

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Doktorský studijní program v biomedicíně

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

**MUDr. Helena Skálová**

**Studium biomarkerů karcinomu prsu po neoadjuvantní léčbě**

***Breast cancer biomarkers after neoadjuvant therapy***

Dizertační práce

Školitel:

Ing. Daniel Tvrđík, Ph.D., Prof. MUDr. Ctibor Povýřil, DrSc.

Praha, 2019

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 30. 10. 2019

HELENA SKÁLOVÁ

Podpis

**Identifikační záznam:**

SKÁLOVÁ, Helena. *Studium biomarkerů karcinomu prsu po neoadjuvantní léčbě. [Breast cancer biomarkers after neoadjuvant therapy.]* Praha 2019. 118 stran. Doktorská dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav patologie 1. LF UK a VFN. Školitel Tvrdík, Daniel; Povýšil, Ctibor.

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala svým školitelům ing. Danielu Tvrdíkovi, Ph.D. a prof. MUDr. Ctiboru Povýšilovi, DrSc. za vedení a podporu, RNDr. Ivaně Tiché, Ph.D. za cenné rady a své rodině za velkou trpělivost.

Dizertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu v biomedicině na Ústavu patologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v letech 2010–2019 s podporou grantových projektů Ministerstva zdravotnictví (IGA-MZ-ČR-NS/10575-3, MZ ČR-RVO VFN64165), Univerzity Karlovy (Program Progres Q28/LF1, UNCE 204065 a SVV 260367), Evropského fondu pro regionální rozvoj (Projekt BBMRI-CZ No:EF16\_013/0001674) a Operačního Programu Praha Konkurenceschopnost (OPPK, Výzkumná laboratoř nádorových onemocnění, CZ.2.16/3.1.00/24509).

## Abstrakt

Chemoterapie je jednou základních léčebných modalit karcinomu prsu, která chirurgickému odstranění nádoru může předcházet a/nebo jej následovat jako součást neoadjuvantní resp. adjuvantní léčby. Selektivní tlak chemoterapie na nádorové buňky však může vést ke změně jejich molekulárního a expresního profilu a následně i chemosenzitivity a zásadně tak ovlivnit další průběh léčby. Cílem této práce bylo zmapovat změny v expresi vybraných markerů v karcinomu prsu po neoadjuvantní chemoterapii, které by mohly přispět k porozumění, jakou roli tyto proteiny a geny sehrávají při odpovědi nádoru na léčbu a vzniku chemorezistence.

Imunohistochemická analýza exprese standardních markerů karcinomu prsu [estrogenových (ER) a progesteronových receptorů (PR), HER2 a proliferační aktivity (Ki67)] a proteinů mezibuněčných spojů (claudinů 1, 3 a 4, E- a N-cadherinu) před a po neoadjuvantní chemoterapii odhalila pokles exprese PR, Ki67 a claudinu 3 a zvýšení exprese claudinu 1. Exprese ER, HER2, claudinu 4, E- a N-cadherinu se významněji nezměnila. Stanovení exprese standardních markerů je součástí rutinního biotického vyšetření vzorků karcinomu prsu a je nezbytné pro indikaci léčby. Naše výsledky podporují současná doporučení pro opakování vyšetření před indikací adjuvantní chemoterapie. Claudiny a cadheriny se podílejí na regulaci epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT), která ovlivňuje chemosenzitivitu nádoru. Změna v expresi claudinů 1 a 3 po léčbě by mohla svědčit pro jejich zapojení v odpovědi nádorové tkáně na chemoterapii. Exprese standardních markerů navíc korelovala s expresí claudinu 1 a N-cadherinu.

V další části práce jsme metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí (qRT-PCR) stanovili transkripční profil 84 genů asociovaných s apoptózou, jejíž funkční mechanismus je pro chemosenzitivitu nádorových buněk zásadní. Panel 13 genů, jejichž exprese se po léčbě změnila (*MCL1*, *IGF1R*, *BCL2L10*, *BCL2A1*, *HRK*, *CASP8*, *CASP10*, *CASP14*, *FADD*, *TNFRSF25*, *TNFSF8*, *CD70* a *CIDEB*), by mohl najít uplatnění jako součást multigenové eseje pro zpřesnění stratifikace pacientek dle očekávané prognózy.

Výsledky dizertační práce upozorňují na možné změny v expresním profilu karcinomu prsu po chemoterapii, které mohou ovlivnit průběh další léčby, a rozšiřují znalosti o konkrétních proteinech a genech, jejichž exprese může souviset s odpovědí nádoru na léčbu.

**Klíčová slova:** HER2, claudiny, cadheriny, apoptóza, karcinom prsu, chemoterapie

## Abstract

Chemotherapy is one of the basic therapeutic procedures of breast cancer (BC) which may precede and/or follow the surgical resection of a tumor as a part of neoadjuvant or adjuvant therapy. However, the selective pressure of chemotherapy on tumor cells may change their molecular and expression profile and thus also their chemosensitivity. The aim of our work was to document the expression changes of selected markers in BC after neoadjuvant chemotherapy, which may contribute to the understanding of the role of these proteins and genes in tumor response to chemotherapy and the development of chemoresistance.

Immunohistochemical analysis of expression of standard BC markers [estrogen (ER) and progesterone receptors (PR), HER2 and proliferation activity (Ki67)] and intercellular junction proteins (claudin 1, 3 and 4, E- and N-cadherin) before and after neoadjuvant chemotherapy revealed a decrease of PR, Ki67 and claudin 3 expression and an increase of claudin 1 expression. The expression of ER, HER2, claudin 4, E- and N-cadherin proved to be stable. Assessment of standard BC markers is performed routinely during a bioptic investigation as a necessary factor for therapy indication. Our results support the current recommendations for the re-examination before indication of adjuvant chemotherapy. Claudins and cadherins participate in the regulation of epithelial-mesenchymal transition (EMT), which affects tumor chemosensitivity. The changes of claudin 1 and 3 expression indicate their involvement in the response of BC to chemotherapy. Moreover, the expression of standard BC markers correlated with the expression of claudin 1 and N-cadherin.

Further, using real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR), we evaluated the transcriptional profile of 84 genes associated with apoptosis, which serves a key role in tumor chemosensitivity. We proposed a panel of 13 genes with different expression before and after therapy (*MCL1*, *IGF1R*, *BCL2L10*, *BCL2A1*, *HRK*, *CASP8*, *CASP10*, *CASP14*, *FADD*, *TNFRSF25*, *TNFSF8*, *CD70* and *CIDEB*), which can be employed in multigene assays to provide a more precise estimation of the patient's prognosis.

Our work presents changes of the expression profile of BC after chemotherapy that might affect further course of treatment. Our results expand knowledge about proteins and genes involved in tumor response to therapy.

**Key words:** HER2, claudins, cadherins, apoptosis, breast cancer, chemotherapy

## Seznam použitých zkratk

AI	apoptotický index
cDNA	komplementární DNA
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DCIS	duktální karcinom <i>in situ</i>
EMT	epiteliálně-mezenchymální tranzice
ER	estrogenové receptory
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
HE	hematoxylin-eosin
IHC	imunohistochemie
ILC	invazivní lobulární karcinom
NST	(invazivní karcinom prsu) nespecifického typu, duktální
PR	progesteronové receptory
PCR	polymerázová řetězová reakce
pCR	kompletní patologická odpověď
PFS	přežití bez progresu
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
TDT	terminální deoxynukleotidyltransferáza
TMA	tkáňový mikročip
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling
WHO	Světová zdravotnická organizace

## Seznam tabulek a obrázků

Tabulka 1. HER2: klinicko-patologická charakteristika 20 případů karcinomu prsu před a po léčbě.

Tabulka 2. Geny asociované s apoptózou: klinicko-patologická charakteristika 16 případů karcinomu prsu před a po léčbě.

Tabulka 3. Claudiny a cadheriny: klinicko-patologická charakteristika 62 případů karcinomu prsu včetně porovnání stadia onemocnění a stupně diferenciacie nádoru před a po léčbě.

Tabulka 4. Claudiny, cadheriny a standardní markery karcinomu prsu: imunohistochemická charakteristika 62 případů invazivního karcinomu prsu nespecifického typu (NST) před a po léčbě.

Tabulka 5. Korelace exprese claudinů 1 a 3 se standardními markery karcinomu prsu a markery EMT.

Tabulka 6. (A) Korelace exprese E-cadherinu se standardními markery karcinomu prsu a N-cadherinem. (B) Korelace exprese N-cadherinu se standardními markery karcinomu prsu a E-cadherinem.

Obrázek 1. Reprezentativní příklad invazivního karcinomu prsu nespecifického typu (NST, duktálního) před a po neoadjuvantní chemoterapii: (A) Invazivní karcinom NST solidního uspořádání v core cut biopsii před léčbou; HE, 200x. (B) Reziduální karcinom převážně solidního uspořádání s ložisky kribriformní úpravy s regresivními změnami [ložiskovou nekrózou (černé hvězdičky) a fibrózou (bílá hvězdička)] po léčbě; HE, 100x.

Obrázek 2. Imunohistochemické vyšetření HER2: (A – případ č. 1, C – případ č. 4) Silná membránová pozitivita (3+) před neoadjuvantní chemoterapií, 200x. (B - případ č. 1) Velmi slabá nekompletní membránová pozitivita (1+) po léčbě, 200x. (D – případ č. 4) Úplná absence zbarvení (0) po léčbě, 200x.

Obrázek 3. Vyšetření HER2 pomocí dvoubarevné fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) za použití sond pro gen *HER2* (červené signály) a centromeru chromozomu 17 (CEP17, zelené signály): (A – případ č. 1, C – případ č. 4) Amplifikace signálů HER2 před léčbou, 1000x. Poměr HER2/CEP17 byl 3,6 (A) a 6,4 (C). (B – případ č. 1, D – případ č. 4) Bez amplifikace



po léčbě, 1000x. Poměr HER2/CEP17 byl 1,5 (B) a 1,3 (D). Pozitivní výsledek byl definován jako  $HER2/CEP17 > 2$ .

Obrázek 4. Expresce HER na úrovni mRNA stanovená pomocí qRT-PCR: (A - případ č. 1., B - případ č. 4) Výsledek pozitivní pro amplifikaci HER2 byl definován jako poměr  $HER2 : RPL23 > 2$  ( $p < 0.05$ , párový t-test).

Obrázek 5. Reprezentativní příklad změny statusu HER2 z negativního před neoadjuvantní chemoterapií na pozitivní po chemoterapii [výsledek imunohistochemického vyšetření (IHC) byl potvrzen fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH)]: (A) Negativní HER2 v core cut biopsii před léčbou; IHC, 400x. (B) Slabá až středně silná membránová pozitivita HER2 u více než 10 % nádorových buněk hodnocená jako 2+ (pozitivní); IHC, 400x. (C, D) Dvoubarevná FISH se sondami pro gen *HER2* (červené signály) a centromeru chromozomu 17 (CEP17, zelené signály); 1000x. Poměr HER2/CEP17 byl 1,6 před (C) a 3,4 po léčbě (D); pozitivní výsledek byl definován jako  $HER2/CEP17 > 2$ .

Obrázek 6. Reprezentativní příklady změn exprese claudinů v invazivním karcinomu prsu nespecifického typu (NST) po neoadjuvantní chemoterapii stanovené imunohistochemicky: (A) Slabá tečkovitá membránová pozitivita claudinu 1 v core cut biopsii před léčbou; 200x. (B) Silná souvislá membránová pozitivita claudinu 1 v reziduální nádorové tkáni u stejné pacientky; 600x. (C) V některých buňkách tečkovitá, v jiných až souvislá membránová pozitivita claudinu 1 v core cut biopsii před léčbou; 200x. (D) Obdobný charakter exprese claudinu 1 v reziduální nádorové tkáni u stejné pacientky. Intenzivnější kontinuální pozitivitu lze pozorovat v ložiscích duktálního karcinomu *in situ* (DCIS, černá šipka) a drobném nenádorovém vývodu (bílá šipka); 200x. (E) Převážně souvislá membránová pozitivita claudinu 3 v core cut biopsii; 600x. (F) Téměř nerozeznatelné ložiskové membránové zbarvení claudinu 3 v reziduální nádorové tkáni u stejné pacientky; 600x. (G) Středně silná membránová pozitivita claudinu 4 ve většině nádorových buněk v core cut biopsii před léčbou; (retrakční artefakty) 600x. (H) Obdobný charakter exprese claudinu 4 v reziduální nádorové tkáni u stejné pacientky; 200x.

Obrázek 7. Reprezentativní příklad imunohistochemicky stanovené exprese claudinů v nenádorové tkáni mléčné žlázy: (A) Nenádorový vývod (černá šipka) obklopený invazivním karcinomem nespecifického typu (NST, duktálním), který se disperzně šíří v podobě drobných shluků buněk (bílá šipky) ve vazivovém stromatu. V přehledně zachycené části vývodu je exprese claudinu 1 soustředěná do apikální a přilehlé laterální části membrány

luminálních buněk. V tomto případě nádorové buňky exprimovaly claudin 1 s přibližně stejnou intenzitou, nicméně bez polaritu zřetelné u buněk nenádorových; 200x. (B) Terminální tubulo-lobulární jednotka s predominantně apikální expresí claudinu 1, která je obvykle slabší intenzity než exprese claudinu 3 a 4; 200x. (C, D) Stejná terminální tubulo-lobulární jednotka se silnou souvislou expresí claudinu 3, respektive claudinu 4 v apikální a laterální části membrány luminálních buněk; 200x.

Obrázek 8. Změny exprese claudinů po neoadjuvantní chemoterapii. Exprese claudinu 1 po léčbě vzrostla, zatímco exprese claudinu 3 poklesla. V expresi claudinu 4 k významným změnám nedošlo.

Obrázek 9. Reprezentativní příklad detekce apoptoticky zanikajících buněk. (A – před léčbou, B – po léčbě) Imunohistochemické vyšetření pomocí protilátky specifické proti aktivované kaspáze 3 s cytoplazmatickou pozitivitou apoptoticky zanikajících buněk, 200x. (C – před léčbou, D – po léčbě) Zelená fluorescence v jádrech apoptoticky zanikajících buněk, kde došlo k inkorporaci fluoresceinu-12-dUTP, 1000x.

Obrázek 10. Dendrogram z hierarchické shlukové analýzy exprese genů asociovaných s apoptózou v karcinomu prsu u 16 pacientek. Profilování genové exprese bylo provedeno pomocí qRT-PCR. Nadprůměrná exprese pro daný gen je znázorněna červenými čtverci, podprůměrná zelenými. Větve reprezentující případy s dobrou odpovědí na léčbu jsou znázorněny modře, se špatnou odpovědí na léčbu červeně.

Obrázek 11. Doba přežití bez progresu (progression-free survival, PFS). Analýza exprese 13 genů asociovaných s apoptózou ukázala významný rozdíl mezi skupinami s dobrou a špatnou prognózou ( $p < 0.05$ ).

Obrázek 12. Změny v expresi genů asociovaných s apoptózou po léčbě. Dvojnásobná změna v genové expresi byla stanovena jako práh pro hodnocení upregulace (kladné hodnoty) a downregulace (záporné hodnoty). V expresi uvedených genů před a po léčbě byly zjištěny významné rozdíly ( $p < 0.05$ ).

## Obsah

1. ÚVOD .....	12
1.1. Léčba karcinomu prsu a indikace chemoterapie.....	12
1.2. Standardní markery karcinomu prsu.....	15
1.2.1. Estrogenové a progesteronové receptory.....	16
1.2.2. HER2 .....	16
1.2.3. Proliferační aktivita (Ki67) .....	17
1.3. Molekulární klasifikace karcinomu prsu.....	17
1.4. Claudiny a cadheriny .....	19
1.4.1. Cadheriny a EMT.....	20
1.4.2. Claudiny .....	20
1.5. Role apoptózy v karcinogenezi a protinádorové léčbě .....	21
1.5.1. Mechanismus apoptózy.....	23
1.5.2. Morfologické změny při apoptóze.....	24
2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE .....	25
3. MATERIÁL A METODY .....	27
3.1. Tkáňové vzorky.....	27
3.2. Histologické vyšetření .....	27
3.3. IHC, cytogenetické a molekulárně biologické vyšetření HER2 .....	28
3.3.1. IHC vyšetření HER2 .....	28
3.3.2. Cytogenetické vyšetření HER2 - FISH .....	28
3.3.3. Molekulárně biologické vyšetření HER2 – qRT-PCR .....	29
3.4. IHC vyšetření hormonálních receptorů a Ki67 .....	30
3.5. IHC vyšetření cludinů a cadherinů.....	30
3.6. Detekce apoptoticky zanikajících buněk .....	32
3.7. Molekulárně biologická analýza genů asociovaných s apoptózou.....	33
3.7.1. Izolace RNA.....	33
3.7.2. Real-Time PCR (profilování genové exprese) .....	33
3.8. Statistická analýza .....	35
4. VÝSLEDKY .....	36
4.1. Klinicko-patologická charakteristika, histomorfologické změny nádorů po léčbě.....	36
4.2. Vyšetření standardních markerů karcinomu prsu.....	41
4.2.1. Vyšetření HER2 pomocí IHC, FISH a qRT-PCR .....	41

4.2.2.	IHC vyšetření hormonálních receptorů a proliferační aktivity .....	45
4.3.	IHC analýza claudinů 1, 3 a 4 a E- a N-cadherinu .....	46
4.4.	Korelace exprese claudinů, cadherinů a standardních markerů .....	50
4.5.	Geny apoptózy.....	54
4.5.1.	Detekce apoptoticky zanikajících buněk .....	54
4.5.2.	Profilování genové exprese .....	55
5.	DISKUZE .....	58
6.	ZÁVĚR .....	69
7.	LITERATURA .....	73
8.	SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA.....	87
9.	PUBLIKACE, KTERÉ JSOU PODKLADEM DIZERTAČNÍ PRÁCE .....	91

## 1. ÚVOD

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem žen a druhým nejčastějším vůbec, s vysokou incidencí zejména v rozvinutých zemích. V České republice je každoročně diagnostikováno více než 6500 nových onemocnění a přibližně 2000 pacientek na karcinom prsu zemře (UZIS-ČR, 2017). Setrvalý mírný vzestup incidence byl v rozvinutých zemích zastaven mamografickým screeningem, v České republice prováděným plošně od roku 2002, díky kterému je onemocnění nezhoubná zachyceno a odstraněno již v preinvasivním stadiu. Záchyt preinvasivních a časných stádií onemocnění spolu s rozvojem nových léčebných postupů se však odráží zejména na poklesu mortality (Lakhani S. R. et al., 2012; UZIS-ČR, 2017).

Histologická klasifikace karcinomu prsu nyní zahrnuje více než 20 typů, z nichž nejčastější je invazivní karcinom nespecifického typu (NST, invasive carcinoma of no special type) neboli duktální, který ze všech zhoubných nádorů prsu tvoří 40–75 %. Široký rozptyl hodnot je daný značnou heterogenitou této skupiny, kam spadají nádory bez specifických morfologických rysů, jejichž absence znemožňuje stanovit přesná klasifikační kritéria. Vyskytuje se u pacientek všech věkových kategorií, nicméně stejně jako karcinom prsu obecně je málo častý před 40. rokem. 5–10 % všech karcinomů prsu představuje hereditární forma podmíněná zárodečnou mutací genu *BRCA1* nebo *BRCA2*, také nejčastěji v podobě invazivního karcinomu NST (Lakhani S. R. et al., 2012).

### 1.1. Léčba karcinomu prsu a indikace chemoterapie

Základem léčby je chirurgická resekce nádoru, v indikovaných případech doplněná o lymfadenektomii. Stále významnější roli však hraje předcházející, tzv. neoadjuvantní, či následná, tzv. adjuvantní chemoterapie, obvykle v kombinaci s radioterapií, hormonální terapií a ve vybraných případech tzv. cílenou biologickou léčbou. Použití neoadjuvantní chemoterapie ve více než 80 % případů vede k redukci objemu primárního nádoru a umožnění tzv. prs šetřícího chirurgického výkonu a případně snížení počtu postižených lymfatických

uzlin (Buchholz T. A. et al., 2003). Adjuvantní chemoterapie cílí na reziduální ložiska nádoru, cirkulující nádorové buňky nebo incipientní metastázy, které se nacházejí mimo resekovanou oblast. Prognóza pacientek s časným stadiem karcinomu prsu se výrazně zlepšila a v současnosti je velmi dobrá jak díky včasnému záchytu mamografickým screeningem, tak díky zavedení adjuvantní a později neoadjuvantní chemoterapie u pacientek s vysokým rizikem rekurence nádoru (Lakhani S. R. et al., 2012). Podle Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group u rizikových pacientek s agresivním typem nádoru neo/adjuvantní chemoterapie snižuje mortalitu až o 38 % a v kombinaci s hormonální léčbou až o polovinu, zatímco pacientky s nízkým rizikem relapsu z neo/adjuvantní chemoterapie neprofitují a při jejím podání by byly zbytečně vystaveny jejím vedlejším účinkům (Clarke M. et al., 2005).

Rozhodnutí o podání chemoterapie tedy závisí na odhadu rizika relapsu onemocnění. St. Gallen Consensus Panel v roce 2005 ustanovil tři stupně rizika – nízké, střední a vysoké (Goldhirsch A. et al., 2009). Odhad je založen na kombinaci klinických a patologických faktorů, které zahrnují věk pacientky, velikost primárního nádoru, počet postižených lymfatických uzlin, přítomnost vaskulární invaze, histologický typ nádoru, stupeň diferenciac (grade) a imunohistochemické (IHC) znaky zahrnující proliferativní aktivitu (Ki67), expresi estrogenových (ER) a progesteronových receptorů (PR) a HER2 (Eifel P. et al., 2001; Buchholz T. A. et al., 2003; Goldhirsch A. et al., 2005). Za špatné prognostické faktory se považují věk pacientky pod 35 let, velikost nádoru přesahující 2 cm, pozitivní lymfatické uzliny či vaskulární invaze, nízká diferenciac nádoru, vysoká proliferativní aktivita, absence exprese hormonálních receptorů a overexprese HER2 (Oakman C. et al., 2010).

Rutině používaný model má však své limity zejména u pacientek se středním stupněm rizika relapsu onemocnění, kdy není zřejmé, pro které z nich bude neo/adjuvantní chemoterapie přínosem a pro které zbytečnou zátěží. Navíc není dostatečný pro predikci odpovědi na konkrétní režim chemoterapie, která může být značně odlišná i u nádorů shodné morfologie a stadia (Pusztai L., 2009; Bauer K. et al., 2010). Tyto rozpory odráží značně heterogenní genetickou podstatu karcinomu prsu a nutnost rozšíření prognostických a prediktivních modelů pro individualizaci léčby tak, aby byla tzv. šitá na míru pacientce i nádoru (Pusztai L., 2009). Za tímto účelem byla vyvinuta řada multigenových esejí, které stanovují stupeň rizika relapsu onemocnění na základě exprese stanoveného souboru genů asociovaných s nádorem. Některé z nich jako např. MammaPrint, PAM50 (Prosigna kit) a Oncotype DX Breast Recurrence Score byly schváleny Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv

(Food and drug administration) v USA pro klinické použití jako doplňující vyšetření u pacientek s časným, hormonálně dependentním nádorem (Gyorffy B. et al., 2015). V posledních letech jsou tato vyšetření k dispozici i pro pacientky v ČR (Bielcikova Z. et Petruzelka L., 2016). Následné studie však odhalily nezanedbatelnou diskordanci při porovnání výsledků nejčastěji používaných testů u jednotlivých případů a mezinárodní guidelines použití molekulárních testů v rutinní praxi zatím spíše nedoporučují pro nutnost jejich další validace (Lakhani S. R. et al., 2012; Gyorffy B. et al., 2015; Ellis I. O. et al., 2016). Tou se zabývala rozsáhlá studie TAILORx, která vyhodnotila jako nejspolehlivější genomický test pro pacientky se středním rizikem relapsu Oncotype DX Breast Recurrence Score, jehož perspektiva využití v klinické praxi tím výrazně stoupla (Telli, M. L. et al., 2019).

Na základě jedné z multigenových esejí byla vyvinuta tzv. molekulární klasifikace karcinomu prsu, jejíž terminologie po přijetí na St. Gallen Consensus Conference v roce 2011 figuruje v mezinárodních guidelines (Perou C. M. et al., 2000; Gnant M. et al., 2011). Dosud však není ustálená a její klinický přínos je sporný (Ellis I. O. et al., 2016). Zejména v souvislosti s molekulární klasifikací karcinomu prsu vzrostl počet studií zabývajících se rodinou proteinů mezibuněčných těsných spojů, claudinů a jejich možného prognostického a prediktivního významu (Myal Y. et al., 2010; Prat A. et al., 2010; Kwon M. J., 2013). Vzhledem k tomu, že jsou zřejmě zapojeny do regulace nádorových kmenových buněk a spolu s molekulami adhezních spojů, cadheriny, se podílejí na procesu epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT), jejich exprese může mít význam pro vznik chemorezistence nádoru (Kwon M. J., 2013; Lin X. et al., 2013; Zhou B. et al., 2015). Další studie navíc naznačují jejich pravděpodobné zapojení do mnoha dalších kroků karcinogeneze (Turksen K. et Troy T. C., 2011; Ding L. et al., 2013). Některé z claudinů také představují slibný cíl protinádorové léčby, která by v budoucnu mohla podpořit efekt chemoterapie zejména u chemorezistentních nádorů (Morin P. J., 2005; Saeki R. et al., 2009; Walther W. et al., 2012). Další oblastí s velkým potenciálem pro predikci, nebo dokonce ovlivnění odpovědi na léčbu je komplexní mechanismus apoptózy, jejíž změny jsou zcela klíčové jak při karcinogenezi, tak při odpovědi nádorových buněk na léčbu včetně vzniku chemorezistence (Wong R., 2011; Hassan M. et al., 2014).

Změny nádorové tkáně vyvolané léčbou se odehrávají jak na úrovni morfologické, tak molekulární. Selekcí tlak chemoterapie vede ke změně profilu exprese přežívajících nádorových buněk, které se tak mohou stát na aktuální léčbu rezistentní (Ryška A., 2015).

Změna expresního profilu nádoru může být významná zejména u pacientek, které v průběhu léčby podstoupí jak neoadjuvantní, tak adjuvantní chemoterapii, a na těchto nádorech lze zároveň tyto změny zachytit porovnáním stavu před a po chemoterapii. Jejich mapování může přispět k porozumění, jakou roli tyto geny a jejich produkty sehrávají při odpovědi nádorových buněk na léčbu.

V naší práci jsme se zaměřili na změny exprese vybraných proteinů/genů v nejčastějších histologických typech karcinomu prsu po neoadjuvantní chemoterapii. Zahrnuli jsme do ní jak standardně vyšetřované markery karcinomu prsu (ER, PR, HER2 a Ki67), z nichž všechny nesou významnou prognostickou i prediktivní výpovědní hodnotu, tak proteiny/geny, které by se mohly uplatnit v budoucnu jako součást prognosticko-prediktivních multigenových panelů či jako cíle biologické léčby v rámci komplexního individualizovaného přístupu (claudiny, cadheriny, geny asociované s apoptózou).

## 1.2. Standardní markery karcinomu prsu

Mezi rutinně IHC vyšetřované markery karcinomu prsu patří ER, PR, HER2 a proliferační aktivita stanovená pomocí exprese proteinu Ki67. Vyšetření exprese hormonálních receptorů je nezbytné pro indikaci hormonální terapie, na kterou jsou citlivé pouze karcinomy hormonálně dependentní. Obdobně, pouze pacientky s nádorem overexprimujícím HER2 budou profitovat z biologické léčby cílenou anti-HER2 protilátkou (Lakhani S. R. et al., 2012). Samostatně i v kombinaci umožňují tyto 4 markery odhad biologického chování nádoru, mají prognostický význam a spolu s dalšími výše uvedenými klinicko-patologickými faktory jsou nezbytné pro odhad rizika relapsu onemocnění a tedy indikaci chemoterapie (Eifel I. O. et al., 2001; Buchholz T. A. et al., 2003; Goldhirsch A. et al., 2005). Zcela obecně lze říci, že agresivní nádory, které častěji ztrácí expresi hormonálních receptorů, overexprimují HER2 a mají vyšší Ki67, jsou citlivější na chemoterapii než nádory s vysokou expresí ER a PR, negativním HER2 a nízkou Ki67 (Goldhirsch A. et al., 2009). Hormonální receptory a Ki67 jsou však podstatně silnějším prognostickým ukazatelem než HER2 (Bauer K. et al., 2010). Příkladem je skupina tzv. triple-negativních karcinomů prsu, agresivních nádorů, které neexprimují hormonální receptory ani HER2. V porovnání s nádory hormonálně dependentními a/nebo overexprimujícími HER2 pro pacientku znamenají horší prognózu a omezené možnosti léčby z důvodu absence cílových molekul, nicméně bývají chemosenzitivní (Aysola K. et al., 2013).



### 1.2.1. Estrogenové a progesteronové receptory

Průkaz ER a později i PR má dlouhou historii, jedná se totiž o nejstarší prediktivní markery u solidních nádorů. Přítomnost ER byla v karcinomu prsu prokázána již v 50. letech minulého století a již od počátku byl zřejmý vliv aktivace ER estrogenem na růst nádorové tkáně (Vuong D. et al., 2014; Ryška A., 2015). Obdobný efekt má aktivace PR progesteronem, přičemž exprese PR je regulovaná ER (Thakkar J. P., 2011). Od 70. let je průkaz ER využíván pro predikci odpovědi karcinomu na hormonální léčbu antagonisty estrogenu, z nichž nejznámější je tamoxifen, který se váže na ER a blokuje tak přístup estrogenu (Lakhani S. R. et al., 2012). Zpočátku byly ER detekovány biochemicky z nativní homogenizované tkáně, nástup IHC však toto vyšetření podstatně zjednodušil a zpřístupnil pro rutinní použití, které je pro indikaci hormonální terapie nezbytné. Přibližně 80 % invazivních karcinomů prsu exprimuje ER a 50–70 % současně PR (Ryška A., 2015). Citlivost nádoru k hormonální terapii koreluje s intenzitou exprese obou receptorů (Lakhani S. R. et al., 2012).

### 1.2.2. HER2

Protein HER2 (human epidermal growth factor receptor 2, další možná označení HER2/neu, ERBB2, EGFR2) je znám od počátku 80. let minulého století. Spolu s HER1 (EGFR), HER3 a HER4 patří do rodiny receptorů pro epidermální růstový faktor, transmembránových glykoproteinů s tyrosinkinázovou aktivitou (Duffy M. J., 2005). Aktivace těchto receptorů navázáním ligandu na extracelulární doménu spustí jejich homo- nebo heterodimerizaci a poté fosforylaci intracelulární domény. Jediný HER2 z této rodiny má extracelulární doménu slepou a dimerizuje spontánně. Vzhledem k tomu, že se tyto receptory podílejí na regulaci buněčné proliferace, diferenciace a přežití, zvýšená aktivace signální dráhy v nádorových buňkách vede k jejich proliferaci,ablokování apoptózy a zvýšené neovaskularizaci nádoru a schopnosti metastazovat (Davoli A. et al., 2010; Ryška A., 2015).

Studie z konce minulého století udávaly frekvenci overexprese HER2 v karcinomu prsu 20–40 % (Slamon D. J. et al., 1989), současné údaje jsou o něco nižší, v české populaci se nyní uvádí 12–15 %. Rozdíl spočívá jak ve výběru pacientek, tak v trvalém poklesu relativního zastoupení HER2, ke kterému v populaci dochází. Zastoupení HER2 pozitivních nádorů se mění podle věku a rasy pacientek, ale je také ovlivněno užíváním hormonálních kontraceptiv a substituční terapie (Ryška A., 2015).

Overexprese HER2 je způsobená amplifikací protoonkogenu *c-erbB-2* lokalizovaném na dlouhém raménku 17. chromozomu. Při rutinním vyšetření karcinomu prsu je stav HER2 stanoven IHC, přičemž hraniční pozitivita je v dalším kroku ověřena pomocí molekulárních metod, nejčastěji fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Do 90. let minulého století HER2 sloužil jako špatný prognostický ukazatel, pro pacientku znamenající vyšší riziko rekurence a kratší dobu přežití vzhledem k nižší diferenciaci a vyšší agresivitě HER2-pozitivních nádorů a častějším uzlinovým metastázám (Slamon D. J., et al. 1989; Paterson M. C. et al., 1991; Press M. F. et al., 1997; Andrulis I. L. et al., 1998). Později byla vyvinuta tzv. biologická léčba karcinomu prsu anti-HER2 protilátkou trastuzumabem, která se váže na extracelulární doménu receptoru, čímž blokuje heterodimerizaci, brání spuštění signální dráhy a navíc indukuje cytotoxicitu závislou na Fc receptoru (Davoli A. et al., 2010). Z HER2 se tím stal prediktivní marker, jehož status je nezbytné znát před indikací léčby. Kromě zřejmé souvislosti s odpovědí na léčbu anti-HER2 protilátkami se navíc ukázalo, že overexprese HER2 je prediktorem dobré odpovědi na neoadjuvantní chemoterapii (Quddus R. M. et al., 2005).

### 1.2.3. Proliferační aktivita (Ki67)

Proliferační aktivita (Ki67) má prognostickou i prediktivní výpovědní hodnotu. Větší zastoupení proliferujících buněk znamená agresivnější nádor, který ale na druhou stranu lépe reaguje na chemoterapii i hormonální léčbu (Viale G. et al., 2008). Přestože se jedná o jeden z klíčových faktorů při rozhodování o léčbě, jeho vyšetření má zejména v malých vzorcích z punkční jehlové (core cut) biopsie své limity, které jsou dané zejména nestejným rozmístěním proliferujících buněk ve tkáni, ale i poměrně nízkou shodou mezi hodnotícími patology (Ryška A., 2015).

## 1.3. Molekulární klasifikace karcinomu prsu

Kromě výzkumu zaměřeného na jednotlivé markery či jejich malé skupiny se od konce 90. let s nástupem vysokokapacitní analýzy genové exprese a zejména technologie mikročipů (microarrays) začaly uplatňovat profily genové exprese, tedy modely zahrnující desítky až desítky tisíc proměnných i jejich vzájemné vazby (Reis-Filho J. S. et al., 2006). Na základě jedné z těchto metod vznikla molekulární klasifikace karcinomu prsu, která jej dělí do následujících podtypů: luminální (luminal) A a B, HER2-pozitivní (HER2-enriched), bazální

(basal-like) a podobné normální prsní žláze (normal-like) (Perou C. M. et al., 2000). Označení jednotlivých skupin vychází ze struktury normální prsní žlázy s hormonálně dependentními luminálními buňkami zodpovědnými za produkci mléka, zevně obklopenými myoepiteliemi, tedy buňkami bazálními, které hormonální receptory postrádají. Pro zjištění příslušné podskupiny a zároveň rizika relapsu nemoci lze použít test PAM50 (The Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay), vyšetření exprese 50 genů z mRNA pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí (qRT-PCR). Z následných studií však vyplývají jak návrhy na další subtypizaci stávajících kategorií, např. luminální typ C, tak na nové skupiny nádorů s vlastnostmi více či méně odlišnými od předchozích, např. claudin-low nebo claudin-high (Myal Y. et al.; 2010; Prat A. et al.; 2010). Podle většiny mezinárodních guidelines není test PAM50 doporučen pro rutinní klinickou praxi a přínos molekulární klasifikace karcinomu prsu je tedy spíše ve výzkumné sféře (Ellis I. O. et al., 2016).

Ze základních molekulárních podtypů karcinomu prsu jsou nejčastější nádory luminálního typu, které exprimují geny typické pro luminální epitelové buňky normální prsní žlázy, jako např. cytokeratiny 7, 8, 18 a 19. Luminální typ A tvoří přibližně 40 % karcinomů prsu a má nejlepší prognózu. Jedná se o nádory dobře diferencované, s pozitivními hormonálními receptory a negativním HER2, které dobře reagují na hormonální terapii, ale špatně na chemoterapii. Nádory luminálního typu B jsou v mnohém podobné, ale vzhledem k horší diferenciaci, HER2 pozitivitě a/nebo mutaci *TP53* mají horší prognózu. Přestože exprimují hormonální receptory, odpověď na hormonální léčbu je u nich horší, nicméně lépe reagují na chemoterapii (Bielcikova Z. et Petruzelka L., 2016). Nádory HER2 pozitivní neexprimují hormonální receptory, mají nízkou diferenciaci a nezářídka mutaci *TP53*. Bazální typ karcinomu prsu je poněkud nesourodá skupina, která se dělí na další podtypy, jimž je společná exprese genů typických pro myoepitelové buňky zevní vrstvy vývodů a lobulů normální prsní žlázy či obecně bazální epitelie, např. cytokeratiny 5/6 a 14, calponin, p63 či hladkosvalový aktin (Leidy J., 2014). Většinou, i když ne vždy, jde o nádory triple-negativní (ER-, PR-, HER2-), s mutací *TP53*, nízké diferencované. Vzhledem k časté mutaci *BRCA1* jsou to nejčastější nádory mladého věku (do 40 let). Jak nádory HER2-pozitivní, tak bazální jsou agresivní a nesou špatnou prognózu, alespoň zpočátku však obvykle dobře reagují na chemoterapii (Leidy J. et al., 2014). Zatímco pacientky s HER2-pozitivními nádory profitují z biologické léčby anti-HER2 protilátkami, u pacientek s bazálním typem karcinomu jsou další možnosti léčby zpravidla značně omezené díky negativitě hormonálních receptorů i

HER2 (Perou C. M., 2010). Nejméně častá skupina nádorů podobných normální prsní žláze je zatím nejhůře definovaná, její imunohistochemický profil se překrývá s lumenálním typem A (ER+, PR+, HER2-, nízká proliferační aktivita), nicméně prognóza je spíše srovnatelná s lumenálním typem B (Dai H. et al., 2015).

