös muuttuneen proteiinien synteesin säätelyn ja solun ravinteiden kulutuksen kautta. *Drosophila melanogaster*illa tehdyt tutkimukset osoittavat, että PTEN inhiboi mTOR:ia, mikä johtaa muuntuneeseen proteiinien translaatioon ja aminohappojen kulutukseen. Tämä taas saa aikaan huomattavaan kasvun sekä yksilön että sen elinten koossa. Viimeaikaiset tutkimukset osoittavat myös, että PTEN:n mutaatiot saataavat vaikuttaa VEGF:n, joka stimuloi verisuonten muodostusta, aktiivisuuteen lisäämällä HIF-1:n (hypoxia-inducible transcription factor 1) aktiivisuutta. HIF-1 puolestaan saa aikaan VEGF:n transkription. Tällöin PTEN:n puuttumisen aiheuttama yhdistelmä lisääntynyttä metaboliaa ja angiogeneesiä saattaa edistää kasvainsolujen kasvua ja metastaasia (Sansal & Sellers, 2004).

PTEN$^{-/-}$ hiiren alkion kantasoluissa on havaittu pieni lyheneminen (5-10 %) solusyklin pituudessa (Sun ym., 1999). Normaalin *PTEN* - ekspression palauttaminen *PTEN*$^{-/-}$ -soluihin on saanut useissa glioomasolulinjoissa aikaan solusylkin pysähtymisen G_1 -vaiheeseen 24 h infektion jälkeen (Weng ym., 1999).

2.5.2 Solujen adheesio ja migraatio

Koska PTEN:n puuttumista on havaittu usein loppuvaiheen metastaattisissa kasvaimissa, on oletettu että sillä voisi olla tehtävä solujen adheesion ja migraation säätelyssä. PTEN estää selektiivisesti integriini- ja kasvutekijävälitteistä ERK -tyypin MAP – kinaasireitin aktivaatiota. Sillä ei kuitenkaan ole vaikutusta basaaliseen MAP -kinaasiaktiivisuuteen ilman ärsykettä. PTEN inhiboi myös Shc:n fosforylaatiota ja Ras -aktiivisuutta, jotka johtavat MAP -kinaasin inhibitioon. MAP -kinaasireitin lisäksi solujen liikkumista säätelee FAK, jonka fosforylaatiossa on havaittu huomattava aleneminen soluissa, joissa on *PTEN* -yliekspressio. Tämä johtaa solujen leviämisen, migraation solunulkoisen matriksin proteiineissa ja invaasion estoon

(Maehama ym., 2001). FAK:n yliekspressio voi estää PTEN:n biologisia vaikutuksia solun migraatioon ja invaasioon (Gu ym., 1999).

2.5.3 Ohjelmoitu solukuolema

PTEN:n yliekspressio saa aikaan apoptoosin monissa eri solutyypeissä ja hiiren alkion fibroblastit joista puuttuu PTEN -ekspressio, ovat resistenttejä monille eri apoptoottisille ärsykkeille (Maehama ym., 2001). PTEN:n kyky edistää apoptoottista vastetta saattaa liittyä toimintoihin, joilla PTEN pysäyttää solusyklin ja sitä saattaa välittää useampi kuin yksi mekanismi. Vaikutuksillaan Akt:hen PTEN voi saada aikaan proapoptoottisten molekyylien kuten Fas:n ja Bim:n aktivoitumisen kun se samalla edistää antiapotoottisten molekyylien kuten bcl-2 -perheen jäsenen Bad ja XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) inaktivaatiota (Kishimoto ym., 2003).

PTEN:llä on myös merkittävä rooli siinä, että se saa aikaan anoikiksen soluissa, jotka menettävät kontaktin solunulkoisen matriksin kanssa. Kun PTEN -ekspressio palautetaan PTEN -negatiivisiin soluihin, se säätelee negatiivisesti FAK:ta minkä seurauksena solu kykenee anoikikseen (Maehama ym., 2001).

2.5.4 Solutyyppikohtaiset erot

PTEN -ekspression palauttamisen eri kasvainsolulinjoihin on havaittu johtavan joko solusykslin pysähtymiseen (glioblastooma, munuaissyöpä) tai apoptoosiin (eturauhassyöpä). Tähän on esitetty eri syitä. Tuumorisuppressiivisuuden seuraukset saattavat johtua täysin solutyypistä tai vaihtoehtoisesti muut onkogeeniset reitit voivat vaikuttaa PTEN:n käyttäytymiseen (Di Cristofano & Pandolfi, 2000). PTEN:n yliekspression vaikutusten on osoitettu vaihtelevan eri aikaan eri kasvatusolosuhteissa (Lu ym., 1999, Weng ym., 1999) ja että suoran ulkoisen apoptoottisen ärsykkeen puuttuessa PTEN saa aikaan solusyklin pysähtymisen G_1 -vaiheeseen (Di Cristofano & Pandolfi, 2000).

2.6 PTEN:n merkitys syövän lääkehoidossa

PTEN:n puuttuminen näyttää saavan solut sensitiiviseksi sirolimuusille (Crowder & Ellis, 2005). Solulinjat ja ksenografitit joista PTEN puuttuu täysin, vaikuttavat olevan valikoivasti herkkiä sirolimuusille ja sen analogille CCI-779:lle minkä perusteella on mahdollista, että sen kaltaisilla yhdisteillä saattaisi olla terapeuttista merkitystä potilaille joiden kasvaimista puuttuu PTEN -ekspressio. Faasin I kokeissa CCI-779:lle on havaittu vaste metastaattisessa rintasyövässä ja faasin II kokeissa havaittiin metastaattisen taudin vakiintuminen tai osittainen vaste vähintään kolmen kuukauden ajan 20 %:lla potilaista (Sansal & Sellers, 2004). DeGraffenried ym tutkivat kolmen eri solulinjan herkkyyttä sirolimuusille ja PI3K -inhibiittorille LY294002:lle ja he havaitsivat että alentunut PTEN -ekspressio lisää herkkyyttä näiden kahden lääkeaineen solujen kasvua estävälle vaikutukselle (DeGraffenried ym., 2004).

PTEN -ekspression puuttuminen saa solulinjoissa aikaan myös resistenssiä tietyille lääkkeille, esimerkiksi gefinitibille ja vaste on havaittu kun PTEN:n toiminta on palautunut normaaliksi (Sansal & Sellers, 2004). Solujen, joissa PTEN -taso on alentunut, on havaittu olevan resistentimpiä kemoterapeuttisille aineille kuin normaalisti PTEN:iä ekspressoivien solujen. Shoman ym. (2005) ovat myös havainneet rintasyöpäpotilailla, joita hoidettiin antiestrogeeni tamoksifeenilla merkittävän yhteyden alentuneen PTEN -ekspression ja lyhyemmän elinajan välillä verrattuna potilaisiin, joilla on normaali PTEN -ekspressio.

2.7 PTEN -ekspression säätely

Useissa tutkimuksissa on tullut esiin, että PTEN:iä säädellään transkriptiotasolla eli vaikuttamalla sen ekspressiotasoon, solunsisäisellä kuljetuksella sekä post-translationaalisella modifikaatiolla kuten fosforyloimalla (Maehama ym., 2004).

PTEN:n ekspressiota säätelevät transkriptiotasolla useat eri transkriptiofaktorit, mm. p53 (Leslie & Downes, 2004). PTEN säätelee itseään siten, että se lisää p53 -proteiinin tasoa suoraan pidentämällä sen puoliintumisaikaa. Tämä autoregulatorinen rooli edellyttää PTEN:n ja p53:n fyysistä interaktiota, mikä ei ole riippuvainen

PTEN:n fosfataasiaktiivisuudesta (Tang & Eng, 2006). Sporadisissa rintasyövissä saattaa olla normaali *PTEN* -geeni, mutta alentunut PTEN -immunoreaktiivisuus. Tämä havainto osoittaa, että normaalin *PTEN* -geenin tai sen proteiinituotteen dysregulaatio voi poistaa PTEN:n toiminnan ja johtaa syövän kehittymiseen. Transkriptionaalisen säätelyn lisäksi normaalin PTEN -proteiinin toimintaa voivat muokata myös proteiinien väliset vuorovaikutukset, fosforylaatio ja muut epigeneettiset tekijät (Leslie & Downes, 2004). Yksi merkittävimmistä edistysaskeleista PTEN:n säätelyn tutkimisessa oli havainto fosforyloinnista C-terminaalisella alueella (Tang & Eng 2006). PTEN:n C-terminaalinen osa on kriittinen sen tuumorisuppressoriaktiivisuudelle ja se sisältää mahdollisia fosforylointikohtia, joilla todennäköisesti on merkitystä PTEN:n säätelyssä. Aminohapot Ser380, Thr382 ja Thr383 ovat kaseiinikinaasi II:n (CK2) fosforylointisubstraatteja. CK2:n välittämä näiden aminohappojen fosforylaatio vähentää PTEN:n katalyyttisen ja C2-domainin affiniteettia solukalvolle siten alentaen PTEN:n aktiivisuutta (Leslie & Downes, 2004).

CK2 -välitteisen PTEN:n fosforylaation inhiboiminen johtaa lisääntyneeseen PTEN -aktiivisuuteen ja vastaavaan alentumiseen Akt:n aktiivisuudessa. Tämä fosforyloimattoman PTEN:n aktivaatio saattaa johtua konformaation muutoksesta, joka avaa sen PDZ:aa sitovat kohdat. Näiden kohtien olemassaolo PTEN:ssä mahdollistaa vuorovaikutuksen PDZ:n sisältävien proteiinien kuten MAGI-2:n (membrane-associated guanylate kinase inverted-2) kanssa, sekä sellaisten aktiivisten kompleksien muodostamisen, jotka voivat alentaa Akt-aktiivisuutta (Leslie & Downes, 2004). MAGI-2:n yliekspression on osoitettu palauttavan PTEN:n stabiilisuuden soluissa, joissa on normaali PTEN mRNA -taso mutta alentunut proteiinin määrä. Muita PTEN:n kanssa vuorovaikutuksessa toimivia PDZ:n sisältäviä proteiineja ovat MAGI-3, hDLG ja hMAST (microtubule-associated serine-threonine kinase), jotka kaikki voivat sitoutua PTEN:iin ja vaikuttaa sen stabiilisuuteen C-terminaalisen osan fosforylaatiolla (Leslie & Downes, 2004, Valiente ym., 2005).

