



Univerzita Karlova v Praze

3.lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

**Vliv biotransformace a transportu na účinky
chemoterapie a prognózu rakoviny prsu**

Ing.Miluše Hubáčková

Praha 2013

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Obor: Preventivní medicína

**Předseda oborové rady: Doc.MUDr. Alexander Čelko,
CSc.**

**Školící pracoviště: Státní zdravotní ústav v Praze
Laboratoř toxikogenomiky**

Autor: Ing.Miluše Hubáčková

Školitel: RNDr.Pavel Souček, CSc.

Školitel konsultant (byl – li):

Oponenti:

S disertací je možno se seznámit na děkanátě
3.lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze

Obsah

Souhrn	1
Summary	2
1. Úvod	4
1.1 Karcinom prsu.....	5
1.2 Rezistence nádorů.....	6
1.3 ABCB1 a jeho úloha v membránovém transportu.....	6
1.4 Biotransformační enzymy.....	7
2. Cíle práce	8
3. Materiál a metodika	9
4. Výsledky	10
4.1 Vliv polymorfismu a exprese genu NQO1 na prognózu karcinomu prsu.....	10
4.2 Úloha genů kódujících oxidativní stres v prognóze karcinomu prsu.....	11
4.3 Úloha polymorfismu a exprese genu ABCB1 v prognóze karcinomu prsu.....	15
4.4 Expresní profil genu cytochromu P450 u pacientek s karcinomem prsu.....	15
5. Diskuze	16
6. Závěry	20
7. Literatura	22

Souhrn

Úvod: Cílem této práce bylo sledování genetických polymorfismů a expresních profilů biotransformačních enzymů a enzymů mnohočetné lékové rezistence a jejich vlivu na prognózu karcinomu prsu včetně možných prognostických a prediktivních vlastností jako odpovědi na onkologickou léčbu.

Materiál a metody: Polymorfismy biotransformačních genů byly stanoveny pomocí real-time PCR a polymorfismy genu *ABCB1* pomocí NanoChip Assay v DNA získané z krve pacientek. Expres genů byly stanoveny metodou qPCR v nádorové a v okolní nenádorové tkáni, exprese proteinu NQO1 a p53 byla stanovena imunohistochemicky v nádorové tkáni.

Výsledky: Frekvence studovaných polymorfismů se významně nelišily od dříve publikovaných výsledků. Pro gen *NQO2* byl nalezen významný vztah pro Leu alelu SNP rs1143684 asociovanou s nižším stádiem a lepší prognózou nemoci. Genotyp Ala/Ala SNP rs4880 *SOD2* byl asociován se zhoršeným PFS u pacientek léčených cyklofosfamidem bez hormonální terapie. Nalezený významný vztah mezi PFS a variantní alelou SNP rs699473 *SOD3* byl asociován se zhoršeným PFS u pacientek léčených tamoxifenem nebo aromatázovým inhibítorem. U genu *ABCB1* byl nalezen významný vztah mezi variantními alelami SNPs rs1128503 a rs1045642 a expresí ER, která tak nebyla častěji v nádorech nalezena.

Závěry: Naše výsledky naznačují význam zařazení validačních souborů do prováděných studií či ověřování výsledků na větších souborech vzorků. V našich studiích jsme ukázaly, že biotransformační enzymy a enzymy

modifikující oxidativní stres se jeví nadějnými prognostickými markery v budoucí cílené léčbě karcinomu prsu. U genu *ABCB1* se nám ukázaly jako nejzajímavějšími polymorfismy pro další studium rezistence karcinomu SNPs v exonu 12 a 26.

Summary

Introduction: The aim of this study was to evaluate the genetic polymorphisms and expression profiles of biotransformation enzymes and enzymes of multidrug resistance and their influence to the prognosis of breast cancer patients and potential prognostic and predictive properties of a treatment's outcome.

Materials and methods: Polymorphisms of biotransformation genes were determined using real-time PCR and polymorphisms of *ABCB1* gene were determined using NanoChip Assay in DNA from the blood of patients. The expression of genes was determined using qPCR in paired tumor and adjacent non-tumor tissue, the expression of NQO1 and p53 protein was assessed by immunohistochemistry in the tumor breast tissues.

Results: The frequencies of the studied SNPs did not differ from the previous published results. The significant association was found for Leu alel of SNP rs1143684 of *NQO2* gene, which was associated with lower stadium of disease and with better prognosis of disease. Genotype Ala/Ala of SNP rs4880 of *SOD2* gene was associated with worse PFS in the treatment of cyclophosphamide without hormonal therapy outcome. Also significant

association with PFS and variant allele of SNP rs699473 of *SOD3* gene was found, where worse PFS was associated tamoxifen or aromatase inhibitor treatment. For gene *ABCB1* significant association was found between variant allele of SNPs rs1128503 and rs1045642 and expression of ER, which was not more often found in tumor tissues samples.

Conclusions: Our results suggest the importance of including of validation sets into the performed studies or the verification of the results on the larger number of samples. In our studies we showed that the biotransformation enzymes and enzymes modifying oxidative stress seem to be promising prognostic markers in the future targeted therapy of breast carcinomas. The most interesting polymorphisms of *ABCB1* gene for the next study of the resistance of breast cancer seem to be SNPs in exon 12 and 26.

1. Úvod

Vznik nádorového onemocnění neboli karcinogeneze je vícestupňový proces, při kterém dochází ke změně normálního buněčného růstu a diferenciaci. Na začátku nádorového bujení je iniciovaná nádorová buňka, která vznikla nahromaděním celé řady genetických změn (mutací). Mezi dalšími faktory, které se podílí na vzniku nádorového bujení, jsou pak další genetické faktory a také faktory životního prostředí. Proto je dnes karcinogeneze chápána jako proces vyvolaný jak dědičnými vlivy (např.: polymorfismem, nebo-li dědičnou variací DNA vyskytující se alespoň u 1% populace), tak genotoxickým působením chemických látek. V současné době tak patří nádorová onemocnění mezi nejzávažnější onemocnění a nejčastější příčiny úmrtí v lidské populaci.

