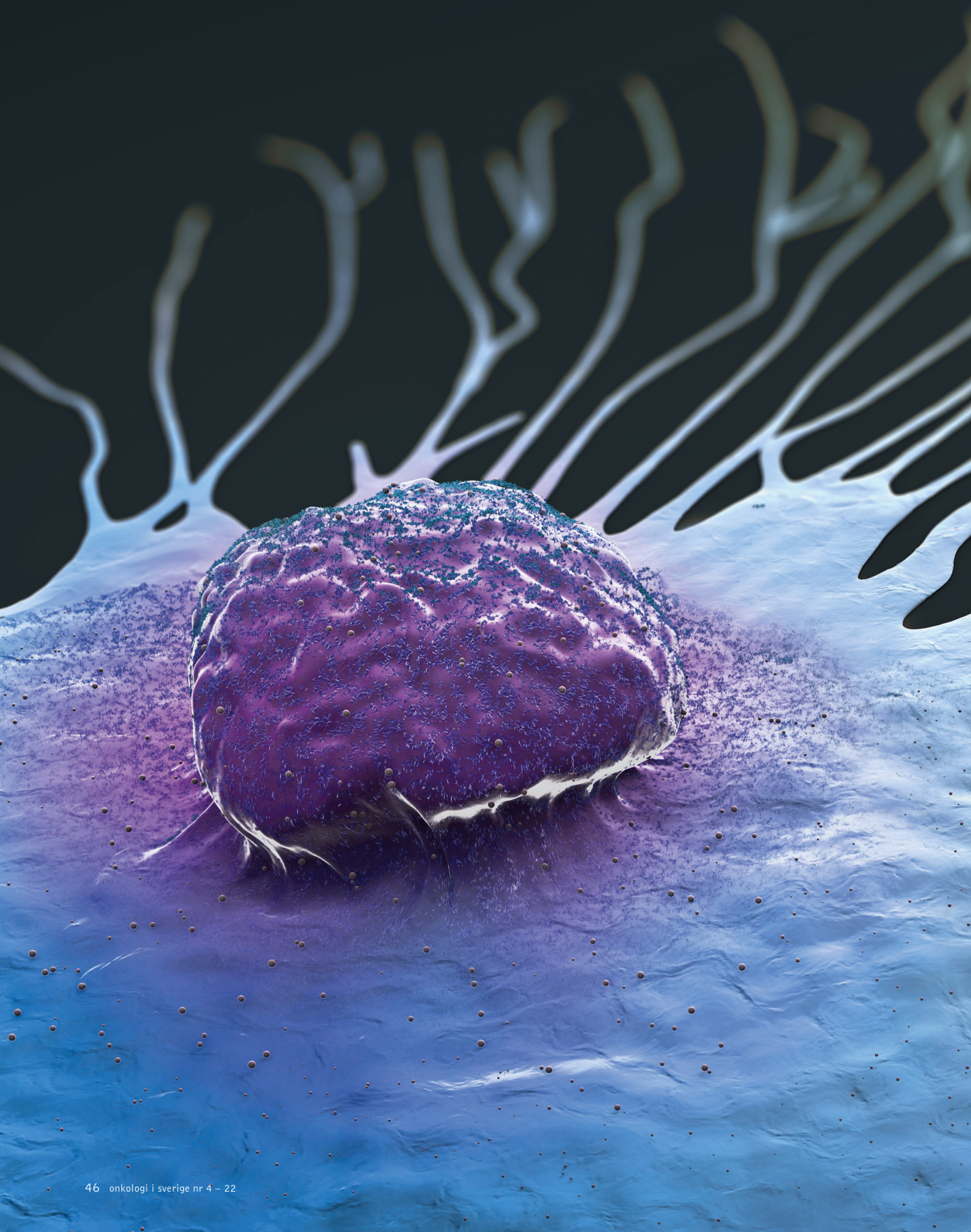


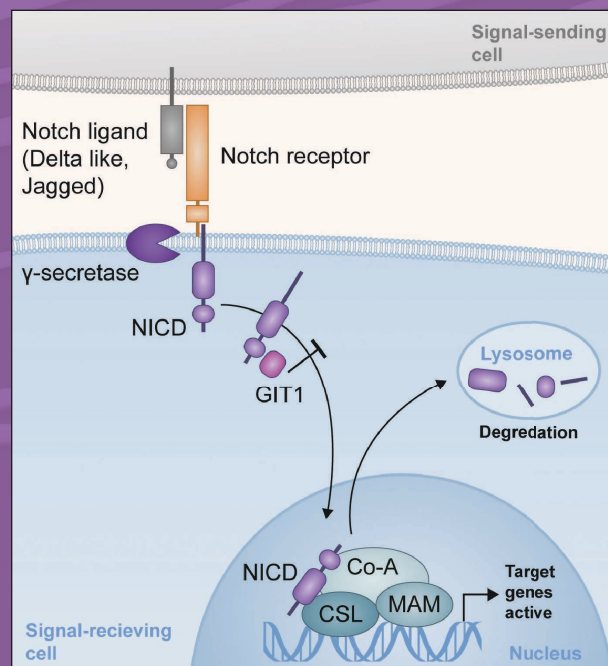


GIT1 skyddar mot bröstcancer genom negativ Notch-reglering

Hyperaktiv Notch-signalering observeras ofta vid bröstcancer och korrelerar med dålig prognos. I en nyligen publicerad artikel visar vi att ökade uttrycksnivåer av proteinet GIT1 korrelerar med ökad återfallsfri överlevnad hos östrogenreceptornegativa bröstcancerpatienter och att höga nivåer av GIT1 hämmar Notch-signalering. Våra resultat visar således att GIT1 kan modulera Notch-signalering och påverka tillväxt av bröstcancer.

Bröstcancer drabbar cirka tio procent av alla kvinnor under deras livstid och är därför en stor medicinsk och samhällsproblem. Bröstcancer är en heterogen sjukdom som klassificeras baserat på närvaro (ER(+)) eller frånvaro (ER(-)) av östrogenreceptorn. Hormonella terapier är relativt effektiva för ER(+)-tumörer, dock finns färre behandlingsalternativ tillgängliga för ER(-)-tumörer, särskilt för så kallade trippelnegativ bröstcancer (TNBC), som inte bara är negativ för östrogenreceptorn utan även för progesteronreceptorn och HER2-receptorn. Identifiering av nya molekylära mekanismer associerade med ER(-)-status är därför av stort intresse eftersom dessa mekanismer kan representera nya terapeutiska mål för riktad behandling.