PTEN:n promoottorin toimintaa ja mRNA -ekspressiota todennäköisesti säätelee useampi kuin yksi transkriptiotekijä. Esimerkiksi genomisen *PTEN*:n promoottorisekvenssissä on runsaasti G -ja C -emäksiä sisältävä 5' transloimaton alue, joka voidaan aktivoida Sp1 -transkriptiofaktorilla ja saada aikaan

konstitutiivinen PTEN -ekspressio (Han ym., 2003). Toinen transkriptiofaktori Egr-1 (early growth response-1) sitoutuu *PTEN*:n transloimattomalle alueelle säteilyindusoidun signaloinnin aikana. *PTEN*:n promoottorialueella on myös sitoutumiskohta toisellekin säteilyherkälle transkriptiofaktorille p53:lle, jonka on osoitettu kohottavan sekä PTEN mRNA:n että proteiinin tasoja. NF-κB lisää *PTEN*:n ekspressiota solujen erilaistumisen aikana, mutta vähentää *PTEN*:n transkriptiota soluissa, jotka vastaavat apoptoottiseen ärsykkeeseen, mistä voi päätellä että NF-κB -indusoitu *PTEN*:n transkriptoituminen saattaa riippua solukontekstista. Ligaasiaktivoitu tumareseptori PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor) on mukana anti-inflammatorisessa vasteessa, jonka arvellaan välittyvän transkriptionaalisesti kontrolloidun *PTEN*:n aktivoimisen kautta (Leslie & Downes, 2004).

2.8 *PTEN*:n mutaatiot rintasyövässä

Tuumorisuppressorigeenit ovat resessiivisiä ja niiden geneettisen inaktivaation two hit -mallin mukaan inaktivaatio vaatii erilliset molempiin alleeleihin kohdistuvat tapahtumat. Usein toinen tapahtuma on kromosomimuutos ja toinen on pienempi mutaatio (Singh ym., 1998).

PTEN:n mutaatioiden ja proteiinin ekspression vähenemisen yleisyys primaarisissa sporadisissa rintasyövissä on edelleen epäselvä. Arviot mutaatioiden ja toiminnan menetysten määrästä vaihtelevat 1 ja 48 %:n välillä. Tulokset ovat peräisin immunohistokemiallisista ja mutaatioanalyysitutkimuksista (Panigrahi ym., 2004). LOH:ia 10q23 -alueella on löydetty 29–48%:ssa sporadisista rintasyövistä (Stingh ym., 1998, Garcia ym., 1999).

2.8.1 *PTEN*:n deleetiot

Kun toista tuumorisuppressorigeenin alleeleista kohtaa somaattinen tai perinnöllinen mutaatio, toisen alleelin menetys johtaa selektiiviseen lisääntymis- tai eloonjäämisetuun, joka johtaa maligniin transformaatioon. Toisen alleelin menetys johtuu usein suuren kromosomaalisen alueen deleetiosta, mikä johtaa LOH:iin

(Kenemans ym., 2004). LOH:n on todettu olevan yleinen primaarikasvaimissa, mutta molempien alleelien puuttuminen liittyy myöhäisen vaiheen aggressiivisempiin ja usein metastaattisiin kasvaimiin (Di Cristofano & Pandolfi, 2000). Molempien alleelien puuttumisen on myös todettu olevan useammin yhteydessä perinnölliseen kuin spontaaniin rintasyöpään (Eng, 2003). Tutkimuksissa esitetyt arviot täydellisestä PTEN -ekspression puuttumisesta eivät ole korkeita, esimerkiksi Panigrahi ym. (2004) havaitsivat tutkimuksessaan, että PTEN -proteiini puuttui kokonaan 8 %:lla rintasyöpäpotilaista.

2.8.2 Haploinsufficiency

Haploinsufficiency tarkoittaa, että jo yhden alleelin mutaatio tai menetys voi riittää saamaan aikaan solufenotyypin, joka johtaa tuumorigeenisyyteen ilman toisen alleelin inaktivaatiota. Tämä on poikkeuksellista tuumorisuppressorigeeneille, jotka tavallisesti ovat resessiivisiä. Vaihtoehtoisesti haploinsufficiency voi lisätä syöpäriskiä ihmisillä joilla jo on heterotsygoottinen muutos erillisessä tuumorisuppressorigeenissä. Yhden *PTEN* -alleelin inaktivoitumisella on osoitettu olevan huomattava vaikutus solujen eloonjäämiseen ja lisääntymiseen hiirimalleissa (Di Cristofano ym., 1998). Tutkimuksia koskien *PTEN* -haploinsufficiencya rintasyöpäpotilailla ei ole julkaistu.

2.8.3 Mutaatiot

Rintasyövissä on havaittu *PTEN*:n missense- ja frameshift- mutaatioita. Missense-mutaatiot sijaitsevat eksonissa 6, kun taas frameshift -mutaatioita on löydetty eksoneista 3, 7 ja 9 (Ali ym., 1999). Suurin osa *PTEN*:n luonnollisesti tapahtuvista missense -mutaatioista potilasnäytteissä on löydetty fosfataasidomainista (Maehama ym., 2001). C-terminaalista osaa koodaavalta alueelta on löydetty useita nonsensemutaatioita (Tamura ym., 1999). Tämänkaltaiset *PTEN* -mutaatiot ovat kuitenkin rintasyövässä huomattavasti harvinaisempia kuin useissa muissa syövissä

2.8.4 Perinnölliset mutaatiot

Perinnöllisiä *PTEN*:n mutaatioita on löydetty harvinaisissa autosomaalisissa vallitsevasti periytyvissä sairauksissa Cowdenin syndrooma ja Bannayan-Zonana syndrooma. Näille on tyypillistä hamartoomien eli hyperplastisten, epäjärjestäytyneiden ja hyvänlaatuisten kasvaimien kehittyminen (Ali ym., 1999). Hamartoomia esiintyy eri elimissä, mm. rinnassa ja 25–50 %:lle potilaista kehittyykin rintasyöpä (Hanssen ym., 1995, Eng, 1997). Yleisesti *PTEN* -mutaatiot ovat perinnöllisissä rintasyövissä harvinaisia, niitä esiintyy vain 1 %:ssa kaikista perinnöllisistä rintasyövistä (Kenemans ym., 2004).

Cowdenin syndroomassa ja Bannayan-Zonana syndroomassa on löydetty 95 perinnöllistä mutaatiota. Näistä noin puolet on frameshift -mutaatioita ja loput ovat pistemutaatioita. Pistemutaatioista puolet on nonsense -mutaatioita, 24 missense -mutaatioita ja 11 emäskorvautumisia, jotka aiheuttavat silmukoitumismuunnoksia. Suurin osa (75 %) perinnöllisistä mutaatioista johtaa lyhentyneen proteiinin tuottoon. Yli puolet (13) missense -mutaatioista keskittyy fosfataasiydinmotiiviin eksonissa 5. 19 nonsense mutaatioista kohdistuu kolmeen kodoniin eksoneissa 5 ja 7 (Bonneau & Longy, 2000).

Kun hamartoomien ja kasvainten viereisen normaalikudoksen DNA:ta on analysoitu, on havaittu deleetioita normaalissa *PTEN* -alleelissa. Tämä merkitsee sitä, että ekspression menetys on varhainen tapahtuma, joka johtaa kohonneeseen solujen lisääntymiseen, kudosten epäjärjestykseen ja mahdollisuuteen kasvaimen kehittymiselle (Lynch ym., 1997).

2.8.5 Epigeneettiset muutokset

Epigeneettiset muutokset kuuluvat yleisimpiin syövissä tavattaviin molekulaarisiin muutoksiin (Baylin & Herman, 2000). Epigeneettiset muutokset eroavat geneettisistä muutoksista pääasiassa siten, että niitä taaphtuu useammin kuin geneettisiä muutoksia ja niitä esiintyy määritellyllä alueella geeniä (Widschwendter & Jones, 2002). Epigeneettiset muutokset ovat sellaisia muutoksia geenin toiminnassa, jotka eivät muuta DNA -sekvenssiä vaan ne muodostavat ylimääräisen transkriptionaalisen

kontrollin, joka säätelee geenin ekspressiota. Näitä muutoksia ovat esimerkiksi promoottorialueen hypermetylaatio. Garcia ym. tutkivat 90 rintasyöpänäytettä ja normaalikudosnäytettä samoilta potilailta. He havaitsivat hypermetylaatiota 43.ssa syöpänäytteessä, mutta vastaavia muutoksia ei löytynyt yhdestäkään normaalikudosnäytteestä (Garcia ym., 2004).

LOH:n osuuden 10q23:ssa rintasyövissä on todettu olevan suurempi kuin mutaatioiden määrän jäljellejäävässä *PTEN* -alleelissa. Tämän havainnon perusteella on päätelty, että näissä tapauksissa PTEN:n toiminnan menetyksen olisivat saaneet aikaan epigeneettiset muutokset. Vaikka taustalla oleva mekanismi on vielä täysin selvittämättä, on mahdollista että tästä olisi vastuussa PTEN -säätelijän kuten DJ-1:n virheellinen säätely. Primaarisissa rintasyöpänäytteissä DJ-1 ekspressio korreloi positiivisesti fosfo-Akt:n immunoreaktiivisuuden kanssa. *In vitro* DJ-1.n on todettu estävän PTEN:n negatiivista PI3K -säätelyä ja lisäävän Akt -aktiivisuutta (Kim & Mak, 2006).

2.8.6 Silmukoitumismuunnokset

Erilaiset RNA:n prosessointimenetelmät tiedetään elintärkeiksi geenin toiminnan säätelyssä. Sporadisissa syövissä on esitetty useita esimerkkejä vaihteluista mRNA:n prosessoinnissa ja sitä seuraavasta erilaisten silmukoitumismuunnosten ekspressioista. Silmukoitumuskohtamutaatiot saattavat käsittää jopa 22 % kaikista Cowdenin sairauden ja Bannayan-Zonana syndrooman perinnöllisistä PTEN -muutoksista (Agrawal ym., 2005). Kuitenkaan suurimmassa osassa silmukoitumiskohtamutaatioista joita on raportoitu, ei ole voitu osoittaa niiden vaikutusta mRNA:han ja yhdessäkään ei kuvata mutaation biokemiallista seurausta (Eng, 2003). Agrawal ym. (2005) tutkivat 40 Cowdenin sairautta tai Bannayan-Zonana syndroomaa sairastavan potilaan kasvainnäytettä ja löysivät viisi silmukoitumiskohtamutaatiota, joista neljä johti mRNA:n poikkeavaan muokaamiseen. Tutkiessaan näiden näytteiden PTEN -proteiinitasoja he havaitsivat niissä huomattavaa vaihtelua. Riippuen siitä mihin eksoneihin poikkeava prosessointi kohdistui, proteiinitaso oli alentunut vain hiukan tai jopa 80 %:sesti verratuuna normaalikontrolleihin.