Z nově navržených molekulárních podtypů karcinomu prsu je nejvíce diskutovaná skupina claudin-low nádorů s nízkou expresí až ztrátou claudinů 3, 4 a 7, E-cadherinu a lumenálních cytokeratinů, většinou triple-negativních (ER-, PR-, HER2-), exprimujících markery EMT a nádorových kmenových buněk (Herschkowitz J. I. et al., 2007). Histologicky se u nich často objevuje metaplastická a medulární diferenciaci a nádorová tkáň je obvykle prostoupená lymfocyty (Prat A. et al., 2010). Další navržená skupina claudin-high karcinomů se vyznačuje vysokou expresí claudinů 1 a 4 a negativitou ER. Obě skupiny claudin-low i claudin-high zahrnují zejména agresivní nádory, které bývají chemosenzitivní, nicméně další možnosti terapie jsou limitované vzhledem k časté triple- nebo ER-negativitě (Myal Y. et al., 2010; Prat A. et al., 2010). Jejich význam pro klinickou praxi však dosud není jasný a vyžaduje další výzkum (Lakhani S. R. et al., 2012; Ellis I. O. et al., 2016).

#### 1.4. Claudiny a cadheriny

Claudiny a cadheriny patří mezi hlavní transmembránové molekuly mezibuněčných propojení, tzv. těsných a adhezních spojů, které zajišťují adhezi buněk k sobě navzájem i v daném kompartmentu, polaritu epitelu či endotelu a v případě těsných spojů také permeabilitu tkáně regulací prostupu vody, iontů a makromolekul paracelulárním prostorem. Jsou tedy nezbytné pro udržení homeostázy, pevnost i správnou funkci tkáně (Mineta K. et al., 2011). Napojení claudinů na cytoskelet a schopnost přenosu signálu do buňky naznačují, že navíc pravděpodobně hrají podstatnou roli v buněčné proliferaci, diferenciaci a apoptóze (Turksen K. et Troy T. C., 2011; Ding L. et al., 2013; Singh A. B. et Dhawan P., 2015). Zatímco cadheriny byly objeveny v 80. letech 20. století a v současné době jich známe více než 100 v nejrůznějších typech tkání, claudiny byly objeveny až na přelomu tisíciletí a dosud jich bylo popsáno 27 u epitelových a endotelových buněk (Takeichi M., 1977; Mineta K. et al., 2011). Expresie obou skupin proteinů byla nalezena jak ve zdravých tkáních, tak u nenádorových onemocnění a benigních a maligních nádorů, kde může být odlišná od zdravé tkáně (Singh A. B. et al., 2010).

#### 1.4.1. Cadheriny a EMT

Cadheriny, jakožto hlavní proteiny mezibuněčných adhezních spojů, hrají při karcinogenezi a progresi nádorového onemocnění klíčovou roli během EMT, při níž epiteliální nádorové buňky nabývají vlastností mezenchymálních buněk narušením mezibuněčných spojů, ztrátou polaritity a reorganizací cytoskeletu (Osanai M. et al., 2017). Tyto změny usnadňují a urychlují růst nádoru, invazi nádorových buněk do okolních tkání, invazi do cév a metastazování a jsou také považovány za faktor přispívající k chemorezistenci (Singh A. et al., 2010; Lin X. et al., 2013).

V průběhu EMT se mezibuněčné spoje nerozpadají, ale procházejí regulovanými změnami, jako je tzv. „cadherin switch“, kdy epiteliální buňky ztrácí původně vysoce exprimovaný E-cadherin a začnou exprimovat N-cadherin, který je fyziologicky přítomen ve tkáních mezodermálního původu (Hazan R. B. et al., 2000). „Cadherin switch“ je považovaný za marker EMT, přestože ztráta exprese E-cadherinu nepodmiňuje expresi N-cadherinu a u některých buněk exprimujících N-cadherin zůstává exprese E-cadherinu zcela zachovaná nebo je jen snižena (Nieman M. T. et al., 1999; Rai H. et al., 2014).

E-cadherin je obvykle v nejčastějším typu zhoubného nádoru prsu, invazivním karcinomu NST, přítomen ve většině buněk, stejně jako v normálních epiteliích mléčné žlázy. Jeho IHC průkaz se využívá v diagnostice pro odlišení invazivního karcinomu NST od lobulárního, pro který je charakteristická jeho absence (Lakhani S. R. et al., 2012). N-cadherin se v normálních epiteliích mléčné žlázy nevyskytuje, jeho aberantní exprese se však objevuje u části invazivních karcinomů (Nieman M. T. et al., 1999; Hazan R. B. et al., 2000).

#### 1.4.2. Claudiny

Přes rostoucí množství studií zabývajících se rolí claudinů v karcinogenezi, jejich přesná úloha zůstává dosud neobjasněna. Důvodem může být složitost a velké množství regulačních mechanismů, do kterých jsou claudiny zapojeny. Výsledky studií dokumentují jejich význam pro proliferaci, diferenciaci i apoptózu a to zřejmě na více úrovních. Navíc je pravděpodobné, že role a exprese claudinů závisí nejen na typu nádoru, ale i na řadě dalších faktorů, např. stádiu onemocnění či stupni diferenciaci (Turksen K. et al., 2011; Ding L. et al., 2013; Kwon M. J., 2013; Singh A. B. et al., 2015). Recentní studie naznačují zapojení claudinů v EMT spolu s cadheriny, což není překvapivé, vzhledem k jejich stěžejní roli základní kostry mezibuněčných těsných spojů. Právě přes proces EMT se claudiny

podílejí na regulaci nádorových kmenových buněk, které mají sebeobnovovací potenciál, a tím mohou ovlivnit vznik rezistence nádoru k léčbě a rekurenci po iniciální chemoterapii (Singh A. et Settleman J., 2010; Osanai M. et al., 2017). Claudin 1 dle nejnovějších poznatků přispívá k tzv. kolektivní migraci, kdy se neoplastické buňky na invazivním okraji uvolní z nádorové masy a penetrují do okolních tkání buď na základě EMT nebo nezávisle na EMT (Zhou B. et al., 2015). Claudiny 3 a 4 udržují epiteliální fenotyp buněk modulací exprese hlavních EMT markerů, zejména pak udržováním exprese E-cadherinu (Lin X. et al., 2013).

Kombinace exprimovaných claudinů a intenzita jejich exprese se ukázaly být tkáňově specifické a charakteristické vzory jejich exprese byly popsány i u mnoha typů nádorů. Claudiny 1, 3 a 4 mají aktuálně největší potenciál vstoupit do diagnostiky a predikce odpovědi nádoru na léčbu v oblasti mnoha orgánových systémů včetně prsu (Singh A. B. et al., 2010; Kwon M. J., 2013; Singh A. B. et Dhawan P., 2015; Osanai M. et al., 2017). Zapojení claudinů v karcinogenezi a jejich snadno dostupné extracelulární receptorové domény navíc dělají z claudinů slibný cíl nových protinádorových léků, které by v budoucnu mohly podpořit efekt chemoterapeutik, zejména u chemorezistentních nádorů (Saeki R. et al., 2009).

V normální tkáni mléčné žlázy epitel vývodů exprimuje claudiny 1, 3 a 4 s vysokou intenzitou. Většina karcinomů prsu si zachovává vysokou nebo i zvýšenou expresi claudinů 3 a 4, zatímco u claudinu 1 často dochází k downregulaci či úplné ztrátě exprese (Kulka J. et Tokes A. M., 2005; Singh A. B. et al., 2010; Turksen K. et Troy T. C., 2011; Ding L. et al., 2013). Odhalení jiných opakujících se vzorců exprese se vztahem k prognóze a chemosenzitivitě nádoru vedlo k navržení výše popsaných nových skupin nádorů v molekulární klasifikaci karcinomu prsu, tedy claudin-low a claudin-high (Myal Y. et al., 2010; Prat A. et al., 2010; Dias K. et al., 2017).

### 1.5. Role apoptózy v karcinogenezi a protinádorové léčbě

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt, poprvé popsaná v roce 1970, je jedním z nejstudovanějších biologických procesů (Kerr J. F. et al., 1972; Wong R., 2011). Vzhledem k tomu, že u dlouho žijících mnohobuněčných organismů je naprosto nezbytná k udržení homeostázy tkání, její defekty jsou podstatou mnoha onemocnění. Zatímco přehnaná apoptóza vede k degenerativním onemocněním, imunodeficitům či infertilitě, nedostatečná apoptóza vede ke karcinogenezi či autoimunitním onemocněním (Hassan M. et al., 2014).

Souvislost apoptózy s eliminací potenciálně maligních buněk, hyperplazií a progresí tumoru byla zřejmá prakticky hned od jejího objevu. Díky chybám v apoptóze se nádorovým buňkám prodlužuje životnost a zvyšuje práh citlivosti na oxidativní stres a hypoxii při růstu nádoru. Delší životnost nádorových buněk vede k nahromadění dalších genetických alterací, které deregulují proliferaci a diferenciaci, podporují angiogenezi a zvyšují invazivitu i schopnost přežít bez ukotvení do extracelulární matrix a tedy metastazovat. Kromě toho je defektní apoptóza podstatou resistance nádorových buněk na imunitní mechanismy cytotoxických T-lymfocytů a NK buněk (Hassan M. et al., 2014). Na jakékoliv úrovni mechanismu apoptózy může dojít ke změně, která umožní nádorové buňce apoptóze uniknout a podpořit tak vznik a růst nádoru. Pro zjednodušení je možné tyto změny shrnout do tří hlavních oblastí: 1) vychýlení rovnováhy mezi pro- a protiapoptotickými faktory, 2) snížená aktivita kaspáz a 3) snížená signalizace přes receptory smrti (Wong R., 2011).

Cytotoxické protinádorové léky vyvolávají zánik nádorových buněk, a to jak v podobě apoptózy, tak nekrózy, tedy nespecifické buněčné smrti, ale i dalších, hůře definovaných podob buněčné smrti. Apoptóza je většinou vyvolaná interakcí chemoterapeutika s DNA, která způsobí její ireverzibilní změny (např. 5-fluorouracil, deriváty platiny), další léky interferují s polymerizací a depolymerizací mikrotubulů (taxany). Defekty apoptózy jsou tedy často zodpovědné i za rezistenci nádoru k léčbě (Fulda S. et Debatin K. M., 2000-2013).

Takřka každá nalezená odchylka v mechanismu apoptózy u nádorových buněk je potenciálně využitelným cílem protinádorové léčby. Celá řada studií se zabývá možnostmi, jak obnovit v nádorových buňkách schopnost apoptózy. Strategie, kterými lze docílit odstranění defektů apoptózy, zahrnují genovou terapii, regulaci exprese, přímou interakci s daným proteinem a imunoterapii. Mezi nejčastější výzkumné subjekty patří rodina BCL2, IAP a p53 (Fulda S. et Debatin K. M., 2000-2013; Kasibhatla S. et Tseng B., 2003; Wong R., 2011; Hassan M. et al., 2014). V souvislosti s terapií cílenou na stimulaci apoptózy však vyvstává mnoho otázek, zejména jaký bude mít efekt na nenádorové buňky. Přesto mají tyto látky velký potenciál doplnit stávající algoritmy onkologické léčby, podpořit účinek chemoterapie a snížit rezistenci na chemoterapii (Fulda S., 2015; Gimenez-Bonate P. et al., 2009).

### 1.5.1. Mechanismus apoptózy

K aktivaci apoptózy dochází dvěma základními cestami, vnější receptorovou a vnitřní mitochondriální.

Vnější dráhu spouští navázání ligandu na receptor smrti (death receptor). Ligandem může být např. TNF nebo Fas ligand produkovaný imunitními buňkami či apokrinní sekrecí, dále však i řada cytokinů, růstových faktorů, hormonů či toxinů. Mezi nejznámější receptory smrti patří rodina TNF receptorů, konkrétně např. TNF receptor 1 (TNFR1) a Fas (CD95). Po navázání ligandu receptory trimerizují, čímž se aktivuje tzv. doména smrti (death domain) a vytváří se tak vazebné místo pro adapterový protein, jako např. TRADD (TNF receptor-associated death domain) nebo FADD (Fas-associated death domain). Výsledný komplex DISC (death-inducing signaling complex) váže homodimer inaktivních prokaspáz 8 a proteolyticky jej aktivuje na homodimer iniciátorových kaspáz 8. Aktivovaná kaspáza 8 potom štěpí efektorové prokaspázy 3 a 7 na kaspázy 3 a 7, které jsou spolu s kaspázou 6 (aktivovaná kaspázou 3) zodpovědné za rozklad intracelulárních struktur, včetně proteinkináz, cytoskeletu, proteinů opravy DNA a inhibitorů endonukleáz, které se tím aktivují a degradují DNA (Wong R., 2011).

Vnitřní dráha je aktivovaná zevnitř buňky mnoha podněty, např. neopravitelným poškozením DNA, hypoxií, velmi vysokou koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$ , nedostatkem růstových faktorů, virovou infekcí, radiací, některými léky a v neposlední řadě onkogenní aktivací (Hassan M. et al., 2014; Wong R., 2011). Při události spouštějící apoptózu, např. poškození DNA, hromadí se protein p53 zastaví buněčný cyklus a mimo jiné uvolní z jádra či aktivuje proapoptotické proteiny, zvýší se permeabilita mitochondriální membrány a do cytoplazmy se uvolní další proapoptotické molekuly, zejména cytochrom-c. Propustnost mitochondriální membrány a tedy celá vnitřní dráha je regulovaná proteiny z rodiny BCL2, respektive rovnováhou mezi jejími pro- a protiapoptotickými zástupci. Tato regulace zahrnuje značné množství proteinů a složité interakce mezi nimi, které jsou známy pouze částečně (Korsmeyer S. J. et al., 2000; Chipuk J. E. et Green D. R., 2008; Song G. et al., 2011). Cytochrom-c v cytosolu vytváří s proteinem APAF-1 a ATP pentamerní strukturu, která váže prokaspázu 9 a mění ji na aktivní kaspázu 9. Celý komplex zvaný apoptosom aktivuje efektorové prokaspázy 3 a 7 a další průběh je již obdobný jako u dráhy vnější. Další molekuly uvolněné z membrány mitochondrií jsou zodpovědné např. za kondenzaci DNA [AIF (apoptosis-inducing factor), endonukleáza G] nebo inhibici inhibitorů kaspáz IAP (inhibitors of apoptosis proteins) (Smac/DIABLO a Omi/HtrA2) (Fulda S. and Debatin K. M., 2000-2013).



Do procesu apoptózy je zahrnuto obrovské množství dalších regulačních molekul pro obě dráhy, jejichž regulace je navíc v některých místech propojena, např. BH3-only proteinem Bid z BCL2 rodiny, který může být aktivován i z vnější dráhy kaspázou 8 (Elmore S., 2007).

Kromě těchto hlavních drah může být apoptóza spuštěna i dalšími mechanismy, např. přes endoplazmatické retikulum nebo na kaspázách nezávisle přes AIF (Wong R., 2011).

### 1.5.2. Morfologické změny při apoptóze

Prvním viditelným jevem v optickém mikroskopu je kondenzace chromatinu, sraštění a rozpad jádra neboli karyorexe, způsobená fragmentací DNA endonukleázami. Později dochází ke zmenšení buňky a změny v ultrastruktuře organel jsou patrné jako zahuštění a zvýraznění eosinofilie cytoplazmy. Buněčná membrána zůstává zachovaná po celý proces apoptózy a ke konci začne vytvářet záhyby, které po rozpadu buňky obklopují jednotlivá apoptotická tělíska. Již na počátku apoptózy se na zevním povrchu buněčné membrány objevuje signál pro makrofágy v podobě fosfatidylserinu, který je u vitálních buněk exprimovaný ve vrstvě vnitřní. Makrofágy tak často rozeznají a fagocytují zanikající buňku ještě dřív, než se rozpadne na apoptotická tělíska, což je také důvod, proč byla apoptóza objevena relativně pozdě. Vzhledem k tomu, že se intracelulární molekuly v procesu apoptózy nedostávají do kontaktu s extracelulárním prostředím, nedochází k zánětlivé odpovědi jako u nekrózy, kdy je integrita buněčné membrány narušena velmi časně (Kerr J. F. et al., 1994; Hacker G., 2000; Elmore S., 2007; Wong R., 2011).

## 2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Práce se zabývá studiem biomarkerů karcinomu prsu, a to jak standardních, používaných v rutinní praxi již desítky let (ER, PR, HER2, Ki67), tak experimentálních, které by se mohly uplatnit v budoucnu jako součást prognosticko-prediktivních multigenových panelů či jako cíle biologické léčby v rámci komplexního individualizovaného přístupu. Jednu skupinu zkoumaných markerů tvoří proteiny mezibuněčných těsných a adhezních spojů, claudiny a cadheriny, které se podílejí na regulaci EMT a mohly by tedy ovlivňovat chemosenzitivitu nádoru. Druhou skupinou jsou geny asociované s apoptózou, jejíž funkční mechanismus je pro chemosenzitivitu nádorových buněk zásadní.

**Hypotéza:** V nádorových buňkách dochází vlivem chemoterapie ke změnám expresního profilu. U konkrétního typu nádoru, v našem případě karcinomu prsu, se vyskytují častěji změny v expresi některých konkrétních proteinů/genů, které souvisejí nebo by mohly souviset s citlivostí nádoru na léčbu a jejichž změněná exprese by tedy mohla mít dopad na další průběh léčby.

Hlavním cílem práce je mapování změn exprese výše uvedených proteinů a genů po neoadjuvantní chemoterapii na základě porovnání jejich exprese v nádoru před a po aplikaci léčby a zhodnocení jejich významu v kontextu současných znalostí a v případě standardních markerů v kontextu současných doporučení pro standardizované biotické vyšetření. U claudinů a cadherinů sledování změn po chemoterapii a jejich korelace se standardními markery může přispět k porozumění jejich role v odpovědi nádoru na chemoterapii, ale i v samotné karcinogenezi karcinomu prsu. Poslední část práce je věnována identifikaci genů asociovaných s apoptózou s potenciálním prognostickým významem.

Konkrétně lze cíle práce shrnout do těchto bodů:

- a) Analýza změn exprese ER, PR a Ki67 za použití IHC a HER2 za použití IHC, FISH a qRT-PCR po neoadjuvantní chemoterapii.
  
- b) IHC analýza exprese claudinů 1, 3 a 4 a E- a N-cadherinu před a po neoadjuvantní chemoterapii.
  
- c) Vzájemná korelace exprese sledovaných claudinů, cadherinů a standardních markerů před a po chemoterapii na podkladě IHC analýzy.
  
- d) Molekulární analýza expresního profilu 84 genů asociovaných s apoptózou před a po neoadjuvantní chemoterapii za účelem identifikace genů zapojených do reakce nádorových buněk na chemoterapii. Návrh panelu markerů pro stratifikaci pacientek z hlediska prognózy.

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1. Tkáňové vzorky

Tkáňové vzorky karcinomů prsu byly získány během diagnostické punkční jehlové (core cut) biopsie a terapeutického chirurgického zákroku (segmentální resekce či mastektomie) a byly biopticky vyšetřeny na Ústavu patologie 1. Lékařské fakulty a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze v letech 2006–2015. Práce celkem zahrnuje vzorky od 82 pacientek ve věkovém rozmezí od 23 do 77 let (medián 54 let), které před terapeutickým chirurgickým zákrokem podstoupily neoadjuvantní chemoterapii. Od každé pacientky byly vybrány dva vzorky – jeden z diagnostické punkční biopsie odebraný před neoadjuvantní léčbou, a druhý z definitivního chirurgického resekatu obsahující reziduální nádor po neoadjuvantní léčbě nejčastěji antracykliny a/nebo taxany, v případě HER2-pozitivních nádorů v kombinaci s anti-HER2 protilátkou. Následně popsaná vyšetření byla vždy provedena na obou spárovaných vzorcích. V tabulkách 1-3 (str. 36–39) je uvedena klinicko-patologická charakteristika jednotlivých vyšetřovaných souborů.

#### 3.2. Histologické vyšetření

Všechny vzorky byly nejprve fixovány v 10% neutrálním pufrovaném formalínu při pokojové teplotě 6-24 h a poté zality do parafínu. Pro dosažení optimální fixace u vzorků z mastektomie byla tkáň bezprostředně po příjmu vzorku do bioptické laboratoře Ústavu patologie upravena pomocí paralelních řezů po 10 mm, které umožňují rovnoměrný prostup fixační tekutiny celým preparátem. Tímto postupem se lze vyvarovat suboptimální fixaci tkáně a následné alteraci výsledků IHC vyšetření, zejména falešné negativity.

Histologické vyšetření bylo provedeno patologem na preparátech o tloušťce 3  $\mu\text{m}$ , standardně barvených hematoxylinem eosinem (HE). Histologický typ a stupeň diferenciacie nádoru (grade) byly stanoveny dle WHO Tumors of the Breast and Female Genital Organs (Tavassoli F. A. et Devilee P., 2003), respektive WHO Classification of Tumors of the Breast

(Lakhani S. R. et al., 2012). Stupeň diferenciace byl hodnocen podle Nottinghamského systému Elstona a Ellise.

Odpověď na neoadjuvantní léčbu v reziduálním tumoru byla hodnocena dle Chevallierovy klasifikace: I – žádný reziduální karcinom, II – karcinom *in situ*, III – invazivní karcinom se stromální fibrózou, IV – žádné nebo nevýznamné regresivní změny v invazivním karcinomu (Chevallier B. et al., 1993). Byly vybrány pouze takové vzorky definitivních resektátů, které obsahovaly reziduální invazivní karcinom s výraznými (kategorie III) či méně výraznými nebo žádnými (kategorie IV) regresivními změnami po neoadjuvantní chemoterapii, s výjimkou 4 nádorů u kterých došlo ke kompletní patologické odpovědi (pCR, kategorie I a II) v částech práce zabývající se změnami exprese HER2 a transkripčního profilu sledovaných genů asociovaných s apoptózou.

### 3.3. IHC, cytogenetické a molekulárně biologické vyšetření HER2

#### 3.3.1. IHC vyšetření HER2

IHC vyšetření HER2 bylo provedeno na obou vzorcích od všech 82 pacientek (164 vzorků), z toho u 70 pacientek (140 vzorků) manuálně s použitím HercepTestu (kompletní kit, originální ředění výrobcem, Agilent Technologies Inc., K5204) a u 12 pacientek (24 vzorků) automatizovaně s monoklonální králičí protilátkou anti-HER2 4B5 PATHWAY (originální ředění výrobcem, Ventana Medical Systems, 790-2991) na přístroji Ventana BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems) dle návodu výrobce. Úroveň exprese HER2 byla stanovena dle WHO Tumors of the Breast and Female Genital Organs (Tavassoli F. A. et Devilee P., 2003) a WHO Classification of Tumors of the Breast (Lakhani S. R. et al., 2012): negativní (skóre 0 a 1+), slabě pozitivní (2+) a silně pozitivní (3+) pro overexpresi HER2 proteinu.

#### 3.3.2. Cytogenetické vyšetření HER2 - FISH

FISH byla provedena na vzorcích, které byly IHC hodnoceny jako hraniční, tedy slabě pozitivní (2+), a na vzorcích s invazivním karcinomem NST se zvýšenou pravděpodobností diskordantního fenotypu [HER2-negativní s nízkou až nulovou expresí ER a/nebo PR (<10 %)]. V první části práce týkající se změn HER2 byla dále provedena na obou spárovaných

vzorcích v případech s výraznou změnou exprese HER2 po léčbě [ze silně pozitivní (3+) na negativní (0 nebo 1+)]. K vyšetření byla použita sonda Path Vysion HER2 DNA Probe (Thermo Fisher Scientific Inc., 02J01) nebo ZytoLight HER2/CEN 17 Dual Color Probe (ZytoVision Z-2077). Postup je u obou výrobců obdobný, ve zkratce 3 µm silné řezy zhotovené z parafinových bločků byly nejdříve deparafinovány v xylenu, vloženy do roztoku 0,2M HCl a následně do roztoku NaSCN o teplotě 80 °C. Bílkovinná složka tkáně byla naštěpena Proteasou II (25 mg) v 50 ml solného roztoku s pH 2,0 po dobu 45 (punkční biopsie) a 60 min (vzorky z resekátů), poté byla tkáň fixována v 10% neutrálním pufrovaném formalínu. Po aplikaci FISH sondy a utěsnění preparátů tekutým pryžovým cementem probíhala kodenaturace vzorku a DNA sondy po dobu 1 min při teplotě 75 °C. Následovala hybridizace vzorků přes noc v ThermoBrite systému (Agilent Technologies Inc.) při teplotě 37 °C. Nenavázaná sonda byla odmyta při 74 °C a bylo provedeno podbarvení 4',6-diamidin-2-fenylindolem (DAPI). Na fluorescenčním mikroskopu bylo zhodnoceno u každého vzorku minimálně 20 jader. Výsledek pozitivní pro amplifikaci HER2 byl definován jako poměr HER2 : CEP17 > 2.

### 3.3.3. Molekulárně biologické vyšetření HER2 – qRT-PCR

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (qRT-PCR) byla použita pro ověření výsledků IHC a FISH u obou spárovaných vzorků v případech s výraznou změnou exprese HER2 po léčbě [ze silně pozitivní (3+) na negativní (0 nebo 1+)] v první části práce sledující změny HER2. Izolace RNA a syntéza komplementární DNA (cDNA) byly provedeny dle standardních postupů. Deparafinizace přibližně 20 µm silných řezů proběhla za použití xylenu a 100% ethanolu. RNA byla extrahována pomocí RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104). Pro reverzní transkripci byl použit RevertAid – H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, K1632) obsahující náhodný hexamerový primer a reverzní transkriptázu z Moloney-Murine leukemia virus (MMLV). Úroveň exprese mRNA HER2 byla kvantifikována pomocí LightCycler 480 (Roche Diagnostics) za použití LightMix Her2/neu kit (Tib MolBiol) dle návodu výrobce. Součástí kitu byla kalibrační DNA pro vytvoření kalibrační křivky.

Podmínky PCR byly následující: Iniciační denaturace probíhala 10 min při 95 °C. Následovalo 50 cyklů zahrnujících denuraci při 95 °C po 10 s, nasednutí primerů (annealing) při 60 °C po 10 s a syntézu DNA při 72 °C po 10 s. mRNA HER2 byla

normalizována vzhledem k produktu housekeepingového genu, ribozomálnímu proteinu L23 (RPL23). PCR amplifikace každého transkriptu byla provedena dvakrát. Výsledek pozitivní pro amplifikaci HER2 byl definován jako poměr  $HER2 : RPL23 > 2$ .

### 3.4. IHC vyšetření hormonálních receptorů a Ki67

IHC vyšetření ER a PR bylo provedeno na obou vzorcích od všech 82 pacientek (164 vzorků), na řezech silných 3  $\mu\text{m}$  po deparafinizaci v xylenu při pokojové teplotě a rehydrataci ve vzestupné alkoholové řadě. Teplem indukované odhalení antigenů (HIER, heat-induced epitope retrieval) bylo provedeno v 0,01M citrátovém pufru (pH 9,0 pro ER a Ki67; pH 6,0 pro PR) ve vodní lázni při teplotě 98 °C po 40 min. Endogenní aktivita peroxidázy byla blokována 3% roztokem  $\text{H}_2\text{O}_2$  v metanolu při pokojové teplotě po 20 min. Byly použity protilátky proti ER (monoklonální, myší, klon 6F11, 1:50, Leica Microsystems Inc., NCL-L-ER-6F11), PR (monoklonální, myší, klony PGR-312 a 16, 1:50, Leica Microsystems Inc., NCL-PGR-312 a ORG-8721) a Ki67 (monoklonální, myší, klon Mib-1, 1:50, Agilent Technologies, M7240). Následně byly preparáty při pokojové teplotě inkubovány 30 min v N-Histofine Simple Stain Max-Peroxidase (multi) (originální ředění výrobcem, Nichirei Biosciences Inc., 41415) a 5 min v chromogenu DAB-3S (originální ředění výrobcem, Nichirei Biosciences Inc., 415194S).

Hodnocení všech tří markerů bylo vyjádřeno v procentech pozitivních nádorových buněk. Pro oba hormonální receptory byly výsledky kategorizovány do skupiny pozitivní nebo negativní, pozitivní skóre bylo stanoveno jako  $\geq 1$  % nádorových buněk s jaderným zbarvením. Vysoká buněčná proliferace (Ki67) byla stanovena jako  $\geq 20$  % nádorových buněk s jaderným zbarvením.

### 3.5. IHC vyšetření claudinů a cadherinů

IHC vyšetření claudinů a cadherinů bylo provedeno na spárovaných vzorcích od 62 pacientek (124 vzorků). U všech punkčních biopsií a u vzorků z resekátů, které obsahovaly malé množství reziduální nádorové tkáně, nedostatečné pro techniku tkáňových mikročipů (TMA), bylo provedeno ze standardních parafinových bločků. Vzorky z definitivní resekce s dostatečným množstvím reziduální nádorové tkáně byly zpracovány technikou TMA. Podle preparátů barvených HE byly vybrány reprezentativní oblasti nádoru a odpovídající

parafínové bločky byly použity pro sestavení TMA. Tři až čtyři tkáňové válečky o průměru 2,0 mm byly vyříznuty z původního bločku a vnořeny do recipientního v přístroji TMA Master (3DHISTECH Ltd.). Každý výsledný kompozitní bloček obsahoval až 63 vzorků, z toho maximálně 61 z nádorové tkáně a 2 z nenádorové tkáně.

IHC vyšetření bylo provedeno na řezech silných 3  $\mu\text{m}$  po deparafinizaci v xylenu při pokojové teplotě a rehydrataci ve vzestupné alkoholové řadě. Teplem indukované odhalení antigenů (HIER, heat-induced epitope retrieval) bylo provedeno v 0,01M citrátovém pufru (pH 6,0 pro claudiny 3 a 4, pH 9,0 pro claudin 1, E- a N-cadherin) ve vodní lázni při teplotě 98 °C po 40 min. Endogenní aktivita peroxidázy byla blokována 3% roztokem  $\text{H}_2\text{O}_2$  v metanolu při pokojové teplotě po 20 min. Byly použity protilátky proti claudinu 1 (polyklonální, králíčí, 1:100, Cell Marque Corporation, 359A), claudinu 3 (polyklonální, králíčí, 1:800, Abcam, ab15102), claudinu 4 (polyklonální, kozí, 1:100, Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-17664), E-cadherinu (monoklonální, myší, klon 4A2C7, 1:100, Thermo Fisher Scientific Inc., 18-0223) a N-cadherinu (monoklonální, myší, klon 6G11, 1:300, Agilent Technologies Inc., M3613). Následně byly preparáty pro claudin 1, claudin 3 a E-cadherin při pokojové teplotě inkubovány 30 min v N-Histofine Simple Stain Max-Peroxidase (multi) (originální ředění výrobcem, Nichirei Biosciences Inc., 41415) a pro claudin 4 za stejných podmínek v N-Histofine Simple Stain Max-Peroxidase (g) (originální ředění výrobcem, Nichirei Biosciences Inc., 41416) a poté 5 min v chromogenu DAB-3S (originální ředění výrobcem, Nichirei Biosciences Inc., 415194S). Preparáty pro N-cadherin byly barveny kitem EnVision+ System-HRT (originální ředění výrobcem, Agilent Technologies Inc., K4006) dle návodu výrobce.

Pro hodnocení míry exprese claudinů a cadherinů jsme použili různé semikvantitativní skórovací systémy za účelem rozlišení kategorií s předpokládaným dopadem na biologické chování nádoru či jeho odpovědi na chemoterapii.

Expresce claudinů byla hodnocena podle kombinovaného skóre popsaného jinými autory (Lechpammer M. et al., 2008; Lu S. et al., 2013): hodnotou 0–3 klasifikuje jak procentuální zastoupení pozitivních nádorových buněk (0=0 %, 1<25 %, 2=25–50 %, 3>50 %), tak intenzitu membránového zbarvení (0=0, 1=1+, 2=2+, 3=3+) a získané výsledky se násobí. Výsledné skóre tedy nabývá hodnot 0–9, z toho 0 je hodnoceno jako negativní, 1–2 jako slabě pozitivní, 3–6 jako středně pozitivní a 9 jako silně pozitivní. Negativní a slabě pozitivní výsledek značí nízkou expresi, středně a silně pozitivní výsledek vysokou expresi proteinů. Pro identifikaci nádorů, které by podle molekulární klasifikace spadaly do podskupin claudin-



low nebo claudin-high jsme použili kritéria navržená v předchozích studiích. Kritéria pro claudin-low nádory zahrnovala triple negativitu a nízkou nebo chybějící expresi nejméně 2 ze 4 následujících proteinů mezibuněčných spojů: claudin 3, 4, 7 a E-cadherin, přičemž někteří autoři navržená kritéria rozšířili o nízkou nebo chybějící expresi claudinu 1 (Dias K. et al., 2017; Gerhard R. et al., 2012). Kritéria pro claudin-high nádory zahrnovala ER-negativitu a vysokou expresi claudinu 1 a 4 (Myal Y. et al., 2010).

U E-cadherinu byla použita třístupňová škála (0=0 %, 1<70 %, 2 ≥70 %), kdy jako normální byla posuzována silná membránová pozitivita nejméně 70 % nádorových buněk a pozitivita nižší než 70 % a negativní výsledek byly hodnoceny jako aberantní (Kowalski P. J. et al., 2003). U N-cadherinu byla použita čtyřstupňová škála (0=0 %, 1<25 %, 2=25–50 %, 3>50 %), přičemž pozitivní výsledek byl definován jako vyšší nebo roven 1 % nádorových buněk s membránovým zbarvením.

### 3.6. Detekce apoptoticky zanikajících buněk

Apoptoticky zanikající buňky byly detekovány 2 nezávislými metodami, a to IHC vyšetřením aktivované kaspázy 3 a TUNEL analýzou.

IHC vyšetření bylo provedeno na obou vzorcích od 16 pacientek (32 vzorků) s protilátkou proti naštěpené kaspáze 3 (cleaved caspase 3) (polyklonální, králíčí, 1:250, Cell Signaling Technology, Asp175) po předchozí deparafinizaci v xylenu, rehydrataci ve vzestupné alkoholové řadě, teplem indukovaném odhalení antigenů v 0,01M citrátovém pufru (pH 6,0) ve vodní lázni při teplotě 98 °C po 40 min a blokování endogenní aktivity peroxidázy 3% roztokem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v metanolu. Jako pozitivní byly hodnoceny buňky s cytoplazmatickým zbarvením.

Na stejných vzorcích byla provedena analýza TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling) s použitím fluorometrického TUNEL systému (Promega, G3250) dle návodu výrobce. Po naštěpení roztokem 20 µg/ml proteinázy K po 20 min byly preparáty inkubovány ve směsi nukleotidů obsahující fluorescein-12-dUTP a TdT (terminální deoxynucleotidyltransferáza) po 1 h při teplotě 37 °C. Na pozitivní kontroly bylo před inkubací aplikováno 1 U/ml DNázy, u negativních kontrol byla použita směs nukleotidů bez TdT. Pro znázornění všech jader byly preparáty dobarveny DAPI. DNA označená fluorescein-12-dUTP byla pozorována fluorescenčním mikroskopem.

Pro kvantitativní zhodnocení apoptózy byl pro aktivovanou kaspázu 3 i TUNEL stanoven apoptotický index (AI), který je definován jako procento pozitivních jader k jejich celkovému množství (Duan W. R. et al., 2003). Z každého vzorku bylo hodnoceno 5 náhodně vybraných zorných polí nádorové tkáně při zvětšení 200x.

### 3.7. Molekulárně biologická analýza genů asociovaných s apoptózou

#### 3.7.1. Izolace RNA

Izolace RNA z parafinových řezů byla provedena dle standardního postupu. Deparafinizace přibližně 20 µm silných řezů z každého vzorku proběhla za použití xylenu a 100% ethanolu. RNA byla poté extrahována pomocí RNeasy Micro Kit (Qiagen, 74104) dle návodu výrobce.

#### 3.7.2. Real-Time PCR (profilování genové exprese)

Genová exprese 84 klíčových genů apoptózy byla vyprofilována pomocí RT<sup>2</sup> Profiler Apoptosis PCR Array (Qiagen, PAHS-012).

Přehled vyšetřovaných genů dle jejich zapojení v jednotlivých fázích apoptózy:

Indukce Apoptózy:

Receptory domény smrti: CRADD, FADD, TNF, TNFRSF10B (DR5).  
Poškození a oprava DNA: ABL1, CIDEA, CIDEB, TP53 (p53), TP73.  
Extracelulární apoptotické signály: CFLAR (Casper), DAPK1, TNFRSF25 (DR3).  
Další pro-apoptotické geny: BAD, BAK1, BAX, BCL10, BCL2L11, BID, BIK, BNIP3, BNIP3L, CASP1 (ICE), CASP10 (MCH4), CASP14, CASP2, CASP3, CASP4, CASP6, CASP8 (FLICE), CD27 (TNFRSF7), CD70 (TNFSF7), CYCS, DFFA, DIABLO (SMAC), FAS (TNFRSF6), FASLG (TNFSF6), GADD45A, HRK, LTA (TNFB), NOD1 (CARD4), PYCARD (TMS1, ASC), TNFRSF10A (TRAIL-R), TNFRSF9, TNFSF10 (TRAIL), TNFSF8, TP53BP2, TRADD, TRAF3.