Notch-signalering har dykt upp som en intressant målkandidat för behandling av olika sjukdomar². Kopplingen mellan hyperaktiverad Notch-signalering och dålig prognos är väl etablerad för bröstcancer, särskilt för ER(-)-tumörer³. En koppling mellan östrogensignalering och Notch-signalering har också rapporterats, där Notch-signalering är högre vid ER(-) bröstcancer än vid ER(+) bröstcancer⁴. Notch-signalering är en evolutionärt bevarad cell-cell-kommunikationsmekanism där ligander på plasmamembranet på en cell aktiverar Notch-receptorer på en intilliggande cell (Figur 1). Receptorligand-interaktionen leder till proteolytisk klyvning av receptorn vilket frigör den intracellulära domänen av Notch (kallad NICD), som migrerar till kärnan, där en genreglering sker. Även om den molekylära arkitekturen för Notch-vägen



Figur 1. Schematisk översikt av den centrala signalkaskaden i Notch-signalering. När Notch-receptorn interagerar med en ligand på en intilliggande cell genomgår Notch-receptorn proteolytisk klyvning med γ -sekretaskomplexet, vilket frigör den intracellulära Notch-domänen (NICD), som translokerar till cellkärnan. I kärnan bildar NICD ett co-aktivator (Co-A) komplex som interagerar med CSL och MAM för att reglera Notch nedströms genuttryck.

är enkel, reglerar Notch-signalering viktiga fundamentala processer i de flesta organ i kroppen. De olika rollerna för Notch-signalering indikerar att det finns ytterligare kontrollsteg i denna signalväg som förmodligen förmedlas av proteiner utanför den centrala signalkaskaden. I överensstämmelse med detta resonemang finns det förvånansvärt få mutationer i gener som kodar för de centrala komponenterna i Notch-signalvägen i bröstcancer.