Agrawal ja Eng (2006) löysivät tutkimuksessaan kahdeksan uutta PTEN silmukoitumismuunnosta. He havaitsivat myös, että näiden ekspressiot olivat erilaisia sporadisessa rintasyövässä, perinnöllisessä Cowdenin sairaudessa ja normaalikudoksessa. He havaitsivat, että transloituneilla silmukoitumismuunnoksilla oli myös erilaiset vaikutukset riippuen siitä, mihin eksoniin tai samankin eksonin eri kohtiin poikkeuksellinen prosessointi kohdistui. Esimerkiksi mRNA:n eksoniin 5 lisätyt eripituiset intronialueet vaikuttivat huomattavasti translaation seurauksena muodostuneen proteiinin toimintaan. Yksi silmukoitumismuunnoksista toimi kuten normaali PTEN, mutta kaksi muuta toimivat vastakkaisella tavalla lisäämällä sykliini D1:n promoottoriaktiivisuutta mikä edelleen lisää Akt:n aktiivisuutta. *PTEN* silmukoitumismuunnosten yleisyydestä rintasyövässä ei ole tutkimustuloksia.

2.9 *PTEN*:n mutaatioiden vaikutukset

Kun PTEN on deletoitunut, mutatoitunut tai muuten inaktivoitunut, PI3K efektorien aktivaatio saattaa tapahtua ilman ulkoisia ärsykkeitä, mikä mahdollistaa kasvaimen kehittymisen (Cully ym., 2006). PTEN:n toiminnan menetys rintasyövässä johtaa useiden PI3K-Akt -signalointikaskadin komponenttien lisääntyneeseen basaalitason fosforyloimiseen sekä kaskadin ligandi-indusoitujen signaalien keston pitenemiseen (Mills ym., 2003).

Hiirillä kohdennettujen PTEN:n toimintahäiriöiden on todettu vahvistavan PTEN:n toiminnan menetyksen ja tuumorigeenisyyden välistä yhteyttä. Hiiren PTEN -geenin homotsygoottinen deleetio johtaa varhaiseen sikiönkuolemaan. Hiiret, joilla on heterotsygoottinen PTEN -mutaatio, ovat elinkykyisiä mutta niille kehittyy kasvaimia huomattavasti enemmän kuin normaaliyksilöille (Maehama ym., 2001).

Tutkimuksissa, joissa on selvitetty *PTEN* -mutaatioiden yhteyttä rintasyövän taudinkuvaan, on pääsääntöisesti havaittu että alentunut ekspressio liittyy edenneeseen ja metastoituneeseen syöpään. Bose ym. (2002) tutkivat 34 invasiivista kasvainnäytettä immunohistokemiallisesti ja he havaitsivat alentuneen PTEN -ekspression 13 tapauksessa. Eniten alentunutta ekspressiota esiintyi vaiheiden II ja III syövissä ja se oli myös tilastollisesti yhteydessä kasvainten verisuonitukseen. He eivät

kuitenkaan havainneet korrelaatiota muiden ennustetekijöiden tai estrogeeni- ja progesteronireseptoristatuksen kanssa. Singh ym. (1998) havaitsivat LOH:ia yli puolessa niistä kasvaimista, joissa oli imusolmukemetastaaseja. LOH:n on myös todettu olevan tilastollisesti merkitsevästi yhteydessä estrogeenireseptorinegatiivisen rintasyövän kanssa (Bose ym., 1998). Garcia ym (1999). osoittivat merkitsevän korrelaation LOH:n, imusolmukemetastaasien ja histologisen luokituksen välillä. Perren ym. (1999) havaitsivat korrelaation PTEN -ekspression puuttumisen ja negatiivisen ER- ja PR-statuksen välillä. Lee ym. (2004) löysivät tilastollisesti merkitsevän yhteyden alentuneen PTEN -ekspression, imusolmukestatuksen ja kasvaimen luokituksen välillä. Useissa tutkimuksissa on osoitettu, että PTEN -ekspression puuttuminen korreloi kuolleisuuden, imusolmukemetastaasien ja ER -statuksen kanssa (Depowski ym., 2001).

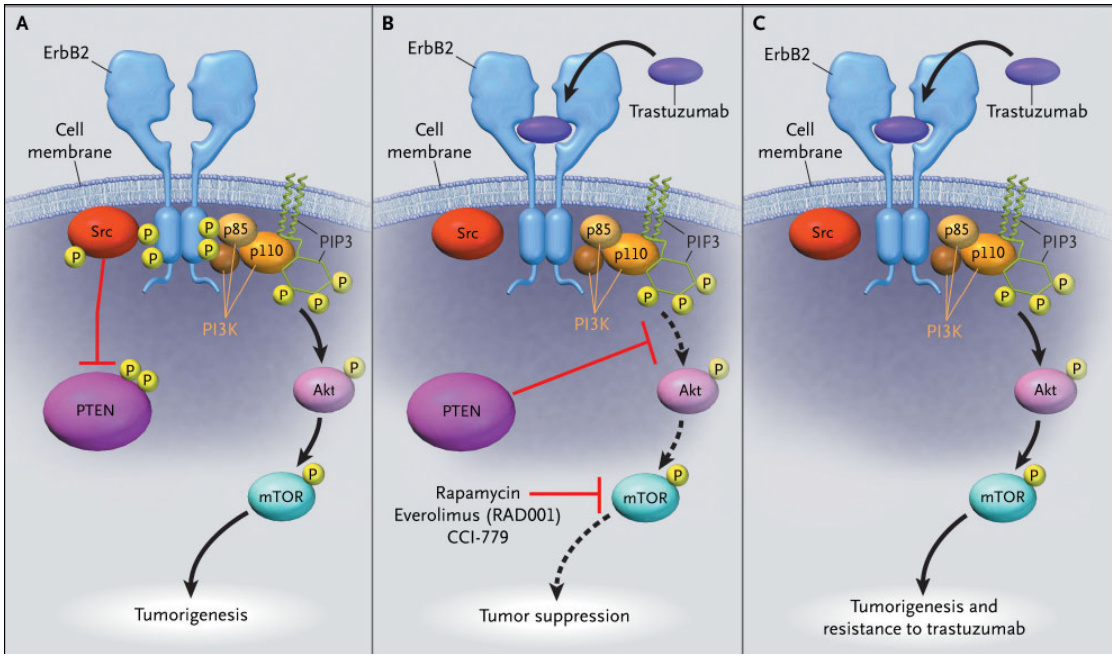
2.10 PTEN ja HER2 rintasyövässä

Aiemmissa tutkimuksissa ei ole havaittu eroa HER2 yliekspression ja alentuneen PTEN -ekspression välillä (Bose ym., 2002, Shoman ym., 2005). Sen sijaan *PTEN*:n promoottorin hypermetylaation ja HER2 -proteiinin yliekspression välillä on havaittu korrelaatio (Garcia ym., 2004).

2.10.1 PTEN ja trastutsumabi

Trastutsumabi vaikuttaa vähentämällä HER2:teen sitoutuvaa PTEN:n tyrosiinikinaasi Src:tä ja näin estää PTEN:n tyrosiinifosforylaatiota. Tämän seurauksena on PTEN:n aktivoituminen. Tämä mekanismi osoittaa toiminnallisen vuorovaikutuksen HER2 -reseptorin ja PTEN:n Src:n kautta rintasyöpäsoluissa tapahtuvan tuumorisuppression välillä. Src:llä on tärkeä onkogeeninen tehtävä (esim. PTEN:n inaktivointi), kun se sitoutuu yliekspressoituneeseen HER2 -reseptoriin ja samalla aktivoituu. Trastutsumabi taas irrottaa Src:n HER2:sta, inhiboi Src:tä ja siten aktivoi PTEN:iä (Kuva 2), joka osallistuu trastutsumabin antituumorivaikutukseen (Nagata ym., 2004). Tämä äskettäin havaittu trastutsumabin toimintamekanismi selkeästi osoittaa, että trastutsumabivaste riippuu sekä HER2:n säätelystä että sen alapuolella olevien HER2:teen liittyvien tapahtumien estämisestä ja lisäksi myös PTEN -statuksesta.

Rintasyöpäsolulinjoilla, hiiriksenografteilla ja kliinisillä näytteillä tehdyt tutkimukset ovat osoittaneet, että PTEN:n vajaus on molekulaarinen mekanismi, joka vaikuttaa HER2 -yliekspressoivien rintasyövän resistenssiin trastutsumabi-pohjaiseen hoitoon sekä että PTEN:n puuttumisen on todettu liittyvän trastutsumabiresistenssiin potilaissa (Vogel ym.,2002).



Kuva 2. **PTEN:n puuttumisen aikaansaama trastutsumabi-resistenssi.** Kuvassa A HER2:n (kuvassa ErbB2) yliekspressio johtaa sen autofosforylaation aiheuttamaan aktivoitumiseen. Tämän seurauksena Src -kinaasi ja Pik3 aktivoituvat ja liittyvät HER2 -reseptoriin. On osoitettu, että aktivoituessaan Src -kinaasi inaktivoi PTEN:iä fosforyloimalla sen C-terminaalista osaa. Kuvassa B trastutsumabi sitoutuessaan HRE2 -reseptoriin saa aikaan Src:n irtoamisen ja inaktivoitumisen. Tämän seurauksena PTEN:n toiminta normalisoituu. Kuvassa C PTEN:n toiminnan heikentyminen tai täydellinen puuttuminen saattaa johtaa trastutsumabi-resistenssiin (Pandolfi ym., 2004).

Nagata ym. (2004) havaitsivat tutkimuksessaan, että HER2 -positiivisten potilaiden trastutsumabivasteissa oli eroja riippuen siitä, oliko PTEN -ekspressio normaali vai alentunut. Trastutsumabiresistensseillä solulinjoilla tehdyt tutkimukset osoittivat huomattavan eron PTEN – aktiivisuudessa resistenttien ja lääkkeelle herkkien solulinjojen välillä. Selektiivinen PTEN:n inhibitio joka liittyy Akt:n aktiivisuuden indusoimiseen, johti huomattavasti alentuneeseen trastutsumabi-herkkyyteen. Myös kliinisissä potilasnäytteissä trastutsumabilla hoidettujen HER2 -yliekspressoivien potilaiden PTEN -ekspressio oli voimakkaasti yhteydessä trastutsumabivasteeseen (Fujita ym. 2006).