Anti-apoptotické geny:

AKT1, BAG1, BAG3, BAX, BCL2, BCL2A1 (BFL1), BCL2L1 (BCLXL), BCL2L10, BCL2L2, BFAR, BIRC3 (c-IAP2), BIRC5, BIRC6, BNIP2, BNIP3, BNIP3L, BRAF, CD27 (TNFRSF7), CD40LG (TNFSF5), CFLAR (Casper), DAPK1, FAS (TNFRSF6), HRK, IGF1R, IL10, MCL1, NAIP (BIRC1), NFKB1, NOL3, RIPK2, TNF, XIAP (BIRC4).

Regulace apoptózy:

Negativní regulace apoptózy: BAG1, BAG3, BCL10, BCL2, BCL2A1 (BFL1), BCL2L1 (BCLXL), BCL2L10, BCL2L2, BFAR, BIRC2 (c-IAP1), BIRC3 (c-IAP2), BIRC6, BNIP2, BNIP3, BNIP3L, BRAF, CASP3, CD27 (TNFRSF7), CD40LG (TNFSF5), CFLAR (Casper), CIDEA, DAPK1, DFFA, FAS (TNFRSF6), IGF1R, MCL1, NAIP (BIRC1), NOL3, TP53 (p53), TP73, XIAP (BIRC4).

Pozitivní regulace apoptózy: ABL1, AKT1, BAD, BAK1, BAX, BCL2L11, BID, BIK, BNIP3, BNIP3L, CASP1 (ICE), CASP10 (MCH4), CASP14, CASP2, CASP4, CASP6, CASP8 (FLICE), CD40 (TNFRSF5), CD70 (TNFSF7), CIDEB, CRADD, FADD, FASLG (TNFSF6), HRK, LTA (TNFB), LTBR, NOD1 (CARD4), PYCARD (TMS1, ASC), RIPK2, TNF, TNFRSF10A (TRAIL-R), TNFRSF10B (DR5), TNFRSF25 (DR3), TNFRSF9, TNFSF10 (TRAIL), TNFSF8, TP53 (p53), TP53BP2, TRADD, TRAF2, TRAF3.

Receptory domény smrti:

CRADD, DAPK1, FADD, TNFRSF10A (TRAIL-R), TNFRSF10B (DR5), TNFRSF11B (OPG), TNFRSF1A (TNFR1), TNFRSF1B, TNFRSF21, TNFRSF25 (DR3), TRADD.

Kaspázy a jejich regulace:

Kaspázy: CASP1 (ICE), CASP10 (MCH4), CASP14, CASP2, CASP3, CASP4, CASP5, CASP6, CASP7, CASP8 (FLICE), CASP9, CFLAR (Casper), CRADD, PYCARD (TMS1, ASC).

Aktivace kaspáz: AIFM1 (PDCD8), APAF1, BAX, BCL2L10, CASP1 (ICE), CASP9, NOD1 (CARD4), PYCARD (TMS1, ASC), TNFRSF10A (TRAIL-R), TNFRSF10B (DR5), TP53 (p53).

Inhibice kaspáz: CD27 (TNFRSF7), XIAP (BIRC4).

PCR byla provedena na 96-jamkových destičkách na přístroji LightCycler 480 (Roche Diagnostics) dle návodu výrobce (Qiagen). 500 pg izolované RNA bylo nejdříve konvertováno na cDNA pomocí RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen, C-03), která byla preamplifikována pomocí RT<sup>2</sup> Nano PreAMP Human Apoptosis Primer Mix (Qiagen, PBH-7012). Pro real-time PCR byl použit RT<sup>2</sup> Real Time SYBR Green PCR master mix (Qiagen, PA-010). Celkový reakční objem pro PCR byl 25  $\mu$ l, s ekvivalentem 5 pg RNA. Iniciační denaturace probíhala při 95 °C po 10 minut. Následovalo 45 cyklů v 95 °C po 15 s a 60 °C po 1 min.

Získaná data byla analyzována RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis Template v3.0 (Qiagen) a relativní změny v expresi genů byly stanoveny metodou 2Delta-DeltaCt (Livak et Schmittgen, 2001). Expresce mezi vzorky byla normalizována pomocí průměrného počtu cyklů 5 housekeepingových genů ( $\beta$ -2-mikroglobulinu (B2M), hypoxantin-fosforibosyltransferázy 1 (HPRT1), ribozomálního proteinu L13a (RPL13A), glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázy (GAPDH) a  $\beta$ -aktinu (ACTB)). Dvojnásobná změna v genové expresi byla stanovena jako práh pro hodnocení up- a downregulace (Li Z. et al. 2008). Nakonec byla porovnána exprese genů před a po terapii.

### 3.8. Statistická analýza

Q-PCR data z vyšetření HER2 jsou uvedena jako aritmetický průměr absolutního počtu kopií  $\pm$  standardní odchylka od průměru. Analýza změn claudinů a cadherinů a jejich korelace se standardními markery karcinomu prsu byly provedeny pomocí softwaru STATISTICA (verze 10, StatSoft Inc.). Analýza exprese genů asociovaných s apoptózou byla zpracována programem RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis Template v3.0 (Qiagen) a STATISTICA (verze 9.1, StatSoft Inc.). Rozdíly v expresi sledovaných markerů v částech práce na menších souborech pacientek sledujících změny HER2 a genů asociovaných s apoptózou v nádorové tkáni před a po léčbě byly zpracovány párovým t-testem. V části práce zahrnující větší soubor pacientek, která se zabývá rozdíly v expresi claudinů, cadherinů a standardních markerů karcinomu prsu před a po léčbě, byl použit Wilcoxonův párový test (ordinální kategorické proměnné). Korelace exprese jednotlivých markerů byly hodnoceny pomocí  $\chi^2$  testu (dichotomické proměnné). Všechny testy byly oboustranné. Rozdíly s p-hodnotou (p-value)  $<0,05$  byly vyhodnoceny jako statisticky významné.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Klinicko-patologická charakteristika, histomorfologické změny nádorů po léčbě

Celkem byly vyšetřeny vzorky karcinomu prsu od 82 pacientek s věkovým rozmezím od 23 do 77 let (medián 54 let). Jednalo se o 3 soubory pacientek, z nichž několik bylo zahrnuto ve dvou nebo všech třech souborech. Většina pacientek (78/82) měla invazivní karcinom NST (Obr. 1, str. 41), pouze v částech studie zabývajících se změnami exprese HER2 a genů asociovaných s apoptózou byly celkem 4 invazivní lobulární karcinomy (ILC) a 2 DCIS, v jednom případě před a ve druhém případě po chemoterapii (Tab. 1 a 2). V dalších 3 případech v části studie zabývajících se geny asociovanými s apoptózou po léčbě již nebyl invazivní karcinom ani DCIS prokázán.

Z 20 pacientek zahrnutých v části práce sledující změny HER2 došlo po léčbě u 8 (40 %) ke snížení stádia a tedy rozsahu nádorového onemocnění, u 7 (35 %) zůstal rozsah onemocnění přibližně stejný a progresse byla zaznamenána u 3 pacientek (15 %). U 2 pacientek (10 %) nebylo stadium po léčbě hodnoceno, nicméně jedna zemřela v důsledku generalizace nádorového onemocnění. V menším souboru 16 pacientek v části práce sledující změny genů asociovaných s apoptózou bylo zahrnuto 8 pacientek (50 %), u kterých došlo ke snížení stádia, 4 pacientky (25 %) bez výraznějších změn a 4 (25 %) pacientky s progresí onemocnění. U 4 pacientek (25 %) byl nález vyhodnocen jako kompletní patologická odpověď (pCR). V další části práce, která byla zaměřena na expresi claudinů a cadherinů a zahrnovala 62 pacientek, došlo u 31 (50 %) pacientek ke snížení a u 11 (18 %) pacientek ke zvýšení stádia onemocnění. U 17 (27 %) pacientek se stadium nezměnilo a u 3 (5 %) nebyl tento údaj dostupný (Tab. 3).

**Tabulka 1. HER2: klinicko-patologická charakteristika 20 případů karcinomu prsu před a po léčbě.**

No.		HER2 (0-3+)	ER (%)	PR (%)	Klinické stádium	Typ národu	Neoadjuvantní léčba
HER2 pozitivní							
1	Před léčbou	3	90	0	IIA	ILC	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel, trastuzumab
	Po léčbě	1	40	0	I		
2	Před léčbou	3	80	90	IIIB	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel, paklitaxel, trastuzumab
	Po léčbě	2	60	30	I		
3	Před léčbou	3	25	0	IIA	NST	doxorubicin, cyklofosfamid
	Po léčbě	3	20	0	IIA		
4	Před léčbou	3	0	0	IIIB	NST	fluorouracil, epirubicin, cyklofosfamid, paklitaxel, trastuzumab
	Po léčbě	0	20	10	I		
5	Před léčbou	3	0	0	IV	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel
	Po léčbě	3	15	5	IV		
6	Před léčbou	3	0	0	IIB	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel
	Po léčbě	3	10	10	IIIA		
7	Před léčbou	3	0	0	IIB	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel, trastuzumab
	Po léčbě	3	40	10	0 (DCIS)		
8	Před léčbou	3	5	0	IIA	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, paklitaxel, trastuzumab
	Po léčbě	2	0	0	0 (DCIS)		
HER2-negativní							
9	Před léčbou	0	50	10	IIIB	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel
	Po léčbě	0	10	10	IIIC		
10	Před léčbou	1	70	80	IIB	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel
	Po léčbě	0	90	100	I		
11	Před léčbou	0	90	100	IIA	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel
	Po léčbě	0	80	15	IIA		
12	Před léčbou	1	90	0	IV	ILC	tamoxifen, letrozol, doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel
	Po léčbě	2	40	0	IIA		
13	Před léčbou	1	90	20	0 (DCIS)	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel, goserelin
	Po léčbě	0	80	20	I		
14	Před léčbou	1	20	90	IV	ILC	fluorouracil, epirubicin, cyklofosfamid, docetaxel
	Po léčbě	0	30	0	IV		
15	Před léčbou	0	60	100	IIIB	ILC	adriamycin, cyclophosphamide, taxoter,
	Po léčbě	0	70	80	IIB		
16	Před léčbou	1	90	20	IIA	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel
	Po léčbě	1	90	30	IIIC		
17	Před léčbou	0	75	45	IIB	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel
	Po léčbě	0	40	5	IIA		
18	Před léčbou	0	80	100	IIA	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel
	Po léčbě	0	80	90	N/A		
19	Před léčbou	0	80	20	IIB	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel, paklitaxel
	Po léčbě	0	80	30	I		
Triple-negativní							
20	Před léčbou	0	0	0	IIB	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel
	Po léčbě	0	0	0	IIA		

ER – estrogenové receptory, PR – progesteronové receptory, NST – (invazivní karcinom prsu) nespecifického typu, ILC – invazivní lobulární karcinom, DCIS – ductální karcinom *in situ*, N/A – údaj nedostupný

**Tabulka 2. Geny asociované s apoptózou: klinicko-patologická charakteristika 16 případů karcinomu prsu před a po léčbě.**

No.		Klinické stádium	TNM	HER2 (0-3)	ER (%)	PR (%)	Ki67 (%)	Casp3 (%)	Tunel (%)	Věk (roky)	Dg.	Neoadjuvantní léčba
HER2-pozitivní												
1	Před léčbou	IIA	T2 N0 MX	3	90	0	40	15	20	62	ILC	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel, trastuzumab
	Po léčbě	I	T1 N0 MX	1	40	0	3	3	1	62		
2	Před léčbou	IIIB	T4 NX MX	3	80	90	70	1	1	61	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel, paklitaxel, trastuzumab
	Po léčbě	I	T1 N0 MX	2	60	30	5	0	0	61		
3	Před léčbou	IIA	T2 N0 MX	3	25	0	20	13	15	45	NST	doxorubicin, cyklofosfamid
	Po léčbě	IIA	TX N1 MX	3	20	0	5	9	10	45		
4	Před léčbou	IIB	T2 N0 MX	3	0	0	35	3	0	54	NST	fluorouracil, epirubicin, cyklofosfamid, paklitaxel, trastuzumab
	Po léčbě	I	T1 NX MX	0	20	10	N/A	N/A	1	54		
5	Před léčbou	IV	T4 N1 MX	3	0	0	80	5	1	49	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel
	Po léčbě	IV	T4 N1 MX	3	15	5	3	3	5	49		
6	Před léčbou	IIB	T3 N0 MX	3	0	0	60	5	1	38	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel
	Po léčbě	IIIA	T1 N2 MX	3	10	10	30	3	5	38		
Luminální												
7	Před léčbou	I	T1 N0 MX	1	80	80	10	1	1	48	ILC	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel
	Po léčbě	0	T0 N0 M0	pCR						48		
8	Před léčbou	IIIB	T4 N1 MX	0	50	10	20	N/A	0	71	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel
	Po léčbě	IIIC	T2 N3 MX	0	10	10	2	1	5	71		
9	Před léčbou	IIB	T2 N1 MX	1	70	80	15	4	2	47	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel
	Po léčbě	I	T1 N0 MX	0	90	100	4	1	1	47		
10	Před léčbou	IIA	T2 N0 MX	0	90	100	10	0	0	46	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel
	Po léčbě	IIA	T1 N1 MX	0	80	15	0	2	5	46		
11	Před léčbou	IIIB	T4 N1 MX	0	80	0	15	1	5	47	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, doxorubicin, paklitaxel letrozol
	Po léčbě	N/A	N/A	1	0	0	30	70	50	47		
12	Před léčbou	IV	T4 N2 MX	1	90	0	60	N/A	N/A	75	ILC	tamoxifen, letrozol, doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel
	Po léčbě	IIA	T2 N0 MX	2	40	0	5	0	1	75		
Bazální												
13	Před léčbou	I	T1 N0 MX	1	0	0	85	5	5	39	NST	doxorubicin, cyklofosfamid
	Po léčbě	I	T1 N0 M0	pCR						39		
14	Před léčbou	IIB	T3 N1 MX	0	0	0	80	35	20	45	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel
	Po léčbě	IIB	T2 N1 M0	pCR						45		
15	Před léčbou	IIB	T2 N1 MX	0	0	0	45	70	50	55	NST	fluorouracil, epirubicin, cyklofosfamid, docetaxel
	Po léčbě	I	T1 N0 MX	pCR						55		
16	Před léčbou	IIB	T3 N0 MX	0	0	0	90	5	10	48	NST	doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel
	Po léčbě	IIA	T2 N0 M0	0	0	0	10	30	40	48		

ER – estrogenové receptory, PR – progesteronové receptory, Ki67 – proliferační aktivita, Casp3 – kaspáza 3, Dg. – diagnóza (histologický typ nádoru), NST – (invazivní karcinom prsu) nespecifického typu, ILC – invazivní lobulární karcinom, pCR – patologická kompletní odpověď, N/A - nehodnotitelné

**Tabulka 3. Claudiny a cadheriny: klinicko-patologická charakteristika 62 případů karcinomu prsu včetně porovnání stadia onemocnění a stupně diferenciacie nádoru před a po léčbě.**

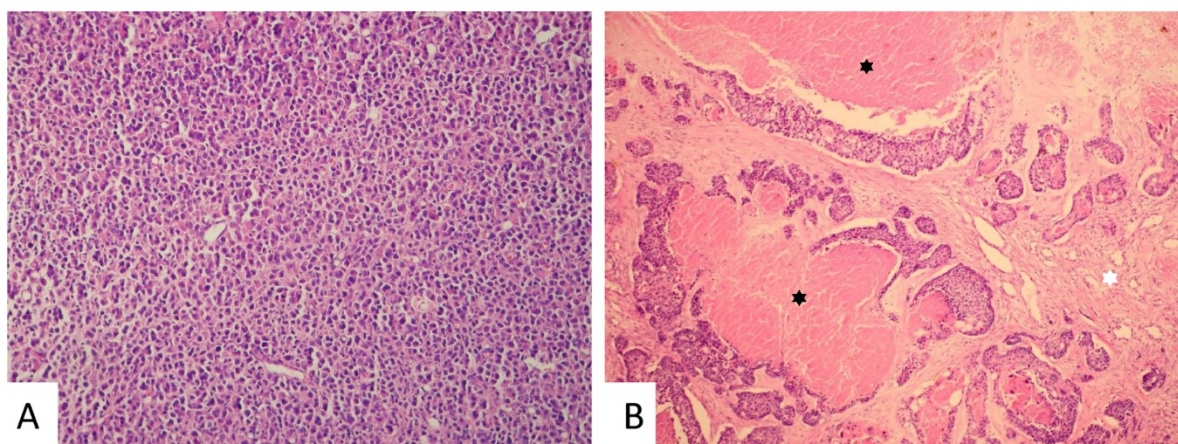
<b>Věk v době odběru core cut biopsie (roky)</b>		
<40	10 (16 %)	
40-60	34 (55 %)	
>60	18 (29 %)	
<b>Rozsah chirurgického výkonu</b>		
Mastektomie	32 (52 %)	
Prs šetřící výkon	30 (48 %)	
<b>Neoadjuvantní chemoterapie</b>		
Doxorubicin, cyklofosfamid	5 (8 %)	
Doxorubicin, cyklofosfamid, docetaxel	34 (55 %)	
Doxorubicin, cyklofosfamid, paklitaxel	3 (5 %)	
Fluorouracil, epirubicin, cyklofosfamid	3 (5 %)	
Letrozol	4 (6 %)	
Paklitaxel	2 (3 %)	
Jiné kombinace	11 (18 %)	
<b>Neoadjuvantní anti-HER2 léčba (trastuzumab)</b>		9 (15 %)
<b>Stádium onemocnění</b>	<b>Před léčbou</b>	<b>Po léčbě</b>
I	4 (6 %)	15 (25 %)
II	39 (63 %)	30 (48 %)
III	16 (26 %)	12 (19 %)
IV	2 (3 %)	2 (3 %)
Neznámé	1 (2 %)	3 (5 %)
<b>Změny stadia onemocnění po neoadjuvantní chemoterapii</b>		
Snížení	31 (50 %)	
Zvýšení	11 (18 %)	
Nezměněné	17 (27 %)	
Neznámé	3 (5 %)	
<b>Kategorie dle Chevallierovy klasifikace*</b>		
III	48 (77 %)	
IV	14 (23 %)	
<b>Grade nádoru</b>	<b>Před léčbou</b>	<b>Po léčbě</b>
G1	6 (10 %)	6 (10 %)
G2	33 (53 %)	30 (48 %)
G3	23 (37 %)	26 (42 %)
<b>Histologický typ nádoru</b>		
Invazivní karcinom NST	62 (100 %)	
<b>Mínoritní histologická komponenta v invazivním karcinomu NST**</b>		7 (12 %)
Lobulární	4 (6 %)	
Tubulární	1 (2 %)	
Neuroendokrinní	1 (2 %)	
Mikropapilární	1 (2 %)	

NST - (invazivní karcinom prsu) nespecifického typu, \* rozsah histologicky hodnocené regrese nádoru, \*\*5-20 % primárního nádoru



Před neoadjuvantní chemoterapií byla většina nádorů středně diferencovaná (grade 2), třetina níže diferencovaná (grade 3) a menšina dobře diferencovaná (grade 1). V tabulce 3 je uvedeno zastoupení jednotlivých grade nádorů před a po chemoterapii v souboru 62 případů v části práce týkající se claudinů a cadherinů. Přestože po léčbě mírně stouplo zastoupení níže diferencovaných nádorů a poklesl počet středně diferencovaných nádorů, celkově změny nebyly statisticky významné ( $p > 0,05$ ). Hodnocení diferenciací je nicméně u nádorů po chemoterapii méně spolehlivé z důvodu cytopatického efektu chemoterapie a v některých případech minimálního množství reziduální nádorové tkáně.

Ve vzorcích z definitivních resektátů po chemoterapii byly s různou intenzitou vyjádřeny regresivní změny nádorové tkáně (Obr. 1). U 70 % (57/82) nádorů odpovídaly kategorii III (III/IV) dle Chevallierovy klasifikace. V různém rozsahu byla patrná snížená buněčnost, u některých nádorů představovaly rezidua jen klastry buněk či jednotlivé buňky roztroušené ve fibrotizovaném stromatu. V některých případech část nádorových buněk jevila cytopatické změny vyvolané chemoterapií v podobě velkých nepravidelných až bizarních jader a vakuolizace cytoplazmy. Mitotická aktivita byla u většiny nádorů s výraznějšími regresivními změnami nenápadná. Často byly zastíženy ložiskové nekrózy a apoptoticky zanikající buňky. Fibróza či fibroelastóza byla obvykle výrazná, místy s vaskularizací, edémem, chronickou zánětlivou celulizací a makrofágy. V některých případech tvořil převažující část nádoru DCIS a invazivní složka byla zachycena pouze v malém rozsahu. U 25 % (21/82) nádorů byly změny po chemoterapii vyjádřeny pouze minimálně nebo vůbec a nález byl zařazen do kategorie IV (IV/IV) dle Chevallierovy klasifikace. Ve 4 případech (4/82, 5 %) již invazivní složka nádoru po léčbě zachycena nebyla a nález odpovídal kategorii II a I dle Chevallierovy klasifikace. V tabulce 3 je uvedeno zastoupení kategorií III a IV u 62 případů v části práce týkající se claudinů a cadherinů.

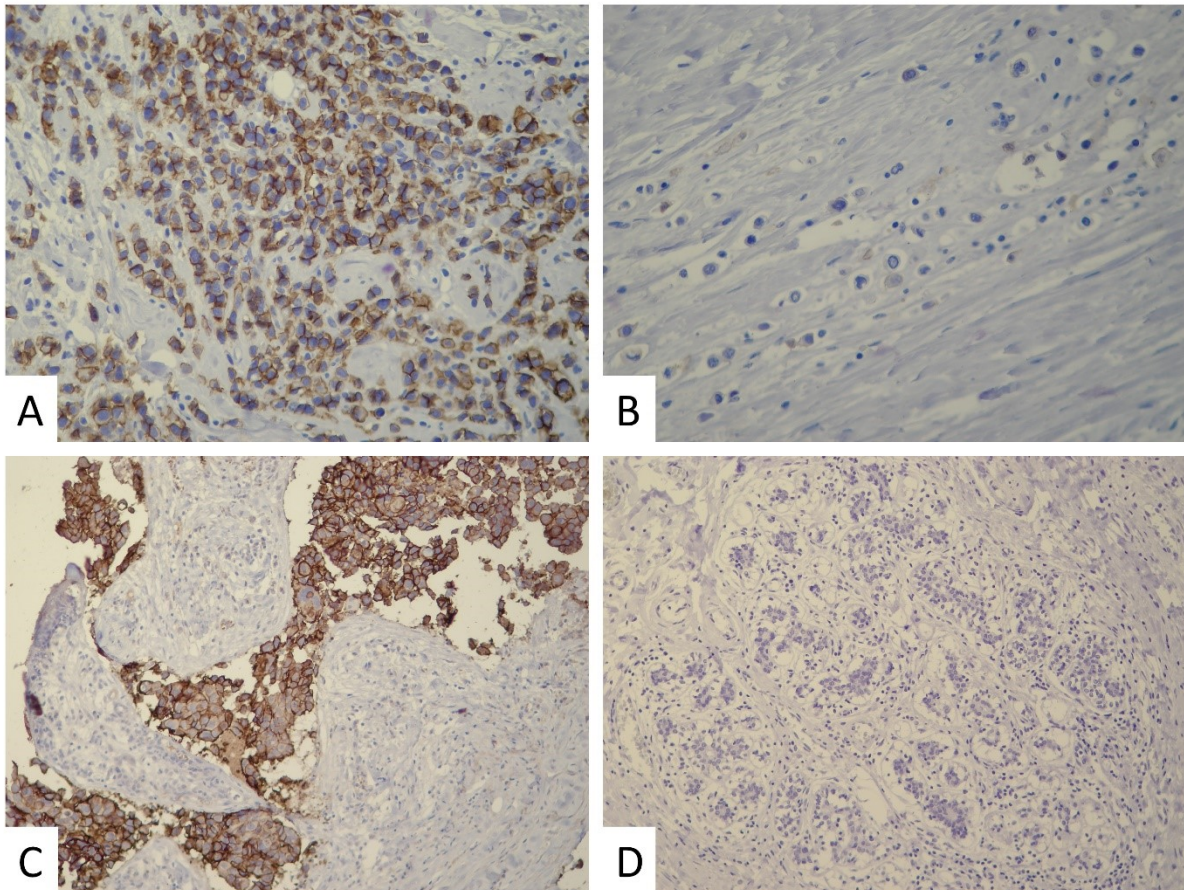


**Obrázek 1. Reprezentativní příklad invazivního karcinomu prsu nespecifického typu (NST, duktálního) před a po neoadjuvantní chemoterapii: (A) Invazivní karcinom NST solidního uspořádání v core cut biopsii před léčbou; HE, 200x. (B) Reziduální karcinom převážně solidního uspořádání s ložisky kribriformní úpravy s regresivními změnami [ložiskovou nekrózou (černé hvězdičky) a fibrózou (bílá hvězdička)] po léčbě; HE, 100x.**

## 4.2. Vyšetření standardních markerů karcinomu prsu

### 4.2.1. Vyšetření HER2 pomocí IHC, FISH a qRT-PCR

Do první části práce byly zahrnuty vzorky od 20 pacientek, jejichž klinicko-patologická charakteristika je shrnuta v tabulce 1. Při IHC vyšetření zůstal po léčbě status HER2 nezměněný ve 12 případech (12/20, 60 %), k menším změnám došlo v 6 případech (6/20, 30 %). Ve 2 případech (2/20, 10 % z celkového počtu 20 případů, 25 % z HER2 pozitivních nádorů) byla zaznamenána změna ze silné kompletní membránové positivity většiny buněk (3+) v jednom případě na slabou nekompletní membránovou pozitivitu u méně než 10 % nádorových buněk (1+) a ve druhém případě na úplnou absenci zbarvení (0), které obě spadají do kategorie negativní (Obr. 2).

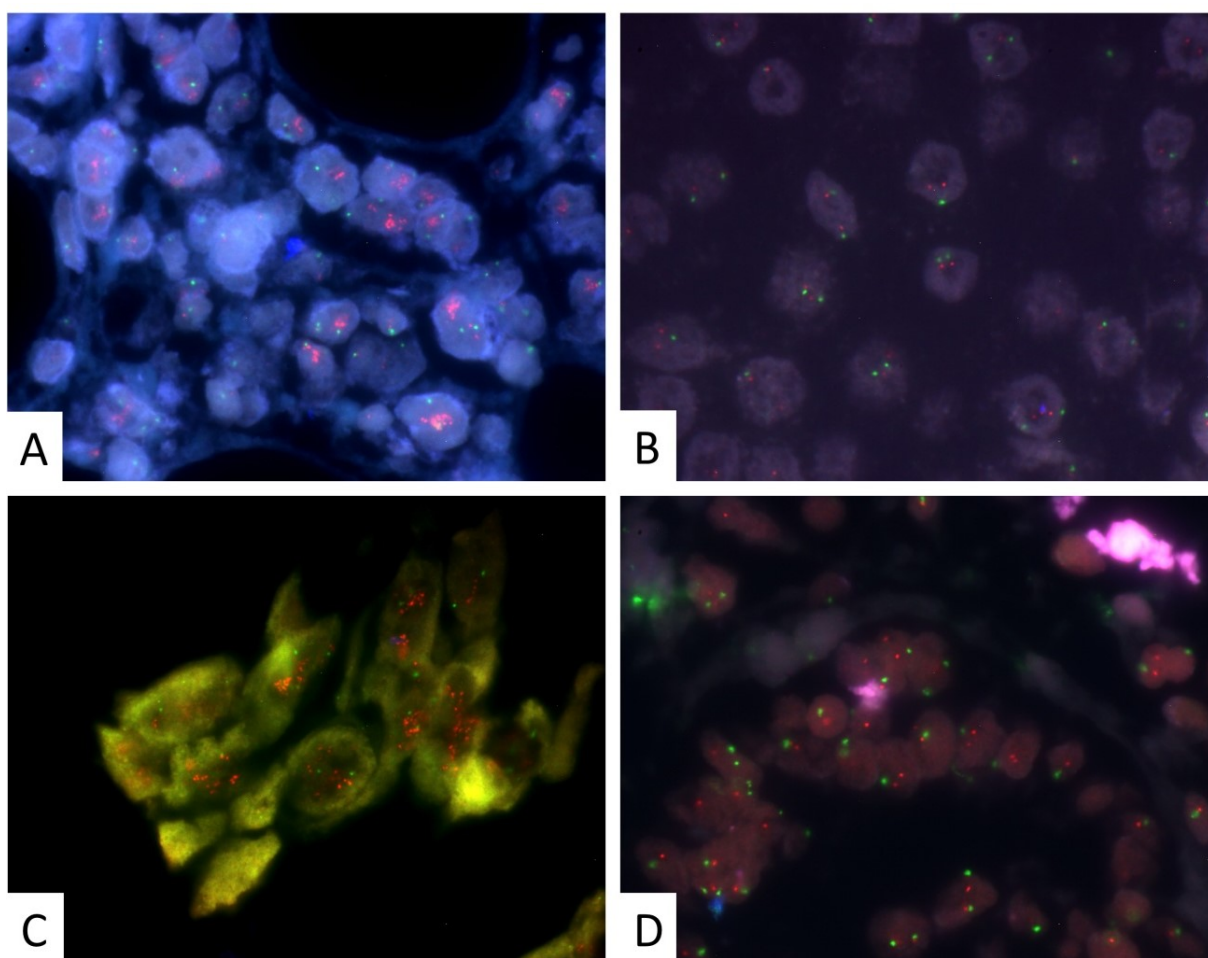


**Obrázek 2. Imunohistochemické vyšetření HER2: (A – případ č. 1, C – případ č. 4) Silná membránová pozitivita (3+) před neoadjuvantní chemoterapií, 200x. (B - případ č. 1) Velmi slabá nekompletní membránová pozitivita (1+) po léčbě, 200x. (D – případ č. 4) Úplná absence zabarvení (0) po léčbě, 200x.**

U všech vzorků byly zároveň IHC vyšetřeny hormonální receptory, přičemž u 7 pacientek (7/20, 35 %) se po chemoterapii exprese nezměnila vůbec nebo méně než o 10 % a u 13 pacientek (13/20, 65 %) se změnila o více než 10 % u jednoho či obou receptorů. Ve 2 případech (2/20, 10 %) byla zaznamenána výrazná ztráta exprese PR ze silné positivity většiny buněk v původním nádoru na velmi slabě pozitivní či zcela negativní u reziduálního nádoru. V obou případech se silnou změnou HER2 jsme však zásadní změny ve statusu hormonálních receptorů (>10 %) nezaznamenali. U obou pacientek došlo po neoadjuvantní chemoterapii k částečné regresi nádoru a snížení stadia onemocnění.

U obou případů se silnou změnou HER2 byly výsledky IHC ověřeny na úrovni DNA pomocí FISH a na úrovni RNA pomocí qRT-PCR. Výsledky vyšetření FISH byly následující: před léčbou byl v prvním případě poměr HER2/CEP17 3,6 (průměrný počet kopií CEP17

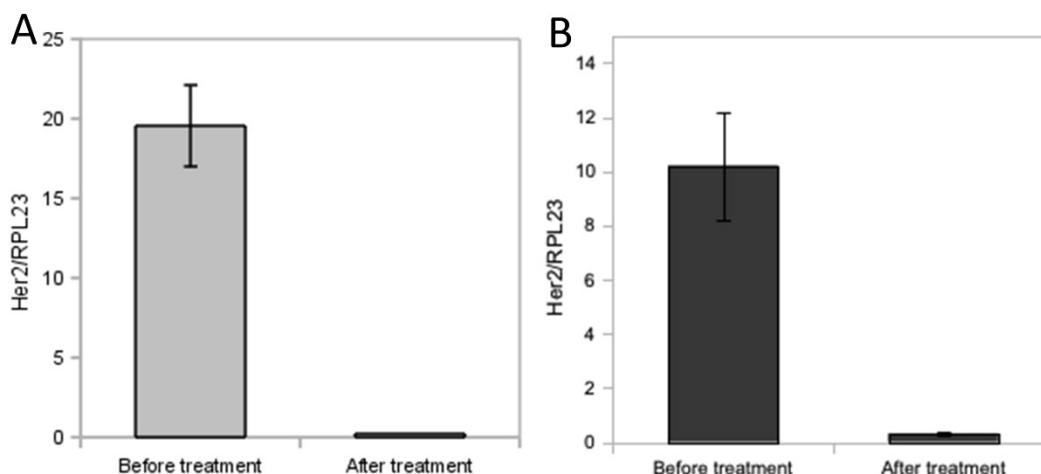
2,15; průměrný počet kopií genu *HER2* 7,75), ve druhém případě 6,4 (průměrný počet kopií *CEP17* 2,3; průměrný počet kopií genu *HER2* 14,6). Oba výsledky ze vzorků odebraných před chemoterapií byly vyhodnoceny jako pozitivní pro amplifikaci genu *HER2* (Obr. 3). Po léčbě byl v prvním případě poměr *HER2/CEP17* 1,5 (průměrný počet kopií *CEP17* 2,25; průměrný počet kopií genu *HER2* 3,3), ve druhém případě 1,3 (průměrný počet kopií *CEP17* 2,2; průměrný počet kopií genu *HER2* 2,9). Oba výsledky ze vzorků odebraných po chemoterapii byly vyhodnoceny jako negativní pro amplifikaci genu *HER2* (Obr. 3). Na úrovni DNA jsme tedy v obou případech prokázali amplifikaci genu *HER2* před léčbou, ale nikoliv po léčbě.



**Obrázek 3. Vyšetření *HER2* pomocí dvoubarevné fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) za použití sond pro gen *HER2* (červené signály) a centromeru chromozomu 17 (*CEP17*, zelené signály): (A – případ č. 1, C – případ č. 4) Amplifikace signálů *HER2* před léčbou, 1000x. Poměr *HER2/CEP17* byl 3,6 (A) a 6,4 (C). (B – případ č. 1, D – případ č. 4) Bez amplifikace po léčbě, 1000x. Poměr *HER2/CEP17* byl 1,5 (B) a 1,3 (D). Pozitivní výsledek byl definován jako  $HER2/CEP17 > 2$ .**

Výsledky vyšetření qRT-PCR byly následující: Před léčbou byl v prvním případě poměr HER2/RPL23  $19,6 \pm 2,5$  [počet kopií HER2  $(6,04 \pm 0,34) \times 10^5$ ; počet kopií RPL23  $(3,09 \pm 0,23) \times 10^4$ ], ve druhém případě  $10,2 \pm 1,9$  [počet kopií HER2  $(6,49 \pm 0,99) \times 10^4$ ; počet kopií RPL23  $6,35 \pm 0,26$ ]. Po léčbě byl v prvním případě poměr HER2/RPL23  $0,22 \pm 0,01$  [počet kopií HER2  $(1,88 \pm 0,26) \times 10^4$ ; počet kopií RPL23  $(8,66 \pm 0,82) \times 10^4$ ], ve druhém případě  $0,32 \pm 0,06$  (počet kopií HER2  $2,57 \pm 0,55$ ; počet kopií RPL23  $8,03 \pm 0,17$ ). Na úrovni RNA jsme tedy v obou případech prokázali overexpresi genu HER2 před léčbou a downregulaci po léčbě ( $p < 0,05$ ) (Obr. 4).

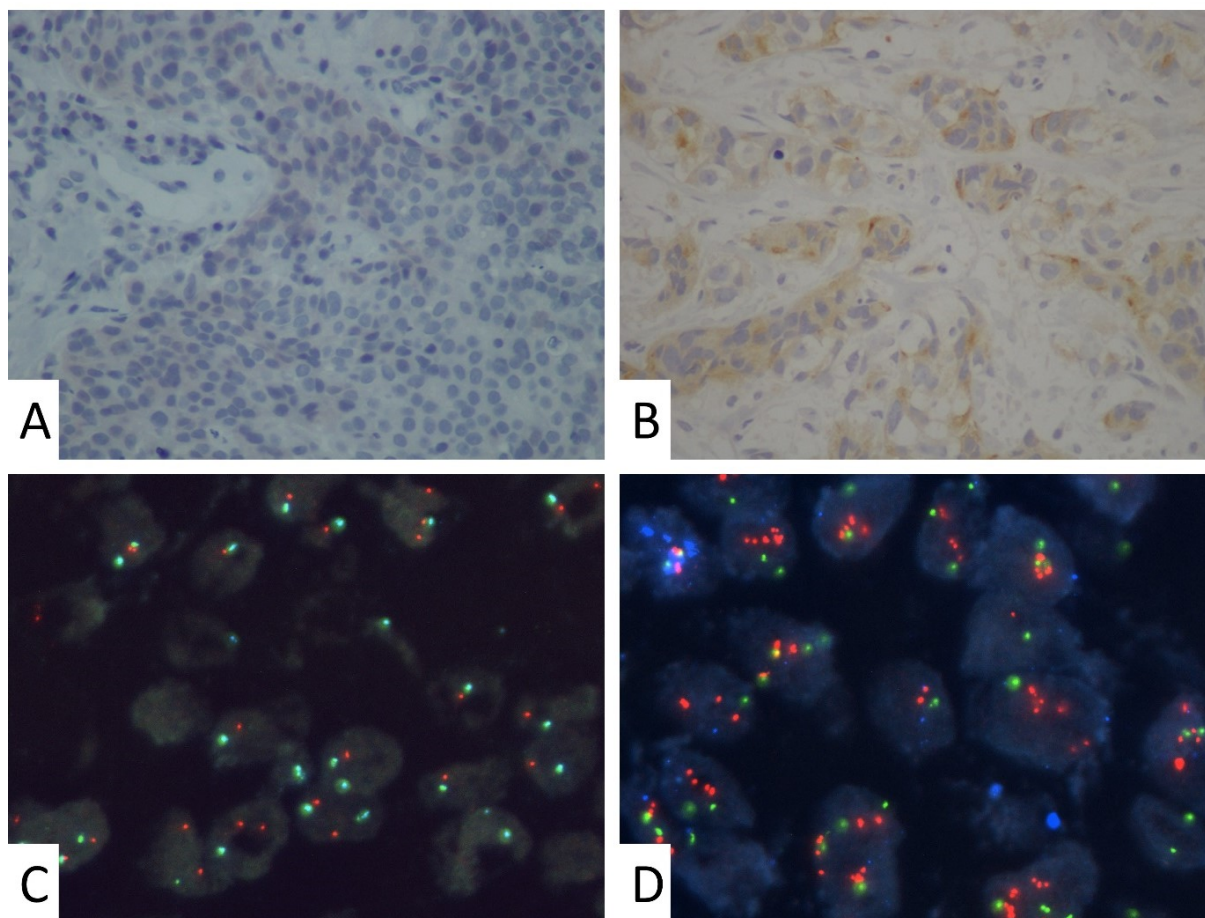
Pomocí metod FISH a qRT-PCR byla tedy potvrzena ztráta exprese HER2 u původně silně pozitivních nádorů v obou případech, které byly identifikovány pomocí IHC.