Léčba nádorových onemocnění je kombinací chirurgických zákroků, radioterapie a chemoterapie. Ta je založena na podávání cytostatik, které jsou schopny usmrtit nádorové buňky. Jejich použití je však doprovázeno řadou závažných nežádoucích účinků, které mohou poškozovat i zdravé lidské buňky. Nemalým problémem je rovněž rozvoj resistance nádorů vůči používaným cytostatikům, což následně vede ke snížení účinnosti léčby.

Proto se v současné době hledají zcela nová léčiva nebo účinnější deriváty známých cytostatik. Zároveň se hledají možnosti jak zvýšit účinnost konvenčních cytostatik ovlivněním procesů, které probíhají po vstupu cytostatik do organismu (distribuce a biotransformace) a buněk (membránový transport).

Na základě výsledků mnoha prací se jeví studium fenotypu a genotypu nádorových buněk jako další možnost, která by mohla pomoci k pochopení vzniku a rozvoje jednotlivých nádorů, jejich diagnostice a následné léčbě. Na druhou stranu by také toto studium mohlo pomoci k nalezení možných rizikových faktorů vzniku a rozvoje nádoru i k definici cílů pro vývoj nových léčiv.

1.1 Karcinom prsu

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem žen. V České republice byl v roce 2009 karcinom prsu nově diagnostikován u 55 mužů (0,7 na 100 tisíc mužů) a u 5 975 žen (111,9 na 100 tisíc žen). Mortalita v České republice má klesající trend, v roce 2009 zemřelo 1607 žen, oproti tomu v roce 2002 zemřelo 1965 žen či v roce 1998 zemřelo 2596 žen (zdroj: ÚZIS). Pokles mortality je vysvětlován zavedením řádného mamografického screeningu, včasným záchytem onemocnění a zvýšenou úspěšností systémové léčby.

Karcinom prsu obecně zařazujeme mezi tzv. hormonálně závislé nádory. Rozlišujeme sporadické formy a tzv. hereditární formy karcinomu prsu (familiární případy). Hereditární formy karcinomu prsu jsou podmíněny mutací genů *BRCA1* nebo *BRCA2*, která se dědí autozomálně dominantně. Kromě těchto majoritních predispozičních genů („high penetrance“) je nyní studována úloha i tzv. genů s nízkou penetrancí. Mezi těmito geny („low“ a „high“) dochází k interakci, např. „high“ *p53* a „low“ *NQO1*.

1.2 Rezistence nádorů

Rezistence maligních nádorů vůči chemoterapeutikům je v současné době jednou z největších překážek v úspěšné terapii nádorových onemocnění. Rezistence přitom nevzniká jen na jedno léčivo, ale zpravidla na celou skupinu léčiv, které se liší strukturou i mechanismem účinku a díky tomu se tento fenomén nazývá mnohočetná léková rezistence neboli multidrug resistance (MDR) [1]. Mezi léčiva, na která vzniká rezistence, patří antracykliny (doxorubicin, daunomycin), vinka-alkaloidy, actinomycin D, valinomycin, gramicidin D, puromycin a také taxany (paclitaxel a docetaxel) [2]. MDR fenotyp maligních buněk může být vrozený nebo získaný po působení protinádorových léčiv [3]. Jedná se o multifaktoriální proces, kterého se účastní řada mechanismů jako je: zvýšená či snížená exprese membránových transportérů (ABC, SLC) způsobující sníženou intracelulární akumulaci léčiva, dále změny v metabolických drahách a subcelulární distribuci cytostatik a v neposlední řadě, ovlivnění cílových struktur léčiva a rozdíly v DNA opravných a apoptotických procesech [4, 5].

1.3 ABCB1 a jeho úloha v membránovém transportu

MDR je multifaktoriálním procesem, na kterém se podílí celá řada mechanismů. Jedním z nich je transportní funkce některých transmembránových transportních proteinů ze skupiny ABC-transportních proteinů (ATP binding cassette proteins). Jedním z nejvýznamnějších

ABC-transportérů přispívajících k rozvoji rezistence je P-glykoprotein (P-gp). Jedná se o transmembránový glykoprotein o velikosti 170kDa tvořený 1280 aminokyselinami. Mezi substráty P-gp řadíme tato protinádorová léčiva: vinka-alkaloidy (vincristin, vinblastin), antracykliny (doxorubicin, daunorubicin), epipodophylotoxiny (etoposid, teniposid), taxany (paclitaxel, docetaxel), kolchicin a actinomycin D [6, 7, 8]. Vývoj nových léčiv, na která by rezistence nevznikala či použití modulátorů ABC-transportních proteinů účastnících se vzniku MDR, je v poslední době velmi intenzivní. Doxorubicin a taxany jsou jedny z neúspěšnějších léků pokročilého karcinomu prsu. Jejich terapeutické použití je limitováno rozvojem mnohočetné lékové rezistence dané zvýšenou expresí P-gp korelující s rezistencí vůči taxanům a doxorubicinu u pacientek s karcinomem prsu [9]. K rezistenci karcinomu prsu přispívá také vysoká exprese proteinů MRP1/2, BCRP, MXR a ABCG2 [10, 11].

1.4 Biotransformační enzymy

Biotransformační enzymy zajišťují v prokaryotních i eukaryotních organizmech jak metabolismus endogenních látek (např. steroidní hormony, vitamíny, oxid dusnatý, žlučové kyseliny), tak i exogenních látek, tzv. xenobiotik (např. léky, polutanty životního prostředí). Biotransformační enzymy představují pro xenobiotika především detoxikaci, která zabraňuje akumulaci velmi nebezpečných látek a poškození biologických molekul.