2.11 Menetelmät

2.11.1 RNA:n eristäminen parafiininäytteistä

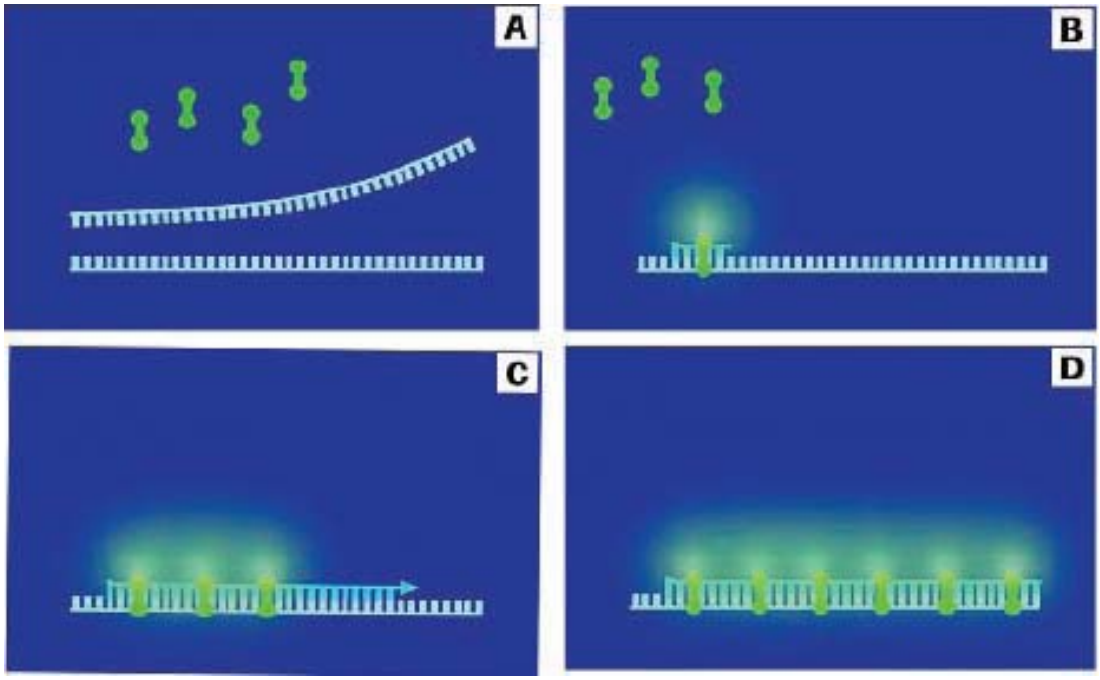
Uusien molekulaaristen menetelmien kuten PCR:n soveltaminen arkistokudosnäytteiden analysoimiseen odotetaan lisäävän syövän taustalla olevien molekulaaristen mekanismien ymmärtämistä. Kuitenkin suurin osa leikkaus- ja ruumiinavausnäytteistä on säilötty formaliinilla kiinnitettyinä ja parafiiniin upotettuina (FFPE) blokkeina pitkiä aikoja ja RNA:n on usein todettu hajoavan tällaisissa olosuhteissa. DNA:n eristäminen kyseisistä näytteistä on hyvin dokumentoitua. Myös RNA:ta on eristetty arkistonäytteistä ja onnistuttu monistamaan tai analysoimaan geeniekspressiota kvantitatiivisesti. RNA:n eristäminen ja sen jatkokäsittely on kuitenkin ongelmallista, koska usein RNA on hajonnut johtuen viiveestä ennen näytteen kiinnitystä, pitkittyneestä kiinnitysvaiheesta tai pitkästä säilytyksestä kiinnityksen jälkeen (Hamatani ym., 2006). Erityisesti formaliinikiinnitysvaihe voi vaihdella hyvinkin paljon eri näytteiden välillä. Tavallinen aika normaalikokoisille rintasyöpänäytteille on noin yksi vuorokausi, mutta suuremmilla näytteillä aika on pitempi. Varsinkin suurikokoisilla näytteillä ongelmaksi muodostuu myös formaliinin epätasainen diffuusio kudoksessa. Näyte on aina pinnalta kiinnittyneempi kuin keskeltä, minkä seurauksena saman näytteen reunalta leikattu leike on erilainen kuin keskiosasta eli näytteiden laaduissa on vaihtelua. Eristystehokkuutta madaltaa myös formaliinikiinnityksen aikaansaama RNA:n (ja DNA:n) sitoutuminen proteiineihin. Eristetyn RNA:n RT -reaktion onnistumista heikentää RNA:n formaliinin aikaansaama muuttuminen (Hamatani ym., 2006).

FFPE on standardiprosessointimenetelmä jota käytetään patologian laboratorioissa ympäri maailmaa, koska siten käsitellyt näytteet ovat stabiileja huoneenlämmössä minkä vuoksi niitä on helppo säilyttää. Ne muodostavatkin laajan arkiston patologisesti hyvin karakterisoituja ja kuvailtuja kliinisiä näytteitä, joista on usein tiedossa hoitovaste ja hoidon lopputulos. Tästä syystä FFPE -näytteet ovat valtava resurssi käytettäväksi erilaisiin retrospektiivisiin ja prospektiivisiin tutkimuksiin (Abramovitz & Leyland-Jones, 2006).

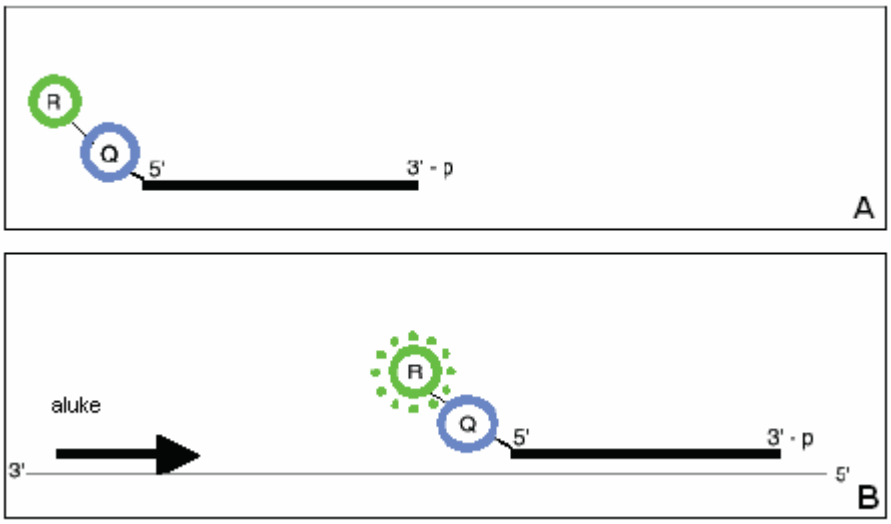
Joidenkin tutkimusten mukaan vain yksi kolmeskymmenesosa FFPE -näytteiden RNA:sta on käyttökelpoista cDNA -synteesiin. Oletettavasti loput RNA:sta on kemiallisesti muuttunut käsittelyjen seurauksena. RNA:n hajoamisen vuoksi ihanteellisena monistettavan kohteen kokona on pidetty ≤100 bp monistettaessa RNA:ta FFPE -näytteistä (Abramovitz & Leyland-Jones, 2006, Hamatani ym., 2006). RT-PCR:llä voidaan analysoida erittäin pieniäkin RNA -fragmentteja, joten se on soveltuva menetelmä tutkittaessa näytteitä joiden RNA on hajonnut jonkin verran tai jopa hyvin paljon, kuten on kyse arkistokudoksissa olevasta RNA:sta (Godfrey ym., 2000). Kun monistettavan alueen koko on hyvin pieni, se kuitenkin usein vaikeuttaa alukkeiden suunnittelua (Hamatani ym., 2006).

2.11.2 Kvantitatiivinen PCR

Perusperiaatteeltaan qPCR (kvantitatiivinen PCR) on samanlainen kuin tavallinen PCR eli reaktiossa monistetaan tiettyä spesifistä DNA -fragmenttia. Tavallisessa PCR:ssä kuitenkin pystytään lähinnä määrittämään ainoastaan onko näytteessä kyseistä fragmenttia ja tarkka kvantitointi on käytännössä mahdotonta. qPCR:ssä PCR -tuotetta ei analysoida geelielektroforeesilla, vaan PCR -laite tunnistaa monistuneet fragmentit. PCR -tuotteiden detektoimiseen käytetään kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvaa fluoresoivaa väriainetta tai sekvenssispesifisiä fluoresoivia koettimia (kuvat 3 ja 4). SYBR Green I on fluoresoiva väriaine, joka sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han eli sen sitoutuessa kaksijuosteiseen monistuneeseen PCR -tuotteeseen syntyy fluoresenssi jonka voimakkuus on verrannollinen DNA:n määrään. Reaktiosyklien edetessä laite mittaa fluoresenssin jokaisen monistussyklin jälkeen. SYBR Green -menetelmä on riippumaton DNA:n sekvenssistä, eli se tunnistaa kaiken kaksijuosteisen DNA:n. Tämä asettaa vaatimuksia alukkeiden suunnittelulle, koska sekä epäspesifinen alukkeiden kiinnittyminen vääriin templaatteihin että aluke-dimeerien muodostuminen tulee minimoida. Monistetun tuotteen spesifisyys voidaan kuitenkin todeta sulamiskäyrän avulla. Reaktion lopussa lämpötilaa nostetaan asteittain ja PCR -tuotteen denaturoituessa havaitaan jyrkkä väheneminen SYBR Greenin fluoresenssissa. Spesifiset tuotteet voidaan erottaa epäspesifistä niiden erilaisten sulamislämpötilojen perusteella (DyNAmo Capillary SYBR Green qPCR Kit, ohjekirja, Finnzymes).



Kuva 3. **SYBR Green -detektiomenetelmä PCR:ssä.** Denaturaatiovaiheen jälkeen reaktiossa oleva DNA on yksijuosteista, jolloin SYBR Green ei sitoudu, eikä fluoresenssia muodostu (kuva A). Annealing-vaiheessa alukkeet hybridisoituvat kohdesekvenssiin. Tällöin muodostuu lyhyitä alueita kaksijuosteista DNA:ta, joihin väriaine sitoutuu ja syntyy fluoresenssia (kuva B). Pidennysvaiheessa alukkeiden perään on muodostunut pidempi sekvenssi, jolloin SYBR Greenia voi sitoutua enemmän (kuva C). Lopuksi koko templaatti on kaksijuosteinen ja maksimimääräväriainetta on sitoutuneena (kuva D) (Technical Note No. LC 18/2004, Roche).



Kuva 4. **Sekvenssispesifinen detektiomenetelmä.** Vapaana liuoksessa olevan koettimen fluoresointi estetään siihen kiinnittyneellä spesifisellä molekyylyiilä (Q) (kuva A). Kun koetin hybridisoituu kohteeseensa, estäminen vähenee ja fluoresoiva aine (R) emittoi vihreää fluoresenssiä PCR -laitteen LED:n vaikutuksesta (Technical Note No. LC 18/2004, Roche).

qPCR:ssä on käytössä kaksi kvantitointimenetelmää, absoluuttinen ja suhteellinen. Absoluuttinen kvantitointi edellyttää, että käytössä on kontrolli, jonka absoluuttinen RNA -konsentraatio on tiedossa. Suhteellisessa kvantitoinnissa näytteiden RNA -tasoja verrataan kalibraattorinäytteen RNA -tasoon. Kalibraattorina voidaan käyttää esimerkiksi kudosta tai solulinjaa, jossa tutkittavan geenin ekspressio on normaali (Bookout & Mangelsdorf, 2003).