**Obrázek 4. Expresse HER na úrovni mRNA stanovená pomocí qRT-PCR: (A - případ č. 1, B - případ č. 4) Výsledek pozitivní pro amplifikaci HER2 byl definován jako poměr HER2 : RPL23  $> 2$  ( $p < 0,05$ , párový t-test).**

V další části práce, kde byly hodnoceny výsledky vyšetření HER2 u 62 pacientek, byl zaznamenán mírný nárůst exprese po neoadjuvantní chemoterapii (Tab. 4), který však nebyl statisticky významný ( $p > 0,05$ ). V tomto souboru nebyl zachycen žádný další případ ztráty exprese HER2 u původně silně pozitivního nádoru, nicméně zaznamenali jsme 4 případy, kdy se status HER2 změnil z negativního na pozitivní. 3 z těchto případů, které byly IHC

hodnoceny jako slabě pozitivní (2+), byly ověřeny metodou FISH, u 1 byl výsledek IHC silně pozitivní (3+) (Obr. 5).



**Obrázek 5. Reprezentativní příklad změny statusu HER2 z negativního před neoadjuvantní chemoterapií na pozitivní po chemoterapii [výsledek imunohistochemického vyšetření (IHC) byl potvrzen fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH)]: (A) Negativní HER2 v core cut biopsii před léčbou; IHC, 400x. (B) Slabá až středně silná membránová pozitivita HER2 u více než 10 % nádorových buněk hodnocená jako 2+ (pozitivní); IHC, 400x. (C, D) Dvoubarevná FISH se sondami pro gen *HER2* (červené signály) a centromeru chromozomu 17 (CEP17, zelené signály); 1000x. Poměr HER2/CEP17 byl 1,6 před (C) a 3,4 po léčbě (D); pozitivní výsledek byl definován jako  $HER2/CEP17 > 2$ .**

#### 4.2.2. IHC vyšetření hormonálních receptorů a proliferační aktivity

Statistická analýza exprese před a po neoadjuvantní chemoterapii byla provedena na souboru 62 případů (analýza zahrnovala ordinální kategorické proměnné - data neuvedena; tabulka 4 ukazuje zjednodušené dichotomicky kategorizované výsledky IHC vyšetření). Po léčbě došlo

k významnému poklesu exprese PR (medián před/po léčbě 25/2;  $Z=3,7$ ;  $p<0,001$ ) a Ki67 (medián před/po léčbě 25/10;  $Z=2,7$ ;  $p=0,01$ ). Status ER ani zastoupení triple-negativních nádorů se zásadněji nezměnily ( $p>0,05$ ).

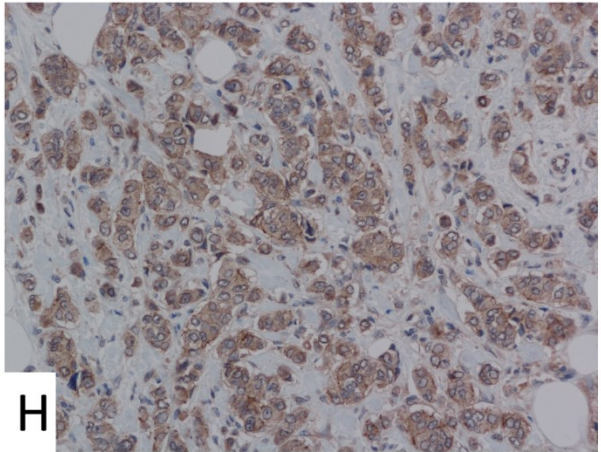
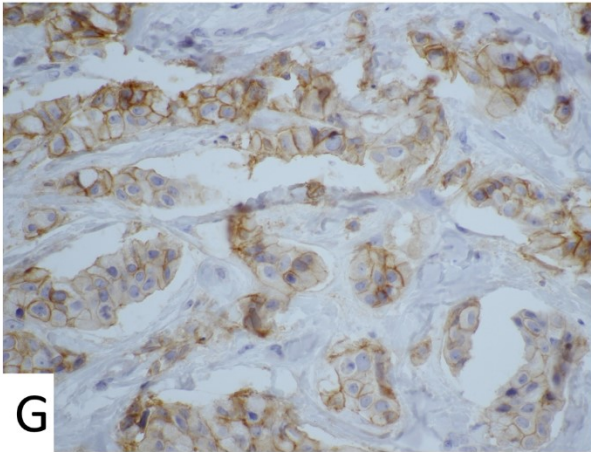
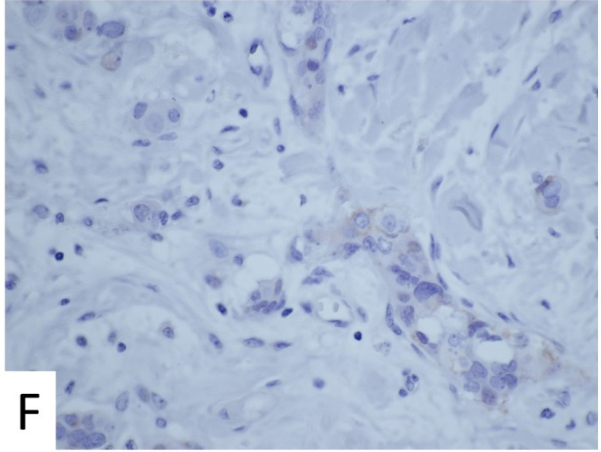
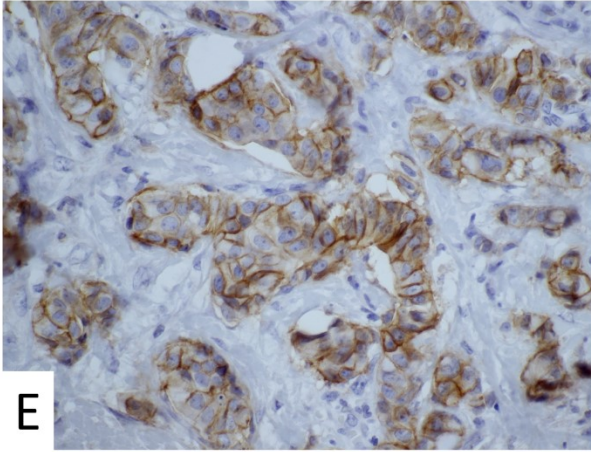
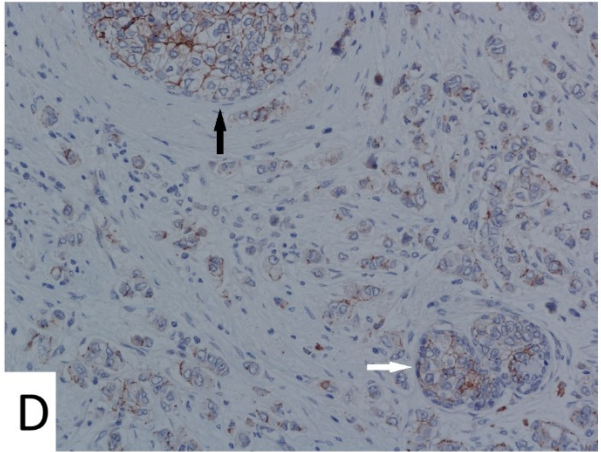
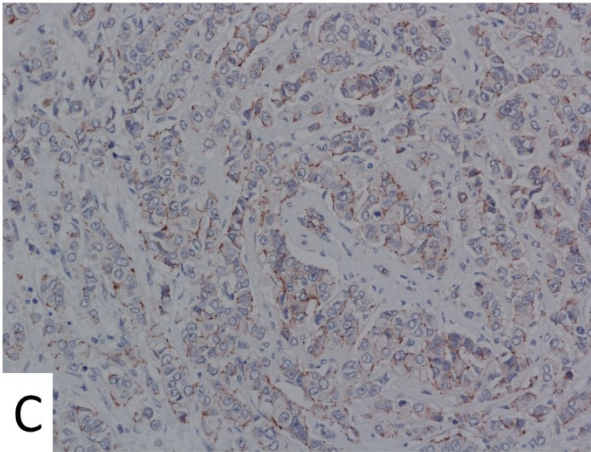
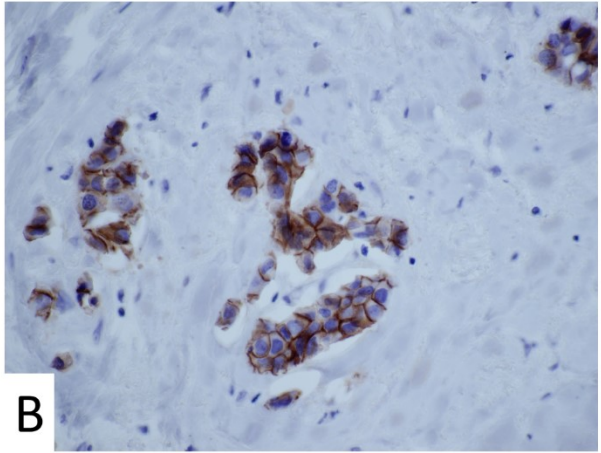
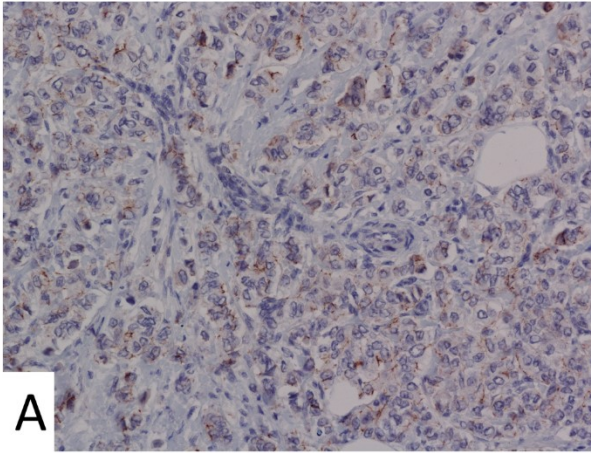
**Tabulka 4. Claudiny, cadheriny a standardní markery karcinomu prsu: imunohistochemická charakteristika 62 případů invazivního karcinomu prsu nespecifického typu (NST) před a po léčbě.**

Marker: exprese	Před léčbou	Po léčbě
Claudin-1: vysoká	25 (40 %)	34 (55 %)
Claudin-1: nízká	37 (60 %)	28 (45 %)
Claudin-3: vysoká	59 (95 %)	51 (82 %)
Claudin-3: nízká	3 (5 %)	11 (18 %)
Claudin-4: vysoká	61 (98 %)	58 (94 %)
Claudin-4: nízká	1 (2 %)	4 (6 %)
E-caderin: normální	47 (76 %)	44 (71 %)
E-caderin: aberantní	15 (24 %)	18 (29 %)
N-cadherin: negativní	47 (76 %)	48 (77 %)
N-cadherin: pozitivní	15 (24 %)	14 (23 %)
ER: pozitivní	45 (73 %)	48 (77 %)
ER: negativní	17 (27 %)	14 (23 %)
PR: pozitivní	39 (63 %)	35 (56 %)
PR: negativní	23 (37 %)	27 (44 %)
HER2: pozitivní	9 (15 %)	12 (19 %)
HER2: negativní	53 (85 %)	50 (81 %)
Ki67: nízká	43 (70 %)	25 (40 %)
Ki67: vysoká	19 (30 %)	37 (60 %)
Triple-negativní	12 (19 %)	10 (16 %)

Míra exprese je dichotomicky kategorizovaná podle předpokládaného dopadu na biologické chování nádoru a/nebo jeho odpověď na léčbu (vysoká - nízká, pozitivní - negativní, normální - aberantní). ER – estrogenové receptory, PR – progesteronové receptory, Ki67 – proliferační aktivita, triple-negativní – ER-, PR- a HER2-negativní

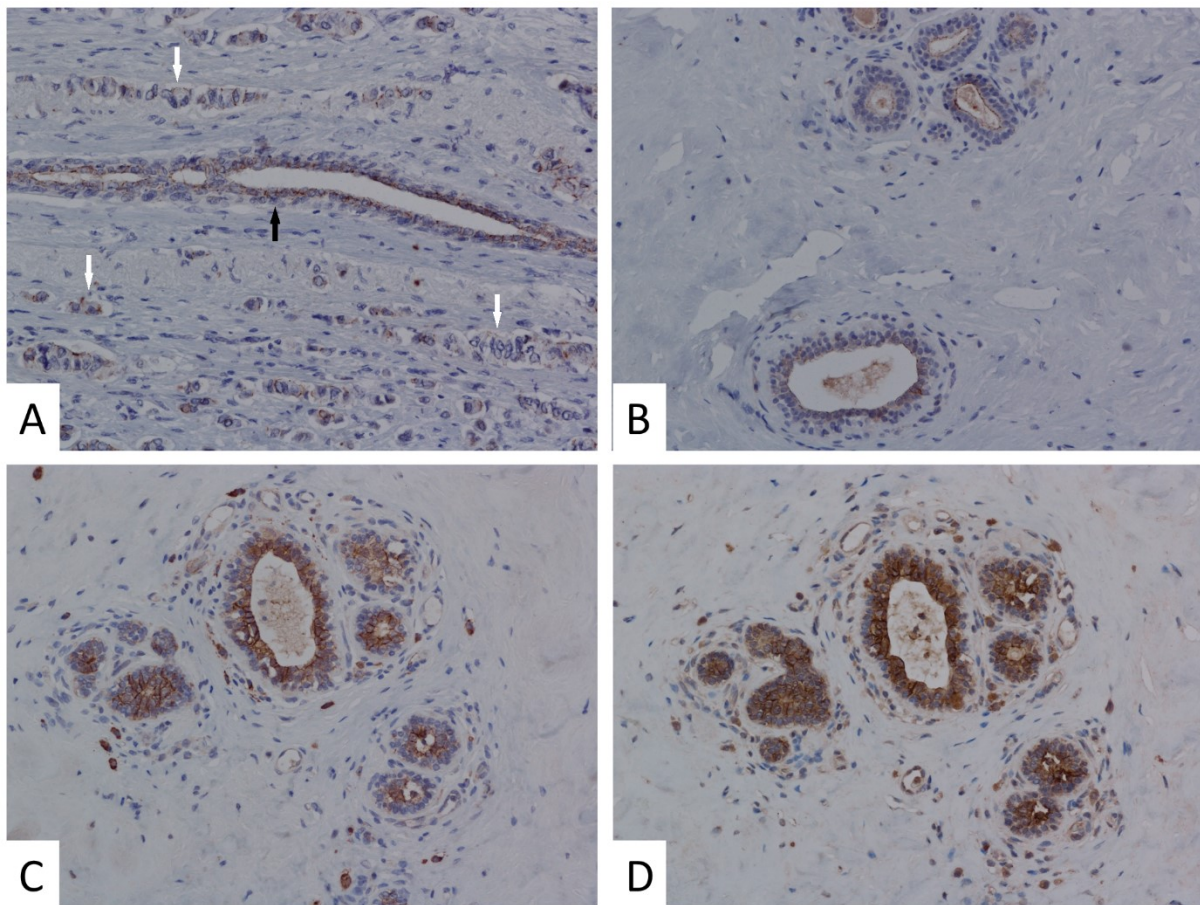
#### 4.3. IHC analýza claudinů 1, 3 a 4 a E- a N-cadherinu

Statistická analýza exprese před a po neoadjuvantní chemoterapii byla provedena na souboru 62 případů (analýza zahrnovala ordinální kategorické proměnné - data neuvedena; tabulka 4 ukazuje zjednodušené dichotomicky kategorizované výsledky IHC vyšetření). Před léčbou jevila většina nádorů vysokou expresi claudinů 3 a 4, nicméně u claudinu 1 převažovala nízká exprese (Tab. 4, Obr. 6).





Obrázek 6 (předchozí strana). Reprezentativní příklady změn exprese claudinů v invazivním karcinomu prsu nespecifického typu (NST) po neoadjuvantní chemoterapii stanovené imunohistochemicky: (A) Slabá tečkovitá membránová pozitivita claudinu 1 v core cut biopsii před léčbou; 200x. (B) Silná souvislá membránová pozitivita claudinu 1 v reziduální nádorové tkáni u stejné pacientky; 600x. (C) V některých buňkách tečkovitá, v jiných až souvislá membránová pozitivita claudinu 1 v core cut biopsii před léčbou; 200x. (D) Obdobný charakter exprese claudinu 1 v reziduální nádorové tkáni u stejné pacientky. Intenzivnější kontinuální pozitivitu lze pozorovat v ložiscích duktálního karcinomu *in situ* (DCIS, černá šipka) a drobném nenádorovém vývodu (bílá šipka); 200x. (E) Převážně souvislá membránová pozitivita claudinu 3 v core cut biopsii; 600x. (F) Téměř nerozeznatelné ložiskové membránové zabarvení claudinu 3 v reziduální nádorové tkáni u stejné pacientky; 600x. (G) Středně silná membránová pozitivita claudinu 4 ve většině nádorových buněk v core cut biopsii před léčbou; (retrakční artefakty) 600x. (H) Obdobný charakter exprese claudinu 4 v reziduální nádorové tkáni u stejné pacientky; 200x.



Obrázek 7. Reprezentativní příklad imunohistochemicky stanovené exprese claudinů v nenádorové tkáni mléčné žlázy: (A) Nenádorový vývod (černá šipka) obklopený invazivním

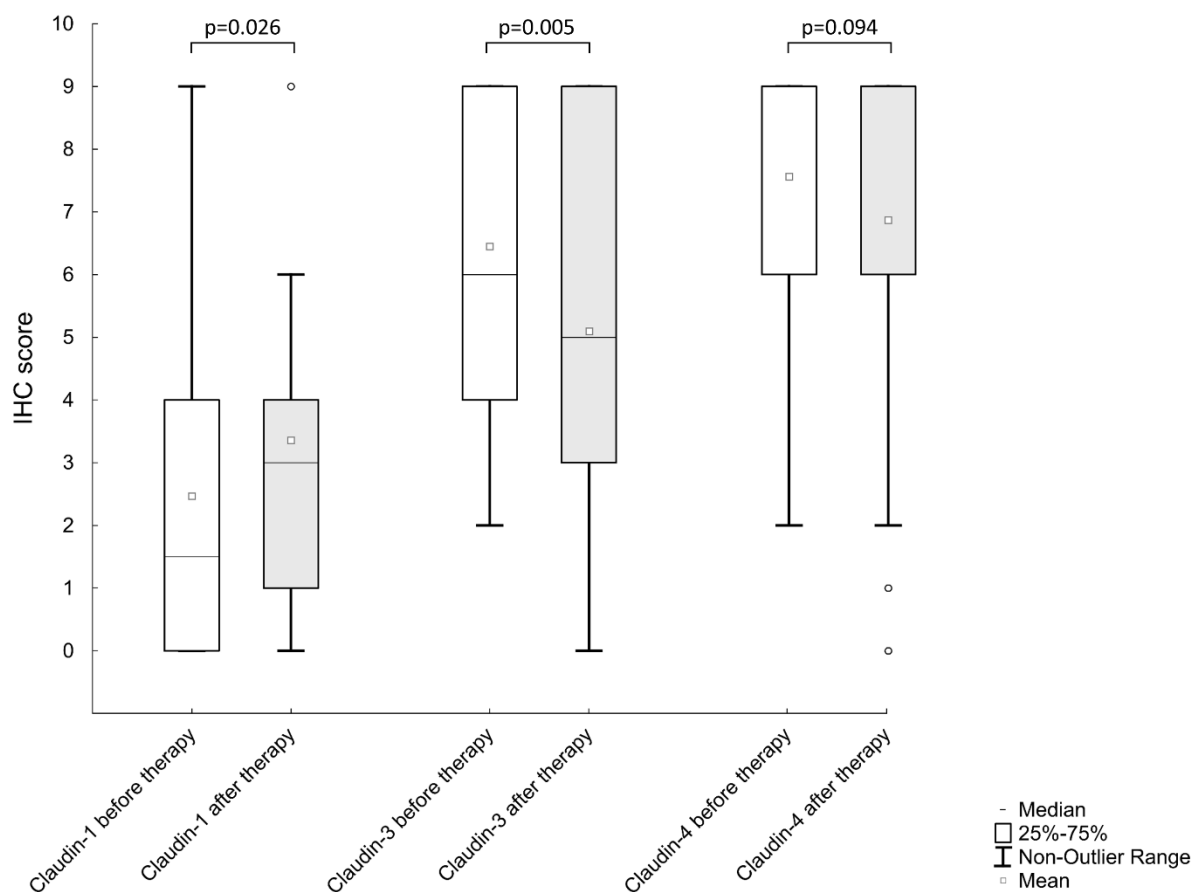
**karcinomem nespecifického typu (NST, duktálním), který se disperzně šíří v podobě drobných shluků buněk (bílé šipky) ve vazivovém stromatu. V přehledně zachycené části vývodu je exprese claudinu 1 soustředěná do apikální a přilehlé laterální části membrány luminálních buněk. V tomto případě nádorové buňky exprimovaly claudin 1 s přibližně stejnou intenzitou, nicméně bez polarity zřetelné u buněk nenádorových; 200x. (B) Terminální tubulo-lobulární jednotka s predominantně apikální expresí claudinu 1, která je obvykle slabší intenzity než exprese claudinu 3 a 4; 200x. (C, D) Stejná terminální tubulo-lobulární jednotka se silnou souvislou expresí claudinu 3, respektive claudinu 4 v apikální a laterální části membrány luminálních buněk; 200x.**

Zatímco membránová pozitivita claudinů 3 a 4 byla ve většině případů středně až silně intenzivní a souvislá, u claudinu 1 byla spíše tečkovitá a slabší. Přibližně ve třetině případů jsme pozorovali různě intenzivní cytoplazmatickou a/nebo jadernou pozitivitu claudinu 1 a v pětině případů slabou cytoplazmatickou pozitivitu claudinů 3 a 4. Apikolaterální polarita exprese claudinů, typická pro nenádorový epitel mléčné žlázy, nebyla v nádorových buňkách rozeznatelná (Obr. 7).

Přibližně čtvrtina nádorů před i po neoadjuvantní léčbě měla aberantní, tedy sníženou či chybějící, expresi E-cadherinu a u stejného počtu nádorů byla zaznamenána pozitivita N-cadherinu (Tab. 4).

Po léčbě došlo ke zvýšení exprese claudinu 1 (median před/po léčbě 1,5/3;  $Z=2,2$ ;  $p=0,03$ ) a snížení exprese claudinu 3 (median před/po léčbě 6/5;  $Z=2,8$ ;  $p=0,005$ ). Exprese claudinu 4 po léčbě mírně poklesla, nicméně rozdíl nebyl statisticky významný ( $p>0,05$ ) (Obr. 6 a 8). Exprese E- ani N-cadherinu se po léčbě výrazněji nezměnila ( $p>0,05$ ).

Přestože v žádném z vyšetřených vzorků před chemoterapií nebyla zachycena současná nízká exprese všech 3 claudinů, po léčbě se objevila ve 4 případech (4/62, 6 %), doprovázená současnou ztrátou exprese E-cadherinu. Pouze jeden z těchto nádorů byl však zároveň triple-negativní a jediný tedy splňoval navržená IHC kritéria pro podskupinu claudin-low. Další 3 triple-negativní nádory (3/62, 5 %) v souboru vzorků po léčbě splňovaly tato kritéria částečně, vzhledem k tomu, že naše studie nezahrnovala claudin 7. Dále bylo zaznamenáno 11 nádorů (11/62, 18 %) před a 10 (10/62, 16 %) po chemoterapii s vysokou expresí claudinů 1 a 4 a současně absencí exprese ER, které odpovídaly navrženým IHC kritériím podskupiny claudin-high. Dva claudin-high nádory (2/11, 17 %) overexprimovaly HER2 před léčbou a 1 (1/10, 6 %) po léčbě.



**Obrázek 8. Změny exprese claudinů po neoadjuvantní chemoterapii. Exprese claudinu 1 po léčbě vzrostla, zatímco exprese claudinu 3 poklesla. V expresi claudinu 4 k významným změnám nedošlo.**

#### 4.4. Korelace exprese claudinů, cadherinů a standardních markerů

Korelace exprese claudinů 1, 3 a 4, E- a N- cadherinu a standardních markerů karcinomu prsu byla provedena na podkladě IHC analýzy. Výsledky jsou však limitované velikostí souboru a jejich interpretace není jednoznačná.

Tabulka 5 zobrazuje korelaci exprese claudinů 1 a 3 k expresi ostatních sledovaných markerů. Negativní korelace mezi expresí claudinu 1 a ER byla zaznamenána u nádorů před léčbou ( $\chi^2=5,79$ ; degrees of freedom (df)=1;  $p=0,016$ ), ale nikoliv po léčbě. Vysoká exprese claudinu 1 negativně korelovala s expresí PR ( $\chi^2=4,66$ ; df=1;  $p=0,031$ ) a HER2 ( $\chi^2=5,35$ ; df=1;  $p=0,021$ ) a pozitivně s Ki67 ( $\chi^2=4,98$ ; df=1;  $p=0,026$ ) u nádorů po léčbě, ale nikoliv před léčbou. Vysoká exprese claudinu 1 dále pozitivně korelovala s triple-negativními nádory

před ( $\chi^2=4,29$ ;  $df=1$ ;  $p=0,038$ ) i po léčbě ( $\chi^2=5,95$ ;  $df=1$ ;  $p=0,015$ ). Souvislost mezi expresí claudinu 1 a N-cadherinu ani E-cadherinu nalezena nebyla ( $p>0,05$ ).

**Tabulka 5. Korelace exprese claudinu 1 a claudinu 3 se standardními markery karcinomu prsu a markery EMT.**

Marker	Claudin 1						Claudin 3		
	Před léčbou (n=62)			Po léčbě (n=62)			Po léčbě (n=62)		
Expres	p	Vysoká	Nízká	p	Vysoká	Nízká	p	Vysoká	Nízká
<b>Grade</b>	0,144			0,053			0,277		
G1-2		13	26		16	20		28	8
G3		12	11		18	8		23	3
<b>ER</b>	<b>*0,016</b>			0,156			0,700		
Pozitivní		14	31		24	24		39	9
Negativní		11	6		10	4		12	2
<b>PR</b>	0,144			<b>*0,031</b>			0,596		
Pozitivní		13	26		15	20		28	7
Negativní		12	11		19	8		23	4
<b>HER2</b>	1,000			<b>*0,021</b>			0,464		
Pozitivní		4	5		3	9		9	3
Negativní		21	32		31	19		42	8
<b>Ki67</b>	0,350			<b>*0,026</b>			0,702		
Vysoká		19	24		18	7		20	5
Nízká		6	13		16	21		31	6
<b>E-cadherin</b>	0,526			0,107			<b>*0,005</b>		
Aberantní		5	10		7	11		11	7
Normální		20	27		27	17		40	4
<b>N-cadherin</b>	0,977			0,844			0,484		
Pozitivní		6	9		8	6		12	2
Negativní		19	28		26	22		39	9
<b>Triple-negativní</b>	<b>*0,038</b>			<b>*0,015</b>			0,484		
Triple-negativní		8	4		9	1		9	1
ER+ / PR+ / HER2+		17	33		25	27		42	10

\* signifikantní korelace  $<0,05$ . EMT – epiteliálně-mezenchymální tranzice, ER – estrogenové receptory, PR – progesteronové receptory, Ki67 – proliferační aktivita, triple-negativní – ER-, PR- a HER2-negativní

V nádorech po léčbě exprese claudinu 3 pozitivně korelovala s expresí E-cadherinu ( $\chi^2=7,77$ ;  $df=1$ ;  $p=0,005$ ), nicméně souvislost s expresí N-cadherinu ani standardních markerů nalezena nebyla ( $p>0,05$ ). Statistickou analýzu vztahu exprese claudinu 3 k ostatním sledovaným markerům před léčbou a exprese claudinu 4 k ostatním sledovaným markerům před i po léčbě nebylo možné provést z důvodu nerovnoměrného rozložení dat ve skupinách

nádorů s nízkou a vysokou expresí (nízká exprese claudinu 3 byla zastižena pouze ve 3 případech, nízká exprese claudinu 4 v 1 případě před a ve 4 po léčbě).

Tabulka 6 zobrazuje korelaci exprese E- a N-cadherinu k ostatním sledovaným markerům. Exprese N-cadherinu negativně korelovala s ER ( $\chi^2=6,68$ ;  $df=1$ ;  $p=0,010$ ) a PR ( $\chi^2=4,45$ ;  $df=1$ ;  $p=0,035$ ) v nádorech před léčbou a pozitivně s HER2 ( $\chi^2=6,40$ ;  $df=1$ ;  $p=0,011$ ) v nádorech po léčbě. Pozitivita N-cadherinu byla častější v hůře diferencovaných nádorech jak před léčbou ( $\chi^2=4,45$ ;  $df=1$ ;  $p=0,035$ ), tak po léčbě ( $\chi^2=6,46$ ;  $df=1$ ;  $p=0,011$ ). Souvislost mezi expresí E-cadherinu a standardních markerů karcinomu prsu nalezena nebyla ( $p>0,05$ ). Neprokázali jsme ani souvislost mezi expresí E- a N-cadherinu ( $p>0,05$ ). Pouze 6 nádorů před (6/62, 10 %) a 4 nádory po léčbě (4/62, 6 %) jevíly současně aberantní expresi E-cadherinu a pozitivitu N-cadherinu.

**Tabulka 6. (A) Korelace exprese E-cadherinu se standardními markery karcinomu prsu a N-cadherinem.**

Marker Exprese	E-cadherin (A)					
	Před léčbou (n=62)			Po léčbě (n=62)		
	P	Normální	Aberantní	p	Normální	Aberantní
<b>Grade</b>	0,337			0,798		
G1-2		28	11		26	10
G3		19	4		18	8
<b>ER</b>	0,555			0,531		
Pozitivní		35	10		35	13
Negativní		12	5		9	5
<b>PR</b>	0,135			0,927		
Pozitivní		32	7		25	10
Negativní		15	8		19	8
<b>HER2</b>	0,674			0,715		
Pozitivní		6	3		8	4
Negativní		41	12		36	14
<b>Ki67</b>	0,701			0,320		
Vysoká		32	11		16	9
Nízká		15	4		28	9
<b>N-cadherin</b>	0,101			0,966		
Pozitivní		9	6		10	4
Negativní		38	9		34	14
<b>Triple-negativní</b>	1,000			0,404		
Triple-negativní		9	3		6	4
ER+ / PR+ / HER2+		38	12		38	14

**Tabulka 6 (pokračování). (B) Korelace exprese N-cadherinu se standardními markery karcinomu prsu a E-cadherinem.**

Marker Exprese	N-cadherin (B)					
	Před léčbou (n=62)			Po léčbě (n=62)		
	p	Negativní	Pozitivní	p	Negativní	Pozitivní
<b>Grade</b>	<b>*0,035</b>			<b>*0,011</b>		
G1-2		33	6		32	4
G3		14	9		16	10
<b>ER</b>	<b>*0,010</b>			0,542		
Pozitivní		38	7		38	10
Negativní		9	8		10	4
<b>PR</b>	<b>*0,035</b>			0,580		
Pozitivní		33	6		28	7
Negativní		14	9		20	7
<b>HER2</b>	0,201			<b>*0,011</b>		
Pozitivní		5	4		6	6
Negativní		42	11		42	8
<b>Ki67</b>	0,304			0,145		
Vysoká		31	12		17	8
Nízká		16	3		31	6
<b>E-cadherin</b>	0,101			0,966		
Aberantní		9	6		14	4
Normální		38	9		34	10
<b>Triple-negativní</b>	0,116			0,831		
Triple-negativní		7	5		8	2
ER+ / PR+ / HER2+		40	10		40	12

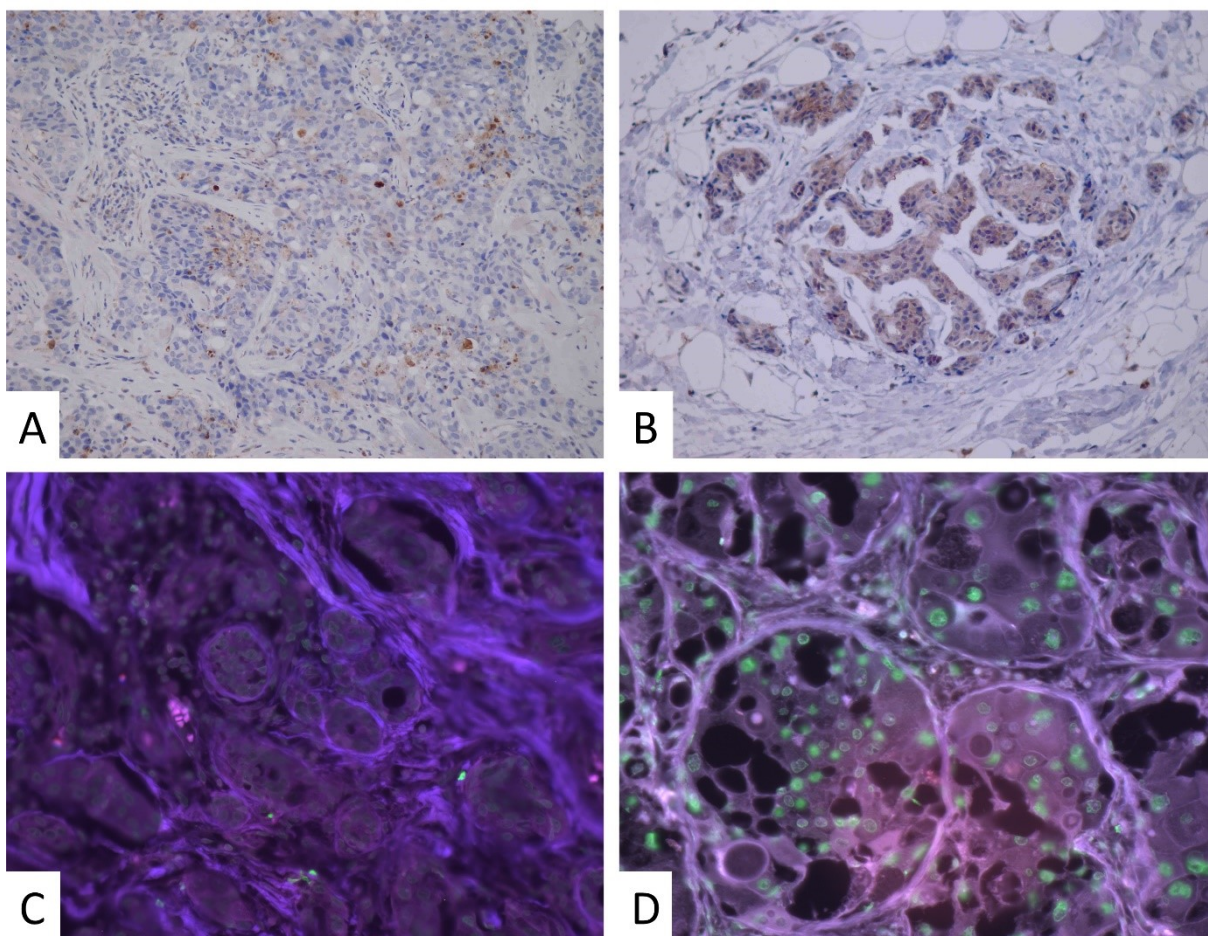
\* signifikantní korelace <0,05. ER – estrogenové receptory, PR – progesteronové receptory, Ki67 – proliferační aktivita, triple-negativní – ER-, PR- a HER2-negativní

Histologicky hodnocený rozsah regrese nádoru vyjádřený pomocí Chevallierovy klasifikace bez zohlednění dalších patologických a klinických dat negativně koreloval s expresí Ki67 před léčbou ( $\chi^2=5,97$ ;  $df=1$ ;  $p=0,015$ ), nicméně nezaznamenali jsme žádnou souvislost s expresí sledovaných claudinů ani cadherinů ( $p>0,05$ ). Tento výsledek však nelze považovat za zcela průkazný, vzhledem k tomu, že nádory s regresí spadající do kategorie I a II dle Chevallierovy klasifikace nebyly do této studie zahrnuty z důvodu absence invazivního karcinomu.