Biotransformační reakce se rozdělují na reakce I. fáze (funkční) a II. fáze (konjugační) [12]. Biotransformační enzymy se účastní také aktivace „prokarcinogenů“ na mutageny a karcinogeny, které reagují s biologickými makromolekulami (DNA, RNA, proteiny, lipidy) a způsobují tak jejich poškození [13], ale i inaktivace chemoterapeutik metabolickou transformací.

Většina genů biotransformačních enzymů je v populaci polymorfni a u některých navíc existují inaktivující alely [14]. Přítomnost polymorfismu může ovlivňovat aktivitu, afinitu či inducibilitu enzymu.

2. Cíle práce

- Stanovení genetických polymorfismů lidských biotransformačních enzymů (NQO1/2) a enzymů oxidativního stresu (SOD2/3) a určení jejich vlivu na riziko vzniku a prognózy karcinomu prsu
- Sledování exprese biotransformačních enzymů (NQO1/2, CYP1B1, CYP2E1, CYP3A4, CYP2C9) a enzymů oxidativního stresu (SOD2/3) v nádorové a okolní nenádorové tkáni karcinomu prsu a posouzení jejich významu v predikci a prognóze vývoje karcinomu prsu.
- Stanovení významných genetických polymorfismů *ABCB1* a exprese genu *ABCB1* v nádorové a okolní nenádorové tkáni karcinomu prsu a určení jejich vlivu na mnohočetnou lékovou rezistenci karcinomu prsu.

3. Materiál a metodika

Do studie bylo zahrnuto 321 vzorků krve s histologicky potvrzenou diagnózou karcinomu prsu z období únor 2000 až prosinec 2006 ze třech fakultních nemocnic v Praze. Z této skupiny bylo navíc získáno 120 vzorků tkáně karcinomu prsu a k tomu 51 párových kontrol z okolní tkáně bez morfologických známek karcinomu. Z kryostatových řezů tkání o velikosti 5- μ m byla izolována celková RNA. Ta byla také izolována i z archivních vzorků parafinových bločků fixovaných formalinem (FFPE).

Genomová DNA byla izolována z periferních krevních lymfocytů. Polymorfismy (SNPs) genů *NQO1* (rs1800566), *NQO2* (rs1143684), *SOD2* (rs4880) a *SOD3* (rs2536512, rs1799895 a rs699473) byly stanoveny alelickou diskriminací pomocí real-time PCR dle dřívějších publikací [15, 16].

Šest polymorfismů v genu *ABCB1* [(-1)G>A, rs2214102; 61A>G, Asn21Asp, rs9282564;1199G>A, Ser400Asn, rs2229109; 1236C>T, Gly412Gly, rs1128503; (+44)C>T, rs2032588 a 3435C>T, Ile1145Ile, rs1045642] bylo stanoveno pomocí NanoChip Molecular Biology Workstation (Nanogen Inc.) dle dříve popsané metody [17].

Expresní hladiny byly pro všechny studované geny stanoveny pomocí qPCR s absolutní kvantifikací s využitím externí kalibrační křivky dle zavedené metodiky [15, 16, 17].

Imunohistochemické stanovení proteinů p53 a NQO1 bylo provedeno na spolupracujícím pracovišti dle dříve popsané metodiky [15].

Pro statistickou analýzu byly hladiny transkriptů všech stanovených genů logaritmičsky transformovány za účelem normalizace rozložení dat. Transformované hladiny genů byly analyzovány parametrickým ANOVA testem či oboustranným *t*-testem pro nezávislé vzorky. Pro porovnání exprese *ABCBI* mezi nádorovými a nenádorovými vzorky tkání byl použit oboustranný *t*-test a *Kendallův W* test. Hladiny transkriptů všech stanovených genů byly korelovány s velikostí tumoru nebo s věkem při diagnóze použitím lineární regrese *Spearmanovým* testem. Vztah mezi kategorizovanými hodnotami genotypu, imunohistochemického skóre a klinicko-patologickými daty byly analyzovány použitím oboustranného *Fisherova* exaktního testu. Genetické modely byly rovněž hodnoceny logistickou regresí. PFS byl hodnocen metodou Kaplan-Meier a pro porovnání byl použit long-rank test. Hodnoty *p* byly vždy stanoveny pomocí oboustranných testů. Hodnota *p* nižší než 0,05 byla považována za statisticky významnou. Všechny statistické analýzy byly provedeny použitím softwaru SPSS v15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

4. Výsledky

4.1. Vliv polymorfismu a exprese genu *NQO1* na prognózu karcinomu prsu

Pro hodnocení výsledků studie genu *NQO1* byla nejprve provedena analýza evaluačního souboru pacientek ($n = 52$). Pro zopakování a potvrzení výsledků byl vytvořen validační soubor pacientek ($n = 53$).

Byla nalezena 19 % frekvence variantní alely Ser rs1800566 v obou souborech ($n = 105$).

V evaluačním, validačním souboru ani v kombinaci obou těchto souborů nebyl nalezen žádný významný vztah mezi genotypem *NQO1* a hladinou transkriptu *NQO1*. U nosiček s alespoň jednou variantní Ser alelou nebyla významně častěji nalezena exprese proteinu NQO1 v nádorové tkáni ve srovnání s nosičkami normálního genotypu Pro/Pro ($p = 0,032$ v evaluačním souboru, $p = 0,018$ ve validačním souboru, $p = 0,001$ v obou souborech). Hladina transkriptu *NQO1* také velmi dobře korelovala s expresí proteinu NQO1. Pacientky s prokázanou expresí NQO1 v nádoru měly významně vyšší hladinu transkriptu *NQO1* oproti pacientkám bez nalezené exprese NQO1 (evaluační soubor $p = 0,042$; validační soubor $p = 0,017$; oba soubory $p = 0,007$).