PREDIKTOR FÖR DÅLIG PROGNOIS

Vi har identifierat G-proteinkopplat receptorkinas-interagerande protein 1 (GIT1) som en modulator av Notch-signalering i bröstcancer och en prediktor för dålig prognos vid ER(-) bröstcancer⁵. GIT1 är ett evolutionärt konserverat adapterprotein som finns i cytosolen hos alla celler där det påverkar många olika signalvägar och cellprocesser⁶. Vi började med att undersöka proteinuttrycket för GIT1 i tumörprover från patienter med ER(+) och ER(-) bröstcancer. Med flera olika tekniker för att undersöka proteinuttryck kunde vi observera en signifikant lägre proteinnivå av GIT1 i prover från ER(-)-patienter än i prover från ER(+)-patienter. För att avgöra om proteinuttrycket av GIT1 kunde förutsäga prognos hos bröstcancerpatienter, utförde vi en Kaplan-Meier-analys i flera olika databaser, som avslöjade en direkt korrelation mellan högt GIT1-uttryck och ökad återfallsfri överlevnad. När vi stratifierade data från bröstcancerpatienterna efter olika ER-status, observerades en mer uttalad skillnad mellan hög och låg GIT1 hos ER(-)-patienter än hos ER(+)-patienter.

Eftersom det är tidigare känt att Notch-aktiviteten är förstärkt i ER(-)-tumörer, undersökte vi det möjliga sambandet mellan GIT1 och Notch. Immunfärgning för NICD (Notch intracellulära domän) gav en stark nukleär färgning i proverna från ER(-)-patienterna, och omvänt, en svag nukleär färgning i ER(+)-proverna. För att verifiera dessa resultat utförde vi experiment där GIT1-nivåerna antingen förstärktes eller tystades ner med shRNA. Detta resulterade i en ökning av

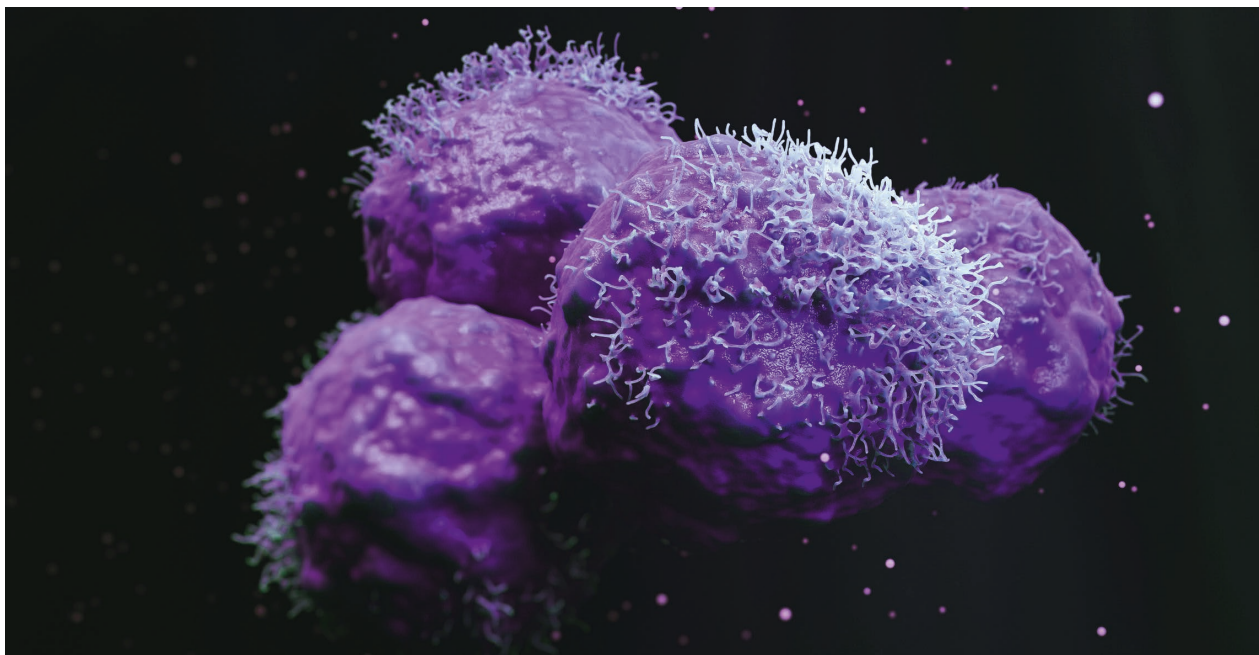
Notch-signaleringen då GIT1 tystades, och en minskning då GIT1 överuttrycktes. Dessa resultat som visade att GIT1 kunde reglera Notch-signalering kunde verifieras med en rad olika biokemiska analyser.