## 4.5. Geny apoptózy

### 4.5.1. Detekce apoptoticky zanikajících buněk

Oblasti vyššího výskytu nádorových buněk s cytoplazmatickou pozitivitou aktivované kaspázy 3 většinou odpovídaly oblastem s větším množstvím pozitivních jader při vyšetření TUNEL (Obr. 9). Pouze část těchto buněk zároveň jevila morfologické znaky odpovídající apoptóze. Na rozdíl od aktivované kaspázy 3 byla zvýšená pozitivita TUNEL místy zastižena i v ložiscích nekrózy nádoru.



**Obrázek 9. Reprezentativní příklad detekce apoptoticky zanikajících buněk. (A – před léčbou, B – po léčbě) Imunohistochemické vyšetření pomocí protilátky specifické proti aktivované kaspáze 3 s cytoplazmatickou pozitivitou apoptoticky zanikajících buněk, 200x. (C – před léčbou, D – po léčbě) Zelená fluorescence v jádrech apoptoticky zanikajících buněk, kde došlo k inkorporaci fluoresceinu-12-dUTP, 1000x.**

V tabulce 2 jsou uvedeny apoptotické indexy (AI) jednotlivých vzorků stanovené oběma metodami. Skutečnost, že navzájem dobře korelují ( $R=0,95$ ), svědčí pro srovnatelnou spolehlivost obou metod pro detekci apoptoticky zanikajících buněk.

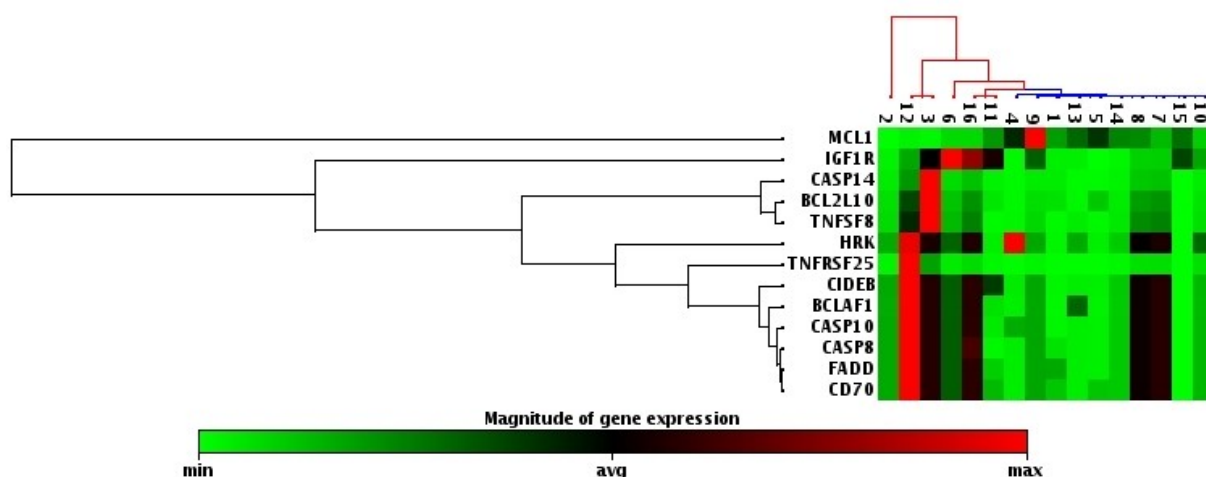
Po léčbě byl u 1 pacienta (1/16, 6 %) zaznamenán nápadnější pokles AI, u 2 pacientů (2/16, 12 %) značné zvýšení a v 8 případech (8/16, 50 %) menší změny do 5 %. U 3 pacientů (3/16, 19 %) nemohly být z technických důvodů výsledky vyhodnoceny.

#### 4.5.2. Profilování genové exprese

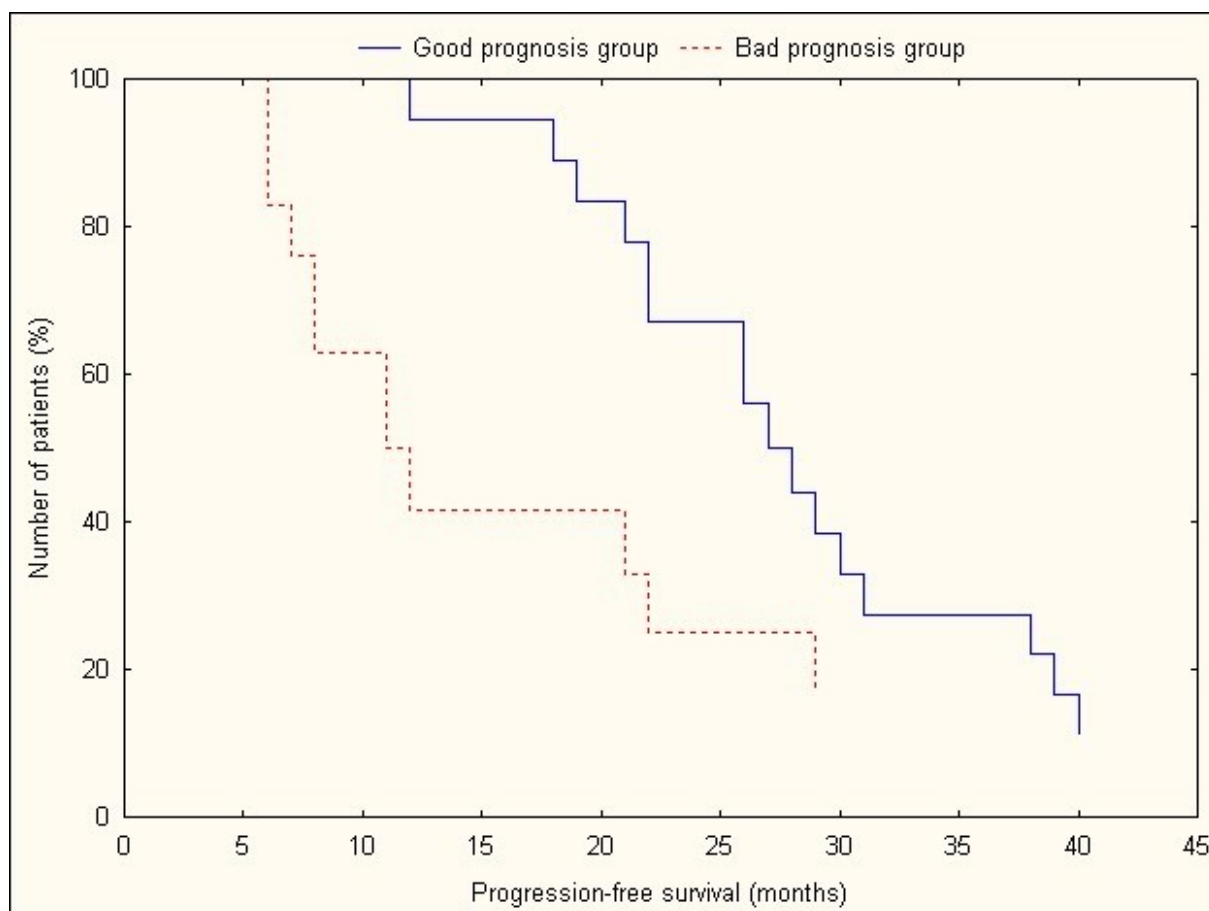
U všech spárovaných vzorků od 16 pacientek byl stanoven transkripční profil 84 klíčových genů apoptózy pomocí qRT-PCR. Nejprve jsme analyzovali vzorky odebrané před léčbou a porovnali je se skupinou 4 vzorků od pacientek s patologicky ověřenou kompletní remisí (pCR), která byla vybrána jako standard pro nádory s dobrou odpovědí na léčbu. U 13 ze sledovaných 84 genů byl v našem souboru vzorků prokázán prognostický význam ( $p<0,05$ ). Data byla zpracována pomocí hierarchické shlukové analýzy a na jejím základě byly pacientky rozděleny do dvou skupin (Obr. 10). Jedna skupina měla transkripční profil obdobný jako pacientky s patologicky ověřenou kompletní remisí, ostatní byly zařazeny do druhé skupiny. Tyto dvě skupiny dobře korelovaly s údajem přežití bez progresu (PFS, progression-free survival) a odpovídaly tedy skupině pacientek s dobrou (6/12, 50%) a špatnou prognózou (6/12, 50%) (Obr. 11).

Nakonec byla provedena analýza změn exprese jednotlivých prognosticky významných genů před a po chemoterapii. Ve skupině pacientek s dobrou prognózou jsme po léčbě zaznamenali downregulaci exprese genů *MCL1* a *IGF1R* a overexpresi genů *BCL2L10*, *BCL2A1*, *CASP8*, *CASP10*, *CASP14*, *CIDEB*, *FADD*, *HRK*, *TNFRSF25*, *TNFSF8* a *CD70*. Ve skupině pacientek se špatnou prognózou byla nalezena pouze upregulace genu *IGF1R*, zatímco exprese ostatních genů se významněji nezměnila (Obr. 12).

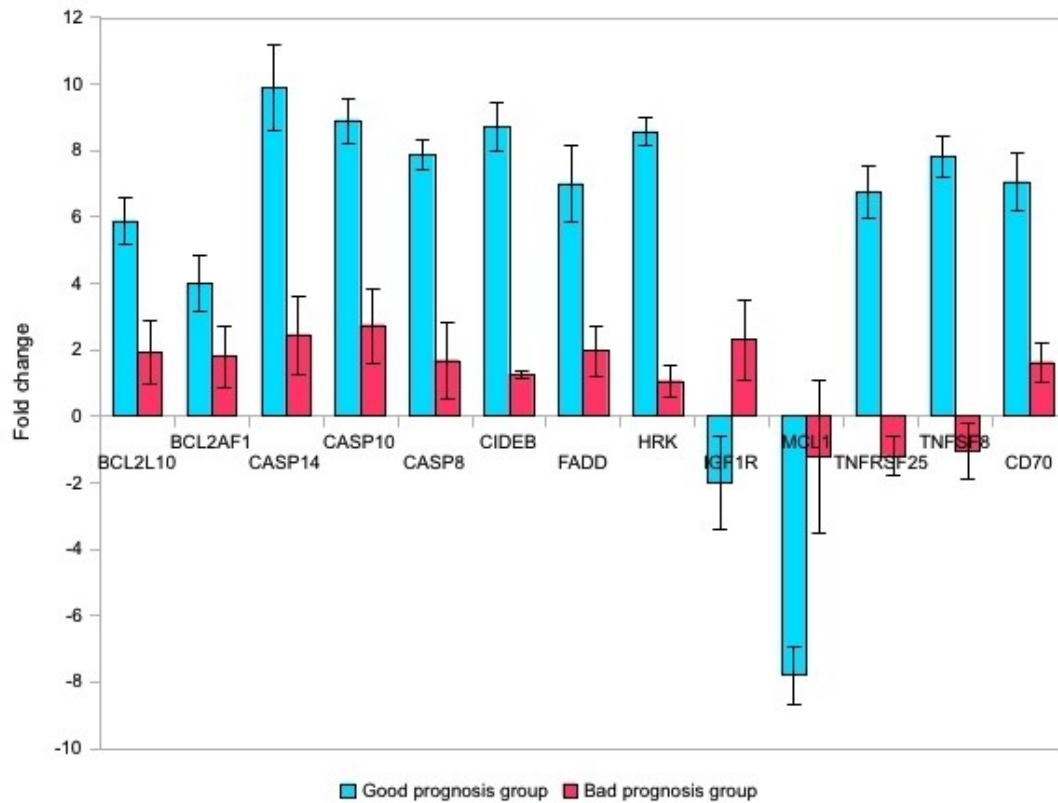




Obrázek 10. Dendrogram z hierarchické shlukové analýzy exprese genů asociovaných s apoptózou v karcinomu prsu u 16 pacientek. Profilování genové exprese bylo provedeno pomocí qRT-PCR. Nadprůměrná exprese pro daný gen je znázorněna červenými čtverci, podprůměrná zelenými. Větve reprezentující případy s dobrou odpovědí na léčbu jsou znázorněny modře, se špatnou odpovědí na léčbu červeně.



Obrázek 11 (předchozí strana). Doba přežití bez progresu (progression-free survival, PFS). Analýza exprese 13 genů asociovaných s apoptózou ukázala významný rozdíl mezi skupinami s dobrou a špatnou prognózou ( $p < 0,05$ ).



Obrázek 12. Změny v expresi genů asociovaných s apoptózou po léčbě. Dvojnásobná změna v genové expresi byla stanovena jako práh pro hodnocení upregulace (kladné hodnoty) a downregulace (záporné hodnoty). V expresi uvedených genů byly zjištěny významné rozdíly v expresi před a po léčbě ( $p < 0,05$ ).

## 5. DISKUZE

Karcinom prsu je jedním z mála solidních nádorů, u kterých se IHC vyšetřované prediktivní markery používají v rutinní praxi již desítky let. Standardní IHC panel prediktivních markerů, zahrnující ER, PR, HER2 a Ki67 slouží jak k odhadu chemosenzitivity nádoru, tak k průkazu exprese hormonálních receptorů a overexprese HER2, který je pro indikaci hormonální, resp. cílené biologické anti-HER2 léčby nezbytný (Lakhani S. R. et al., 2012). Řada studií prokázala u karcinomu prsu častou a vysokou intercelulární karyotypickou variabilitu nezřídka s masivními chromozomálními přestavbami, která se odráží v nejednotné expresi markerů jak v různých oblastech nádoru, tak v primárním nádoru a metastázách, ale i v rozdílech mezi expresním profilem primárního a recidivujícího onemocnění (Saint-Ruf C. et al., 1990; Saint-Ruf C. et al., 1991; Pandis N. et al., 1995; Pandis N. et al., 1998; Teixeira M. R. et al., 2001). Další práce včetně této upozornily na možné změny základního IHC profilu karcinomu prsu u pacientek po neoadjuvantní léčbě (Varga Z. et al., 2005; Lee H. C. et al., 2007; Adams A. L. et al., 2008; Yin H. F. et al., 2009; Kinsella M. D. et al., 2012).

Několik předcházejících studií porovnávalo expresi standardních IHC biomarkerů karcinomu prsu v diagnostické punkční biopsii a chirurgickém resekátu jak u pacientek, které nepodstoupily, tak u pacientek, které podstoupily neoadjuvantní chemoterapii. U pacientek bez neoadjuvantní chemoterapie byla vysoká shoda všech 4 markerů (Asogan A. B. et al., 2017; Dekker T. J. et al., 2013; You K. et al., 2017). Většina studií zahrnujících pacientky po neoadjuvantní chemoterapii však odhalila mezi oběma vzorky podstatné změny (Kinsella, M. D. et al., 2012; Yin H. F. et al., 2009; van de Ven S. et al., 2011; Yoshida A. et al., 2017; Li P. et al., 2013; Cabrera-Galeana P. et al., 2018; Moazed V. et al., 2018; Dede D. S. et al., 2013; Lee H. C. et al., 2013).

Expresse hormonálních receptorů v karcinomech prsu podléhá selekčnímu tlaku chemoterapie různě intenzivně. Zatímco ER jsou poměrně stabilní, exprese PR často významně klesá, stejně jako v našem souboru vzorků (Yin H. F. et al., 2009; Kinsella M. D. et al., 2012). Expresse PR je závislá na funkční signální dráze regulované ER a je indikátorem jejího stavu. Nádory exprimující ER, ale nikoliv PR, proto hůře odpovídají na hormonální

terapii. Ze stejného důvodu se prakticky nevyskytují karcinomy prsu, které by exprimovaly pouze PR (Thakkar J. P. et al., 2011; Ryška A., 2015). Pokles Ki67 po léčbě, který jsme zaznamenali, je obvyklý jev způsobený antiproliferačním účinkem cytotoxické léčby (Yoshioka T. et al., 2015; Cabrera-Galeana P. et al., 2018; Moazed V. et al., 2018).

Status HER2 se i přes zaznamenané změny projevil spíše jako stabilní faktor v souladu s většinou relevantních studií jiných autorů (Taucher S. et al., 2003; Tinari N. et al., 2006; Lee H.C. et al., 2007; D'Alfonso T. et al., 2010; Kinsella M. D. et al., 2012). Další práce však popisují jak upregulaci (Adams A. L. et al., 2008) tak downregulaci HER2 po léčbě (Yoshida A. et al., 2017). Přestože celkově se status HER2 po léčbě v našem souboru vzorků významně nezměnil, v jednotlivých případech byla zaznamenána změna z negativního na pozitivní. Příčinou tohoto jevu však může být nerovnoměrná, pouze ložisková overexprese HER2 v některých nádorech, která v malých vzorcích z core cut biopsie nemusí být zastižena (Davila E. et Amazon K., 2010).

V další části naší práce byla v menším souboru pacientek zachycena poměrně neobvyklá ztráta exprese HER2 z původní silně pozitivní (3+) na negativní (0 a 1+). Stejná změna byla ojediněle popsána i v jiných studiích (Varga Z. et al., 2005; Adams A. L. et al., 2008). Příčinou by mohla být koexistence 2 klonů v nádorové populaci buněk, z nichž jeden HER2 overexprimuje a druhý nikoliv. Při kombinované léčbě chemoterapií a anti-HER2 protilátkou potom nádorová populace s overexpresí téměř nebo zcela zaniká a v reziduálním nádoru převáží buňky bez overexprese, které jsou na léčbu méně citlivé (Adams A. L. et al., 2008).

Spárované vzorky, kde se změna vyskytla, byly testovány pomocí 3 nezávislých metod (IHC, FISH, qRT-PCR), vzhledem k tomu, že ani přes maximální optimalizaci přípravy vzorků nelze ojedinělé případy falešné negativity IHC vyšetření způsobené ztrátou epitopů při nedostatečné fixaci tkáně resekátů po léčbě zcela spolehlivě vyloučit. Nyní již v praxi rutinně používaná metoda FISH detekuje amplifikaci genu na úrovni DNA a umožňuje odlišení prosté amplifikace genu HER2 a chromozomální duplikace. Metody kvantitativní PCR představují dostupnou alternativu pro FISH a umožňují detekci na úrovni DNA i RNA (Bieche I. et al., 1999). V porovnání s FISH se jedná o citlivější, rychlejší a jednoduché metody, umožňující testování mnoha vzorků najednou, nicméně v případě qRT-PCR je problematické získání dostatečného množství kvalitní RNA, která bývá v materiálu z parafinových bločků degradovaná (Riehle U. et al., 2010). Pokud je nám známo, naše práce byla první, kde byl status HER2 vyšetřen na všech úrovních, tzn. proteinu, DNA a RNA.

Dobrá korelace výsledků qRT-PCR s výsledky IHC a FISH byla následně ověřena na větším souboru vzorků (Tvrdek D. et al., 2012). V následujících letech další autoři navrhli využití qRT-PCR jako doplňující test v případech s hraničním nebo nejasným výsledkem FISH (Zoppoli G. et al., 2017).

Na podkladě studií popisujících změny exprese standardních markerů po chemoterapii bylo v minulosti doporučeno IHC vyšetření provedené na vzorcích z core cut biopsie zopakovat na vzorcích z definitivních resekátů před indikací adjuvantní terapie. V současné době se upouští od opakování vyšetření v případě jednoznačné pozitivita ER, PR a HER2 v core cut biopsii, u HER2 právě s výjimkou pacientek po neoadjuvantní chemoterapii, u kterých je výskyt výrazných změn pravděpodobnější. Přestože ztráta exprese PR je po chemoterapii častá, pro indikaci hormonální léčby je postačující pozitivita ER, které se jeví jako poměrně stabilní (Goldhirsch A. et al, 2005; Yin H. F. et al., 2009; Kinsella M. D. et al., 2012). Vyšetření proliferační aktivity, která je přímo úměrná citlivosti nádoru na chemoterapii, je doporučeno opakovat vždy, vzhledem k tomu, že její pokles je v důsledku chemoterapie obvyklý.

Změny standardně vyšetřovaných markerů karcinomu prsu po chemoterapii byly tedy již popsány více autory, nicméně pokud je nám známo, dosud se žádná studie nezabývala stabilitou exprese claudinů, které byly v nedávné době navrženy jako další markery pro rozšíření molekulární klasifikace karcinomu prsu. V naší práci jsme zaznamenali změny v expresi 2 ze 3 sledovaných claudinů. Exprese claudinu 1 po léčbě vzrostla, zatímco exprese claudinu 3 poklesla. V expresi claudinu 4 k významným změnám nedošlo.

Exprese claudinu 1 v karcinomu prsu je obvykle podstatně nižší než v nenádorových lumenálních buňkách prsní žlázy (Lu S. et al., 2013). Dle recentně publikovaných studií může *CLDN1* v průběhu karcinogeneze působit v závislosti na typu nádoru a dalších dosud ne zcela zřejmých okolnostech buď jako tumor supresorový gen, nebo jako protoonkogen (Kwon M. J., 2013; Zhou B. et al., 2015). Jeho lokalizace v nádorových buňkách nemusí být omezená pouze na oblast mezibuněčných těsných spojů, ale stejně jako v našem souboru vzorků se často vyskytuje i v cytoplazmě a jádře (Dhawan P. et al., 2005; Zhou B. et al., 2015). V případě tumor supresivního účinku je jeho snížená exprese spojována s výraznější EMT a kolektivní migrací na invazivním okraji nádoru a pravděpodobně přispívá k chemorezistenci nádoru (Li M. et al., 2009; Fortier A. M. et al., 2013; Zhou B. et al., 2015). My jsme však po chemoterapii zaznamenali zvýšení jeho exprese naznačující zapojení jiných mechanismů,

kteře by mohly souviset např. s vyšší proliferací aktivitou. Ta korelovala s vysokou expresí claudinu 1 po léčbě, přestože celkově došlo v našem souboru vzorků ke snížení exprese Ki67.

Vysokou expresi claudinu 1 jsme pozorovali častěji u triple-negativních karcinomů než hormonálně dependentních a/nebo overexprimujících HER2, a to jak před, tak po chemoterapii. V souladu s našimi výsledky byla v několika dalších studiích popsána vyšší exprese claudinu 1 u bazálních karcinomů, z nichž většina je triple-negativní (Blanchard A. A. et al., 2013; Lu S. et al., 2013). Před léčbou byla vysoká exprese claudinu 1 častější u ER-negativních než ER-pozitivních nádorů a po léčbě u PR-negativních než PR-pozitivních a HER2-negativních než HER2-pozitivních. Vysokou expresi claudinu 1 v ER-negativních karcinomech dokumentuje také několik dalších studií (Blanchard A. A. et al., 2009; Zhou B. et al., 2015). Kombinace uvedených faktorů obvykle svědčí pro agresivnější, méně diferencované nádory, u kterých nelze očekávat odpověď na hormonální ani anti-HER2 léčbu, nicméně obvykle jsou alespoň na počátku terapie chemosenzitivní (Goldhirsch A. et al., 2005, Lakhani S. R. et al. 2012).

Asociace se standardními markery karcinomu prsu se dále projevila u N-cadherinu. Jeho pozitivitu jsme pozorovali častěji u nádorů ER- a/nebo PR-negativních než ER- a/nebo PR-pozitivních před léčbou a HER2-pozitivních než HER2-negativních po léčbě. Získaná exprese N-cadherinu podporuje invazivní fenotyp a metastatický potenciál u středně až špatně diferencovaných karcinomů prsu, a ty také často ztrácejí expresi hormonálních receptorů a/nebo overexprimují HER2 (ElMoneim H. M. et Zaghoul N. M., 2011; Qian X. et al., 2014). Přes některé obdobné rysy ve vztahu ke standardním markerům karcinomu prsu, zejména hormonálním receptorům, jsme neprokázali souvislost mezi claudinem 1 a N-cadherinem.

Claudiny 3 a 4 jsou příbuzné proteiny a pravděpodobně podléhají stejným regulačním mechanismům (Shang X. et al., 2012; Osanai M. et al., 2017). Jejich exprese je v karcinomech prsu obvykle vysoká, stejně jako v lumenálních buňkách normální prsní žlázy (Kulka J. et Tokes A. M., 2005; Singh A. B. et al., 2010; Turksen K. et Troy T. C., 2011; Ding L. et al., 2013). Vysokou expresi obou claudinů jsme zastihli u většiny nádorů v obou skupinách. Oba claudiny se podílejí na zachování epiteliálního fenotypu modulací exprese hlavních EMT markerů, zejména podporou exprese E-cadherinu (Lin X. et al., 2013), a také naše výsledky naznačují korelaci mezi claudinem 3 a E-cadherinem.

Vzhledem k těmto interakcím mezi claudiny a cadheriny se můžeme domnívat, že snížení exprese claudinů 3 a 4 v nádorových buňkách zvýší jejich rezistenci k chemoterapii.

Pokles exprese claudinu 3 po léčbě tuto hypotézu podporuje, předpokládáme-li, že by mohl být projevem zániku části nádorové buněčné populace s vysokou expresí, která je na chemoterapii citlivá, a následného relativního či absolutního zmnožení klonu nádorových buněk s nižší expresí i citlivostí k chemoterapii. Výsledky relevantních studií jsou často protichůdné a je obtížné je interpretovat ve vztahu k naší práci, protože většina se zabývala ovariálními karcinomy léčenými deriváty platiny, které se v běžných režimech chemoterapie karcinomu prsu používají podstatně méně často než antracykliny a taxany (Li M. et al., 2009; Fortier A. M. et al., 2013; Shang X. et al., 2013). Shrňeme-li však závěry těchto studií, více autorů se přiklání k původnímu předpokladu, že redukovaná exprese claudinů 3 a 4 přispívá k chemorezistenci, nelze ovšem vyloučit vliv dalších faktorů, např. typu nádoru a chemoterapeutika (Kwon, M. J., 2013).

Přestože většina invazivních karcinomů prsu NST intenzivně exprimuje claudiny 3 a 4 a E-cadherin, není známo, zda jejich exprese souvisí s některým ze standardních markerů. Několik autorů uvádí mírně vyšší expresi claudinu 3 u ER-pozitivních než u ER-negativních nádorů, vyšší expresi claudinu 4 u ER-negativních a bazálních nádorů (obvykle triple-negativních) a aberantní expresi E-cadherinu u ER-negativních nádorů, nicméně v jiných studiích tyto souvislosti nalezeny nebyly (Kowalski P. J. et al., 2003; Soini Y., 2004; Blanchard A. A. et al., 2009; Kulka J. et al., 2009; Lu S. et al., 2013). Data získaná v aktuální studii nebyla dostatečná pro statistickou analýzu korelace exprese claudinu 4 s expresí ostatních sledovaných markerů a pouze částečně vyhovující pro analýzu exprese claudinu 3, u kterého jsme neprokázali souvislost s expresí hormonálních receptorů, HER2 ani Ki67. Souvislost s expresí standardních markerů nebyla nalezena ani u E-cadherinu.

Mezi reziduálními karcinomy prsu po neoadjuvantní chemoterapii byl v několika studiích včetně naší zaznamenán vyšší výskyt podskupiny claudin-low nádorů (Kwon M. J., 2013; Sabatier R. et al., 2014). Nicméně navrhovaná IHC kritéria zcela neodpovídají molekulární claudin-low podskupině nádorů. Vzhledem k tomu, že první studie popisovaly claudin-low nádory jako triple-negativní, byl tento faktor zařazen do IHC kritérií pro identifikaci této podskupiny (Prat A. et al., 2010; Prat A. et Perou C. M., 2011). Později se však ukázalo, že do ní spadají také některé nádory ER-pozitivní a non-triple-negativní, což naznačuje poměrně velkou heterogenitu tohoto podtypu (Sabatier R. et al., 2014). Význam molekulárních podskupin claudin-low a claudin-high nádorů však zatím není zcela objasněn a v klinické praxi není zohlednění molekulární klasifikace při indikaci léčby doporučeno (Lakhani S. R. et al., 2012; Ellis I. O. et al., 2016).

Zastoupení invazivních karcinomů prsu NST s aberantní expresí E-cadherinu v různých pracích značně kolísá od téměř 0 % do 45 % (Kowalski P. J. et al., 2003; ElMoneim H. M. et Zaghoul N. M., 2011; Singhai R. et al., 2011). Studie zabývající se expresí N-cadherinu udávají pozitivitu až v 50 % karcinomů NST, která je oproti našim výsledkům přibližně dvojnásobná, nicméně tyto soubory obsahovaly karcinomy se střední a nízkou nebo pouze nízkou diferenciací (ElMoneim H. M. et Zaghoul N. M., 2011; Qian X. et al., 2014). Role obou cadherinů v EMT naznačuje jejich možný vliv na chemosenzitivitu nádoru. Downregulace E-cadherinu podporuje chemorezistenci a obdobný efekt lze předpokládat u upregulace N-cadherinu (Nakamura T. et al., 2003; Wang W. et al., 2017). Naše studie však po chemoterapii neprokázala významné změny v expresi E-cadherinu ani N-cadherinu. Přestože „cadherin switch“ je považován za hlavní znak EMT, nově nabytá exprese N-cadherinu nemusí být doprovázena ztrátou exprese E-cadherinu a ani v našem souboru vzorků jsme vzájemnou závislost obou markerů nepozorovali (Nieman M. T. et al., 1999; Rai H. et Ahmed J., 2014). Přestože přibližně čtvrtina nádorů jevila aberantní expresi E-cadherinu a obdobné množství pozitivitu N-cadherinu, pouze u třetiny z nich se projevil obě současně.

Po léčbě jsme nezaznamenali významnější změny ve stupni diferenciaci nádoru (grade), nicméně jeho stanovení po chemoterapii má své limity a je spíše orientační. Jediný marker z vyšetřovaných proteinů mezibuněčných spojů, jehož exprese dobře korelovala se stupněm diferenciaci, byl N-cadherin, což odpovídá vysoké invazivitě nízké diferencovaných karcinomů (grade 3) (Qian X. et al., 2014; ElMonheim H. M. et Zaghoul N. M., 2011). Překvapivě se v našem souboru vzorků neprojevila souvislost mezi grade a E-cadherinem, jehož exprese bývá častěji snížena u hůře diferencovaných karcinomů NST (ElMoneim H. M. et Zaghoul N. M., 2011; Singhai R. et al., 2011). Absence souvislosti však může být způsobena nižší četností dobře diferencovaných karcinomů (grade 1) v našem souboru, která je daná selekcí pacientek pro neoadjuvantní chemoterapii.

Apoptóza, další formy programované buněčné smrti a nekróza jsou přímým projevem účinku cytotoxických chemoterapeutik na nádorovou tkáň. Složitý mechanismus regulace forem programované buněčné smrti a obrovské množství účastnících se molekul vede i k určitému překrývání se apoptózy a jiných typů programované buněčné smrti, např. na kaspázách nezávislé buněčné smrti, nekroptózy apod. (Leist M. et Jaattela M., 2001). Právě na kaspázách nezávislá programovaná buněčná smrt, ale také např. doba od stimulace apoptózy



by mohly být příčinou překvapivě nízkého apoptotického indexu ve skupině pacientek s dobrou prognózou.

Chemoterapeutika mohou v nádorových buňkách indukovat apoptózu jak vnitřní drahou, zejména jako reakci na poškození DNA a dalších stěžejních molekul, tak vnější drahou přes receptory smrti. Vzhledem k tomu, že funkční mechanismus apoptózy je zásadní pro chemosenzitivitu nádoru, změny v expresi genů zapojených v procesu apoptózy v nádorové tkáni po chemoterapii mohou přispět k odhalení klíčových faktorů chemorezistence, které by v budoucnu mohly být využitelné jako prediktivní markery či cílové struktury pro biologickou léčbu zejména chemorezistentních nádorů (Fulda S. et Debatin K. M., 2000-2003).

V naší práci jsme určili expresní profil 84 genů asociovaných s apoptózou a na jeho základě jsme vybrali 13 genů (*IGF1R*, *MCL1*, *BCL2L10*, *BCL2A1*, *HRK*, *CASP8*, *CASP10*, *CASP14*, *FADD*, *TNFRSF25*, *TNFSF8*, *CD70* a *CIDEB*), jejichž exprese se vlivem léčby změnila a které mohou být nápomocné při stratifikaci pacientů vzhledem k různé odpovědi nádoru na léčbu. Skupina zahrnuje geny pro jeden povrchový receptor s protiapoptotickou funkcí (*IGF1R*), členy rodiny BCL2 (*MCL1*, *BCL2L10*, *BCL2A1*), protein regulující funkci některých BCL2 proteinů (*HRK*), jeden ze superrodiny receptorů smrti (*TNFRSF25*), dva ligandy receptorů smrti (*TNFSF8*, *CD70*), jeden z prostředníků mezi receptory smrti a kaspázami (*FADD*), dále některé kaspázy včetně iniciátorové kaspázy 8 (*CASP8*, *CASP10*, *CASP14*) a proapoptotický protein z rodiny CIDE (*CIDEB*). Zatímco ve skupině pacientek s dobrou prognózou došlo ke změně exprese všech uvedených genů, ve skupině se špatnou prognózou se změnila pouze exprese *IGF1R*. Jejich zapojení v apoptóze a dalších signálních drahách může naznačovat mechanismus, jakým mohou ovlivnit citlivost nádoru na chemoterapii nebo být chemoterapií ovlivněny.

Jediný gen, jehož exprese se změnila v obou prognosticky významných skupinách, byl *IGF1R*, a to ve smyslu downregulace ve skupině s dobrou prognózou a upregulace ve skupině se špatnou prognózou. IGF1R (insulin-like growth factor receptor 1) je tyrosin-kinázový receptor aktivovaný vazbou na insulin-like growth factor 1 (IGF1) a 2 (IGF2). Příslušná funkční signální dráha je nezbytná pro správný vývoj prsní žlázy a zejména luminální diferenciaci. Je regulovaná ER, které mimo jiné aktivují transkripci *IGF1R*. Exprese IGF1R je udávána u velké většiny karcinomů prsu, aktivní fosforylovaná forma IGF1R přibližně u poloviny, amplifikace, overexprese či somatické mutace byly detekovány u 9 % nádorů a zárodečné mutace nesou zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu (Nielsen T. O. et al., 2004;

Law J. H. et al., 2008; TCGA, 2012). Expresse a role IGF1R v karcinomu prsu a rezistenci nádoru na terapii se liší v závislosti na molekulárním typu karcinomu. V luminálních nádorech je expresse IGF1R obvykle vlivem stimulace ER vysoká a koreluje s dobrou prognózou, zatímco v bazálních a HER2-pozitivních nádorech je podstatně méně častá a koreluje se špatnou prognózou. Nádory nesoucí BRCA-1 mutaci pravidelně vykazují upregulaci IGF1R a IGF1. Obecně je u karcinomů korelace vyšší expresse IGF1R se špatnou prognózou obvyklejší a pravděpodobně souvisí se zapojením IGF1R v regulaci EMT a dediferenciaci. IGF1R a příslušná signální dráha mají zřejmě podstatný vliv na vznik rezistence nádoru na standardní cílenou léčbu tamoxifenem a trastuzumabem. Anti-IGF1R monoklonální protilátka však v kombinaci s hormonální či anti-HER2 léčbou dosud očekávaný efekt v podobě snížení rezistence nepřinesla (Farabaugh S. M. et al., 2015).

Mezi členy rodiny genů *BCL2* došlo k upregulaci expresse genů *BCL2L10* a *BCL2A1* a downregulaci expresse genu *MCL1* ve skupině pacientek s dobrou prognózou. Proteiny patřící do této skupiny tvoří homo- a heterodimery s pro- i protiapoptotickým účinkem a jejich aberantní expresse je u nádorů velmi častá (Amundson S. A. et al., 2000). Mnohé studie popsaly overexpresi protiapoptotických a/nebo redukci expresse proapoptotických členů *BCL2* rodiny na různých nádorových buněčných liniích, u kterých se často navíc projevila rezistence k chemoterapii (Amundson S. A. et al., 2000; Wong R., 2011). *MCL1* reguluje apoptózu v závislosti na transkripční variantě, z nichž delší izoforma apoptózu inhibuje a kratší ji podporuje. Obvykle je však jeho expresse spojena s inhibicí apoptózy a je tedy považována za protiapoptotický faktor. Dosud byla popsána zejména v souvislosti s hematologickými malignitami (MacCallum D. E. et al., 2005; Fagerberg L. et al., 2014). *BCL2L10* interaguje např. s *BCL2*, *BCLXL* a *BAX*, pravděpodobně brání uvolnění cytochromu C z mitochondrií a tím aktivaci kaspázy 3 a jeho overexpresi se tedy jeví jako protiapoptotický faktor (Fagerberg L. et al., 2014; Uhlen M. et al., 2017). *BCL2A1* za fyziologických podmínek reguluje přežití leukocytů při zánětu inhibicí apoptózy. Jeho overexpresi byla popsána u hematologických solidních zhoubných nádorů, kde přispívá k progresi onemocnění (Vogler M., 2012). Zajímavé je možné ovlivnění expresse genů z *BCL2* rodiny steroidními hormony, na které upozorňuje studie na buněčné linii karcinomu prsu, kde overexpresi genu *BCL2* vyvolaná stimulací estrogeny přispěla ke vzniku chemorezistence (Teixeira M. R. et al., 1995).

Produkt genu *Harakiri (HRK)*, u kterého došlo k upregulaci expresse ve skupině s dobrou prognózou, podporuje apoptózu vazbou na protiapoptotické proteiny *BCL2* a

BCLX(L) a tvorbou inaktivních komplexů (Fagerberg L. et al., 2014). Jeho exprese v karcinomu prsu je spíše nízká (Uhlen M. et al. 2017).