Kohdegeenin transkriptin määrä normalisoidaan samassa näytteessä olevan referenssigeenin transkriptin määrällä. Referenssigeenillä normalisoidaan jokaisen näytteen tuottama signaali siten, että näytteiden väliset erot todella johtuvat niiden välisistä biologisista eroista. Usein referenssigeeneinä käytetään nk. housekeeping – geenejä kuten β-aktiini, GAPDH tai 18S rRNA, koska niiden ekspressiotasot ovat lähes vakiot eri soluissa (DyNAmo Capillary SYBR Green qPCR Kit, ohjekirja, Finnzymes).

Tulosten laskemiseen käytetään kunkin näytteen crossing point (Cp) -arvoja (Technical Note No. LC 13/2001, Roche). Crossing point on se PCR -syklien määrä, jossa näyte ylittää detektiokynnyksen eli se on verrannollinen reaktion alussa olevaan templaatti-DNA:n määrään (DyNAmo Capillary SYBR Green qPCR Kit, ohjekirja, Finnzymes). Crossing pointit ovat kunkin reaktion monistustehokkuuden funktioita. Kohde- ja referenssigeenien määrät ovat PCR -tehokkuuden ja näytteiden crossing pointien eli niiden konsentraatioiden funktioita. Tulokset esitetään näytteen kohde/referenssisuhteena, joka on jaettu kalibraattorin kohde/referenssisuhteella. Kalibraattorinäytteen suhteen tehdyssä kvantitaatioanalyysissa tarkkuus riippuu siis kohde- ja referenssigeenien monistumisen erilaisista tehokkuuksista. PCR -tehokkuuksien vaihtelut voidaan kuitenkin korjata oikeiden tuloksien saavuttamiseksi. PCR:n teoreettinen optimitehokkuus on kaksi, mikä tarkoittaa että jokainen PCR -tuote replikoituu joka syklissä. Todellisuudessa tehokkuuteen kuitenkin vaikuttavat monet tekijät kuten templaattikonsentraatio ja reaktion tehokkuus vaihtelee. Eroja tehokkuudessa voivat aiheuttaa mm. vaihtelut alkuperäisen näytteen määrässä ja nukleiinihappojen toimivuudessa, näytteessä olevan RNA:n mahdollinen hajoaminen, erot näytteiden laaduissa, pipetointivirheet sekä vaihtelut cDNA -synteesin tehokkuudessa.

qPCR:ssä monistuminen lasketaan teoreettisesti yhtälöllä:

$\mathbf{N = No \times E^{Cp}}$, jossa

N = molekyylien määrä tietyn syklin aikana
N_0 = molekyylien alkuperäinen lukumäärä
E = monistustehokkuus (optimaalisesti E=2)
Cp = syklien määrä detektiovaiheessa (crossing point)

Käyttämässämme kvantitoinnissa (Rochen RelQuant – ohjelma) tehdään ensin qPCR sekä referenssi- että kohdealukkeille kalibraattorinäytteestä eri laimennoksilla (esim. 1:10 – 1:10 000), joiden avulla ohjelma laskee korjauskertoimen. Korjauskertoimella kompensoidaan vaihtelut PCR -reaktion monistustehokkuudessa.

Varsinainen kvantitointi tapahtuu soveltamalla ΔΔCp -menetelmää:

ΔCp(näyte) =Cp(kohde) - Cp(referenssi)
ΔCp(kalibraattori) = Cp(kohde) - Cp(referenssi)
ΔΔCp määritetään kaavalla:
ΔΔCp = ΔCp(näyte) – ΔCp(kalibraattori)

Kohdegeenin ekspressio normalisoituna referenssigeenillä ja suhteutettuna kalibraattoriin = $2^{-\Delta\Delta Cp}$

Tämä kaava olettaa, että monitustehokkuus on sekä kalibraattorin että näytteen monistusreaktioissa yhtä suuri ja optimaalinen. Koska tilanne ei kuitenkaan ole tämä, suhteellisessa kvantifioinnissa kompensoidaan reaktioiden väliset erot edellä mainitulla korjauskertoimella.

2.11.3 Pseudogeenin merkitys

Tutkittaessa PTEN:n ekspressiota transkriptiotasolla on pseudogeenin olemassaolo huomioitava. Sen monistumista PCR -reaktiossa ei voida estää alukesuunnittelulla, koska pseudogeenista puuttuvat intronit. Kuitenkin cDNA on käyttökelposta PCR -reaktioissa, koska pseudogeeni ei transkriptoidu. Tällöinkin on varmistuttava siitä, että käytettävä mRNA on DNAasi -käsiteltyä, jotta mahdollinen kontaminoiva genominen DNA saadaan poistettua näytteestä.

3. Tutkimuksen tavoitteet

Tutkimuksen tavoitteena oli

1) kehittää kvantitatiivinen PTEN -määritysmenetelmä solulinjoista, jääkudosleikkeistä ja FFPE -leikkeistä eristetylle lähetti-RNA:lle

2) määrittää PTEN -ekspressiotaso rintasyöpäsolulinjoissa sekä HER2 -positiivisissa että HER2-negatiivisissa potilasnäytteissä

4. Materiaalit ja menetelmät

4.1 Näytteet

Näytteinä oli RNA:ta 57 rintasyöpäkasvainjääleikkeestä, 15 FFPE -rintasyöpänäytettä, RNA:ta 7 rintasyöpäsolulinjasta: DU-4475, MDA-157, MDA-361, SKBR-3, UACC-812, ZR-75-30 ja ZR-751 sekä 5 rintasyöpäsolulinjaa: BT-474, EFM-192, JIMT-1, MDA-453 ja UACC-893. Eettisen toimikunnan lupa potilasnäytteiden käyttöön tutkimustarkoituksessa on haettu jo aiemmin.

qPCR:n kalibraattorina käytettiin MCF-7 – rintasyöpäsolulinjasta eristettyä RNA:ta, jonka PTEN -ekspressiotaso tiedettiin kirjallisuuden perusteella normaaliksi (DeGraffenried ym. 2004). Kontrollina qPCR:ssä oli RNA:ta kolmesta eturauhassyöpäsolulinjasta, joiden *PTEN* -geenideleetiot tiedettiin. Solulinjat olivat PC3, jossa on homotsygoottinen *PTEN* -deleetio, LNCap, jossa on yhden alleelin menetys sekä DU145, jossa mahdollisesti on yhden alleelin deleetio (Hermans ym., 2004).

4.2 Soluviljelmät ja reagenssit

Rintasyöpäsolulinjat BT-474, DU-4475, MCF-7, MDA-157, MDA-361, MDA-453, SK-BR-3, UACC-812, UACC-893, ZR-75-1 ja ZR-75-30 olivat peräisin ATCC:sta (American Type Culture Collection) ja EFM-192 -solut DSMZ:sta (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). JIMT-1 on eristetty trastutsumabille resistentistä potilaasta ja kasvatettu Tampereen yliopiston Lääketieteellisen teknologian instituutin Syöpäbiologian tutkimusryhmässä (Tanner ym., 2004). Solulinjojen kasvatusmediumit on kuvattu taulukossa 1.

Taulukko 1. **Solujen kasvatusmediumit**

Solulinja	**Medium**
BT-474, DU-4475, ZR-75-1, ZR-75-30	RPMI 1640, 10% FBS
EFM-192	RPMI 1640, 20% FBS, 2mM L-glutamiini
JIMT-1	DMEM, 7,5% FCS, P/S
MCF-7	EMEM, 10% FBS, NA-pyruvaatti, NEAA, 10 µg/ml insuliinia
MDA-157, MDA-361, MDA-453, UACC-812, UACC-893	L-15, 10% FBS
SK-BR-3	McCoy's 5A, 10% FBS

4.3 FFPE -näytteet

FFPE -näytteet olivat iältään 2-5 vuotta vanhoja. Formaliinikiinnityksen jälkeen näytteet oli pesty PBS:llä 1 h 15 min ja inkuboitu 70 % alkoholissa 1 h 15 min, 96 % alkoholissa 3 x 1h ja ABS alkoholissa 3 x 1h. Tämän jälkeen näytteitä oli inkuboitu ksyleenissä 1 h 15 min ja 1h sekä lopuksi upotettu 60 asteiseen parafiiniin 4 x 1h ajaksi.

4.4 RNA:n eristys ja käänteiskopiointi

Potilasnäytteiden ja solulinjojen RNA DNAasi -käsiteltiin RNase-free DNase Set:llä (QIAGEN), jotta näytteistä saatiin pois mahdollinen genominen DNA -kontaminaatio. Tämän jälkeen RNA puhdistettiin PicoPure RNA Isolation Kit:llä (Arcturus) tai Absolutely RNA Nanoprep Kit:llä (Stratagene). RT -reaktio tehtiin Superscript II Reverse Transcriptase:lla (Invitrogen) käyttäen random hexamer -alukkeita.

Solut trypsinoitiin ja pestiin PBS:llä ennen RNA -eristystä. Eristykseen käytettiin GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit:iä (Sigma). DNAasi -käsittely, RNA:n puhdistus ja RT tehtiin kuten yllä. Näytteiden RNA -pitoisuudet mitattiin NanoDrop ND-1000 -spektrofotometrillä (NanoDrop). FFPE -näytteistä eristettiin RNA PureLink FFPE Total RNA Isolation Kit:llä (Invitrogen), DNAasi -käsittely, RNA:n puhdistus ja RT tehtiin kuten yllä. Kaikkiin RT -reaktioihin käytettiin RNA:ta 0,5-1µg.

4.5 Kvantitatiivinen PCR

QPCR -reaktiot tehtiin LightCycler 2.0 -laitteella (Roche), LightCycler Capillaries 20µl -kapillaareilla (Roche) ja DyNAmo Capillary SYBR Green qPCR Kit:llä (Finnzymes). Alukkeet suunniteltiin PerlPrimer -ohjelmalla (OJ Marshall) siten, että ne ovat eri eksoneissa mikä vähentää mahdollisuutta genomisen DNA:n ja siten PTEN -pseudogeenin monistumiseen. PTEN -alukkeiden sekvenssit olivat forward: 5' ATTGCAGAGTTGCACAATATCC 3' ja reverse: 5' CACATATCATTACACCAGTTCGTC 3'. Referenssigeeninä oli GAPDH – geeni ja sen monistamiseen käytettyjen alukkeiden sekvenssit olivat forward: 5' CTGAGCTAGACGGGAAGCTC 3' ja reverse: 5' TCTGAGTGTGGCAGGGACT 3' (Sillanpää ym., 2004). FFPE -näytteiden GAPDH -geenin monistamiseen käytettiin lyhyempiä PerlPrimerilla suunniteltuja alukkeita, joiden sekvenssit olivat forward: 5' AACCTGCCAAATATGATGAC 3' ja reverse: 5' AATTCGTTGTCATACCAGGA 3'.