För att utforska GIT1:s förmåga att påverka tumörutveckling och tillväxt, sökte vi efter gener associerade med cancerstamceller i bröstcancer⁷. I en genuttrycksanalys där vi jämförde 2 509 bröstcancerpatienter med höga och låga GIT1-nivåer såg vi ett signifikant ökat uttryck av aldehyddehydrogenas 1 (ALDH1)-genen hos patienter med lågt GIT1. När vi utförde en korrelationsanalys hittade vi en tydlig negativ korrelation mellan ALDH1 och GIT1 hos bröstcancerpatienter. När vi utförde experimentet där GIT1 tystades i bröstcancerceller, kunde vi observera en signifikant ökning av antalet ALDH1-positiva celler, medan i celler där GIT1 överuttrycktes såg vi motsatt effekt.

ANTALET KOLONIER ÖKADE

Förmågan hos celler att bilda kolonier är en inneboende cellgenskap som är starkt förknippad med cancerstamhet. Vi fann att när GIT1 tystades ökade antalet kolonier avsevärt, medan GIT1-överuttryck i stället minskade antalet kolonier, jämfört med kontrollceller. Vi analyserade vidare påverkan av Notch-GIT1-axeln på tumörutveckling genom att studera hur enskilda celler kunde proliferera. När vi undersökte hur två eller tre celler kunde proliferera observerade vi betydligt fler sfäroider i celler där GIT1 hade tystats. Effekten var också här motsatt då GIT1 överuttrycktes.

GIT1-Notch-axeln som etablerades ovan fick oss att vilja utforska förhållandet mellan GIT1 och Notch mer i detalj. Genom att utföra ett experiment kallat co-immunoprecipitation kunde vi konstatera att GIT1 band till det klyvda intracellulära fragmentet av Notch, så kallad NICD. Notch-signalering kan moduleras i olika steg i signalkaskaden och vi undersökte först om GIT1 påverkade den totala mängden Notch-receptorer. Detta experiment visade att höga och låga



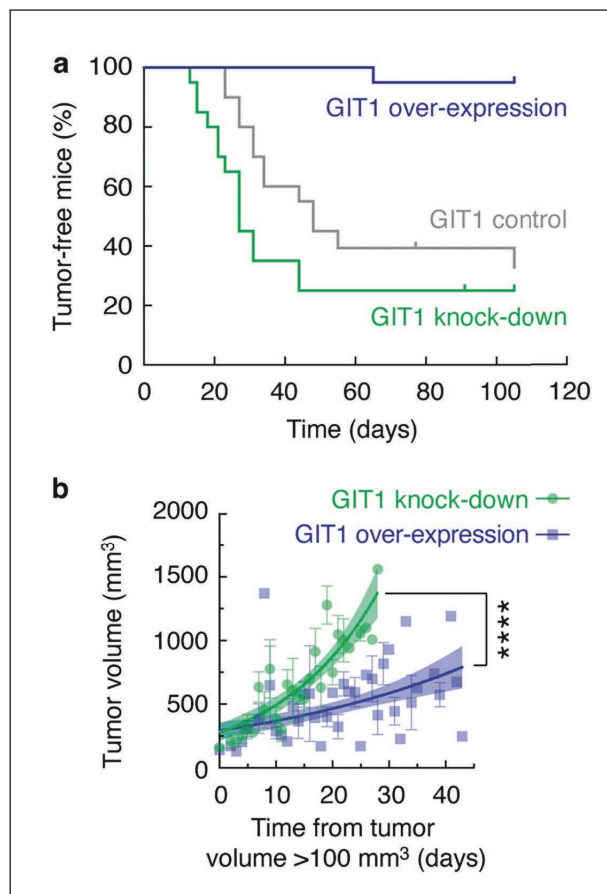
GIT1-nivåer inte hade en uppenbar effekt på den totala mängden Notch. Däremot förändrades den intracellulära distributionen av NICD av GIT1. När GIT1 tystades i bröstcancer-celler ökade mängden NICD i cellens kärna och minskade mängden NICD i cellens cytosol. Även i detta experiment såg vi en motsatt effekt då GIT1 överuttrycktes. Tillsammans visar våra experiment att GIT1 förankrar NICD i cytosolen och därigenom hindrar transporten av NICD till kärnan.