4.2 Úloha genů kódujících oxidativní stres v prognóze karcinomu prsu

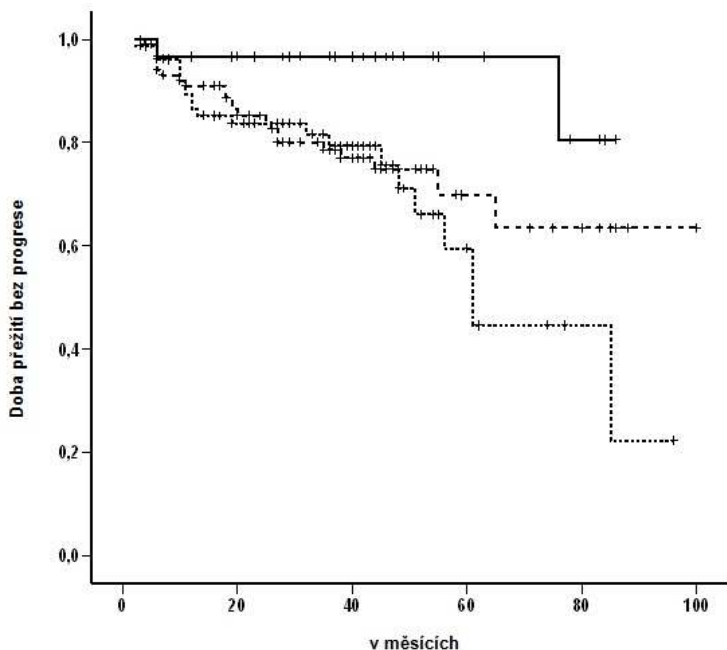
Celkem bylo shromážděno 321 DNA vzorků pacientek s karcinomem prsu. Hladiny transkriptů byly stanoveny pomocí qPCR u 120 vzorků nádorové a u 51 vzorků okolní nenádorové tkáně karcinomu prsu. Průměrná hladina exprese v nádorové tkáni měla tento charakteristický trend: *NQO1*>*NQO2*>*SOD2*>*SOD3*; v okolní nenádorové tkáni pak tento: *NQO1*>*SOD2*>*NQO2*>*SOD3*.

U polymorfismu rs1143684 genu *NQO2* byla nalezena významná spojitost se stádiem nemoci a expresí progesteronového receptoru (PR). U pacientek se stádiem nemoci 0 nebo I (méně pokročilé stádium nemoci) se

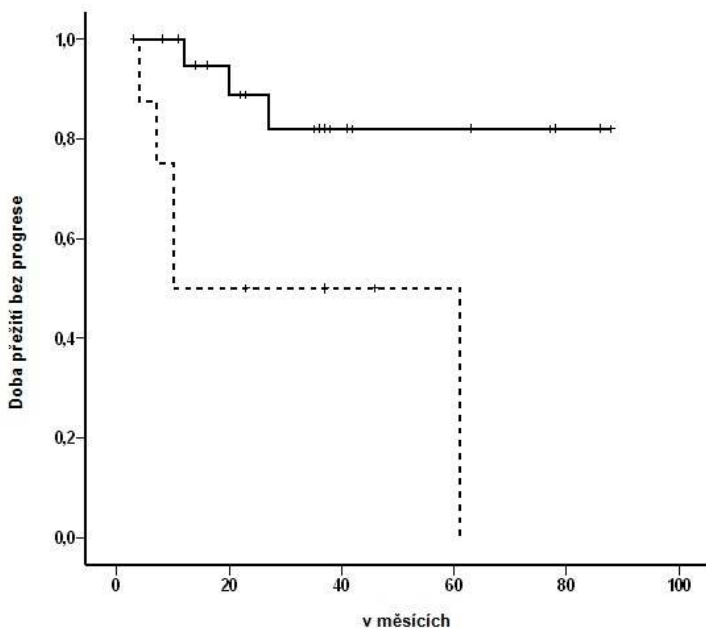
častěji vyskytovala variantní Leu alela genu *NQO2* než u pacientek se stádiem nemoci II-IV ($p = 0,033$). Skupina pacientek, u kterých nebyla nalezena exprese PR a které měly stádium nemoci 0 nebo I, měly významně častěji přítomnou variantní Leu alelu genu *NQO2* než pacientky se stádiem nemoci II-IV ($p = 0,029$). Pacientky, které měly karcinom exprimující ER nebo ER i PR, měly také častěji přítomnou variantní Thr alelu SNP rs2536512 *SOD3* ($p = 0,007$; $p = 0,018$).

Hladina transkriptu genu *SOD3* byla významně vyšší u karcinomů s gradem 1 nebo 2 než u karcinomů s gradem 3 ($p = 0,006$).

Polymorfismus rs699473 v genu *SOD3* významně modifikoval PFS všech pacientek (Obrázek č.1, $p = 0,038$). SNP rs4880 genu *SOD2* významně modifikoval PFS ve skupině pacientek bez exprese receptorů ($n = 59$, $p = 0,001$). PFS bylo významně modifikováno u SNP rs699473 genu *SOD3* při léčbě tamoxifenem nebo aromatázovým inhibítorem ($n = 179$; $p = 0,021$). U SNP rs4880 genu *SOD2* bylo PFS významně modifikováno u pacientek léčených cyklofosfamidem bez hormonální terapie ($n = 30$; Obrázek č.2; $p = 0,004$).



Obrázek č.1: Vztah mezi PFS všech studovaných pacientek s karcinomem prsu a polymorfismem rs699473 genu *SOD3*. Kaplan-Meierova křivka přežívání pacientek s genotypem CC (plná čára, $n = 30$), CT (přerušovaná čára, $n = 106$) a TT (tečkovaná čára, $n = 80$) s $p = 0,038$ (long-rank test).