Jak bylo popsáno výše, apoptóza může být vyvolána také externími stimuly, např. vazbou ligandů na povrchové receptory včetně Fas a rodiny receptorů TNFR. V nádorových buňkách mohou být poruchy zevní dráhy apoptózy způsobeny např. downregulací receptorů, expresí neaktivních, tzv. decoy receptorů nebo sekrecí solubilní formy receptoru, která vyváže ligandy produkované imunitními buňkami, zejména cytotoxickými T-lymfocyty, NK-buňkami a makrofágy (Elmore S., 2007). *TNFRSF25 (DR3)*, u kterého došlo k upregulaci exprese ve skupině s dobrou prognózou, kóduje povrchový receptor z TNF superrodiny, který spouští signální dráhu jak přes FADD, tak TRADD adaptorové molekuly a tím stimuluje aktivaci kaspáz (Kitson J. et al., 1996). Vzhledem k tomu, že jej exprimují především aktivované T-lymfocyty, hraje klíčovou roli při zánětu. Stimulace *TNFRSF25* by mohla mít obdobný efekt jako blokáda molekul PD-1 a CTLA-4, která se uplatňuje v imunologické léčbě solidních nádorů (Fagerberg L. et al., 2014). Další upregulované geny *TNSF8 (CD153)* a *CD70 (TNFSF7)* produkují ligandy receptorů smrti (CD30, resp. CD27), exprimované aktivovanými B- a T-lymfocyty, nicméně aberantní exprese CD70 byla popsána u celé řady solidních zhoubných nádorů. Jeho vysoká exprese byla zaznamenána u bazálních karcinomů prsu a u ovariálních karcinomů byl odhalen možný vztah k rezistenci na chemoterapeutika (Petrau C. et al., 2014).

*FADD*, u kterého došlo k upregulaci exprese ve skupině s dobrou prognózou, kóduje jeden z adaptorových proteinů, které svými doménami smrti (DD, death domain) a efektorovými doménami smrti (DED, death effector domain) propojují aktivované TNF receptory, např. Fas receptor, a prokaspázy 8 a 10, aby vytvořily DISC (death-inducing signaling complex). Tím dojde k aktivaci obou prokaspáz na iniciátorové kaspázy, které štěpí další, efektorové kaspázy, včetně kaspázy 14. Ty potom štěpí další intracelulární proteiny včetně inhibitorů endonukleáz a buňka propadá apoptóze. FADD figuruje i v dalších, méně častých a známých cestách indukce apoptózy i v regulaci nekroptózy a navíc hraje roli v regulaci buněčného cyklu a proliferaci (Wang L. et al., 2010; Wajant H. et al., 2013). Porozumění jeho úloze je o to složitější, že závisí na jeho subcelulární lokalizaci. Zatímco v cytoplazmě funguje jako výše popsaný adaptorový protein při indukci apoptózy, v jádře může naopak podporovat přežití buňky (Gómez-Angelats M. et Cidlowski J. A., 2003; Tourneur L. et Chiochia G., 2010). Ani studie zaměřené na roli FADD v karcinogenezi nepřinášejí jednotné výsledky. Ztráta FADD může nádorovým buňkám poskytnout rezistenci ke

stimulaci Fas receptorů (Tourneur L. et Chiocchia G., 2010). Oproti tomu byla popsána upregulace FADD v dlaždicobuněčných karcinomech ovaria, dlaždicobuněčných karcinomech hlavy a krku a nemalobuněčném karcinomu plic, ve všech případech korelující se špatnou prognózou (Cimino Y. et al., 2012; Pattje W. J. et al., 2013; Razaghi A. et al., 2017).

Kaspáza 8 hraje zcela zásadní roli v aktivaci zevní dráhy apoptózy jako spouštěč kaspázové kaskády a aktivuje i druhou iniciátorovou kaspázu 10 (Fagerberg L. et al., 2014). Dále se ukázalo, že je nezbytná pro aktivaci lymfocytů (Kennedy N. J. et al., 1999; Su H. et al., 2005). Snížená nebo nedetekovatelná aktivita iniciačních i efektorových kaspáz byla popsána jak na nádorových buněčných liniích, tak na vzorcích z nádorové tkáně, např. karcinomu prsu, ovaria a děložního cervixu (Devarajan E. et al., 2002). Snížená exprese kaspázy 8, upregulace inhibitorů kaspázy 8 (např. FLIP) nebo inaktivace kaspázy 8 proteinem BCL-2 mohou navíc vyvolat rezistenci nádoru k apoptóze indukované cytotoxickou protinádorovou léčbou (Kim P. K. et al., 2001). Efektorovou kaspázu 14 exprimují zejména vrchní vrstvy epidermis. U řady zhoubných nádorů byla v souvislosti s expresí kaspázy 14 popsána nižší tumorigenicita, výjimkou je však karcinom prsu, kde byla v recentní studii prokázána korelace vysoké exprese kaspázy 14 s vysokou proliferací, nízkou diferenciací a triple-negativním fenotypem nádoru (Hsu S. et al., 2007; Handa T. et al., 2017). V naší studii došlo po chemoterapii k upregulaci exprese genů všech 3 kaspáz ve skupině pacientek s dobrou prognózou, z nichž ani jedna neměla triple-negativní karcinom.

Poslední z upregulovaných genů, *CIDEB*, patří do rodiny *CIDE* (cell death-inducing DFF45 (DNA fragmentation factor 45) – like effector). N-terminální oblast proteinů CIDE je homologní k CIDE-N doménám DFF40/CAD (caspase-activated nuclease) a jejímu inhibitoru DFF40/ICAD, tedy dvěma podjednotkám DFF komplexu. Rozštěpení DFF45/ICAD komplexu kaspázou 3 uvolní DFF40/CAD a vede k fragmentaci DNA a kondenzaci buněčného jádra (Liu X. et al., 1997; Liu X. et al., 1998, Sakahira H. et al., 1998). Jeho downregulace byla popsána u renálních karcinomů (Yu M. et al. 2013).

Shrneme-li výsledky týkající se genů asociovaných s apoptózou, tak ve skupině pacientek s dobrou prognózou po neoadjuvantní chemoterapii došlo k významné změně exprese 13 genů. V 9 případech se jedná o geny s převážně proapoptotickým efektem, jejichž exprese po chemoterapii vzrostla (*CASP8*, *CASP10*, *CASP14*, *HRK*, *TNFRSF25*, *TNFSF8*, *CD70*, *FADD*, *CIDEB*) a ve 2 případech se jedná o geny s převážně protiapoptotickým efektem, jejichž exprese po chemoterapii klesla (*IFG1R*, *MCL1*). Změny v expresi těchto 11 genů by mohly

svědčit pro chemoterapií vyvolanou indukci proapoptotického fenotypu nádorových buněk, u nichž se dá předpokládat lepší odpověď na následnou adjuvantní chemoterapii, a jsou v souladu s lepší prognózou pacientek v dané skupině. Tomu odpovídá i zvýšení exprese protiapoptoticky působícího *IGF1R* ve skupině pacientek se špatnou prognózou. Vyšší exprese genů pro ligandy receptorů smrti (*TNFSF8* a *CD70*) ovšem může souviset také s infiltrací nádoru aktivovanými lymfocyty, která je obvyklou tkáňovou reakcí na regresivní změny po chemoterapii, a mohlo by tedy jít o příznivý projev protinádorové stimulace imunitního systému. Význam zvýšené exprese protiapoptotických genů *BCL2L10* a *BCL2A1* ve skupině s dobrou prognózou je nejasný. Výsledky však nelze interpretovat jednoznačně, a to jak vzhledem k malé velikosti našeho souboru pacientek, tak vzhledem ke složitosti defektů regulačních mechanismů genů apoptózy a jejich produktů v průběhu karcinogeneze, které mohou mít různý dopad v závislosti na konkrétní situaci. U některých popsaných genů již s odstupem od publikace našich výsledků došlo k významnému nárůstu znalostí o jejich roli v karcinogenezi, vztahu ke karcinomu prsu a vzniku rezistence k protinádorové léčbě. Specifické protilátky proti některým z popsaných proteinů či jejich inhibitory a antagonisty je již možné využít v kombinované léčbě zejména chemorezistentních malignit (např. inhibice MCL1) (MacCallum D. E. et al. 2005; Fagerberg L. et al. 2014), další jsou v klinické a preklinické fázi studií (např. protilátka anti-IGF1R, anti-CD70, inhibice FADD) (Farabaugh S. M. et al. 2015; Jacobs J. et al. 2015; Razaghi A. et al., 2017).

## 6. ZÁVĚR

Chemoterapie představuje součást základního léčebného postupu u mnohých pacientek s karcinomem prsu a může být aplikována před (neoadjuvantní) a/nebo po chirurgické resekci nádoru (adjuvantní). Vlivem neoadjuvantní chemoterapie však může dojít ke změně expresního profilu a tím i citlivosti nádoru nejen k adjuvantní chemoterapii, ale také k hormonální a anti-HER2 léčbě. S rozvíjejícími se možnostmi protinádorové léčby navíc stoupá potřeba nových prediktivních markerů pro odhad předpokládané odpovědi nádoru na chemoterapii a potenciálních cílových molekul tzv. biologické léčby, které by doplnily stávající algoritmy zejména u chemorezistentních nádorů a zároveň by sloužily jako prediktory pro dané léčivo. Mohlo by se jednat jak o jednotlivé markery vyšetřované pomocí IHC a/nebo molekulárními metodami, tak o různě rozsáhlé multigenové eseje, vyšetřované např. pomocí DNA mikročipů nebo qRT-PCR.

V naší práci jsme se zaměřili na zachycení změn exprese vybraných proteinů/genů v karcinomu prsu po chemoterapii, jejichž zmapování může přispět k odhalení jejich role v odpovědi nádorové tkáně na chemoterapii. Do studie byly zahrnuty jak prediktivní a prognostické markery standardně vyšetřované (ER, PR, HER2, Ki67), tak vybrané proteiny mezibuněčných spojů podílejících se na regulaci EMT (claudiny a cadheriny), a dále geny asociované s apoptózou. EMT a defektní mechanismus apoptózy patří mezi klíčové faktory v procesu karcinogeneze a progresu nádoru a významně ovlivňují jeho chemosenzitivitu.

Při vyšetření standardních markerů jsme zaznamenali snížení exprese PR a Ki67 po léčbě, zatímco v expresi ER a HER2 k významným změnám nedošlo. Stabilita exprese ER ve sledovaném souboru podporuje současné doporučení pro zpracování bioptických vzorků karcinomu prsu na našem pracovišti, kdy se vyšetření hormonálních receptorů v resekátu opakuje pouze při negativním výsledku v core cut biopsii. Nízká exprese PR může být příčinou snížené citlivosti nádoru na hormonální terapii i při vysoké expresi ER, která je však pro indikaci hormonální terapie dostačující. Vyšetření proliferační aktivity, která je přímo úměrná citlivosti nádoru na chemoterapii, je doporučeno opakovat vždy, vzhledem k tomu, že její pokles je v důsledku chemoterapie obvyklý.

Přestože se status HER2 ukázal jako stabilní, zaznamenali jsme i jednotlivé případy radikální změny z negativní na pozitivní a naopak. Změna exprese z negativní na pozitivní může být pouze relativní, vzhledem k tomu, že overexprese HER2 je v některých nádorech pouze fokální a v malém vzorku z punkční biopsie nemusí být zastižena. Tyto výsledky podporují současný doporučený postup opakovat vyšetření HER2 v resekátech u pacientek po neoadjuvantní chemoterapii a u ostatních v případě negativy v punkční biopsii. U obou případů s neobvyklou ztrátou exprese HER2 po léčbě z původní silné positivity byl výsledek IHC vyšetření ověřen pomocí FISH a qRT-PCR s velmi dobrou korelací výsledků všech 3 metod. Naše práce zároveň poukázala na metodu qRT-PCR jako na vhodnou alternativu pro testování HER2 za předpokladu získání dostatečného množství kvalitní RNA z nádorové tkáně.

V další části práce jsme provedli IHC analýzu změn exprese vybraných claudinů a cadherinů po léčbě a korelaci jejich exprese k expresi standardních markerů karcinomu prsu na úrovni proteinů. Prokázali jsme zvýšení exprese claudinu 1 a snížení exprese claudinu 3 po léčbě, zatímco exprese claudinu 4 se významněji nezměnila. Interpretace zvýšené exprese claudinu 1 po léčbě je obtížná vzhledem ke složitosti dosud popsaných relevantních regulačních mechanismů, které navíc mohou mít v závislosti na konkrétní situaci protichůdný výsledek. Vysoká exprese claudinu 1 byla v našem souboru vzorků častěji zaznamenána v nádorech ER-negativních, dále PR-negativních, HER2-negativních a také triple-negativních než v nádorech exprimujících hormonální receptory a/nebo HER2 a korelovala s vyšší proliferací a aktivitou. Kombinace uvedených faktorů obvykle svědčí pro agresivnější, méně diferencované nádory, u kterých nelze očekávat odpověď na hormonální ani anti-HER2 léčbu, nicméně obvykle jsou alespoň na počátku terapie chemosenzitivní. Souvislost mezi expresí claudinu 1 a E- či N-cadherinu nalezena nebyla. Snížená exprese claudinu 3 v nádorech po léčbě by mohla odpovídat vyššímu zastoupení nádorových buněk méně citlivých na léčbu. Po léčbě mírně poklesla i exprese claudinu 4, změna však nebyla statisticky významná. Nízká četnost případů ve skupině s nízkou expresí claudinu 3 před léčbou a claudinu 4 před i po léčbě neumožnila provedení statistické analýzy korelace těchto dvou proteinů v daných skupinách k ostatním markerům. Výsledky analýzy dat po léčbě však svědčí pro pozitivní korelaci mezi expresí claudinu 3 a E-cadherinu. Přestože je exprese claudinu 3 i E-cadherinu v invazivním karcinomu prsu NST obvykle vysoká, není dosud zřejmé, zda souvisí s některým ze standardně vyšetřovaných markerů karcinomu prsu, a naše studie ani u jednoho z nich takovou souvislost neprokázala. Ve skupině vzorků po léčbě se vyskytlo několik

nádorů, které by dle navržených IHC kritérií mohly spadat do podskupiny claudin-low dle molekulární klasifikace, přičemž ve skupině vzorků před léčbou žádný nádor tato kritéria nesplňoval.

Expresi hlavních markerů EMT, E- a N-cadherinu, se projevila jako stabilní a vzájemně nezávislá. Přestože přibližně čtvrtina vyšetřených nádorů jevila aberantní, tedy sníženou, expresi E-cadherinu a stejné množství nádorů pozitivitu N-cadherinu, pouze u třetiny z nich byly zastiženy současně. Pozitivita N-cadherinu byla častější u ER-negativních, dále PR-negativních, HER2-pozitivních a hůře diferencovaných nádorů. Expresi žádného dalšího sledovaného proteinu mezibuněčných spojů se stupněm diference nádoru (grade) nekorelovala.

Při analýze změn exprese genů asociovaných s apoptózou byly pacientky rozděleny do dvou skupin dle prognózy. Ve skupině pacientek s dobrou prognózou po neoadjuvantní chemoterapii došlo k významné změně exprese 13 genů. V 9 případech se jedná o geny s převážně proapoptotickým efektem, jejichž exprese po chemoterapii vzrostla (*CASP8*, *CASP10*, *CASP14*, *HRK*, *FADD*, *TNFRSF25*, *TNFSF8*, *CD70*, *CIDEB*) a ve 2 případech se jedná o geny s převážně protiapoptotickým efektem, jejichž exprese po chemoterapii klesla (*MCL1*, *IGF1R*). Změny v expresi těchto 11 genů by mohly svědčit pro chemoterapií vyvolanou indukci proapoptotického fenotypu nádorových buněk, u nichž se dá předpokládat lepší odpověď na následnou adjuvantní chemoterapii, a jsou v souladu s lepší prognózou pacientek v dané skupině. Tomu odpovídá i zvýšení exprese spíše protiapoptoticky působícího *IGF1R* ve skupině pacientek se špatnou prognózou. Vyšší exprese genů pro ligandy receptorů smrti *TNFSF8* a *CD70* ve skupině pacientek s dobrou prognózou ovšem může souviset s infiltrací nádoru aktivovanými lymfocyty, která je obvyklou tkáňovou reakcí na regresivní změny po chemoterapii, a mohla by tedy indikovat příznivou protinádorovou stimulaci imunitního systému. Význam zvýšené exprese protiapoptotických genů *BCL2L10* a *BCL2A1* ve skupině s dobrou prognózou je nejasný.

V naší práci jsme tedy prokázali, že chemoterapie významně ovlivňuje expresi řady sledovaných proteinů/genů v karcinomu prsu. V případě standardních markerů naše výsledky podporují současný doporučený postup pro IHC vyšetření biotických vzorků. Změny v expresi claudinu 1 a 3 svědčí pro jejich úlohu v odpovědi nádorových buněk na chemoterapii. Některé zastižené korelace exprese claudinů a cadherinů s expresí standardních markerů se v karcinomech prsu pravděpodobně vyskytují častěji, vzhledem k tomu, že byly recentně popsány i dalšími autory. Zaznamenali jsme však i dosud nepopsané korelace, které



by mohly být nápomocné při porozumění roli claudinů a cadherinů v karcinogenezi karcinomu prsu a jeho odpovědi na léčbu. Navržený panel genů asociovaných s apoptózou by mohl najít uplatnění v rámci multigenových esejí cílených na přesnější stratifikaci pacientek se středním stupněm rizika relapsu nádorového onemocnění, která by v rámci této heterogenní skupiny pacientek umožnila větší individualizaci léčby. Uvedené výsledky statistických analýz jsou nicméně limitované velikostí testovaných souborů vzorků a pro jejich validaci a odhalení souvisejících regulačních mechanismů jsou nezbytné další studie zahrnující větší soubory.

## 7. LITERATURA

Adams, A. L., I. Eltoum, H. Krontiras, W. Wang and D. C. Chhieng. The effect of neoadjuvant chemotherapy on histologic grade, hormone receptor status, and HER2/neu status in breast carcinoma. *Breast J.* 2008;14(2):141-146

Amundson, S. A., T. G. Myers, D. Scudiero, S. Kitada, J. C. Reed and A. J. Fornace, Jr. An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 2000;60(21):6101-6110

Andrulis, I. L., S. B. Bull, M. E. Blackstein, D. Sutherland, C. Mak, S. Sidlofsky, K. P. Pritzker, R. W. Hartwick, W. Hanna, L. Lickley, R. Wilkinson, A. Qizilbash, U. Ambus, M. Lipa, H. Weizel, A. Katz, M. Baida, S. Mariz, G. Stoik, P. Dacamara, D. Strongitharm, W. Geddie and D. McCready. *neu/erbB-2* amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer. Toronto Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol.* 1998;16(4):1340-1349

Asogan, A. B., G. S. Hong and S. K. Arni Prabhakaran. Concordance between core needle biopsy and surgical specimen for oestrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 status in breast cancer. *Singapore Med J.* 2017;58:145-149

Aysola, K., A. Desai, C. Welch, J. Xu, Y. Qin, V. Reddy, R. Matthews, C. Owens, J. Okoli, D. J. Beech, C. J. Piyathilake, S. P. Reddy and V. N. Rao. Triple Negative Breast Cancer - An Overview. *Hereditary Genet* 2013;(Suppl 2)

Bauer, K., C. Parise and V. Caggiano. Use of ER/PR/HER2 subtypes in conjunction with the 2007 St Gallen Consensus Statement for early breast cancer. *BMC Cancer.* 2010;10:228

Bieche, I., P. Onody, I. Laurendeau, M. Olivi, D. Vidaud, R. Lidereau and M. Vidaud. Real-time reverse transcription-PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications. *Clin Chem.* 1999;45(8 Pt 1):1148-1156

Bielcikova, Z. and L. Petruzelka. Genomic Tests as Predictors of Breast Cancer Patients Prognosis. *Klin Onkol.* 2016;29(1):13-19

Blanchard, A. A., X. Ma, K. J. Dueck, C. Penner, S. C. Cooper, D. Mulhall, L. C. Murphy, E. Leygue and Y. Myal. Claudin 1 expression in basal-like breast cancer is related to patient age. *BMC Cancer*. 2013;13:268

Blanchard, A. A., G. P. Skliris, P. H. Watson, L. C. Murphy, C. Penner, L. Tomes, T. L. Young, E. Leygue and Y. Myal. Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. *Virchows Arch*. 2009;454(6):647-656

Buchholz, T. A., K. K. Hunt, G. J. Whitman, A. A. Sahin and G. N. Hortobagyi. Neoadjuvant chemotherapy for breast carcinoma: multidisciplinary considerations of benefits and risks. *Cancer*. 2003;98(6):1150-1160

Cabrera-Galeana, P., W. Munoz-Montano, F. Lara-Medina, A. Alvarado-Miranda, V. Perez-Sanchez, C. Villarreal-Garza, R. M. Quintero, F. Porrás-Reyes, E. Bargallo-Rocha, I. Del Carmen, A. Mohar and O. Arrieta. Ki67 Changes Identify Worse Outcomes in Residual Breast Cancer Tumors After Neoadjuvant Chemotherapy. *Oncologist*. 2018;23(6):670-678

Cimino, Y., A. Costes, D. Damotte, P. Validire, S. Mistou, N. Cagnard, M. Alifano, J. F. Régnard, G. Chiocchia, C. Sautés-Fridman and L. Tourneur. FADD protein release mirrors the development and aggressiveness of human non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2012;106(12):1989-1996

Clarke, M., R. Collins, S. Darby, C. Davies, P. Elphinstone, V. Evans, J. Godwin, R. Gray, C. Hicks, S. James, E. MacKinnon, P. McGale, T. McHugh, R. Peto, C. Taylor and Y. Wang. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;366(9503):2087-2106

D'Alfonso, T., Y. F. Liu, S. Monni, P. P. Rosen and S. J. Shin. Accurately assessing her-2/neu status in needle core biopsies of breast cancer patients in the era of neoadjuvant therapy: emerging questions and considerations addressed. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(4):575-581

Dai, H., T. Li, Z. Bai, Y. Yang, X. Liu, J. Zhan and B. Shi. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res*. 2015;5(10):2929-2943

Davila, E. and K. Amazon. The Clinical Importance of the Heterogeneity of HER2 neu. *Case Rep Oncol*. 2010;3(2):268-271

Davoli, A., B. A. Hocevar and T. L. Brown. Progression and treatment of HER2-positive breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;65(4):611-623

Dede, D. S., B. Gumuskaya, G. Guler, D. Onat, K. Altundag and Y. Ozisik. Evaluation of changes in biologic markers ER, PR, HER 2 and Ki-67 index in breast cancer with administration of neoadjuvant dose dense doxorubicin, cyclophosphamide followed by paclitaxel chemotherapy. *J BUON*. 2013;18(2):366-71

Dekker, T. J., V. T. Smit, G. K. Hooijer, M. J. Van de Vijver, W. E. Mesker, R. A. Tollenaar, J. W. Nortier and J. R. Kroep. Reliability of core needle biopsy for determining ER and HER2 status in breast cancer. *Ann Oncol*. 2013;24(4):931-7

Devarajan, E., A. A. Sahin, J. S. Chen, R. R. Krishnamurthy, N. Aggarwal, A. M. Brun, A. Sapino, F. Zhang, D. Sharma, X. H. Yang, A. D. Tora and K. Mehta. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene*. 2002;21(57):8843-8851

Dhawan P., A. B. Singh, N. G. Deane, Y. No, S. R. Shiou, C. Schmidt, J. Neff, M. K. Washington and R. D. Beauchamp. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest*. 2005 Jul;115(7):1765-76

Dias, K., A. Dvorkin-Gheva, R. M. Hallett, Y. Wu, J. Hassell, G. R. Pond, M. Levine, T. Whelan and A. L. Bane. Claudin-Low Breast Cancer; Clinical & Pathological Characteristics. *PLoS One*. 2017;12(1):e0168669

Ding, L., Z. Lu, Q. Lu and Y. H. Chen. The claudin family of proteins in human malignancy: a clinical perspective. *Cancer Manag Res*. 2013;5:367-375

Duan, W. R., D. S. Garner, S. D. Williams, C. L. Funckes-Shippy, I. S. Spath and E. A. Blomme. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol*. 2003;199(2):221-228

Duffy, M. J. Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem*. 2005;51(3):494-503

Eifel, P., J. A. Axelson, J. Costa, J. Crowley, W. J. Curran, Jr., A. Deshler, S. Fulton, C. B. Hendricks, M. Kemeny, A. B. Kornblith, T. A. Louis, M. Markman, R. Mayer and D. Roter. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(13):979-989

Ellis, I. O., P. Carder, S. Hales, A. H. S. Lee, S. E. Pinder, E. Rakha, T. Stephenson, S. Al-Sam, R. Deb, A. Hanby, R. Liebmann, E. Provenzano, D. Rowlands, C. A. Wells, N. Anderson, A. Girling, M. Ibrahim, E. Mallon and C. Quinn. Pathology reporting of breast disease in surgical excision specimens incorporating the dataset for histological reporting of breast cancer. *The Royal College of Pathologists*. 2016

ElMoneim, H. M. and N. M. Zaghoul. Expression of E-cadherin, N-cadherin and snail and their correlation with clinicopathological variants: an immunohistochemical study of 132 invasive ductal breast carcinomas in Egypt. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(10):1765-1771

Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516

Fagerberg, L., B. M. Hallstrom, P. Oksvold, C. Kampf, D. Djureinovic, J. Odeberg, M. Habuka, S. Tahmasebpoor, A. Danielsson, K. Edlund, A. Asplund, E. Sjostedt, E. Lundberg, C. A. Szigyanto, M. Skogs, J. O. Takanen, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, P. Nilsson, J. M. Schwenk, C. Lindskog, F. Danielsson, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, K. von Feilitzen, M. Forsberg, M. Zwahlen, I. Olsson, S. Navani, M. Huss, J. Nielsen, F. Ponten and M. Uhlen. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13(2):397-406

Farabaugh, S. M., D. N. Boone and A. V. Lee. Role of IGF1R in Breast Cancer Subtypes, Stemness, and Lineage Differentiation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:59

Fortier, A. M., E. Asselin and M. Cadrin. Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation. *J Biol Chem*. 2013;288(16):11555-11571

Fulda, S. Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Sem Cancer Biol*. 2015;31:84-88

Fulda, S. and K. M. Debatin. Caspase activation in cancer therapy. *Madame Curie Bioscience Database [Internet]; Austin (TX): Landes Bioscience © 2000-2003*

Gerhard, R., S. Ricardo, A. Albergaria, M. Gomes, A. R. Silva, A. F. Logullo, J. F. Cameselle-Teijeiro, J. Paredes and F. Schmitt. Immunohistochemical features of claudin-low intrinsic subtype in metaplastic breast carcinomas. *Breast*. 2012, 21(3):354-60

Gimenez-Bonate, P., A. Tortosa and R. Perez-Tomas. Overcoming drug resistance by enhancing apoptosis of tumor cells. *Curr Cancer Drug Targ*. 2009;9:320-340

Gnant, M., N. Harbeck and C. Thomssen. St. Gallen 2011: Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care (Basel)*. 2011;6(2):136-141

Goldhirsch, A., J. H. Glick, R. D. Gelber, A. S. Coates, B. Thurlimann and H. J. Senn. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol*. 2005;16(10):1569-1583

Goldhirsch, A., J. N. Ingle, R. D. Gelber, A. S. Coates, B. Thurlimann and H. J. Senn. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol*. 2009;20(8):1319-1329

Gómez-Angelats, M. and J. A. Cidlowski. Molecular evidence for the nuclear localization of FADD. *Cell Death And Differentiation*. 2003;10:791

Gyorffy, B., C. Hatzis, T. Sanft, E. Hofstatter, B. Aktas and L. Pusztai. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast Cancer Res*. 2015;17:11

Hacker, G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*. 2000;301(1):5-17

Handa, T., A. Katayama, T. Yokobori, A. Yamane, J. Horiguchi, R. Kawabata-Iwakawa, S. Rokudai, P. Bao, N. Gombodorj, B. Altan, K. Kaira, T. Asao, H. Kuwano, M. Nishiyama and T. Oyama. Caspase14 expression is associated with triple negative phenotypes and cancer stem cell marker expression in breast cancer patients. *J Surg Oncol*. 2017;116(6):706-715

Hassan, M., H. Watari, A. AbuAlmaaty, Y. Ohba and N. Sakuragi. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int*. 2014:150845

Hazan, R. B., G. R. Phillips, R. F. Qiao, L. Norton and S. A. Aaronson. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol*. 2000;148(4):779-790

Herschkowitz, J. I., K. Simin, V. J. Weigman, I. Mikaelin, J. Usary, Z. Hu, K. E. Rasmussen, L. P. Jones, S. Assefnia and S. Chandrasekharan. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007;8:R76

Hsu, S., H. Qin, D. Dickinson, D. Xie, W. B. Bollag, H. Stoppler, H. Pearl, A. Vu, M. Watkins, M. Koehler and G. Schuster. Expression of caspase-14 reduces tumorigenicity of skin cancer cells. *In Vivo*. 2007;21(2):279-283

Chevallier, B., H. Roche, J. P. Olivier, P. Chollet and P. Hurteloup. Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction chemotherapy (FEC-HD) results in a high histologic response rate. *Am J Clin Oncol*. 1993;16(3):223-228

Chipuk, J. E. and D. R. Green. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol*. 2008;18(4):157-164

Jacobs, J., V. Deschoolmeester, K. Zwaenepoel, C. Rolfo, K. Silence, S. Rottey, F. Lardon, E. Smits and P. Pauwels. CD70: An emerging target in cancer immunotherapy. *Pharmacol Ther*. 2015;155:1-10

Kasibhatla, S. and B. Tseng. Why target apoptosis in cancer treatment? *Mol Cancer Ther*. 2003;2(6):573-580

Kennedy, N. J., T. Kataoka, J. Tschopp and R. C. Budd. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med*. 1999;190(12):1891-1896

Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-257

Kerr, J. F., C. M. Winterford and B. V. Harmon. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 1994;73(8):2013-2026

Kim, P. K., R. Mahidhara and D. W. Seol. The role of caspase-8 in resistance to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat*. 2001;4(5):293-296

Kinsella, M. D., A. Nassar, M. T. Siddiqui and C. Cohen. Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and HER2 expression pre- and post- neoadjuvant chemotherapy in primary breast carcinoma: a single institutional experience. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012;5(6):530-536

Kitson, J., T. Raven, Y. P. Jiang, D. V. Goeddel, K. M. Giles, K. T. Pun, C. J. Grinham, R. Brown and S. N. Farrow. A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature*. 1996;384(6607):372-375

Korsmeyer, S. J., M. C. Wei, M. Saito, S. Weiler, K. J. Oh and P. H. Schlesinger. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ*. 2000;7(12):1166-1173

Kowalski, P. J., M. A. Rubin and C. G. Kleer. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res*. 2003;5(6):R217-222

Kulka, J., A. M. Szasz, Z. Nemeth, L. Madaras, Z. Schaff, I. A. Molnar and A. M. Tokes. Expression of tight junction protein claudin-4 in basal-like breast carcinomas. *Pathol Oncol Res*. 2009;15(1):59-64

Kulka, J. and A. M. Tokes. Claudin expression in breast tumors. *Hum Pathol*. 2005;36(7):859-860

Kwon, M. J. Emerging roles of claudins in human cancer. *Int J Mol Sci*. 2013;14(9):18148-18180

Lakhani, S. R., I. O. Ellis, S. J. Schnitt, P. H. Tan and M. J. van de Vijver. WHO Classification of Tumours of the Breast. IARC, Lyon. 2012

Law, J. H., G. Habibi, K. Hu, H. Masoudi, M. Y. Wang, A. L. Stratford, E. Park, J. M. Gee, P. Finlay, H. E. Jones, R. I. Nicholson, J. Carboni, M. Gottardis, M. Pollak and S. E. Dunn. Phosphorylated insulin-like growth factor-i/insulin receptor is present in all breast cancer subtypes and is related to poor survival. *Cancer Res*. 2008;68(24):10238-10246

Lee, H. C., H. Ko, H. Seol, D. Y. Noh, W. Han, T. Y. Kim, S. A. Im and I. A. Park. Expression of Immunohistochemical Markers before and after Neoadjuvant Chemotherapy in

Breast Carcinoma, and Their Use as Predictors of Response. *J Breast Cancer*. 2013;16(4):395-403

Lee, H. C., J. O. Lee and I. A. Park. Changes in protein expression in breast cancer after anthracycline-based chemotherapy. *Korean J Pathol*. 2007;41:165-170

Lechpammer, M., M. B. Resnick, E. Sabo, E. Yakirevich, W. O. Greaves, K. T. Sciandra, R. Tavares, L. C. Noble, R. A. DeLellis and L. J. Wang. The diagnostic and prognostic utility of claudin expression in renal cell neoplasms. *Mod Pathol*. 2008;21(11):1320-1329

Leidy, J., K. Ashraf and K. Dina. Basal-Like Breast Cancer: Update on Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(1):37-43

Leist, M. and M. Jaattela. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(8):589-598

Li, M., C. Balch, J. S. Montgomery, M. Jeong, J. H. Chung, P. Yan, T. H. Huang, S. Kim and K. P. Nephew. Integrated analysis of DNA methylation and gene expression reveals specific signaling pathways associated with platinum resistance in ovarian cancer. *BMC Med Genomics*. 2009;2:34

Li, P., T. Liu, Y. Wang, S. Shao, W. Zhang, Y. Lv, J. Yi and Z. Wang. Influence of neoadjuvant chemotherapy on HER2/neu status in invasive breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2013;13(1):53-60

Li, Z., B. Liu, A. Maminishkis, S. P. Mahesh, S. Yeh, J. Lew, W. K. Lim, H. N. Sen, G. Clarke, R. Buggage, S. S. Miller and R. B. Nussenblatt. Gene expression profiling in autoimmune noninfectious uveitis disease. *J Immunol*. 2008;181(7):5147-57

Lin, X., X. Shang, G. Manorek and S. B. Howell. Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition by Claudin-3 and Claudin-4. *PLoS One*. 2013;8(6):e67496

Liu, X., P. Li, P. Widlak, H. Zou, X. Luo, W. T. Garrard and X. Wang. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(15):8461-8466

Liu, X., H. Zou, C. Slaughter and X. Wang. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*. 1997;89(2):175-184

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8



Lu, S., K. Singh, S. Mangray, R. Tavares, L. Noble, M. B. Resnick and E. Yakirevich. Claudin expression in high-grade invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with the molecular subtype. *Mod Pathol.* 2013;26(4):485-495

MacCallum, D. E., J. Melville, S. Frame, K. Watt, S. Anderson, A. Gianella-Borradori, D. P. Lane and S. R. Green. Seliciclib (CYC202, R-Roscovitine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of Mcl-1. *Cancer Res.* 2005;65(12):5399-5407

Mineta, K., Y. Yamamoto, Y. Yamazaki, H. Tanaka, Y. Tada, K. Saito, A. Tamura, M. Igarashi, T. Endo, K. Takeuchi and S. Tsukita. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett.* 2011;585(4):606-612

Moazed, V., E. Jafari, B. Kalantari Khandani, A. Nemati, A. Roozdar and S. A. Ben Razavi. Prognostic Significance of Reduction in Ki67 Index After Neoadjuvant Chemotherapy in Patients With Breast Cancer in Kerman Between 2009 and 2014. *Iran J Pathol.* 2018;13(1):71-77

Morin, P. J. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res.* 2005;65(21):9603-9606

Myal, Y., E. Leygue and A. A. Blanchard. Claudin 1 in breast tumorigenesis: revelation of a possible novel "claudin high" subset of breast cancers. *J Biomed Biotechnol.* 2010:956897

Nakamura, T., Y. Kato, H. Fuji, T. Horiuchi, Y. Chiba and K. Tanaka. E-cadherin-dependent intercellular adhesion enhances chemoresistance. *Int J Mol Med.* 2003;12(5):693-700

Národní onkologický registr. Ústav zdravotnických informací a statistický ČR, © 2017 [cit. 5. 12. 2018]. Dostupné z: <http://uzis.cz/>

Nielsen, T. O., H. N. Andrews, M. Cheang, J. E. Kucab, F. D. Hsu, J. Ragaz, C. B. Gilks, N. Makretsov, C. D. Bajdik, C. Brookes, L. M. Neckers, V. Evdokimova, D. G. Huntsman and S. E. Dunn. Expression of the insulin-like growth factor I receptor and urokinase plasminogen activator in breast cancer is associated with poor survival: potential for intervention with 17-allylamino geldanamycin. *Cancer Res.* 2004;64(1):286-291

Nieman, M. T., R. S. Prudoff, K. R. Johnson and M. J. Wheelock. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol.* 1999;147(3):631-644

Oakman, C., G. Viale and A. Di Leo. Management of triple negative breast cancer. *Breast.* 2010;19(5):312-321

Osanai, M., A. Takasawa, M. Murata and N. Sawada. Claudins in cancer: bench to bedside. *Pflugers Arch.* 2017;469(1):55-67

Pandis, N., Y. Jin, L. Gorunova, C. Petersson, G. Bardi, I. Idvall, B. Johansson, C. Ingvar, N. Mandahl and F. Mitelman. Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas: identification of eight karyotypic subgroups. *Genes Chromosomes Cancer.* 1995;12(3):173-185

Pandis, N., M. R. Teixeira, A. Adeyinka, H. Rizou, G. Bardi, F. Mertens, J. A. Andersen, L. Bondeson, K. Sfikas, H. Qvist, N. Apostolikas, F. Mitelman and S. Heim. Cytogenetic comparison of primary tumors and lymph node metastases in breast cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998;22(2):122-129