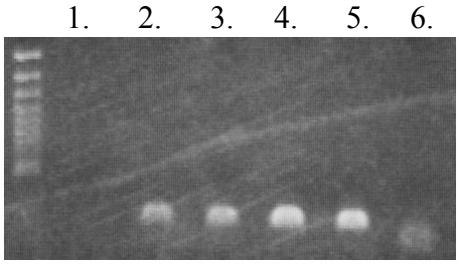
Jokaisessa qPCR -reaktiossa oli 1µl templaattia (potilasnäytteet laimennettiin 1:2, solulinjat 1:50), 0,5 µM molempia alukkeita, 10µl Master Mixiä (sisältää polymeraasin, polymeraasin puskurin, DNTP:t, $MgCl_2$:a, sekä SYBR Green -värin) ja lopputilavuus oli 20 µl. Reaktio-olosuhteet olivat: 95 °C x 15 min (kerran), 95 °C x 15 s, 58 °C x 25 s ja 72 °C x 20 s 40 syklin ajan ja lopuksi sulamiskäyrä. Kvantitointi suoritettiin Relative Quantification (Roche) -ohjelmalla

Alukkeiden spesifisyys tarkistettiin sekä ajamalla PCR -tuote 1,5% geelille että sekvensoimalla PCR -tuotteet. Sekvensointi suoritettiin ABI PRISM 310 genetic Analyzer (Applied Biosystems) -laitteella käyttäen BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit:iä (Applied Biosystems) ja sekvensoinnin tulokset tarkistettiin BLAST -ohjelmalla (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

5. Tulokset

5.1 PTEN -ekspression kvantitatiivinen RT-PCR

Menetelmän spesifisyys osoitettiin MCF-7 -solulinjassa, jossa tunnetusti on normaalit *PTEN* -alleelit. Tuloksena oli PCR -tuote, jonka sulamislämpötila oli 80 °C. Se ajettiin geelille (kuva 5), josta puhdistettu tuote sekvensoitiin ja BLAST -haku tietokannasta osoitti kyseessä olevan PTEN mRNA -sekvenssin. Jatkossa sulamiskäyräanalyyseissa vastaavan sulamislämpötilan omaava reaktiotuote katsottiin spesifiseksi.

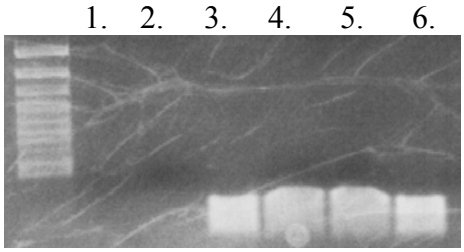


Kuva 5. 1. H_2O, 2. JIMT-1, 3. MCF-7, 4. MDA-361, 5. MDA-361, genominen DNA, 6. H_2O

Eturauhassyöpäsolulinjojen qPCR -tulokset on esitetty taulukossa 2. Näytteet ajettiin myös geelille (kuva 6), puhdistettiin ja sekvensoitiin.

Taulukko 2. **Eturauhassyöpäsolulinjojen qPCR -tulokset**

Solulinja	PTEN -ekspressio
MCF-7	1,00
PC3 (täydellinen deleetio)	0,00
LNCap (yhden alleelin deleetio)	0,08
DU145 (mahdollinen yhden alleelin deleetio)	0,65



Kuva 6. 1. PC3 1:25, 2. PC3 1:50, 3. LNCap 1:25, 4. LNCap 1:50, 5. DU145 1:25, 6. DU145 1:50

5.2 PTEN -ekspressio rintasyöpäpotilaiden jääleikenäytteissä

Potilasnäytteistä ja solulinjoista eristetty RNA analysoitiin kvantitatiivisella PCR:llä. PCR onnistui 45/57 potilasnäytteellä. PTEN ekspressiotasot vaihtelivat 0:sta moninkertaiseen verrattuna MCF-7 -solulinjaan. Kaikkien potilasnäytteiden tulokset on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. **Potilasnäytteiden tulokset**, **MCF-7 = 1,00**

	Näytteet									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
PTEN -ekspressio	0,00	0,01	0,06	0,07	0,08	0,09	0,11	0,12	0,16	0,16
HER2 -status	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos
PIK3CA -mutaatio	neg	neg	neg	neg	pos	pos	*	neg	neg	pos
	11	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**
PTEN -ekspressio	0,19	0,25	0,27	0,32	0,34	0,36	0,41	0,44	0,46	0,65
HER2 -status	neg	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos
PIK3CA -mutaatio	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg
	21	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**	**28**	**29**	**30**
PTEN -ekspressio	0,88	1,04	1,10	1,14	1,24	1,34	1,41	1,55	1,67	1,83
HER2 -status	*	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos
PIK3CA -mutaatio	neg	pos	neg	neg	neg	*	neg	*	pos	neg
	31	**32**	**33**	**34**	**35**	**36**	**37**	**38**	**39**	**40**
PTEN -ekspressio	1,88	1,90	2,22	2,96	3,18	3,52	3,96	7,95	49	58
HER2 -status	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	neg	neg	neg
PIK3CA -mutaatio	pos	neg	neg	*	neg	neg	neg	neg	pos	neg
	41	**42**	**43**	**44**	**45**					
PTEN -ekspressio	1509	4335	6518	2525407	8710768					
HER2 -status	pos	neg	neg	neg	pos					
PIK3CA -mutaatio	neg	neg	neg	neg	neg					

* = ei tiedossa

PTEN -ekspressio oli normaali tai kohonnut 24 näytteessä (53 %), eli PTEN:iä ekspressoitui saman verran tai enemmän kuin MCF-7 soluissa. 19 näytteessä (42 %) PTEN -ekspressio oli alentunut eli korkeintaan puolet MCF-7:n tasosta. Kuudessa näytteessä (13,3 %) PTEN -ekspressiotaso oli sama tai alempi kuin LNCap -soluissa.

44 näytteen HER2 -status oli tiedossa. Näistä 17 oli HER2 -positiivisia ja 27 HER2 -negatiivisia. Tarkasteltaessa erikseen HER2:n suhteen positiivisten ja negatiivisten näytteiden PTEN -ekspressiotasoja havaittiin, että HER2 -positiivisista näytteistä 59

%:ssa ekspressio oli korkeintaan puolet MCF-7:n ekspressiosta, kun HER2 -negatiivisissa näytteissä vastaava osuus oli 37 % (taulukko 4).

Taulukko 4. **HER2 -status ja PTEN -ekspressiotaso potilasnäytteissä**

	PTEN -ekspressiotaso		
	0-0,5	*0,51-1*	*1,01-*
HER2 -positiiviset n (%)	9 (53)	1 (6)	7 (41)
HER2 -negatiiviset n (%)	10 (37)	0 (0)	17 (63)

8:ssa potilasnäytteistä oli gain-of-function -mutaatio *PIK3CA* -geenissä. Näiden näytteiden PTEN -ekspressiotasot vaihtelivat ja pienen näytemäärän vuoksi ei voida tehdä mitään johtopäätöksiä PTEN -ekspressiotason ja *PIK3CA* -mutaation välisestä yhteydestä tässä aineistossa. On kuitenkin huomionarvoista, että aineistossa oli myös sellaisia näytteitä, joissa oli sekä alhainen (alle 10 % normaalista) PTEN -ekspressio että *PIK3CA* -mutaatio.

5.3 PTEN -ekspressio rintasyöpäsolulinjoissa

Solulinjojen PTEN -ekspressiotasot on esitetty taulukossa 5. Kaksi solulinjaa, JIMT-1 ja MDA-361 tiedettiin trastutsumabi – resistenteiksi (Tanner ym., 2004). Molemmissa näissä solulinjoissa oli myös alhainen PTEN -ekspressio. Vastaavasti neljän solulinjan, BT-474, SKBR-3, UACC-812 ja ZR-75-30, tiedettiin olevan herkkiä trastutsumabille (Tanner ym., 2004). Näistä kolmen solulinjan PTEN -ekspressiotaso oli vähintään yhtä korkea kuin MCF-7:n, ainoastaan SKBR-3:n PTEN -ekspressio oli alhainen, noin kolmasosa kalibraattoriin verrattuna.

Taulukko 5. **Solulinjojen qPCR – tulokset, MCF-7 = 1,00**

Solulinja	***PTEN -ekspressiotaso***	***Solulinja***	***PTEN -ekspressiotaso***
JIMT-1	0,00	**MDA-453**	1,06
MDA-361	0,00	**UACC-812**	1,49
EFM-192	0,10	**MDA-157**	2,59
SKBR-3	0,34	**ZR-7530**	3,74
UACC-893	0,34	**BT-474**	4,11
DU-4475	0,50	**ZR-751**	10,99

PIK3CA -mutaatio tiedettiin olevan viidessä solulinjassa (EFM-192, JIMT-1, MDA-361, MDA-453 ja UACC-893). Näiden PTEN -ekspressio havaittiin keskimäärin alhaisemmaksi verrattuna solulinjoihin, joissa mutaatiota ei ole (BT-474, SKBR-3, UACC-812 ja ZR-7530) (p=0,02).

5.4 PTEN -ekspressio rintasyöpäpotilaiden FFPE - näytteissä

RNA eristettiin 15 FFPE -näytteestä. Yhden näytteen kohdalla eristys epäonnistui, joten qPCR:llä analysoitiin 14 näytettä, joista yhdeksästä saatiin monistettua sekä *PTEN*- että *GAPDH* -geenit. Yhdessäkään näytteessä ei todettu alentunutta *PTEN* -ekspressiota. Tulokset on esitetty taulukossa 6.

Taulukko 6. **FFPE -näytteiden qPCR -tulokset**

Näyte	***PTEN - ekspressiotaso***	***Näyte***	***PTEN - ekspressiotaso***
MCF-7	1,00	**5**	21,74
1	1,46	**6**	22,98
2	2,89	**7**	23,53
3	11,08	**8**	44,08
4	11,99	**9**	143,98

6. Pohdinta

PTEN on tuumorisuppressorigeeni, jonka mutaatiot tai deleetiot ovat erittäin yleisiä syövissä. Rintasyövässä kuitenkin mutaatioiden osuuden on todettu olevan pieni, vaikka alentunutta ekspressiota on havaittu useissa tutkimuksissa (Cully ym., 2006, Panigrahi ym., 2004). Muuttuneen ekspression taustalla voi olla geneettisten vaihteluiden lisäksi myös useita muita mekanismeja, kuten muutoksia transkriptiossa tai proteiinin stabiilisuudessa, proteiinin muokkauksessa tai eri proteiinien välisissä vuorovaikutuksissa. Näitä muutoksia ei kuitenkaan havaita DNA:ta analysoimalla vaan on tutkittava geenin ekspressiota RNA- tai proteiinitasolla. Epänormaalin *PTEN*:n toiminnan taustalla olevista mekanismeista tiedetään jonkin verran, mutta niiden määrällistä osuutta ja siten merkitystä ei ole kovinkaan paljon tutkittu. Alentuneen PTEN -tason on todettu olevan yhteydessä sekä huonoon ennusteeseen (Depowski ym., 2001) että mahdollisesti myös trastutsumabiresistenssiin (Nagata ym., 2004).