Obrázek č.7: Vztah mezi PFS patientek s karcinomem prsu, léčených režimy obsahujícími cyklofosfamid, a polymorfismem rs4880 genu *SOD2*. Kaplan-Meierova křivka přežívání patientek nesoucích alelu Val (plná čára, n = 22) a genotyp Ala/Ala (přerušovaná čára, n = 8) s $p = 0,004$. Všechny patientky v této skupině měly nádory bez exprese progesteronových a estrogenových receptorů a nedostaly hormonální léčbu.

4.3 Úloha polymorfismu a exprese genu *ABCB1* v prognóze karcinomu prsu

Nejvyšší frekvence SNPs genu *ABCB1* byly nalezeny pro variantní alely v exonu 12 (1236T, rs1128503, 38%) a exonu 26 (3435T, rs1045642, 54%).

Významně vyšší průměrná exprese *ABCB1* byla nalezena v okolní nenádorové než v nádorové tkáni pacientek ($p < 0,001$ *Kendallův W* test). Nosičky genotypu TT v pozici 3435 exonu 26 genu *ABCB1* měly významně sníženou expresi *ABCB1* v nádorové tkáni v porovnání s nosičkami CC genotypu ($p = 0,043$). Obdobně, nosičky nesoucí alespoň jednu variantní alelu SNP 1236C>T v exonu 12 měly významně sníženou expresi genu *ABCB1* v nádorové tkáni ($p = 0,029$).

Nosičky variantního genotypu 1236TT v exonu 12 měly významně častěji karcinomy bez nalezené exprese ER v porovnání s nosičkami CC genotypu ($p = 0,011$).

4.4 Expresní profil genu cytochromu P450 u pacientek s karcinomem prsu

Hladiny transkriptů *CYP1B1* a *CYP2E1* byly nejvyšší ze sledovaných genů *CYP*. Hladina transkriptu *CYP1B1* v periferních krevních lymfocytech korelovala s hladinou v okolní nenádorové tkáni ($R^2 = 0,67$) i v nádorové tkáni ($R^2 = 0,42$). Hladina *CYP2E1* byla významně vyšší v invazivních lobulárních karcinomech oproti invazivním duktálním karcinomům ($p = 0,028$). Dále, hladina transkriptu *CYP2E1* byla vyšší v okolní nenádorové tkáni pacientek s nádory bez exprese PR ($p =$

0,026). Hladina *CYP2E1* v nádorové tkáni pacientek s klinickým stádiem nemoci I byla vyšší než u pacientek ve vyšším stádiu nemoci (II - IV; $p = 0,070$).

5. Diskuze

V několika předchozích studiích byl nalezen významný vztah mezi funkčně důležitým polymorfismem Pro187Ser genu *NQO1* a rizikem karcinomu prsu [18, 19, 20]. Naším cílem bylo ověřit dříve publikovaná data a prozkoumat funkční aspekty výše uvedených nálezů u pacientek s karcinomem prsu.

Nejprve jsme se zaměřili na studium vztahů mezi genotypem *NQO1* Pro187Ser v DNA lymfocytů a hladinou transkriptů a expresí proteinů ve vzorcích tkání karcinomů prsu. Všechny významné vztahy, které byly v prvotní studii nalezeny, nebyly v rozšířené studii potvrzeny. Nebyla tak potvrzena silná prediktivní a prognostická úloha u pacientek s karcinomem prsu dostávajících antracykliny a ani nebyla prokázána interakce se stavem proteinu p53 nalezená v předchozí studii [21].

Další studie byla zaměřena na enzymy modifikující oxidativní stres. Oxidativní stres má velmi rozporuplnou úlohu v karcinogenezi. Reaktivní formy kyslíku ovlivňují apoptózu [22], proliferaci nebo vznik karcinomu [23]. Působením antracyklinů a cyklofosfamidů dochází během nádorové terapie k tvorbě oxidativního stresu [24, 25]. Naše studie proto zkombinovala jak hodnocení funkčních SNPs tak i hladin

transkriptů kandidátních genů (*NQO1*, *NQO2*, *SOD2* a *SOD3*) s významnými prognostickými faktory a PFS. Dalším předpokladem byla úloha genu *NQO2* v progresi karcinomu prsu [26]. V naší studii bylo nalezeno, že pacientky nesoucí Leu alelu v SNP rs1143684 *NQO2* měly mírně nižší riziko vzniku pokročilejších stádií nemoci (stádium II-IV) nebo nemoci se špatnou prognózou (nádory bez nalezené exprese PR).

Funkce genu *SOD2* může být ovlivněna ER a p53, a tudíž může být velmi důležitá pro progresi a léčbu karcinomu prsu [23, 27]. Nosiči alely Ala v SNP rs4880 genu *SOD2* léčených cyklofosfamidem, měli horší přežití než pacienti s genotypem Val/Val u karcinomu prsu [28, 29]. V naší studii nosičky genotypu Ala/Ala v SNP rs4880 *SOD2* léčených cyklofosfamidem bez hormonální terapie měly významně horší PFS než nosičky alely Val ($p = 0,004$). Tento výsledek byl později potvrzen i analýzou pacientek rozdělených podle exprese ER a PR. Naše výsledky tak podpořily výše citované studie.

Úloha a význam genu *SOD3* v prognóze pacientek s karcinomem prsu nebyla zatím podrobněji studována. Naše studie v tomto ohledu přinesla kompletně nové výsledky. V naší studii byl nalezen následující trend v expresi genu *SOD3*: nádory grade 3 < grade 1 nebo 2 < nenádorová tkáň. Tento nálezn potvrzuje dříve publikované studie a poukazuje na protektivní vlastnosti genu *SOD3* proti tumorigenezi [30]. Naše data tak podpořila dříve předpokládanou úlohu genu *SOD3* v karcinogenezi [31, 32]. Pacientky s nalezenou expresí ER (nebo expresí ER i PR) v nádorech nesly významně častěji alelu Thr SNP rs2536512 genu *SOD3*. Funkční význam SNP rs2536512 včetně dalšího studovaného SNP

rs699473 genu *SOD3* je neznámý a nebyly publikovány ani jiné studie, které by se vztahem těchto SNPs k prognóze pacientů s jakýmkoliv typem karcinomů zabývaly. Závěrem můžeme konstatovat, že naše studie ukázala, že enzymy modifikující oxidativní stres představují nadějnou oblast pro hledání prognostických markerů karcinomu prsu.