Paterson, M. C., K. D. Dietrich, J. Danyluk, A. H. Paterson, A. W. Lees, N. Jamil, J. Hanson, H. Jenkins, B. E. Krause and W. A. McBlain. Correlation between c-erbB-2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. *Cancer Res.* 1991;51(2):556-567

Pattje, W. J., L. J. Melchers, L. Slagter-Menkema, M. F. Mastik, M. L. Schrijvers, J. H. Gibcus, P. M. Kluin, O. Hoegen-Chouvalova, B. F. van der Laan, J. L. Roodenburg, J. E. van der Wal, E. Schuurung and J. A. Langendijk. FADD expression is associated with regional and distant metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Histopathology.* 2013;63(2):263-270

Perou, C. M. Molecular stratification of triple negative breast cancers. *Oncologist.* 2010;15(5):38-48

Perou, C. M., T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lonning, A. L. Borresen-Dale, P. O. Brown and D. Botstein. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-752

Petrau, C., M. Cornic, P. Bertrand, C. Maingonnat, V. Marchand, J. M. Picquenot, F. Jardin and F. Clatot. CD70: A Potential Target in Breast Cancer? *J Cancer.* 2014;5(9):761-764

Prat, A., J. S. Parker, O. Karginova, C. Fan, C. Livasy, J. I. Herschkowitz, X. He and C. M. Perou. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(5):R68

Prat, A. and C. M. Perou. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol.* 2001;5:5-23

Press, M. F., L. Bernstein, P. A. Thomas, L. F. Meisner, J. Y. Zhou, Y. Ma, G. Hung, R. A. Robinson, C. Harris, A. El-Naggar, D. J. Slamon, R. N. Phillips, J. S. Ross, S. R. Wolman and K. J. Flom. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol.* 1997;15(8):2894-2904

Pusztai, L.. Gene expression profiling of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2009;11(Suppl 3):S11

Qian, X., A. Anzovino, S. Kim, K. Suyama, J. Yao, J. Hult, G. Agiostratidou, N. Chandiramani, H. M. McDaid, C. Nagi, H. W. Cohen, G. R. Phillips, L. Norton and R. B. Hazan. N-cadherin/FGFR promotes metastasis through epithelial-to-mesenchymal transition and stem/progenitor cell-like properties. *Oncogene.* 2014;33(26):3411-3421

Quddus, R. M., J. C. Sung, C. Zhang, T. Pasqueriello, M. Eklund and M. M. Steinhoff. HER-2/neu expression in locally advanced breast carcinomas: pre-and post-neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer.* 2005;12(4):294-298

Rai, H. and J. Ahmed. N-cadherin: A marker of epithelial to mesenchymal transition in tumor progression. *The Internet Journal of Oncology.* 2014;10(1)

Razaghi, A., C. Villacres, V. Jung, N. Mashkour, M. Butler, L. Owens and K. Heimann. Improved therapeutic efficacy of mammalian expressed-recombinant interferon gamma against ovarian cancer cells. *Exp Cell Res.* 2017;359(1):20-29

Reis-Filho, J. S., C. Westbury and J. Y. Pierga. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J Clin Pathol.* 2006;59(3):225-231

Riehle, U., A. Mader, T. Brandstetter, J. Ruhe, A. zur Hausen and E. Stickeler. Nucleic acid sequence-based amplification in formalin-fixed and paraffin-embedded breast-cancer tissues. *J Clin Pathol.* 2010;63(12):1071-1076

Ryška, A., E. Hovorková, F. Sobande, T. Rozkoš, J. Laco and H. Hornyčová. Naděje a úskalí molekulární klasifikace karcinomu prsu. *Cesk Patol.* 2015;51(1):26-32

Sabatier, R., P. Finetti, A. Guille, J. Adelaide, M. Chaffanet, P. Viens, D. Birnbaum and F. Bertucci. Claudin-low breast cancers: clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. *Mol Cancer.* 2014;13:228

Saeki, R., M. Kondoh, H. Kakutani, S. Tsunoda, Y. Mochizuki, T. Hamakubo, Y. Tsutsumi, Y. Horiguchi and K. Yagi. A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. *Mol Pharmacol.* 2009;76(4):918-926

Saint-Ruf, C., M. Gerbault-Seureau, E. Viegas-Pequignot, B. Zafrani, R. Cassingena and B. Dutrillaux. Proto-oncogene amplification and homogeneously staining regions in human breast carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 1990;2(1):18-26

Saint-Ruf, C., M. Gerbault-Seureau, E. Viegas-Pequignot, B. Zafrani, B. Malfoy and B. Dutrillaux. Recurrent homogeneously staining regions in 8p1 in breast cancer and lack of amplification of POLB, LHRH, and PLAT genes. *Cancer Genet Cytogenet*. 1991;52(1):27-35

Sakahira, H., M. Enari and S. Nagata. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 1998;391(6662):96-99

Shang, X., X. Lin, E. Alvarez, G. Manorek and S. B. Howell. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 control tumor growth and metastases. *Neoplasia*. 2012;14(10):974-985

Shang, X., X. Lin, G. Manorek and S. B. Howell. Claudin-3 and claudin-4 regulate sensitivity to cisplatin by controlling expression of the copper and cisplatin influx transporter CTR1. *Mol Pharmacol*. 2013;83(1):85-94

Singh, A. and J. Settleman. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*. 2010;29(34):4741-4751

Singh, A. B. and P. Dhawan. Claudins and cancer: Fall of the soldiers entrusted to protect the gate and keep the barrier intact. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;42:58-65

Singh, A. B., A. Sharma and P. Dhawan. Claudin family of proteins and cancer: an overview. *J Oncol*. 2010:541957

Singhai, R., V. W. Patil, S. R. Jaiswal, S. D. Patil, M. B. Tayade and A. V. Patil. E-Cadherin as a diagnostic biomarker in breast cancer. *N Am J Med Sci*. 2011;3(5):227-233

Slamon, D. J., W. Godolphin, L. A. Jones, J. A. Holt, S. G. Wong, D. E. Keith, W. J. Levin, S. G. Stuart, J. Udove and A. Ullrich. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989;244(4905):707-712

Soini, Y. Claudins 2, 3, 4, and 5 in Paget's disease and breast carcinoma. *Hum Pathol*. 2004;35(12):1531-1536

Song, G., W. Wang and T. Hu. p53 facilitates BH3-only BID nuclear export to induce apoptosis in the irreparable DNA damage response. *Med Hypotheses*. 2011;77(5):850-852

Su, H., N. Bidere, L. Zheng, A. Cubre, K. Sakai, J. Dale, L. Salmena, R. Hakem, S. Straus and M. Lenardo. Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science*. 2005;307(5714):1465-1468

Takeichi, M. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol*. 1977;75(2 Pt 1):464-474

Taucher, S., M. Rudas, R. M. Mader, M. Gnant, E. Sporn, P. Dubsy, S. Roka, T. Bachleitner, F. Fitzal, D. Kandioler, C. Wenzel, G. G. Steger, M. Mittlbock and R. Jakesz. Influence of neoadjuvant therapy with epirubicin and docetaxel on the expression of HER2/neu in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;82(3):207-213

Tavassoli, F. A. and P. Devilee. WHO Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs. IARC, Lyon. 2003

TGCA (The Cancer Genome Atlas). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012;490(7418):61-70

Teixeira, C., J. C. Reed and M. A. Pratt. Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1995;55(17):3902-3907

Teixeira, M. R., H. Tsarouha, S. M. Kraggerud, N. Pandis, E. Dimitriadis, J. A. Andersen, R. A. Lothe and S. Heim. Evaluation of breast cancer polyclonality by combined chromosome banding and comparative genomic hybridization analysis. *Neoplasia.* 2001;3(3):204-214

Telli, M. L., W. J. Gradishar, J. H. Ward. NCCN Guidelines Updates: Breast Cancer. *J Natl Compr Canc Netw.* 2019;17(5.5):552-555

Thakkar, J. P., D. G. Mehta. A review of an unfavorable subset of breast cancer: estrogen receptor positive progesterone receptor negative. *Oncologist.* 2011;16(3):276-285

Tinari, N., R. Lattanzio, C. Natoli, E. Cianchetti, D. Angelucci, E. Ricevuto, C. Ficorella, P. Marchetti, S. Alberti, M. Piantelli and S. Iacobelli. Changes of topoisomerase IIalpha expression in breast tumors after neoadjuvant chemotherapy predicts relapse-free survival. *Clin Cancer Res.* 2006;12(5):1501-1506

Tourneur, L. and G. Chiocchia. FADD: a regulator of life and death. *Trends Immunol.* 2010;31(7):260-269

Turksen, K. and T. C. Troy. Junctions gone bad: claudins and loss of the barrier in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1816(1):73-79

Tvrdik, D., L. Stanek, H. Skalova, P. Dundr, Z. Velenska and C. Povysil. Comparison of the IHC, FISH, SISH and qPCR methods for the molecular diagnosis of breast cancer. *Mol Med Rep.* 2012;6(2):439-443

Uhlen, M., C. Zhang, S. Lee, E. Sjostedt, L. Fagerberg, G. Bidkhor, R. Benfeitas, M. Arif, Z. Liu, F. Edfors, K. Sanli, K. von Feilitzen, P. Oksvold, E. Lundberg, S. Hober, P. Nilsson, J. Mattsson, J. M. Schwenk, H. Brunnstrom, B. Glimelius, T. Sjoblom, P. H. Edqvist,

D. Djureinovic, P. Micke, C. Lindskog, A. Mardinoglu and F. Ponten. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*. 2017;357(6352)

van de Ven, S., V. T. Smit, T. J. Dekker, J. W. Nortier and J. R. Kroep. Discordances in ER, PR and HER2 receptors after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2011;37(6):422-430

Varga, Z., R. Caduff and B. Pestalozzi. Stability of the HER2 gene after primary chemotherapy in advanced breast cancer. *Virchows Arch*. 2005;446(2):136-141

Viale, G., M. M. Regan, M. G. Mastropasqua, F. Maffini, E. Maiorano, M. Colleoni, K. N. Price, R. Golouh, T. Perin, R. W. Brown, A. Kovacs, K. Pillay, C. Ohlschlegel, B. A. Gusterson, M. Castiglione-Gertsch, R. D. Gelber, A. Goldhirsch and A. S. Coates. Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(3):207-212

Vogler, M. (2012). BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. *Cell Death Differ*. 2012;19(1):67-74

Vuong, D., P. T. Simpson, B. Green, M. C. Cummings and S. R. Lakhani. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch*. 2014;465(1):1-14

Wajant, H., J. Gerspach and K. Pfizenmaier. Engineering death receptor ligands for cancer therapy. *Cancer Lett*. 2013;332(2):163-174

Walther, W., S. Petkov, O. N. Kuvardina, J. Aumann, D. Kobelt, I. Fichtner, M. Lemm, J. Piontek, I. E. Blasig, U. Stein and P. M. Schlag. Novel Clostridium perfringens enterotoxin suicide gene therapy for selective treatment of claudin-3- and -4-overexpressing tumors. *Gene Ther*. 2012;19(5):494-503

Wang, L., J. K. Yang, V. Kabaleeswaran, A. J. Rice, A. C. Cruz, A. Y. Park, Q. Yin, E. Damko, S. B. Jang, S. Raunser, C. V. Robinson, R. M. Siegel, T. Walz and H. Wu. The Fas-FADD death domain complex structure reveals the basis of DISC assembly and disease mutations. *Nat Struct Mol Biol*. 2010;17(11):1324-1329

Wang, W., L. Wang, A. Mizokami, J. Shi, C. Zou, J. Dai, E. T. Keller, Y. Lu and J. Zhang. Down-regulation of E-cadherin enhances prostate cancer chemoresistance via Notch signaling. *Chin J Cancer*. 2017;36(1):35

Wolff A. C., M. E. H. Hammond, K. H. Allison, B. E. Harvey, L. M. McShane and M. Dowsett. HER2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update Summary. *J Oncol Pract*. 2018;14(7):437-441

Wong, R. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30(1):87

Yin, H. F., Y. H. Wang, X. Q. Qin, H. Zhang, T. Li, J. M. Ye and Y. H. Liu. Effect of neoadjuvant chemotherapy on histologic grade and expression of biological markers in breast cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2009;31(11):858-862

Yoshida, A., N. Hayashi, K. Suzuki, M. Takimoto, S. Nakamura and H. Yamauchi. Change in HER2 status after neoadjuvant chemotherapy and the prognostic impact in patients with primary breast cancer. *J Surg Oncol.* 2017;116(8):1021-1028

Yoshioka, T., M. Hosoda, M. Yamamoto, K. Taguchi, K. C. Hatanaka, E. Takakuwa, Y. Hatanaka, Y. Matsuno and H. Yamashita. Prognostic significance of pathologic complete response and Ki67 expression after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer.* 2015;22(2):185-191

You, K., S. Park, J. M. Ryu, I. Kim, S. K. Lee, J. Yu, S. W. Kim, S. J. Nam and J. E. Lee. Comparison of Core Needle Biopsy and Surgical Specimens in Determining Intrinsic Biological Subtypes of Breast Cancer with Immunohistochemistry. *J Breast Cancer.* 2017;20(3):297-303

Yu, M., H. Wang, J. Zhao, Y. Yuan, C. Wang, J. Li, L. Zhang, L. Zhang, Q. Li and J. Ye. Expression of CIDE proteins in clear cell renal cell carcinoma and their prognostic significance. *Mol Cell Biochem.* 2013;378(1-2):145-151

Zhou, B., A. Moodie, A. A. Blanchard, E. Leygue and Y. Myal. Claudin 1 in Breast Cancer: New Insights. *J Clin Med.* 2015;4(12):1960-1976

Zoppoli, G., A. Garuti, G. Cirmena, L. V. di Cantogno, C. Botta, M. Gallo, D. Ferraioli, E. Carminati, P. Baccini, M. Curto, P. Fregatti, E. Isnaldi, M. Lia, R. Murialdo, D. Friedman, A. Sapino and A. Ballestrero. Her2 assessment using quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction reliably identifies Her2 overexpression without amplification in breast cancer cases. *J Transl Med.* 2017;15(1):91

## 8. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

### Publikace, které jsou podkladem dizertace:

**Skalova H.**, P. Dundr, C. Povysil, Z. Velenska, L. Petruzelka, D. Tvrdik. Study of the effect of neoadjuvant chemotherapy on the status of Her2/neu. *Folia Biol (Praha)*. 2011;57(5):191-9. **IF=1,151**

Tvrdik D., **H. Skalova**, P. Dundr, C. Povysil, Z. Velenska, A. Berkova, L. Stanek, L. Petruzelka. Apoptosis-associated genes and their role in predicting responses to neoadjuvant breast cancer treatment. *Med Sci Monit*. 2012;18(1):BR60-67. **IF=1,699**

**Skalova H.**, N. Hajkova, B. Majerova, M. Bartu, C. Povysil, I. Ticha. The impact of chemotherapy on the expression of claudins and cadherins in invasive breast cancer. *Exp Ther Med*. 2019;18(4):3014-3024. **IF=1,448**

### Publikace bez vztahu k tématu dizertace:

#### a) s IF:

Spacek J., M. Vocka, I. Netikova, **H. Skalova**, P. Dundr, B. Konopasek, E. Zavadova, L. Petruzelka. Immunological examination of peripheral blood in patients with colorectal cancer compared to healthy controls. *Immunol Invest*. 2018;47(7):643-653

Pagès F., B. Mlecnik, F. Marliot, G. Bindea, F. S. Ou, C. Bifulco, A. Lugli, I. Zlobec, T. T. Rau, M. D. Berger, I. D. Nagtegaal, E. Vink-Börger, A. Hartmann, C. Geppert, J. Kolwelter, S. Merkel, R. Grützmann, M. Van den Eynde, A. Jouret-Mourin, A. Kartheuser, D. Léonard, C. Remue, J. Y. Wang, P. Bavi, M. H. A. Roehrl, P. S. Ohashi, L. T. Nguyen, S. Han, H. L. MacGregor, S. Hafezi-Bakhtiari, B. G. Wouters, G. V. Masucci,



E. K. Andersson, E. Zavadova, M. Vocka, J. Spacek, L. Petruzelka, B. Konopasek, P. Dunder, **H. Skalova**, K. Nemejcova, G. Botti, F. Tatangelo, P. Delrio, G. Ciliberto, M. Maio, L. Laghi, F. Grizzi, T. Fredriksen, B. Buttard, M. Angelova, A. Vasaturo, P. Maby, S. E. Church, H. K. Angell, L. Lafontaine, D. Bruni, C. El Sissy, N. Haicheur, A. Kirilovsky, A. Berger, C. Lagorce, J. P. Meyers, C. Paustian, C. Feng Z, Ballesteros-Merino, J. Dijkstra, C. van de Water, S. van Lent-van Vliet, N. Knijn, A. M. Muşină, D. V. Scripcariu, B. Popivanova, M. Xu, T. Fujita, S. Hazama, N. Suzuki, H. Nagano, K. Okuno, T. Torigoe, N. Sato, T. Furuhashi, I. Takemasa, P. S. Itoh, P. S. Patel, H. N. Vora, B. Shah, J. B. Patel, K. N. Rajvik, S. J. Pandya, S. N. Shukla, Y. Wang, G. Zhang, Y. Kawakami, F. M. Marincola, P. A. Ascierto, D. J. Sargent, B. A. Fox, J. Galon. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet*. 2018;26;391(10135):2128-2139

K. J. Werkstetter, I. R. Korponay-Szabó, A. Popp, V. Villanacci, M. Salemme, G. Heilig, S. T. Lillevang, M. L. Mearin, C. Ribes-Koninckx, A. Thomas, R. Troncone, B. Filipiak, M. Mäki, J. Gyimesi, M. Najafi, J. Dolinšek, S. Dydensborg Sander, R. Auricchio, A. Papadopoulou, A. Vécsei, P. Szitanyi, E. Donat, R. Nenna, P. Alliet, F. Penagini, H. Garnier-Lengliné, G. Castillejo, K. Kurppa, R. Shamir, A. C. Hauer, F. Smets, S. Corujeira, M. van Winckel, S. Buderus, S. Chong, S. Husby, S. Koletzko; **ProCeDE study group**. Accuracy in diagnosis of celiac disease without biopsies in clinical practice. *Gastroenterology*. 2017;153(4):924-935

Dunder P., K. Nemejcova, J. Laco, **H. Skalova**, L. Bauerova, R. Matej, D. Fischerova. Anastomosing hemangioma of the ovary: a clinicopathological study of six cases with stromal luteinization. *Pathol Oncol Res*. 2017;23(4):717-722

Ulrych J., V. Fryba, **H. Skalova**, Z. Krska, T. Krechler, D. Zogala. Premalignant and malignant lesions of the heterotopic pancreas in the esophagus: a case report and review of the literature. *J Gastrointest Liver Dis*. 2015;24(2):235-9

Zavadova E., Vocka M., Spacek J., Francis N., Konopasek B., Fucikova T., **Skalova H.**, Dunder P., Petruzelka L., Rau T. T., Geppert C., Hartmann A. Immune monitoring in

patients with colorectal cancer stage II. Journal for ImmunoTherapy of Cancer. 2015;3(Suppl 2):266

Tvrđík D., L. Stanek, **H. Skalova**, P. Dundr, Z. Velenska, C. Povysil. Comparison of the IHC, FISH, SISH and qPCR methods for the molecular diagnosis of breast cancer. Mol Med Report. 2012;6(2):439-43

#### b) bez IF:

Zavadova E., J. Spacek, M. Vocka, B. Konopasek, T. Fucikova, I. Netikova, P. Dundr, **H. Skalova**, L. Petruzelka. Immunoscore and its predictive value for colorectal cancer. Klin Onkol. 2015;28 Suppl 4:4S82-5

**Skalova H.**, C. Povysil, J. Hofmanova, B. Goldova, R. Jaksa, K. Jandova, J. Galko. Histopathological autoptotic findings in 8 patients with pandemic influenza A (H1N1) pneumonia. Cesk Patol. 2012;48(3):161-164

**Skalova H.** and C. Povysil. Intrapericardial teratoma as a cause of fetal death - a case report. Cesk Patol. 2011;47(4):189-91

Povysil C., P. Dungl, **H. Skalova**, J. Vaculik, M. Horak, V. Povysilova. Histopatologické změny skeletu u pacientů se zlomeninou krčku kosti stehenní; Ortopedie. 2009;3:280-283

Belohlavek J., J. Horak, V. Dytrych, K. Gorican, T. Palecek, P. Kuchynka, O. Smid, **H. Skalova**, V. Rohn, A. Linhart. Katetrizační uzávěr defektu komorového septa při infarktu myokardu; Cor Vasa. 2008;50(12):486–487

#### Abstrakta autora související s dizertací:

**Skalova H.**, P. Dundr, C. Povysil, Z. Velenska, L. Petruzelka, D. Tvrđík. Altered expression of Her2/neu after neoadjuvant treatment of breast cancer – a case study. VI. dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, Praha, 2010

**Skalova H.**, P. Dundr, C. Povysil, Z. Velenska, A. Berkova, L. Stanek, Z. Dlouha, L. Petruzelka, D. Tvrdik. Role of apoptosis associated genes in predicting clinical outcome of breast cancer. The 7. symposium and workshop on molecular pathology and histochemistry, Olomouc, 2011

Tvrđík D., **H. Skálová**, P. Dundr, L. Stanek, C. Povýšil, L. Petruželka. Apoptosis associated genes and their role in predicting responses to neoadjuvant breast cancer therapy. European Congress of Patology, Praha, 2012

### **Přednáška autora související s dizertací:**

Změny exprese Her2/neu v karcinomu prsu po neoadjuvantní chemoterapii. 13. studentská vědecká konference, Praha, 2012

## Original Article

# Study of the Effect of Neoadjuvant Chemotherapy on the Status of Her2/neu

(breast cancer / neoadjuvant chemotherapy / Her2/neu / IHC / FISH / real-time PCR)

H. SKÁLOVÁ<sup>1</sup>, P. DUNDR<sup>1</sup>, C. POVÝŠIL<sup>1</sup>, Z. VELENSKÁ<sup>1</sup>, L. PETRUŽELKA<sup>2</sup>,  
D. TVRDÍK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Pathology, <sup>2</sup>Department of Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

**Abstract.** *Her2/neu* proto-oncogene amplification and protein over-expression is observed in 20–40 % of patients with breast cancer and plays a crucial role in invasive breast cancer and its treatment. A number of studies postulated the stability of *Her2/neu* gene expression, showing that in most patients the status of expression had not significantly changed after the neoadjuvant treatment. In the present study, we investigated samples from 20 patients with invasive breast carcinoma who had undergone neoadjuvant chemotherapy and subsequent surgery. In all cases, the expression level of *Her2/neu* was evaluated in both pre-therapeutically obtained tumour tissue by core needle biopsy and from specimens obtained during final surgery using immunohistochemistry. Fluorescence *in situ* hybridization and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction methods were used for verifying the results obtained by immunohistochemistry. *Her2/neu* status determined by immunohistochemistry remained unchanged in 12 of 20 (60 %) patients after neoadjuvant treatment. In six cases (30 %) minor changes were observed after the treatment. However, in two cases (10 %) we found altered *Her2/neu* expression from strongly positive in the pre-treatment biopsy to negative in the post-treatment surgery specimen. Moreover, this is the first report describing the

changes in *Her2/neu* status at all protein, RNA and DNA levels by using immunohistochemistry, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction and fluorescence *in situ* hybridization, respectively. By using variable methods we demonstrated possible new ways for *Her2/neu* detection and their dependability. Improvement in specific molecule detection can prevent the use of tailored targeted therapy in an untargeted manner.

## Introduction

The *Her2/neu* gene (also known as *ERBB2* or *EGFR2*) encodes a 185 kDa transmembrane glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Her2/neu* has a high sequence homology with other members of the epidermal growth factor receptor family (Duffy, 2005). The function of these receptors is in the regulation of cell growth, differentiation and survival. Receptor activation requires three components: a ligand, a receptor, and a dimerization partner. When a specific ligand binds to a Her2 receptor, it must combine with another receptor of similar structure and undergo dimerization. This initiates a cascade of phosphorylation and signal transduction events that affect the transcription of specific genes involved in cell proliferation and survival (Davoli et al., 2010).

*Her2/neu* proto-oncogene amplification and protein over-expression is observed in 20–40 % of patients with breast cancer (Slamon et al., 1989) and it plays a crucial role in the biological behaviour and pathogenesis of invasive breast cancer and its treatment. Both node-positive and node-negative breast cancer patients whose tumours exhibit *Her2/neu* amplification have a poor prognosis, an increased risk of recurrence and a high risk of disease-related death, showing an overall shorter survival time (Slamon et al., 1987; Ro et al., 1989; Paterson et al., 1991; Press et al., 1997; Andrulis et al., 1998).

However, it does predict a favourable response to neoadjuvant chemotherapy and anti-Her2 antibody treatment (Quddus et al., 2005) because the humanized anti-Her2 antibody binds to the Her2 receptor, thereby

Received April 1, 2011. Accepted June 16, 2011.

This work was supported by Grant NS/10575-3 from the Ministry of Health of the Czech Republic.

Corresponding author: Daniel Tvrđík, Institute of Pathology, General University Hospital in Prague, Studničkova 2, 128 00 Prague 2, Czech Republic. e-mail: Daniel.Tvrdik@vfn.cz

Abbreviations: DAPI – 4,6-diamidino-2-phenylindol, DCIS – ductal carcinoma *in situ*, ER – oestrogen, FISH – fluorescence *in situ* hybridization, HE – haematoxylin and eosin, IHC – immunohistochemistry, MMLV – Moloney-Murine leukaemia virus, PR – progesterone receptors, qRT-PCR – quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RPL23 – ribosomal protein L23.

**Folia Biologica (Praha) 57, 191-199 (2011)**

preventing heterodimerization and interrupting the downstream signalling pathway. Moreover, the bound antibody induces FcR-mediated cytotoxicity (Davoli et al., 2010). Therefore, it is very important to know the status of *Her2/neu* when thinking about biological therapy.

A number of studies have postulated the stability of the *Her2/neu* gene, showing that in most patients the status of expression had not significantly changed after they were given neoadjuvant therapy (Taucher et al., 2003; Tinari et al., 2006; Lee et al., 2007; D'Alfonso et al., 2010). On the other hand, other studies have presented patients with a higher rate of altered status. In 2005, Varga and collaborators (Varga et al., 2005) reported a decreased expression of *Her2/neu* in six patients (26 %) and an increased status in two cases (9 %). In a later similar study, another group of authors (Adams et al., 2008) demonstrated a change from an initial *Her2*-negative tumour to a positive one in two patients (9 %) and from a previously *Her2*-positive tumour to a negative one in six patients (26 %) after the treatment.

In the present study, we investigated samples from 20 patients with invasive breast carcinoma who had undergone neoadjuvant chemotherapy and subsequent surgery (lumpectomy or mastectomy) at the General University Hospital in Prague (Prague, Czech Republic). In all cases, the expression level of *Her2/neu* was evaluated both in pre-therapeutically obtained tumour tissue by core needle biopsy and from specimens removed during final surgery using immunohistochemistry (IHC). Although in 12 cases the expression of *Her2/neu* remained unchanged, there were minor changes observed in six cases, but we also revealed a remarkable alteration in two patients. One possible explanation for this phenomenon is the co-existence of at least two clones of tumour cells with different levels of *Her2/neu* expression and thus different sensitivities to neoadjuvant therapy. In contrast to other reports (Taucher et al., 2003; Varga et al., 2005; Tinari et al., 2006; Lee et al., 2007; Adams et al., 2008; D'Alfonso et al., 2010), both fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) methods were used for verifying the results obtained by IHC.

## Material and Methods

### Patients and treatment

Our study included 20 patients, all females, aged  $54 \pm 13$  (mean  $\pm$  standard deviation) years, neoadjuvantly treated for breast carcinoma at the General University Hospital in Prague between 2005 and 2010. Twelve patients (60 %) had tumour stage II, four patients (20 %) stage III, three patients (15 %) stage IV and one patient (5 %) stage 0 (ductal carcinoma *in situ*, DCIS). The scheme of neoadjuvant chemotherapy is summarized in Table 1. In all cases, tumour tissue was obtained from both diagnostic core needle biopsy and from a specimen removed during final surgery (lumpectomy or mastectomy).

### Histological evaluation

The specimens from the core needle biopsy and surgery were fixed in 10 % formalin and embedded in paraffin wax. Histological evaluation was done on slides routinely stained with haematoxylin and eosin (HE). Tumour stage was determined according to WHO guidelines (Tavassoli and Devilee, 2004) regarding the use of clinical data.

### Immunohistochemistry

Immunohistochemistry included the assessment of *Her2*, oestrogen (ER) and progesterone receptors (PR). Evaluation of *Her2* was done using HerceptTest (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) according to the manufacturer's instructions. The slides were immersed in a preheated Epitope retrieval solution (95–99 °C), in a water bath for 40 min, cooled-down for 20 min at room temperature and then rinsed by a wash buffer. A peroxidase-blocking reagent, a primary antibody, a visualization reagent and a substrate-chromogen solution were applied; the slides were incubated and after each step they were rinsed in a wash buffer. The evaluation of *Her2* over-expression was performed as defined by the HerceptTest scoring guidelines: 0: no staining or membrane staining in less than 10 % of the tumour cells. 1+: partial faint membrane staining in more than 10 % of the tumour cells. 2+: weak to moderate complete membrane staining in more than 10 % of the tumour cells. 3+: strong complete membrane staining in more than 10 % of the tumour cells. HerceptTest was interpreted as negative (score 0 and 1+), weakly positive (2+), and strongly positive (3+) for *Her2* protein over-expression.

Antibody clone ER-6F11 for the ER receptor and PGR-312 for the PR receptor were applied according to manufacturer's instructions (both Novocastra, Leica Microsystems, IL). A positive score for ER and PR was defined as higher than or equal to 10 % of tumour cells showing nuclear staining, with intensity graded from 1+ (weak) to 3+ (strong).

### Fluorescence *in situ* hybridization

Five  $\mu\text{m}$  thick sections from paraffin-embedded tissue were processed for FISH using a PathVysion HER-2 DNA Probe Kit from Abbott Vysis (Downers Grove, IL, USA). The assay procedure was carried out according to the manufacturer's recommendations. First, the slides were deparaffinized in xylene, then pre-treated in 0.2 N HCl and subsequently in an NaSCN solution at 80 °C; the next step was proteolytic treatment. The protease digestion plays a crucial role in terms of obtaining readable and conclusive FISH results. We used Protease II from Abbott Vysis, 25 mg in a 50 ml saline solution at pH 2, digestion time 45 min for the pre-treatment core needle biopsy and 60 min for the post-treatment mastectomy samples. Afterwards, the sections were fixed in buffered formalin. Then we applied the FISH probe, sealed it with liquid rubber cement and co-denatured the specimen and the DNA probe for 1 min at 85 °C and

Table 1. Clinical, histological and immunohistochemical characteristics of patients before and after neoadjuvant therapy

No.		Her2 (0-3+)	ER (%)	PR (%)	Clinical stage	Diagnosis	Neoadjuvant treatment
Her2 positive							
1	Before	3	>90	<1	IIA	ILC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel and trastuzumab
	After	1	30-40	<1	I		
2	Before	3	80	80-90	IIIB	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel + 6× paclitaxel and trastuzumab
	After	2	50-60	20-30	I		
3	Before	3	20-25	<1	IIA	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide
	After	3	20	0	IIA		
4	Before	3	0	0	IIIB	IDC	5× fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide + 12× paclitaxel and trastuzumab
	After	0	20	10	I		
5	Before	3	0	0	IV	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel
	After	3	10-15; 70-80*	<5; 5-10*	IV		
6	Before	3	0	0	IIIB	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel
	After	3	10	10	IIIA		
7	Before	3	0	0	IIIB	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel and trastuzumab
	After	3	40	5-10	0 (DCIS)		
8	Before	3	<5	0	IIA	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 12× paclitaxel and trastuzumab
	After	2	<1	0	0 (DCIS)		
Her2 negative							
9	Before	0	40-50	10	IIIB	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel
	After	0	5-10	10	IIIC		
10	Before	1	60-70	70-80	IIB	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel
	After	0	>90	100	I		
11	Before	0	>90	100	IIA	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel
	After	0	70-80	10-15	IIA		
12	Before	1	80-90	<1	IV	ILC	tamoxifen + letrozole + 4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel
	After	2	40	<1	IIA		
13	Before	1	80-90	20	0 (DCIS)	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel + 6× goserelin
	After	0	80	20	I		
14	Before	1	20	>90	IV	ILC	6× fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel
	After	0	30	0	IV		
15	Before	0	50-60	100	IIIB	ILC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel
	After	0	70	80	IIB		
16	Before	1	90	20	IIA	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 9× paclitaxel
	After	1	80-90	20-30	IIIC		
17	Before	0	65-75	35-45	IIB	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel
	After	0	40	<5	IIA		
18	Before	0	80	100	IIA	IDC	3× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel
	After	0	70-80	80-90	N/A		
19	Before	0	80	20	IIB	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 1× docetaxel + 9× paclitaxel
	After	0	80	30	I		
Triple negative							
20	Before	0	0	0	IIB	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel
	After	0	0	0	IIA		

\* inv; DCIS

ILC - Invasive Lobular Carcinoma

IDC - Invasive Ductal Carcinoma

N/A - not available

then hybridized overnight in ThermoBrite (Vysis, Downers Grove, IL) at 37 °C. After hybridization, the unbound probe was removed in 0.4x SSC/0.3% NP-40 wash solution at 74 °C, the slides were dehydrated and counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI).

For each sample, a minimum of 20 cells were evaluated in an Olympus Provis AX70 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) for the presence of amplification signals. A positive result was defined as the ratio Her2 : CEP17 > 2.

#### RNA isolation, cDNA preparation and qRT-PCR analysis

Deparaffinizing slides of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, isolation of total RNA and synthesis of cDNA were performed by standard procedures described in our previous work (Tvrdik et al., 2005). Briefly: total RNA was extracted using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hamburg, Germany), reverse transcription was performed by a RevertAid – H Minus First Strand cDNA

Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany), which employs a random hexamer primer and Moloney-Murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase.

*Her2/neu* mRNA expression levels were quantified by means of a LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) using the LightMix *Her2/neu* kit (Tib MolBiol, Berlin, Germany) according to manufacturer's protocol. This kit contained a calibrator DNA provided to generate a calibration curve.

The PCR conditions were: initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 50 cycles with the denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 60 °C for 10 s, and extension at 72 °C for 10 s.

The level of *Her2/neu* mRNA was normalized to the level of ribosomal protein L23 (RPL23) as a housekeeping gene. PCR amplification of each transcript was performed twice.

The normalized ratio  $Her2 : RPL23 > 2$  was considered positive for *Her2/neu* gene over-expression.

#### Statistical analysis

Q-PCR data is presented as the arithmetic mean of an absolute copy number  $\pm$  standard deviation of the mean. Two-sided Student's *t*-test was used to evaluate the sta-

tistical significance of the results. Differences with *P* values  $< 0.05$  were considered significant.

## Results

### Histologic findings, tumour staging

Out of 20 patients, 16 (80 %) had infiltrating ductal carcinoma, four (20 %) had infiltrating lobular carcinoma. Tumour stage was determined both before therapy and after therapy (Table 1). In pre-therapeutic investigation 12 (60 %) patients had tumour stage II, four (20 %) patients stage III, three (15 %) patients stage IV and one (5 %) patient stage 0 (DCIS). In post-therapeutic investigation six (30 %) patients had tumour stage I, six (30 %) patients stage II, three (15 %) patients stage III, two (10 %) patients stage IV and one (5 %) patient stage 0 (DCIS). These results indicate tumour reduction and a decrease in tumour stage after therapy in eight (40 %) patients. No significant change was observed in seven (35 %) patients. Progression of disease was found in three (15 %) patients. In two patients (10 %) the tumour stage after therapy was not known, but one of them died with generalized tumour spread.

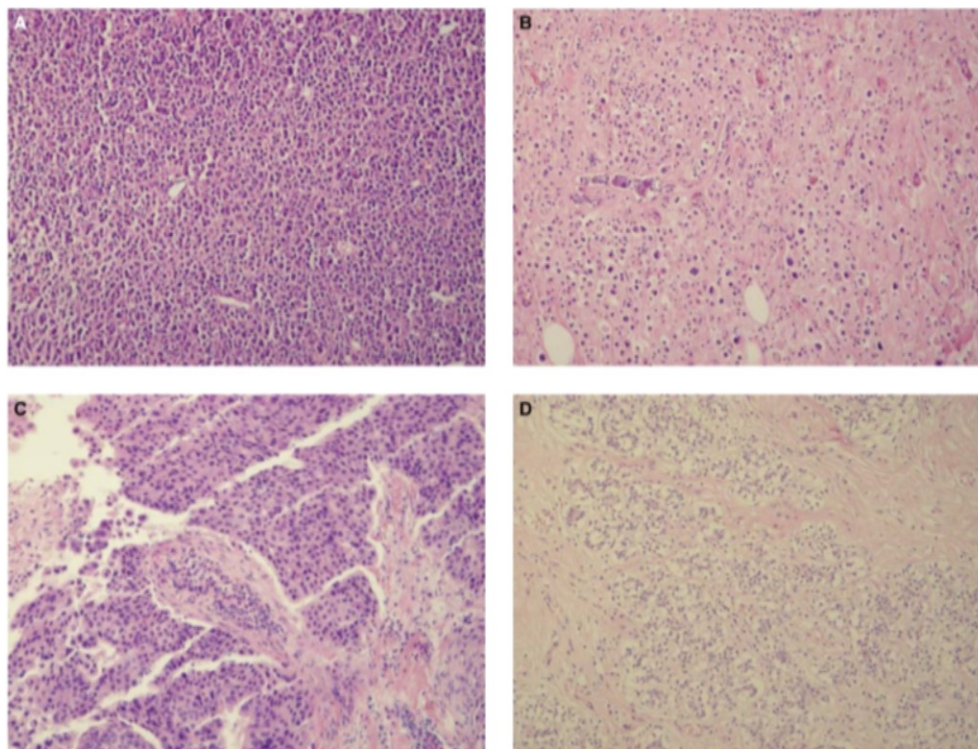


Fig. 1. Histomorphology. Case No. 1: Infiltrative lobular carcinoma before treatment – core needle biopsy (a) and with regressive changes after treatment (b). Case No. 4: Infiltrative ductal carcinoma before treatment – core needle biopsy (c) and after treatment (d). HE, magnification  $\times 100$ .