Tutkimuksen tarkoituksena oli määrittää kvantitatiivisesti PTEN -ekspressiotasoja sekä potilasnäytteistä että rintasyöpäsolulinjoista. Aikaisemmissa tutkimuksissa ekspressiotasoja on määritetty lähinnä immunohistokemiallisesti (Panigrahi ym., 2004). Immunohistokemian tulosten tulkitseminen on kuitenkin subjektiivista ja riippuu mm. käytetystä vasta-aineesta sekä kudosnäytteen käsittelystä. Julkaistuissa töissä on verrattu syöpäsolujen PTEN -värjäytyvyyttä ja positiivisten solujen määrää normaalin rintakudoksen vastaaviin (Lee ym., 2004). Tästä syystä immunohistokemiallisten tutkimusten tulokset eivät useinkaan ole keskenään vertailukelpoisia. Päätimme kehittää PTEN -ekspressiotasojen määrittämiseen kvantitatiivisen RT-PCR -assayn, koska kvantitatiivinen PCR on menetelmänä toistettavampi ja tulokset saadaan ilman subjektiivista arviointia. Käytössä olevat kvantitointimenetelmät mahdollistavat myös näytteiden laadusta ja teknisistä tekijöistä johtuvan vaihtelun hallinnan.

Tulosten perusteella 46 %:ssa potilasnäytteistä oli jonkin verran alentunut PTEN -ekspressio, mikä vastaa kirjallisuudessa proteiiniekspressiolle esitettyjä arvioita (Panigrahi ym., 2004). Näistä näytteistä 29 %:ssa PTEN -taso oli korkeintaan 10 %

kalibraattorinäytteen PTEN -tasoon verrattuna. Vaikka kyseessä olivat kasvainnäytteet, niin niissä on todennäköisesti mukana myös pieniä määriä normaalikudosta. Tällöin nämä hyvin alhaiset PTEN -ekspressiotasot saattavat olla peräisin normaalikudoksesta ja kasvainkudoksessa ei välttämättä lainkaan ekspressoidu PTEN:iä. Tulokset olisivat saattaneet olla erilaisia, mikäli PTEN -ekspressiota olisi määritetty myös proteiinitasolla, koska mRNA -tason analyysissa ei tule esiin proteiinin prosessointiin liittyvät häiriöt.

Kvantitatiivisella PCR:llä analysoitiin myös formaliinilla kiinnitetyistä ja parafiiniin upotetuista rintasyöpänäytteistä eristettyä RNA:ta, joiden PTEN -tasot olivat melko korkeita. Myös jääleikkeissä todettiin osin hyvin korkeita PTEN -ekspressiotasoja. Immunohistokemiallisissa tutkimuksissa ei ole raportoitu vastaavaa, joten erittäin korkeiden ekspressiotasojen merkityksestä ei tiedetä. Mahdollisesti kyseessä voi olla sekundäärinen muutos, jolla yritetään hillitä PI3K-Akt -reitin aktiviteettia.

Sekä *PTEN*- että *GAPDH* -mRNA:n monistaminen epäonnistui 12 jääleikenäytteessä ja 5 FFPE -näytteessä. Jääleikenäytteissä syynä on todennäköisesti epäonnistunut RNA -eristys tai liian pieni RNA -pitoisuus. FFPE -näytteissä RNA saattoi olla liian hajonnutta, käytettyjen alukkeiden monistamat DNA -alueet olivat tällaisille näytteille melko pitkiä, 164 bp ja 201 bp.

Tarkasteltaessa rintasyöpänäytteiden tuloksia havaittiin, että HER2 -positiivisissa näytteissä oli enemmän sellaisia joiden PTEN -taso oli matala kuin HER2 -negatiivisissa. Aikaisemmissa potilasnäytteillä tehdyissä tutkimuksissa näiden ilmiöiden välillä ei ole havaittu yhteyttä. Tulos ei kuitenkaan ole poikkeuksellinen, koska solulinjoilla tehtyjen tutkimusten perusteella Akt – reitti on aktivoitunut HER2 -positiivisissa soluissa (Li ym., 2005, Longva ym., 2005) ja toisaalta tiedetään, että PTEN -aktiivisuuden väheneminen johtaa Akt – reitin aktiivisuuden lisääntymiseen.

Rintasyöpäsolulinjoissa havaittiin, että niissä solulinjoissa joissa tiedettiin olevan *PIK3CA* -mutaatio, myös PTEN -tasot olivat alhaisempia kuin soluissa joissa tätä mutaatiota ei ollut. Tästä aiheesta on olemassa yksi tutkimus, jossa verrattiin PTEN -tasojen ja *PIK3CA* -mutaatioiden välistä yhteyttä rintasyöpänäytteissä ja todettiin, että ne ovat toisensa poissulkevat (Saal ym., 2005). Kohtusyövässä on kuitenkin havaittu

näiden kahden mutaation esiintymistä samoissa näytteissä sekä että *PIK3CA* -mutaatiot olivat yleisempiä niissä tapauksissa joissa oli myös *PTEN* -mutaatio (Oda ym., 2005). Potilasnäytteistä oli *PIK3CA* -mutaatio vain 8 näytteessä, joista puolessa PTEN -ekspressiotaso oli alentunut. Näytemäärä on kuitenkin niin pieni, että tämän tuloksen perusteella ei voi tehdä mitään johtopäätöksiä näiden muutosten esiintymisestä samoissa kasvaimissa.

7. Johtopäätökset

Tässä tutkimuksessa määritettiin kvantitatiivisesti potilasnäytteiden ja rintasyöpäsolulinjojen PTEN -ekspressiotasoja. Tulosten perusteella 42 %:ssa potilasnäytteistä oli alentunut PTEN -ekspressio. Verrattaessa HER2 -positiivisten ja negatiivisten näytteiden PTEN -ekspressiota havaittiin, että HER2 -positiivisista useammassa näytteessä oli alentunut PTEN -ekspressio kuin HER2 -negatiivisissa. Aineistossa oli myös potilasnäytteitä, joissa oli sekä alentunut PTEN -ekspressio että gain-of-function PIK3CA -mutaatio. Rintasyöpäsolulinjojen kohdalla havaittiin, että niissä solulinjoissa joiden PTEN -ekspressio oli normaalia alhaisempi, oli myös *PIK3CA* -mutaatioita ja ne olivat resistenttejä trastutsumabille.

Alentuneen PTEN -ekspression taustalla voi olla hyvin monia eri tekijöitä kuten geenin mutaatiot tai deleetiot, p53:n ekspression aleneminen tai geenin promoottorialueen hypermetylaatio. Jatkossa olisikin tarpeellista tutkia lähemmin näiden osuutta alentuneeseen ekspressioon. Lisäksi tulisi suuremmalla aineistolla selvittää sitä, onko PTEN -ekspression alentuminen yleisempää HER2 -positiivisissa kasvaimissa ja esiintyykö *PIK3CA* -mutaatioita ja alentunutta PTEN -ekspressiota samoissa kasvaimissa.

FFPE -näytteitä on analysoitava enemmän ja niiden tuloksia verrattava vastaavista jääleikenäytteistä saatuihin tuloksiin menetelmän toimivuuden varmistamiseksi. FFPE -aineistosta on tiedossa sekä ck5/14 -status että ennuste, joten niiden avulla voidaan myös tutkia sitä, onko PTEN -ekspressio alentunut basaalityypin kasvaimissa sekä verrata PTEN -ekspressiota ja hoitoennustetta.

Tätä tutkimuslinjaa on tarkoitus jatkaa ja sisällyttää tämän tutkimuksen tulokset vielä tekeillä olevien eksperimenttien lisäksi väitöskirjani toiseen osatyöhön

Lähteet

Abramovitz M, Leyland-Jones B. A systems approach to clinical oncology: Focus on breast cancer. Proteome Sci 2006;4.

Agrawal S, Pilarski S, Eng C. Different splicing defects lead to differential effects downstream of the lipid and protein phosphatase activities of PTEN. Hum Mol Genet 2005;14:2459–2468.

Agrawal S, Eng C. Differential expression of novel naturally occurring splice variants of PTEN and their functional consequences in Cowden syndrome and sporadic breast cancer. Hum Mol Genet 2006;15:777-787.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell, Garland Science, New York, 2002, pp. 880.

Ali IU, Schriml LM, Dean M. Mutational Spectra of PTEN/MMAC1 Gene: a Tumor Suppressor With Lipid Phosphatase Activity. J Natl Cancer Inst 1999;91:1922-1932.

Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. Oncogene 2005;24:7455-7464.

Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. Nat Rev Cancer 2005;5:921-929.

Baylin SB and Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. Trends Genet 2000;16:168-174.

Bonneau D, Longy M. Mutations of the Human PTEN Gene. Hum Mutat 2000;16:109-122.

Bookout AL, Mangelsdorf DJ. Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. Nucl Recept Signal 2003;1.

Bose S, Wang SI, Terry MB, Hibshoosh H, Parson R. Allelic loss of chromosome 10q23 is associated with tumor progression in breast carcinomas. Oncogene 1998;9:123–127.

Bose S, Crane A, Hibshoosh H, Mansukhani M, Sandweis L, Parsons R. Reduced Expression of PTEN Correlates With Breast Cancer Progression. Hum Pathol 2002;33:405-409.

Chung JH, Eng C. Nuclear-Cytoplasmic Partitioning of Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10 (PTEN) Differentially Regulates the Cell Cycle and Apoptosis. Cancer Res 2005;65:8096-8100.

Crowder RJ, Ellis MJ.Treating breast cancer through novel inhibitors of the phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. Breast Cancer Res 2005;7:212-214.

Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. Nat Rev Cancer 2006;6:184-192.

Dahia P LM, FitzGerald MG, Zhang X, Marsh DJ, Zheng Z, Pietsch T, von Deimling A, Haluska FG, Haber DA, En C. A highly conserved processed PTEN pseudogene is located on chromosome band 9p21. Oncogene 1998;16:2403-2406.

DeGraffenried LA, Fulcher L, Friedrichs WE, Grunwald V, Ray RB, Hidalgo M. Reduced PTEN expression in breast cancer cells confers susceptibility to inhibitors of the PI3 kinase/Akt pathway. Ann Oncol 2004;15:1510-1516.