För att avgöra om GIT1-Notch-axeln spelar en betydande roll i tumörprogression, transplanterade vi in genetiskt modifierade bröstcancer-celler i möss med nedsatt immunförsvar. Med detta experiment såg vi att celler med höga nivåer av GIT1 hade avsevärt mindre proliferation och tumörbildning. Bland tjugo djur som hade transplanterats med bröstcancer-celler med höga nivåer av GIT1 upptäcktes endast en tumör (Figur 2). Omvänt accelererades tumörbildningen i djur som transplanterats med bröstcancer-celler där GIT1-uttrycket var lågt. Intressant var också att antalet ALDH1-positiva celler var många fler i tumörerna baserade på bröstcancer-celler där GIT1 hade tystats än i kontrolltumörerna. Med flera olika experiment och analyser kunde vi också visa att GIT1 påverkade Notch-signalering i bröstcancer-cellerna som hade transplanterats till djur.

Sammanfattningsvis visar vår studie att höga nivåer av GIT1 hämmar Notch-signalering och skyddar mot initiering av tumörtillväxt vid ER(-)-bröstcancer. Detta överensstämmer med andra forskningsstudier som beskriver att dysfunktionell Notch-signalering är associerad med cancer. Vi hoppas att våra resultat om GIT1 i framtiden kan bidra till utveckling av nya prognostiska markörer och behandlingsmetoder för patienter med ER(-) bröstcancer.

REFERENSER

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893-917.
2. Andersson ER, Lendahl U "Therapeutic modulation of Notch signalling--are we there yet?" *Nat Rev Drug Discov*. 2014 May;13(5):357-78.
3. Reedijk M, Odorcic S, Chang L, Zhang H, Miller N, McCready DR, Lockwood G, Egan SE "High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival" *Cancer Res* 2005 Sep 15;65(18):8530-7.
4. Lee CW, Raskett CM, Prudovsky I, Altieri DC "Molecular dependence of estrogen receptor-negative breast cancer on a notch-survival signaling axis" *Cancer Res* 2008 Jul 1;68(13):5273-81.
5. Zhang S, Miyakawa A, Wickström M, Dyberg C, Louhivuori L, Varas-Godoy M, Kemppainen K, Kanatani S, Kaczynska D, Ellström ID, Elfman L, Kronqvist P, Repo H, Mikoshiba K, Sahlgren C, Johnsen JI, Uhlén P "GIT1 protects against breast cancer growth through negative regulation of Notch" *Nature Communications* 2022 Mar 22;13(1):1537.
6. Zhou W, Li X, Premont RT "Expanding functions of GIT Arf GTPa-



Figur 2. (a) Kaplan-Meier-plot som visar procentandelen tumörfria möss transplanterade bröstcancer-celler där GIT1 har överuttryckts (GIT1 over-expression) eller tystats (GIT1 knock-down) jämfört med kontrollceller (GIT1 control). (b) Scatter plot av tumörvolymen över tid i möss transplanterade med bröstcancer-celler där GIT1 har tystats (GIT1 knock-down) eller överuttryckts (GIT1 over-expression). Tiden är dagar från tumörvolymen >100 mm³. Helledragen linje, exponentiell regression. Skuggat område, 95 % konfidensband. Jämförelse av tillväxthastighetskonstanter k för GIT1 knock-down (n = 290 tumörmätningar, k = 0.057) och GIT1 over-expression (n = 440 tumörmätningar, k = 0.023), P < 0,0001; F-test.

se-activating proteins, PIX Rho guanine nucleotide exchange factors and GIT-PIX complexes" *J Cell Sci* 2016 May 15;129(10):1963-74.

7. Tanaka N, Kanatani S, Kaczynska D, Fukumoto K, Louhivuori L, Mizutani T, Kopper O, Kronqvist P, Robertson S, Lindh C, Kis L, Pronk R, Niwa N, Matsumoto K, Oya M, Miyakawa A, Falk A, Hartman J, Sahlgren C, Clevers H, Uhlén P "Three-dimensional single-cell imaging for the analysis of RNA and protein expression in intact tumour biopsies" *Nat Biomed Eng*. 2020 Sep;4(9):875-888.

PER UHLÉN, PROFESSOR, INSTITUTIONEN FÖR MEDICINSK BOKEMI OCH BIOFYSIK, KAROLINSKA INSTITUTET, PER.UHLEN@KI.SE



AYAKO MIYAKAWA, MD PHD, ÖVERLÄKARE, ENHETEN FÖR UROLOGI, KAROLINSKA UNIVERSITETSSJUKHUSET, AYAKO.MIYAKAWA@KI.SE