Hlavním cílem studie genu *ABCB1* bylo vyhodnotit účinky některých SNPs na expresní profil genu *ABCB1* u pacientek s karcinomem prsu. V naší studii mělo 8 ze 39 pacientek vyšší expresi *ABCB1* v nádorové tkáni oproti okolní nenádorové tkáni. Vysoká exprese *ABCB1* v nádorové tkáni je považována za rizikový faktor selhání antracyklinové chemoterapie či chemotereapie založené na taxanech [33, 34]. Pacientky se zvýšenou expresí *ABCB1* tak mohou být kandidátkami pro cílenou terapii, zahrnující *ABCB1* inhibitory jako verapamil, cyklosporin A, quinidin apod.[35].

Naše výsledky ukázaly, že SNP v exonu 12 rs1128503 (1236C>T) a 26 rs1045642 (3435C>T) ovlivňují expresi genu *ABCB1*. Ze studovaných klinicko-patologických charakteristik pacientek, byla nalezena souvislost mezi expresí ER a SNP *ABCB1* v exonu 12 a 26. Pacientky nesoucí variantní alely, které snižovali expresi *ABCB1*, měly významně častěji nádory bez nalezené exprese ER. Exprese ER a PR je velmi dobře zavedený prognostický i prediktivní faktor u karcinomu prsu a představuje tak důležitou informaci pro volbu chemoterapie nebo hormonálního režimu. Nordgard a kol. publikovali vztah mezi několika haplotypy *ABCB1* a stavem ER a PR ($P < 0,05$) [36]. Seymour a kol. rovněž našli významný vztah mezi hladinami *ABCB1* proteinu

a pacienti s expresí ER [37]. Proto se tyto polymorfismy jeví ideálními kandidáty pro studie zaměřené na objasnění funkce polymorfismů *ABCB1*.

V expresní studii *CYP* genů bylo nalezeno, že hladiny transkriptů *CYP2C9* a *CYP3A4* v nádorové i okolní nenádorové tkáni byly přítomny ve velmi nízkých koncentracích a byly v souladu s předchozími studiemi [38, 39, 40, 41].

Údaje o expresi *CYP2E1* ve tkáních karcinomu prsu byly v literatuře protichůdné. Ve studii Modugno a kol. nebyla exprese *CYP2E1* detekována v nádorové ani v okolní nenádorové tkáni [42], i když dvě předchozí studie prokázali jeho expresi v nádorové [43] tak i v okolní nenádorové tkáni [44]. Přitom v naší studii byla exprese transkriptu *CYP2E1* jednoznačně nalezena ve všech vzorcích nádorové i okolní nenádorové tkáně pacientek s karcinomem prsu. U čtyř ze 40 pacientek byla v nádorové tkáni navíc pozorována zvýšená exprese genu *CYP2E1*. Tyto pacientky by tak mohly potenciálně těžit z proléčiv aktivovaných právě P450 2E1 (např. etoposide) [45], a proto se gen *CYP2E1* jeví jako možný potenciální prognostický marker v karcinogenezi.

V průměru nejvyšší exprese ze všech studovaných genů *CYP* byla nalezena u genu *CYP1B1*. To podporuje skutečnost, že P450 1B1 je extrahepatální enzym. Naše výsledky tak potvrdily nálezy z předchozích studií, ve kterých byla exprese *CYP1B1* v nádorové a nenádorové tkáni pacientů s karcinomem prsu prokázána [42, 43, 46]. V naší studii byla, tak jako v případě *CYP2E1*, stanovena vyšší exprese *CYP1B1* v nádorové tkáni několika pacientek. Tyto pacientky by mohly podobně jako u P450 2E1 potenciálně těžit z účinků léčiv

založených na enzymatické aktivaci pomocí P450 1B1. V současné době jsou vyvíjena imunoterapeutika P450 1B1, proléčiva aktivovaná P450 1B1 a inhibitory P450 1B1, které by byly schopné využít přítomnost a aktivitu tohoto enzymu v nádorových buňkách [47].

6. Závěry

Naše studie, zabývající se významem polymorfismu, genové a proteinové exprese NOQ1 u pacientek s karcinomem prsu, zdůraznila význam začlenění validačních souborů a ověřování výsledků na větších souborech vzorků v budoucích studiích.

Další práce byla zaměřena na význam genů kódujících oxidativní stres a jejich úlohu v prognóze pacientek s karcinomem prsu. U genu *NQO2* byl nalezen významný vztah v SNP rs1143684, který byl asociován se stádiem nemoci. Pacientky s Leu alelou genu *NQO2* měly nižší riziko vzniku pokročilejších stádií nemoci (stádium II-IV) nebo nemoci s horší prognózou (nádory s absencí PR). V genu *SOD2* byl nalezen významný vztah pro nosičky genotypu Ala/Ala v SNP rs4880, které byly léčené režimy obsahujícími cyklofosamid bez hormonální terapie a které tak měly významně horší PFS. Podobný nálezn byl odhalen také ve skupině pacientek bez nalezené exprese ER a PR. U genu *SOD3* byla odhalena jeho protektivní úloha, která byla dána trendem v expresi jeho transkriptu, kdy nejvyšší exprese byla nalezena v okolní nenádorové tkáni a nejnižší v nádorové tkáni s gradem 3. Nejzajímavějším nálezem byl vztah SNP rs699473 genu *SOD3* k PFS.