Depowski PL, Rosenthal SI, Ross JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. Mod Pathol 2001;14:672-676.

Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. Nat Genet 1998;19:348-355.

Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. Cell 2000;100:387-390.

Eng C. Cowden syndrome. J Genet Counsel 1997;6:181–91.

Eng C. *PTEN*: one gene, many syndromes. Hum. Mutat 2003;22:183–198.

Fujita T, Doihara H, Kawasaki K, Takabatake D, Takahashi H, Washio K, Tsukuda K, Ogasawara Y, Shimizu N. PTEN activity could be a predictive marker of trastuzumab in the treatment of ErbB2-overexpressing breast cancer. Br J Cancer 2006;94:247 – 252.

Garcia JM, Silva JM, Dominguez G, Gonzalez R, Navarro A, Carretero L, Provencio M, Espana P, Bonilla F. Allelic loss of the PTEN region (10q23) in breast carcinomas of poor pathophenotype. Breast Cancer Res Treat 1999;57:237–243.

Garcia JM, Silva J, Pena C, Garcia V, Rodriguez R, Cruz MA, Cantos B, Provencio M, Espana P, Bonilla F. Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer. Genes Chromosomes Cancer 2004;41:117-124.

Godfrey TE, Kim SH, Chavira M, Ruff DW, Warren RS, Gray JW, Jensen RH. Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. J Mol Diagn 2000;2:84-91.

Gu J, Tamura M, Pankov R, Danen EH, Takino T, Matsumoto K, Yamada KM. Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. J Cell Biol 1999;146:389-403.

Hamatani K, Eguchi H, Takahashi K, Koyama K, Mukai M, Ito R, Taga M, Yasui W, Nakachi K. Improved RT-PCR Amplification for Molecular Analyses with Long-term

Preserved Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue Specimens. J Histochem Cytochem 2006; [Epub ahead of print]

Han B, Dong Z, Liu Y, Chen Q, Hashimoto K, Zhang JT. Regulation of constitutive expression of mouse PTEN by the 50-untranslated region. Oncogene 2003;22:5325–5337.

Hanssen AM, Fryns JP. Cowden syndrome. J Med Genet 1995;32:117–9.

Hermans KG, van Alewijk DC, Veltman JA, van Weerden W, van Kessel AG, Trapman J. Loss of a small region around the PTEN locus is a major chromosome 10 alteration in prostate cancer xenografts and cell lines. Genes Chromosomes Cancer 2004;39:171-184.

Isakoff SJ, Engelman JA, Irie HY, Luo J, Brachmann SM, Pearline RV, Cantley LC, Brugge JS. Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells. Cancer Res 2005;65:10992-11000.

Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, Utriainen T, Kokko R, Hemminki A, Tarkkanen M, Turpeenniemi-Hujanen T, Jyrkkiö S, Flander M, Helle L, Ingalsuo S, Johansson K, Jääskeläinen AS, Pajunen M, Rauhala M, Kaleva-Kerola J, Salminen T, Leinonen M, Elomaa I, Isola J. Adjuvant Docetaxel or Vinorelbine with or without Trastuzumab for Breast Cancer. N Engl J Med 2006;354:809-820.

Kenemans P, Verstraeten RA, Verheijen RHM. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. Maturitas 2004;49:34–43.

Kim RH, Mak TW. Tumours and tremors: how PTEN regulation underlies both. Br J Cancer 2006;94:620 – 624.

Kishimoto H, Hamada K, Saunders M, Backman S, Sasaki T, Nakano T, Mak TW, Suzuki A. Physiological functions of Pten in mouse tissues. Cell Struct Funct 2003;1:11-21.

Lee JS, Kim HS, Kim YB, Lee MC, Park CS, Min KW. Reduced PTEN expression is associated with poor outcome and angiogenesis in invasive ductal carcinoma of the breast. Appl Immunohiostochem Mol Morphol 2004;12:205-210.

Leslie NR, Bennett D, Gray A, Pass I, Hoang-Xuan K, Downes CP. Targeting mutants of PTEN reveal distinct subsets of tumour suppressor functions. Biochem J 2001;357:427-435.

Leslie NR, Downes CP. PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. Biochem J 2004;382:1–11.

Li J, Simpson L, Takahashi M, Miliaresis C, Myers MP, Tonks N, Parsons R. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor induces cell death that is rescued by the AKT/protein kinase B oncogene. Cancer Res 1998;58:5667-5672.

Liu JL, Sheng X, Hortobagyi ZK, Mao Z, Gallick GE, Yung WK.Nuclear PTEN-mediated growth suppression is independent of Akt down-regulation. Mol Cell Biol 2005;25:6211-24.

Longva KE, Pedersen NM, Haslekas C, Stang E, Madshus IH. Herceptin-induced inhibition of ErbB2 signaling involves reduced phosphorylation of Akt but not endocytic down-regulation of ErbB2. Int J Cancer 2005;116:359-67.

Lu Y, Lin YZ, LaPushin R, Cuevas B, Fang X, Yu SX, Davies MA, Khan H, Furui T, Mao M, Zinner R, Hung MC, Steck P, Siminovitch K, Mills GB. The PTEN/MMAC1/TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells. Oncogene 1999;18:7034-7045.

Lynch ED, Ostermeyer EA, Lee MK, Arena JF, Ji H, Dann J, Swisshelm K, Suchard D, Macleod PM, Kvinnsland S, Gjertsen BT, Heimdal K, Lubs H, Moller P, King MC. Inherited mutations in PTEN that are associated with breast cancer, cowden disease, and juvenile polyposis. Am J Hum Genet 1997;61:1254–60.

Maehama T, Taylor GS, Dixon JE. PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. Annu Rev Biochem 2001;70:247–279.

Maehama T, Okahara F, Kanaho Y. The tumour suppressor PTEN: involvement of a tumour suppressor candidate protein in PTEN turnover. Biochem Soc Trans 2004;32:343-347.

Mills GB, Kohn E, Lu Y, Eder A, Fang X, Wang H, Bast RC, Gray J, Jaffe R, Hortobagyi G. Linking molecular diagnostics to molecular therapeutics: targeting the PI3K pathway in breast cancer. Semin Oncol 2003;30:93-104.

Myers MP, Pass I, Batty IH, Van der Kaay J, Stolarov JP, Hemmings BA, Wigler MH, Downes CP, Tonks NK. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor supressor function. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:13513-13518.

Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, Klos KS, Li P, Monia BP, Nguyen NT, Hortobagyi GN, Hung MC, Yu D. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients Cancer Cell 2004;6:117-127.

Nahta R, Yu D, Hung MC, Hortobagyi GN, Esteva FJ. Mechanisms of Disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. Nat Clin Pract Oncol 2006; 3:269-280.

Ocaña A, Cruz JJ, Pandiella A. Trastuzumab and Antiestrogen Therapy Focus on Mechanisms of Action and Resistance. Am J Clin Oncol 2006;29: 90–95.

Pandolfi PP. Breast cancer--loss of PTEN predicts resistance to treatment. N Engl J Med 2004;351:2337-2338.

Perren A, Weng LP, Boag AH, Ziebold U, Thakore K, Dahia PL, Komminoth P, Lees JA, Mulligan LM, Mutter GL, Eng C. Immunohistochemical evidence of loss of

PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. Am J Pathol 1999;155:1253-1260.

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Láng I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Rüschoff J, Süto T, Greatorex V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. N Engl J Med 2005;353:1659-1672.

Romond EH, Perez, EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE, Tan-Chiu E, Silnvana M, Soonmyung P, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N. Trastuzumab plus Adjuvant Chemotherapy for Operable HER2-Positive Breast Cancer. N Engl J Med 2005;353:1673-1684.

Saal LH, Holm K, Maurer M, memeo L, Su T, Wang X, Yu JS, Malmstrom PO, Mansukhani M, Enoksson J, Hibsoosh H, Borg A, Parsons R. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. Cancer Res 2005;65:2554-2559.

Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. J Clin Oncol 2004;22: 2954–2963.

Shoman N, Klassen S, McFadden A, Bickis MG, Torlakovic E, Chibbar R. Reduced PTEN expression predicts relapse in patients with breast carcinoma treated by tamoxifen. Mod Pathol 2005;18:250-259.

Sillanpää N, Magureanu GG, Murumägi A, Reinikainen A, West A, Manninen A, Lahti M, Ranki A, Saksela K, Krohn K, Lahesmaa R, Peterson P. Autoimmune regulator induced changes in the gene expression profile of human monocyte-dendritic cell-lineage. Molecular Immunology 2004;41:1185–1198.

Singh B, Ittmann MM, Krolewski JJ. Sporadic Breast Cancers Exhibit Loss of Heterozygosity on Chromosome Segment 10q23 Close to the Cowden Disease Locus. Genes Chromosomes Cancer 1998;21:166-171.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl J Med 2001;344:783-92.

Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. Cell 1998;95:29-39.

Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J, Gavrilova N, Mueller B, Liu X, Wu H. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating

phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:6199-6204.

Suzuki A, de la Pompa JL, Stambolic V, Elia AJ, Sasaki T, del Barco Barrantes I, Ho A, Wakeham A, Itie A, Khoo W, Fukumoto M, Mak TW. High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. Curr Biol 1998;8:1169-1178.

Tamura M, Gu J, Tran H, Yamada KM. PTEN Gene and Integrin Signaling in Cancer. J Natl Cancer Inst 1999;91:1820-1828.

Tamura M, Gu J, Takino T, Yamada KM. Tumor Suppressor PTEN Inhibition of Cell Invasion, Migration, and Growth: Differential Involvement of Focal Adhesion Kinase and p130Cas. Cancer Res 1999;59:442-449.

Tang Y, Eng C. PTEN autoregulates its expression by stabilization of p53 in a phosphatase-independent manner. Cancer Res 2006;66:736-742.

Tanner M, Kapanen AI, Junttila T, Raheem O, Grenman S, Elo J, Elenius K, Isola J. Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. Mol Cancer Ther 2004;3:1585-1592.

Valiente M, Andres-Ponds A, Gomar B, Torres J, Gil A, Tapparel C, Antonarakis SE, Pulido R. Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases. J Biol Chem 2005;280:28936-28943.

Vanin EF. Processed pseudogenes: characteristics and evolution. Annu Rev Genet 1985;19:253-272.

Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. J Clin Oncol 2002;20:719-726.

Weng LP, Smith WM, Dahia PL, Ziebold U, Gil E, Lees JA, Eng C. PTEN suppresses breast cancer cell growth by phosphatase activity-dependent G1 arrest followed by cell death. Cancer Res 1999;59:5808-5814.

Widschwendter M, Jones PA. The potential prognostic, predictive, and therapeutic values of DNA methylation in cancer. Cli Cancer Res 2002;8:188-191.