V práci zaměřenou na význam polymorfismů genu *ABCB1* na expresi a klinicko-patologické charakteristiky pacientek s karcinomem prsu jsme našly vztah mezi SNP rs1128503 a rs1045642 a expresí *ABCB1*. Byl nalezen také vztah mezi těmito polymorfismy a expresí ER. Pacientky, které nesly variantní alely těchto SNPs, a které snižovali expresi *ABCB1*, měly významně častěji nádory, ve kterých nebyla nalezena exprese ER. Nalezená exprese genu *ABCB1* byla nižší ve většině nádorových vzorků v porovnání s okolními nenádorovými vzorky.

V poslední práci jsme se zabývali významem exprese genu cytochromů P450 u pacientek s karcinomem prsu. Exprese genu *CYP2C9* a *CYP3A4* byly ve většině sledovaných vzorků nalezeny ve velmi nízkých hladinách. Významná exprese genu *CYP2E1* byla nalezena jak v nádorové tak i v okolní nenádorové tkáni. Exprese genu *CYP2E1* byla vyšší v nenádorové tkáni u pacientek, u kterých nebyla nalezena exprese PR. Vyšší exprese *CYP2E1* v nádorové tkáni byla nalezena u pacientek s invazivním lobulárním typem karcinomu. Nejvyšší expresní hladina byla nalezena u genu *CYP1B1* přičemž jeho exprese byla vyšší v okolní nenádorové tkáni oproti nádorové tkáni.

7. Literatura

1. Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:385-427.
2. Higgins CF, Gottesman MM. Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci.* 1992;17(1):18-21.
3. Sikic BI, Fisher GA, Lum BL, Halsey J, Beketic-Oreskovic L, Chen G. Modulation and prevention of multidrug resistance by inhibitors of P-glycoprotein. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1997;40:S13-19.
4. Itamochi H, Kigawa J, Terakawa N. Mechanisms of chemoresistance and poor prognosis in ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2008;99(4):653-8.
5. Peterson D, Lee J, Lei XC, Forrest WF, Davis DP, Jackson PK, Belmont LD. A chemosensitization screen identifies TP53RK, a kinase that restrains apoptosis after mitotic stress. *Cancer Res.* 2010;70(15):6325-35.
6. Kusunoki N, Takara K, Tanigawara Y, Yamauchi A, Ueda K, Komada F, Ku Y, Kuroda Y, Saitoh Y, Okumura K. Inhibitory effects of a cyclosporin derivative, SDZ PSC 833, on transport of doxorubicin and vinblastine via human P-glycoprotein. *Jpn J Cancer Res.* 1998;89(11):1220-28.
7. Ling V. Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1997;40:S3-8.
8. Kuwano M, Uchiyumi T, Hayakawa H, Ono M, Wada M, Izumi H, Kohno K. The basic and clinical

- implications of ABC transporters, Y-box-binding protein-1 (YB-1) and angiogenesis-related factors in human malignancies. *Cancer Sci.* 2003;94(1):9-14.
9. Mechetner E, Kyshtoobayeva A, Zonis S, Kim H, Stroup R, Garcia R, Parker RJ, Fruehauf JP. Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin. *Clin Cancer Res.* 1998;4(2):389-98.
 10. Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* 1999;59(1):8-13.
 11. Nakanishi T, Karp JE, Tan M, Doyle LA, Peters T, Yang W, Wei D, Ross DD. Quantitative analysis of breast cancer resistance protein and cellular resistance to flavopiridol in acute leukemia patients. *Clin Cancer Res.* 2003;9(9):3320-28.
 12. Daly AK, Cholerton S, Gregory W, Idle JR. Metabolic polymorphisms. *Pharmacol Ther.* 1993;57:129-60.
 13. Stiborová M, Hudeček J, Hodek P, Frei E. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. listy.* 1999;93:229-37.
 14. Vineis P, Malats N, Lang M, d'Errico A, Caporaso N, Cuzick J, Boffetta P. Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer. IARC Scientific Publication No. 148, IARC, Lyon, pp. 403–408.
 15. Hubackova M, Vaclavikova R, Mrhalova M, Kubackova K, Kodet R, Gut I, Soucek P.

- NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 Pro187Ser polymorphism and expression do not cosegregate with clinico-pathological characteristics of human mammary tumors. *Pharmacogenet Genomics*. 2009;19(7):505-12.
16. Hubackova M, Vaclavikova R, Ehrlichova M, Mrhalova M, Kodet R, Kubackova K, Vrana D, Gut I, Soucek P. Association of superoxide dismutases and NAD(P)H quinone oxidoreductases with prognosis of patients with breast carcinomas. *Int J Cancer*. 2012;130(2):338-48.
 17. Vaclavikova R, Nordgard SH, Alnaes GI, Hubackova M, Kubala E, Kodet R, Mrhalova M, Novotny J, Gut I, Kristensen VN, Soucek P. Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance gene 1 (ABCB1): effects on its expression and clinicopathological characteristics in breast cancer patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18(3):263-73.
 18. Sarmanova J, Susova S, Gut I, Mrhalova M, Kodet R, Adamek J, Roth Z, Soucek P. Breast cancer: role of polymorphisms in biotransformation enzymes. *Eur J Human Genet*. 2004;12:848-54.
 19. Menzel HJ, Sarmanova J, Soucek P, Berberich R, Grünewald K, Haun M, Kraft HG. Association of NQO1 polymorphism with spontaneous breast cancer in two independent populations. *Br J Cancer*. 2004;90:1989-94.
 20. Fowke JH, Shu XO, Dai Q, Jin F, Cai Q, Gao YT, Zheng W. Oral contraceptive use and breast cancer risk: modification by NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) genetic polymorphisms.

- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(8):1308-15.
21. Fagerholm R, Hofstetter B, Tommiska J, Aaltonen K, Vrtel R, Syrjäkoski K, Kallioniemi A, Kilpivaara O, Mannermaa A, Kosma VM, Uusitupa M, Eskelinen M, Kataja V, Aittomäki K, von Smitten K, Heikkilä P, Lukas J, Holli K, Bartkova J, Blomqvist C, Bartek J, Nevanlinna H. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 NQO1*2 genotype (P187S) is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer. *Nat Genet.* 2008;40(7):844-53.
 22. Costantini P, Jacotot E, Decaudin D, Kroemer G. Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(13):1042-53.
 23. Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, Ichimiya M, Sengupta S, Mechanic L, Okamura S, Hofseth LJ, Moake M, Nagashima M, Forrester KS, Harris CC. p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res.* 2004;64(7):2350-6.
 24. Sun W, Kalen AL, Smith BJ, Cullen JJ, Oberley LW. Enhancing the antitumor activity of adriamycin and ionizing radiation. *Cancer Res.* 2009;69(10):4294-300.
 25. Tripathi DN, Jena GB. Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes. *Mutat Res.* 2010;696(1):69-80.

26. Gong X, Kole L, Iskander K, Jaiswal AK. NRH:quinone oxidoreductase 2 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 protect tumor suppressor p53 against 20s proteasomal degradation leading to stabilization and activation of p53. *Cancer Res.* 2007;67(11):5380-8.
27. Razmara A, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V. Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Res.* 2007;1176:71-81.
28. Glynn SA, Boersma BJ, Howe TM, Edvardsen H, Geisler SB, Goodman JE, Ridnour LA, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Naume B, Kristensen VN, Chanock SJ, Wink DA, Ambs S. Mitochondrial target sequence polymorphism in manganese superoxide dismutase predicts inferior survival in breast cancer patients treated with cyclophosphamide. *Clin Cancer Res.* 2009;15:4165-73.
29. Yao S, Barlow WE, Albain KS, Choi JY, Zhao H, Livingston RB, Davis W, Rae JM, Yeh IT, Hutchins LF, Ravdin PM, Martino S, Lyss AP, Osborne CK, Abeloff MD, Hortobagyi GN, Hayes DF, Ambrosone CB. Manganese superoxide dismutase polymorphism, treatment-related toxicity and disease-free survival in SWOG 8897 clinical trial for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;124(2):433-9.
30. Teoh ML, Fitzgerald MP, Oberley LW, Domann FE. Overexpression of extracellular superoxide dismutase attenuates heparanase expression and inhibits breast

- carcinoma cell growth and invasion. *Cancer Res.* 2009;69(15):6355-63.
31. Wheeler MD, Smutney OM, Samulski RJ. Secretion of extracellular superoxide dismutase from muscle transduced with recombinant adenovirus inhibits the growth of B16 melanomas in mice. *Mol Cancer Res.* 2003;1(12):871-81.
 32. Teoh ML, Sun W, Smith BJ, Oberley LW, Cullen JJ. Modulation of reactive oxygen species in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(24):7441-50.
 33. Burger H, Foekens JA, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, Wiemer EA, Stoter G, Nooter K. RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. *Clin Cancer Res.* 2003;9(2):827-36.
 34. Chintamani, Singh JP, Mittal MK, Saxena S, Bansal A, Bhatia A, Kulshreshtha P. Role of p-glycoprotein expression in predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer--a prospective clinical study. *World J Surg Oncol.* 2005;3:61.
 35. Nobili S, Landini I, Giglioni B, Mini E. Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. *Curr Drug Targets.* 2006;7(7):861-79.
 36. Nordgard SH, Ritchie MD, Jensrud SD, Motsinger AA, Alnaes GI, Lemmon G, Berg M, Geisler S, Moore JH, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Kristensen VN. ABCB1 and GST polymorphisms associated with TP53 status in breast cancer. *Pharmacogenet Genomics.* 2007;17(2):127-36.

37. Seymour L, Bezwoda WR, Dansey RD. P-glycoprotein immunostaining correlates with ER and with high Ki67 expression but fails to predict anthracycline resistance in patients with advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1995;36(1):61-9.
38. Kirchheiner J, Brockmoller J. Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;77:1-16.
39. Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:737-47.
40. Huang Z, Fasco MJ, Figge HL, Keyomarsi K, Kaminsky LS. Expression of cytochromes P450 in human breast tissue and tumors. *Drug Metab Dispos.* 1996;24(8):899-905.
41. Haas S, Pierl C, Harth V, Pesch B, Rabstein S, Bruning T, Ko Y, Hamann U, Justenhoven C, Brauch H, Fischer HP. Expression of xenobiotic and steroid hormone metabolizing enzymes in human breast carcinomas. *Int J Cancer.* 2006;119:1785-91
42. Modugno F, Knoll C, Kanbour-Shakir A, Romkes M. A potential role for the estrogen-metabolizing cytochrome P450 enzymes in human breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;82:191-97.
43. Iscan M, KLaavuniemi T, Coban T, Kapucuoglu N, Pelkonen O, Raunio H. The expression of cytochrome P450 enzymes in human breast tumours and normal breast tissue. *Breast Cancer Res Treat.* 2001;70(1):47-54.

44. Hellmold H, Rylander T, Magnusson M, Reihner E, Warner M, Gustafsson JA. Characterization of cytochrome P450 enzymes in human breast tissue from reduction mammoplasties. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(3):886-95.
45. Kawashiro T, Yamashita K, Zhao XJ, Koyama E, Tani M, Chiba K and Ishizaki T. A study on the metabolism of etoposide and possible interactions with antitumor or supporting agents by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;286:1294-1300
46. Huang Z, Fasco MJ, Figge HL, Keyomarsi K, Kaminsky LS. Expression of cytochromes P450 in human breast tissue and tumors. *Drug Metab Dispos.* 1996;24(8):899-905.
47. McFadyen MC, Murray GI. Cytochrome P450 1B1: a novel anticancer therapeutic target. *Future Oncol.* 2005;1(2):259-63.