We focused on two patients with significant *Her2/neu* alteration. Patient No. 1 had infiltrating lobular carcinoma, in post-treatment surgery specimen with regressive changes (Fig. 1a,b) and tumour stage decreased from IIA to I. Patient No. 4 had multiloculated infiltrating ductal carcinoma, and in post-treatment surgery, the specimen was partially necrotic and with regressive changes (Fig. 1c,d). The tumour stage decreased from IIB to I.

#### Immunohistochemistry

Initially, we determined the Her2 status of 20 neoadjuvantly treated patients. We found that in 12 of the 20 (60%) patients the Her2 status remained unchanged after neoadjuvant treatment. In six cases (30%) minor changes were observed after the treatment. However, in two cases (10% of the whole set of patients and 25% of Her2-positive cases; cases Nos. 1 and 4) we found Her2 expression alterations from strongly positive to negative after the treatment (Table 1).

In both pre-treatment biopsies there was a strong membrane staining in more than 10% of tumour cells, and the finding was scored as 3+ (strongly positive for Her2/neu over-expression) (Fig. 2a,c). In the post-treat-

ment specimen only a barely perceptible partial membrane staining in less than 10% of tumour cells was found in case No. 1 (Fig. 2b), and no staining in case No. 4 (Fig. 2d). The finding was scored as 1+ and 0, respectively (negative for Her2 over-expression).

We also determined the ER and PR receptor status on the treatment samples both before and after the treatment (see Table 1). In four patients (20%), the originally negative tumour cells were found to express ER and PR weakly. In other two patients (10%), a change from strongly positive to negative was observed. We also found minor changes in the expression of ER and/or PR in five (25%) other cases. When we compared the two patients with significant Her2 expression alteration (Nos. 1 and 4) regarding the receptor status, we found decreased expression of ER and unchanging very low expression of PR in patient No. 1 and contrariwise slight increase of both in patient No. 4 (see Table 1).

However, a change in the expression of hormone receptors is a more common event and therefore we then concentrated on the change of *Her2/neu* amplification/over-expression by using FISH and quantitative reverse qRT-PCR, respectively.

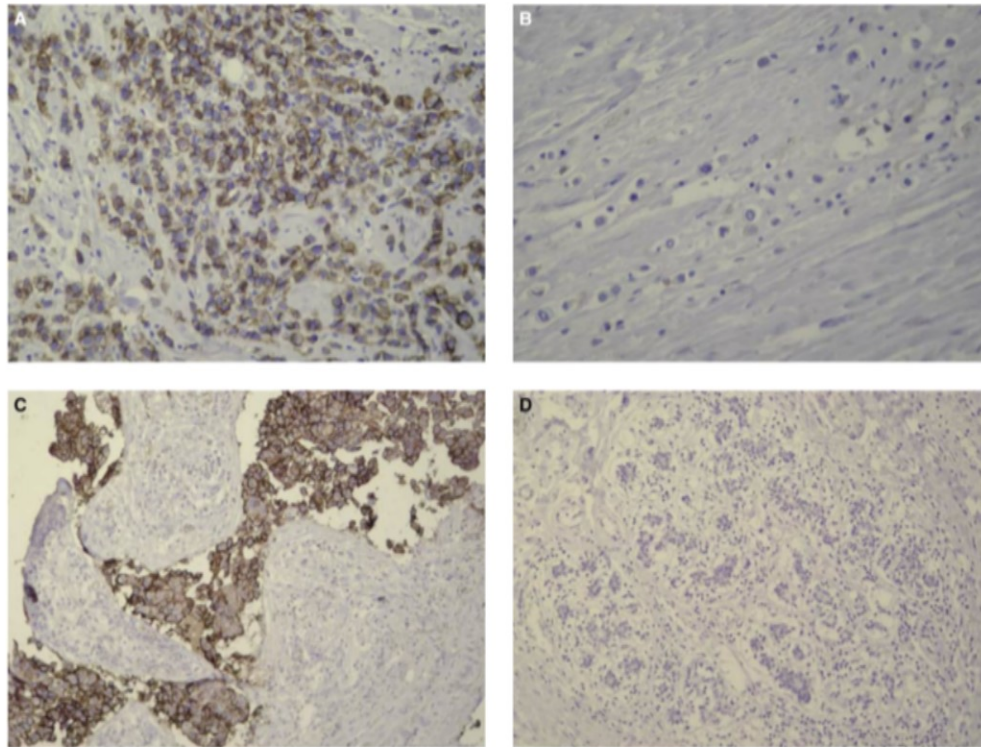


Fig. 2. Immunohistochemical staining for Her2. Strong membrane positivity before treatment in both patients (a – case No. 1, c – case No. 4). Faint partial membrane positivity after treatment (b – case No. 1). Absolute negative staining after treatment (d – case No. 4). Magnification  $\times 200$ .



### Fluorescence *in situ* hybridization

In order to verify correct results of immunohistochemistry in cases No. 1 and No. 4, we analysed the amplification of *Her2/neu* at the DNA level.

The *Her2/neu* probe kit consists of a mixture of two DNA probes: the first labelled in SpectrumOrange spans the whole *Her2* gene, and the second one labelled in SpectrumGreen hybridizes to the  $\alpha$  satellite DNA located at the centromere of chromosome 17 (17p11.1-q11.1), which allows determination of the relative copy number of the *Her2/neu* gene.

Concerning the results of hybridization in the pre-treatment sample of case No. 1, the average number of copies of CEP17 was 2.15 and the average number of copies of the *Her2/neu* gene was 7.75. The ratio of Her2/CEP17 was 3.6, which we interpreted as strong amplification of the *Her2/neu* gene (Fig. 3a). By contrast, in the same case after the treatment (Fig. 3b), the average number of copies of CEP17 was 2.25 and the average number of copies of the *Her2/neu* gene was 3.3. The

ratio of Her2/CEP17 was 1.5, which meant that amplification was not observed.

In case No. 4 before the treatment, the average number of copies of CEP17 was 2.3 and the average number of copies of the *Her2/neu* gene was 14.6. The ratio of Her2/CEP17 was 6.4, which means that strong amplification of the *Her2/neu* gene was observed (Fig. 3c). In the post-treatment sample (Fig. 3d), the average number of copies of CEP17 was 2.2 and the average number of copies of the *Her2/neu* gene was 2.9. The ratio of Her2/CEP17 was 1.3, after which we concluded that amplification was not found.

### Quantitative RT-PCR

Finally, we analysed the over-expression of *Her2/neu* at the RNA level by real-time PCR. In case No. 1 (Fig. 4a), we found  $(6.04 \pm 0.34) \times 10^5$  copies of *Her2*,  $(3.09 \pm 0.23) \times 10^4$  copies of RPL23 and the ratio of Her2/RPL23 was  $19.6 \pm 2.5$  in the sample before the treatment. However, we found  $(1.88 \pm 0.26) \times 10^4$  copies of *Her2*,  $(8.66 \pm 0.82) \times 10^4$  copies of RPL23 and the ratio

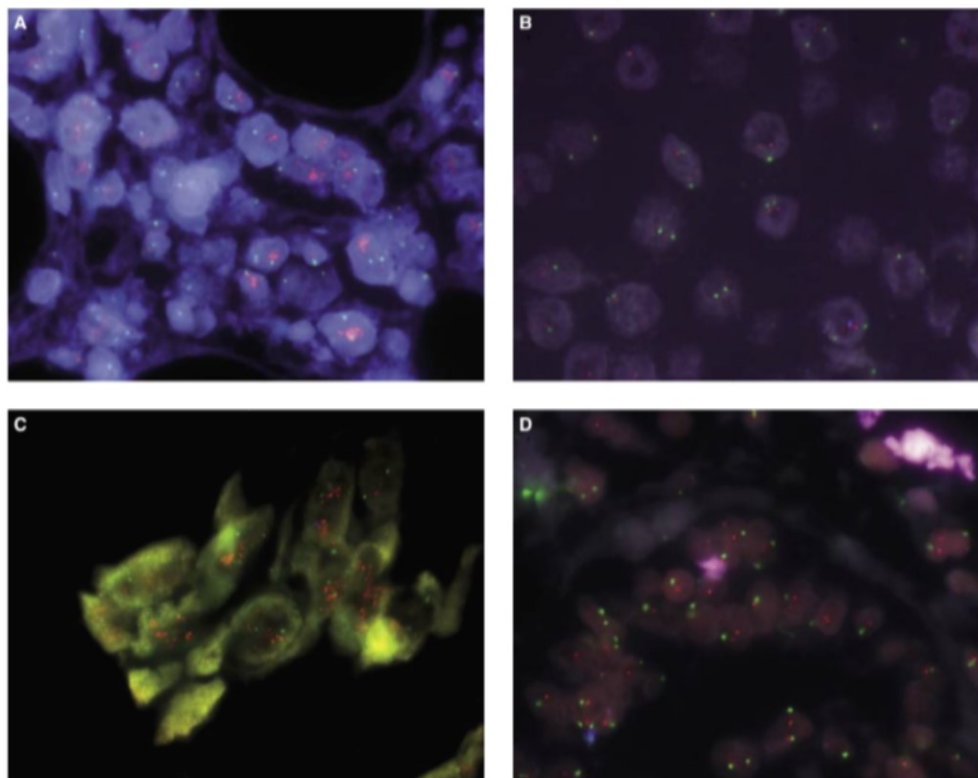


Fig. 3. Fluorescent *in situ* hybridization. Two-colour fluorescent *in situ* hybridization analysis using probe specific for the *Her2/neu* gene (red signals) and for the centromere of chromosome 17 (green signals). The analysis was performed in all samples before (a – case No. 1, c – case No. 4) and after (b – case No. 1, d – case No. 4) the treatment. The hybridization signals were visualized in a fluorescence microscope using appropriate filters. Magnification  $\times 1000$ .

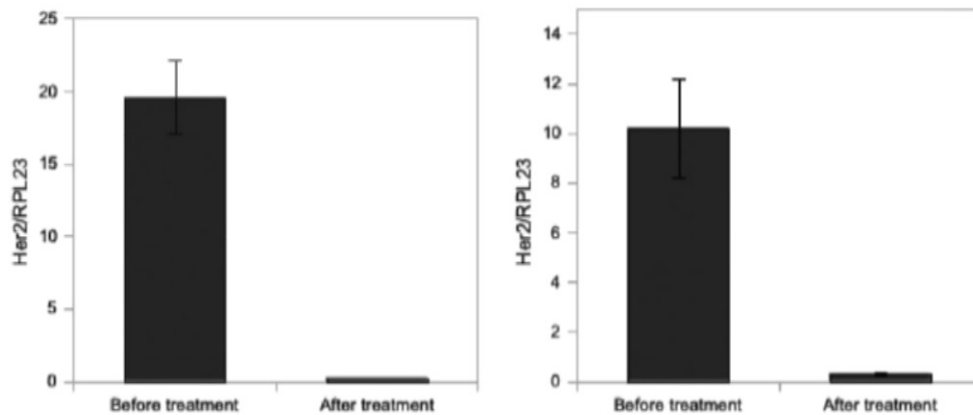


Fig. 4. The expression of Her2/neu mRNA. The evaluation of the *Her2/neu* transcript expression was performed by quantitative RT-PCR analysis. The analysis was performed in both cases (a – case No. 1, b – case No. 4). The level of *Her2/neu* expression was given as normalized ratio Her2/RPL23. ( $P < 0.05$ , two-sided Student's *t*-test).

of Her2/RPL23 was  $0.22 \pm 0.01$  in the sample after the treatment ( $P < 0.05$  for before vs. after the treatment, 2-sided Student's *t*-test).

In case No. 4 (Fig. 4b), we found  $(6.49 \pm 0.99) \times 10^1$  copies of Her2,  $6.35 \pm 0.26$  copies of RPL23 and the ratio of Her2/RPL23 was  $10.2 \pm 1.9$  in the pre-treatment biopsy. However, we found  $2.57 \pm 0.55$  copies of Her2,  $8.03 \pm 0.17$  copies of RPL23 and the ratio of Her2/RPL23 was  $0.32 \pm 0.06$  in the post-treatment surgery specimen ( $P < 0.05$  for before vs. after the treatment, 2-sided Student's *t*-test).

In other words, we found over-expression of the *Her2/neu* gene at the RNA level in both pre-treatment biopsies, while in both post-treatment samples we found down-regulation of *Her2/neu* transcripts.

## Discussion

With the development of tailored therapies targeting specific molecules, Her2, ER, and some other molecular markers have become important predictive factors. For instance, Her2 positivity predicts a response to trastuzumab, the oestrogen receptor positivity predicts a response to hormonal therapy, the presence of c-kit mutation predicts a response to imatinib, and the presence of the epidermal growth factor receptor mutation predicts a response to gefitinib (Van de Vijver, 2005).

Her2 protein over-expression is also indicative of a more aggressive tumour phenotype, increased number of lymph node metastases, shorter time to treatment failure, and a shorter overall survival time (Ro et al., 1989; Slamon et al., 1989; Paterson et al., 1991; Press et al., 1997; Andrulis et al., 1998). Moreover, through unknown mechanisms, it is correlated with the grade and the type of breast cancer and is associated with a poor prognosis (Hoff et al., 2002).

Neoadjuvant chemotherapy substantially reduces the size of the primary tumour and lymph node metastasis in more than 80 % of cases, and increases the probability that breast-conserving surgery can be performed instead of mastectomy. However, surgery is the main treatment method for patients with early breast cancer, and surgery alone or together with radiotherapy may control local disease in most patients. In spite of these treatments, subclinical tumour cells that remain following surgery are responsible for the progression of the disease at a later date. Adjuvant hormonal or cytotoxic treatment is widely used with the goal of eradicating these remaining tumour cells, in order to reduce the subsequent risk of relapse and death (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 1998).

As we have shown in cases No. 1 and No. 4, the expression of Her2 was markedly changed after neoadjuvant chemotherapy from strongly positive to negative. This situation is infrequent but not unknown as most of the published studies that involved stability of Her2/neu described some cases of alteration as well. Overall these changes were usually not statistically significant (Adams et al., 2008), despite that they definitely occur.

The causes for these discrepancies are still unclear. We used three methods (IHC, FISH, qRT-PCR) to eliminate possible sampling error or insufficient fixation of post-treatment specimens, which could lead to the consecutive loss of epitopes and decreased sensitivity for IHC.

The very presumable explanation lies in mono- versus oligoclonality of the tumours. We, like other authors of similar study (Adams et al., 2008), assume a co-existence of at least two clones of tumour cells. One that over-expresses *Her2/neu* and hence is more sensitive to neoadjuvant therapy, including anti-Her2 antibody, and another without over-expression and thus with lower sensitivity. The result of this theory is that the number of

cells with *Her2/neu* over-expression decreases more rapidly than the clone without over-expression, which afterwards becomes more prevalent in the surgery specimen through clonal selective advantage.

It has already been described that many breast carcinomas are karyotypically complex, often with massive structural chromosomal rearrangements (Saint-Ruf et al., 1990, 1991; Pandis et al., 1995a, b). Interestingly, some groups of authors have demonstrated that cytogenetic polyclonality can be found in nearly half of all breast carcinomas that are short-term *in vitro*-cultured and analysed by G-banding and comparative genomic hybridization (CGH) (Teixeira et al., 1994, 2001; Pandis et al., 1995b). Moreover, comparisons between breast carcinomas and their lymph node metastasis have shown that polyclonality may exist in both the primary and secondary tumours (Pandis et al., 1994, 1998). All of these findings suggest that the oligoclonality of breast cancer is not an artefact.

However, in routine practice, it is not common to determine the *Her2/neu* status in breast cancer in samples both before and after the treatment, and in addition, by using two independent methods to minimize possible sampling errors and to distinguish over-expression/amplification. In the light of our results, we concluded that the patients neoadjuvantly treated with anti-Her2 antibody should be retested for the *Her2/neu* status if adjuvant, and that anti-Her2 treatment be considered because the prerequisite for efficiency of targeted therapy is the presence of a target structure at the molecular level. This dual testing would avoid the use of targeted biological therapy in an untargeted manner.

The most common methods for testing the *Her2/neu* status are immunohistochemistry for the detection of gene expression at the protein level, and FISH for the detection of gene amplification at the DNA level. Immunohistochemical evaluation can be affected by variations among antibodies, fixatives, and subjective interpretation. The FISH technique allows the analysis of individual cells, and it can detect whether amplification is the result of chromosome duplication or of gene amplification. However, FISH is expensive, time-consuming and requires several hours for hybridization (often overnight) and considerable time to count amplification in individual cells. Moreover, FISH cannot identify cases in which the gene product is over-expressed in the absence of gene amplification.

Quantitative PCR techniques allow the detection of *Her2/neu* at both the DNA and RNA levels, and may provide alternatives to these methods (Bièche et al., 1999; Lyon et al., 2001). In the future, PCR methods are likely to become more widely used for the same purpose because they are more sensitive, faster, easy to perform, and allow screening multiple samples at the same time. On the other hand, the use of formalin-fixed paraffin-embedded tissue for this purpose at the RNA level may be problematic because the RNA often becomes degraded in this material (Riehle et al., 2010).

In conclusion, in the recent wide discussion and published articles about specific molecules as potential markers of breast cancer behaviour and targets for specific therapy that we know of, this is the first report describing the changes in the *Her2/neu* status at all protein, RNA and DNA levels by using IHC, qRT-PCR and FISH, respectively. As we have shown, quantitative PCR is a valuable tool for the evaluation of *Her2/neu* gene over-expression and correlates well with the results of IHC and FISH, respectively. Moreover, the results obtained by quantitative PCR are not encumbered with any subjective error on the part of the evaluator.

There needs to be more studies encompassing more patients with breast carcinoma to reveal the causes of these differences in expression of the *Her2/neu* gene after the treatment, and to facilitate their possible application in advancement of neoadjuvant therapy. However, repeated testing of the *Her2/neu* status can prevent clinicians from using tailored targeted therapy in an untargeted manner.

## References

- Adams, A. L., Eltoum, I., Krontiras, H., Wang, W., Chheng, D. C. (2008) The effect of neoadjuvant chemotherapy on histologic grade, hormone receptor status, and *Her2/neu* status in breast carcinoma. *Breast J.* **14**, 141-146.
- Andrulis, J. L., Bull, S. B., Blackstein, M. E., Sutherland, D., Mak, C., Sidlofsky, S., Pritzker, K. P., Hartwick, R. W., Hanna, W., Lickley, L., Wilkinson, R., Qizilbash, A., Ambus, U., Lipa, M., Weizel, H., Katz, A., Baida, M., Mariz, S., Stoik, G., Dacamara, P., Strongitham, D., Geddie, W., McCready, D. (1998) *Neu/erbB-2* amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer. Toronto Breast Cancer Study Group. *J. Clin. Oncol.* **16**, 1340-1349.
- Bièche, I., Onody, P., Laurendeau, I., Martine, O., Vidaud, D., Lidereau, R., Vidaud, M. (1999) Real-time reverse transcription-PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications. *Clin. Chem.* **45**, 1148-1156.
- D'Alfonso, T., Liu, Y. F., Monni, S., Rosen, P. P., Shin, S. J. (2010) Accurately assessing *Her2/neu* status in needle core biopsy of breast cancer patients in the era of neoadjuvant therapy: emerging questions and considerations addressed. *Am. J. Surg. Pathol.* **34**, 575-581.
- Davoli, A., Hocevar, B. A., Brown, T. L. (2010) Progression and treatment of HER2-positive breast cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **65**, 611-623.
- Duffy, M. J. (2005) Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin. Chem.* **51**, 494-503.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (1998) Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* **352**, 930-942.
- Hoff, E. R., Tubb, R. R., Myles, J. L., Procop, G. W. (2002) *Her2/neu* amplification in breast cancer: stratification by tumor type and grade. *Am. J. Clin. Pathol.* **117**, 916-921.
- Lee, H., Lee, J., Park, I. A. (2007) Changes in protein expression in breast cancer after anthracycline-based chemotherapy. *Korean J. Pathol.* **41**, 165-170.

- Lyon, E., Millson, A., Lowery, M. C., Woods, R., Wittwer, C. T. (2001) Quantification of HER2/neu gene amplification by competitive PCR using fluorescent melting curve analysis. *Clin. Chem.* **47**, 844-851.
- Pandis, N., Bardi, G., Jin, Y., Dietrich, C., Johansson, B., Andersen, J., Mandahl, N., Mitelman, F., Heim, S. (1994) Unbalanced t(1;16) as the sole karyotypic abnormality in a breast carcinoma and its lymph node metastasis. *Cancer Genet. Cytogenet.* **75**, 158-159.
- Pandis, N., Jin, Y., Gorunova, L., Petersson, C., Bardi, G., Idvall, I., Johansson, B., Ingvar, C., Mandahl, N., Mitelman, F. (1995a) Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas: Identification of eight karyotypic subgroups. *Genes Chromosomes Cancer* **12**, 173-185.
- Pandis, N., Teixeira, M. R., Gerdes, A. M., Limon, J., Bardi, G., Anderson, J. A., Idvall, I., Mandahl, N., Mitelman, F., Heim, S. (1995b) Chromosome abnormalities in bilateral breast carcinomas. *Cancer* **76**, 250-258.
- Pandis, N., Teixeira, M. R., Adeyinka, A., Rizou, H., Bardi, G., Mertens, F., Andersen, J. A., Bondeson, L., Sfikas, K., Qvist, H., Apostolikas, N., Mitelman, F., Heim, S. (1998) Cytogenetic comparison of primary tumors and lymph node metastases in breast cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer* **22**, 122-129.
- Paterson, M. C., Dietrich, K. D., Danyluk, J., Paterson, A. H., Lees, A. W., Jamil, N., Hanson, J., Jenkins, H., Krause, B. E., McBlain, W. A. (1991) Correlation between c-erbB-2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. *Cancer Res.* **51**, 556-567.
- Press, M. F., Bernstein, L., Thomas, P. A., Meisner, L. F., Zhou, J. Y., Ma, Y., Hung, G., Robinson, R. A., Harris, C., El-Naggar, A., Slamon, D. J., Phillips, R. N., Ross, J. S., Wolman, S. R., Flom, K. J. (1997) HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J. Clin. Oncol.* **15**, 2894-2904.
- Quddus, R. M., Sung, J. C., Zhang, C., Pasqueriello, T., Eklund, M., Steinhoff, M. M. (2005) Her2/neu expression in locally advanced breast carcinomas: pre- and post-neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer* **12**, 294-298.
- Riehle, U., Mader, A., Brandstetter, T., Rühle, J., Zur Hausen, A., Stickeler, E. (2010) Nucleic acid sequence-based amplification in formalin-fixed and paraffin-embedded breast-cancer tissues. *J. Clin. Pathol.* **63**, 1071-1076.
- Ro, J. S., El-Naggar, A., Ro, J. Y., Blick, M., Frye, D., Frascini, G., Fritsche, H., Hortobagyi, G. (1989) C-erbB-2 amplification in node-negative human breast cancer. *Cancer Res.* **49**, 6941-6944.
- Saint-Ruf, C., Gerbault-Seureau, M., Viegas-Péquignot, E., Zafrani, B., Cassingena, R., Dutrillaux, B. (1990) Proto-oncogene amplification and homogeneously staining regions in human breast carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* **2**, 18-26.
- Saint-Ruf, C., Gerbault-Sanreau, M., Viegas-Péquignot, E., Zafrani, B., Malfroy, B., Dutrillaux, B. (1991) Recurrent homogeneously staining regions in 8p11 in breast cancer and lack of amplification of POLB, LHRH, and PLAT genes. *Cancer Genet. Cytogenet.* **52**, 27-35.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., McGuire, W. L. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**, 177-182.
- Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udova, J., Ullrich, A. (1989) Studies of Her2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244**, 707-712.
- Taucher, S., Rudas, M., Mader, R. M., Gnant, M., Sporn, E., Dubsy, P., Roka, S., Bachleitner, T., Fitzal, F., Kandioler, D., Wenzel, C., Steger, G., Mittlböck, M., Jakesz, R. (2003) Influence of neoadjuvant therapy with epirubicin and docetaxel on the expression of Her2/neu in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **82**, 207-213.
- Tavassoli, F. A., Devilee, P. (2004) *WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Tumours of the Breast and Female Genital Organs.* IARC Press, Lyon.
- Teixeira, M. R., Pandis, N., Bardi, G., Andersen, J. A., Mandahl, N., Mitelman, F., Heim, S. (1994) Cytogenetic analysis of multifocal breast carcinomas: Detection of karyotypically unrelated clones as well as clonal similarities between tumour foci. *Br. J. Cancer* **70**, 922-927.
- Teixeira, M. R., Tsarouha, H., Kraggerud, S. M., Pandis, N., Dimitriadis, E., Andersen, J. A., Lothe, R. A., Heim, S. (2001) Evaluation of breast cancer polyclonality by combined chromosome banding and comparative genomic hybridization analysis. *Neoplasia* **3**, 204-214.
- Tinari, N., Lattanzio, R., Natoli, C., Cianchetti, E., Angelucci, D., Ricevuto, E., Ficorella, C., Marchetti, P., Alberti, S., Piantelli, M., Iacobelli, S. (2006) Changes of topoisomerase II $\alpha$  expression in breast tumors after neoadjuvant chemotherapy predicts relapse-free survival. *Clin. Cancer Res.* **12**, 1501-1506.
- Tvrđik, D., Svatošová, J., Dunder, P., Povýšil, C. (2005) Molecular diagnosis of synovial sarcoma: detection of SYT-SSX1/2 fusion transcripts by RT-PCR in paraffin-embedded tissue. *Med. Sci. Monit.* **11**, MT1-7.
- Van de Vijver, M. (2005) Gene-expression profiling and the future of adjuvant therapy. *Oncologist* **10** (Suppl 2), 30-34.
- Varga, Z., Caduff, R., Pestalozzi, B. (2005) Stability of the Her2 gene after primary chemotherapy in advanced breast cancer. *Virchows Arch.* **446**, 136-141.

Received: 2011.06.03  
Accepted: 2011.08.29  
Published: 2012.01.01

## Apoptosis – associated genes and their role in predicting responses to neoadjuvant breast cancer treatment

### Authors' Contribution:

- A** Study Design
- B** Data Collection
- C** Statistical Analysis
- D** Data Interpretation
- E** Manuscript Preparation
- F** Literature Search
- G** Funds Collection

Daniel Tvrđík<sup>1,2,3,4,5,6,7,8</sup>, Helena Skálová<sup>1,2,3,4,5,6,7,8</sup>, Pavel Dundr<sup>1,2,3,4,5,6,7,8</sup>, Ctibor Povýšil<sup>1,2,3,4,5,6,7,8</sup>, Zuzana Velenská<sup>1,2,3,4,5,6,7,8</sup>, Adéla Berková<sup>1,2,3,4,5,6,7,8</sup>, Libor Staněk<sup>1,2,3,4,5,6,7,8</sup>, Luboš Petruželka<sup>2,3,4,5,6,7,8</sup>

<sup>1</sup> Institute of Pathology, <sup>1<sup>st</sup></sup> Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of Oncology, <sup>1<sup>st</sup></sup> Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

**Source of support:** This work was supported by Grant IGA MZ ČR NS/10575-3

### Background:

### Summary

Neoadjuvant chemotherapy is used in the treatment of breast carcinoma because it substantially reduces the size of the primary tumor and lymph node metastases. The present study investigated biomarkers that can predict a pathologic response to the therapy.

### Material/Methods:

The role of apoptosis in regression of the tumors after neoadjuvant chemotherapy was determined by TUNEL and anti-active caspase 3 assay. The transcriptional profile of 84 key apoptosis genes was evaluated in both pre-therapeutically obtained tumor tissue by core needle biopsy and in specimens removed by final surgery, using a pathway-specific real-time PCR assay. Obtained data were analyzed by hierarchical cluster analysis and correlation analysis. The immunohistochemical profile of each tumor was determined using the standard ABC method.

### Results:

On the basis of a hierarchical cluster analysis of 13 significantly changed genes, we divided patients into good and poor prognosis groups, which correlate well with progression-free survival. In the good prognosis group, we found a statistically significant down-regulation of the expression of MCL1 and IGF1R genes after neoadjuvant treatment. We also found a statistically significant over-expression of BCL2L10, BCL2AF1, CASP8, CASP10, CASP14, CIDEB, FADD, HRK, TNFRSF25, TNFSF8 and CD70 genes. In contrast, we found up-regulation of IGF1R after the treatment in the group with poor prognosis.

### Conclusions:

Gene expression profiling using real-time PCR assay is a valuable research tool for the investigation of molecular markers, which reflect tumor biology and treatment response.

### key words:

biomarkers • apoptosis • breast cancer • neoadjuvant chemotherapy

### Abbreviations:

PCR – polymerase chain reaction; TUNEL – terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling; ABC – avidin-biotin complex; pCR – pathologically complete response

### Full-text PDF:

<http://www.medscimonit.com/fulltxt.php?ICID=882205>

### Word count:

3054

### Tables:

1

### Figures:

4

### References:

37

### Author's address:

Daniel Tvrđík, Institute of Pathology, General University Hospital, Studničkova 2, Prague 2, 128 00, Czech Republic, e-mail: Daniel.Tvrdik@vfn.cz

## BACKGROUND

Breast cancer is the most common malignant disease in women, occurring more frequently in developed countries [1]. Neoadjuvant chemotherapy, also called pre-operative chemotherapy, is now widely used in the treatment of breast carcinoma. It has several potential advantages compared with the traditional strategy of surgery followed by adjuvant chemotherapy. Neoadjuvant chemotherapy substantially reduces the size of the primary tumor and lymph node metastasis in more than 80% of cases, and increases the probability that breast-conserving surgery can be performed instead of mastectomy [2]. Neoadjuvant chemotherapy is also a valuable research tool for the discovery of predictive markers of chemotherapy response.

Clinicians have long recognized the heterogeneity of human breast cancers, not only in terms of their diverse natural histories despite identical morphological features, but also in their varied response to treatment [3].

Unfortunately, little progress has been made regarding new prognostic and predictive markers that can assist oncologists in treatment decision-making for breast cancer. Generally accepted prognostic and predictive factors include age, tumor size, lymph node status, histologic tumor type, grade, mitotic rate, Her2 and hormone receptor status [2,4,5]. In general, the poor prognostic features include young age (<35 years), high tumor grade, large size (>2 cm), nodal involvement, lack of hormone receptor expression, and the overexpression of Her2. Other negative features are a high proliferative rate and the presence of lymphovascular invasion [6].

Until the development of microarray techniques in the late 1990s, the main approach used for identifying prognostically significant groups consisted of testing 1 or several markers in a group of patients [7]. However, no single tumor marker has been shown to possess a sufficient predictive value to render it clinically useful [8,9]. To achieve a greater predictive value, multiple markers need to be examined and correlated with the response of tumor cells to the treatment. The development of microarray technology has provided us with just such an opportunity. Molecular profiling has identified at least 5 breast cancer subtypes: luminal-A, luminal-B, Her2-overexpressed, basal-like, and normal breast-like [10,11]. These tumor subtypes have diverse disease biology, behavior, relapse risk, and therapy sensitivity [12,13].

Clinicians also have other tools based on microarray technology to assist in treatment decisions for breast cancer patients. The most recent St. Gallen consensus panel agreed that validated multigene tests (OncotypeDX and Mammaprint) could assist in deciding whether to add chemotherapy in cases where its use was uncertain after the consideration of conventional markers. On the other hand, molecular-based technologies are not regarded by the panel as sufficiently reliable yet to make a definitive contribution to the therapeutic decision [14].

The present study was aimed at the investigation of biomarkers that can predict a pathologic response to therapy, and included 16 patients with invasive breast carcinoma, who had undergone neoadjuvant chemotherapy and

subsequent surgery (lumpectomy or mastectomy) at the General University Hospital (Prague, Czech Republic). In all cases, the expression profile of 84 key apoptosis genes was evaluated both in pre-therapeutically obtained tumor tissue from a core needle biopsy and in specimens removed during final surgery, using a real-time PCR assay.

## MATERIAL AND METHODS

### Patients and treatment

This study included 16 patients, all female, aged 52±11 (mean ±standard deviation) years, neoadjuvantly treated for breast carcinoma at the General University Hospital (Prague, Czech Republic) between 2005 and 2010. Two patients (12.5%) had a stage I tumor, 9 patients (56.2%) stage II, 3 patients (18.8%) stage III, and 2 patients (12.5%) stage IV. The scheme of neoadjuvant chemotherapy is summarized in Table 1.

In all cases, tumor tissue was obtained from both a diagnostic core needle biopsy and from specimens removed during final surgery (lumpectomy or mastectomy).

### Histological evaluation

The specimens from the core needle biopsy and surgery were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin wax. The histological evaluation was done on slides routinely stained with hematoxylin and eosin (HE). Tumor stage was determined according to WHO guidelines [15] regarding the usage of clinical data. The molecular classification of the tumors was based on the immunohistochemical profile of Her2, ER, PR, CK5,6, CK8 and CK18 [16]. After the histological evaluation, areas of eventual tumor necrosis were macro-dissected using a scalpel.

### Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed using the avidin-biotin complex (ABC) method as was described in our previous work [17]. Primary antibodies were applied against c-erbB-2 protein (1:100, clone 5A2, Novocastra); ER (1:20, clone ER-6F11, Novocastra); PR (1:100, clone PGR-312, Novocastra); Ki-67 (1:50, clone MIB-1, DakoCytomation); CK5,6 (1:50, clone D5/16B4, DakoCytomation), CK8 (ready to use, clone 35bH11, DakoCytomation), CK18 (1:50, clone DC10, DakoCytomation) and cleaved caspase-3 (1:250, Asp175, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). In the case of active caspase-3, antigen retrieval was performed with a 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) in a water bath for 40 minutes.

### TUNEL assay

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) was performed with a fluorometric TUNEL system (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol. In brief, the tissue sections were treated with 20 µg/ml of proteinase K for 20 minutes and then incubated in a nucleotide mixture containing fluorescein-12-dUTP and TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) for 1 hour at 37°C. Positive controls were pretreated with 1 U/ml of DNase, and negative

**Table 1.** Clinical, histological and immunohistochemical characteristics of patients before and after neoadjuvant therapy.

No.	Clinical stage	TNM	Her2 (0-3+)	ER (%)	PR (%)	Ki67 (%)	Casp. 3 (%)	Tunel (%)	Age (years)	Diagnosis	Neoadjuvant treatment	
<b>Her2 positive</b>												
1	Before	IIA	T2 N0 MX	3	>90	<1	35-40	10-15	20	62	ILC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel and trastuzumab
	After	I	T1 N0 MX	1	30-40	<1	2-3	2-3	1			
2	Before	IIIB	T4,NX,MX	3	80	80-90	70	<1	1	61	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel + 6× paclitaxel and trastuzumab
	After	I	T1 N0 MX	2	50-60	20-30	<5	0	0			
3	Before	IIA	T2 N0 MX	3	20-25	<1	15-20	10-13	15	45	IDC	4x doxorubicin and cyclophosphamide
	After	IIA	TX N1 MX	3	20	0	<5	9	10			
4	Before	IIB	T2 N0 MX	3	0	0	25-35	2-3	0	54	IDC	5× fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide + 12× paclitaxel and trastuzumab
	After	I	T1 NX MX	0	20	10	N/A	N/A	1			
5	Before	IV	T5 N1 MX	3	0	0	75-80	5	1	49	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel
	After	IV	T4 N1 MX	3	10-15; 70-80*	<5; 5-10*	<3; 30-40*	2-3	5			
6	Before	IIB	T3 N0 MX	3	0	0	50-60	3-5	1	38	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel
	After	IIIA	T1 N2 MX	3	10	10	25-30	2-3	5			
<b>Luminal</b>												
7	Before	I	T1 N0 MX	1	70-80	70-80	5-10	<1	1	48	ILC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel
	After	0	T0 N0 M0	pCR								
8	Before	IIIB	T4 N1 MX	0	40-50	10	15-20	N/A	0	71	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel
	After	IIIC	T2 N3 MX	0	5-10	10	<2	<1	5			
9	Before	IIB	T2 N1 MX	1	60-70	70-80	10-15	4	2	47	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel
	After	I	T1 N0 MX	0	>90	100	3-4	<1	1			
10	Before	IIA	T2 N0 MX	0	>90	100	5-10	0	0	46	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel
	After	IIA	T1 N1 MX	0	70-80	10-15	0	1-2	5			
11	Before	IIIB	T4 N1 MX	0	70-80	0	10-15	<1	5	47	IDC	4× doxorubicin, cyclophosphamide and doxorubicin + 16× paclitaxel + letrozole
	After	IV	TX N3 M1	1	0	0	25-30	60-70	50			
12	Before	IV	T4 N2 MX	1	80-90	<1	50-60	N/A	N/A	75	ILC	tamoxifen + letrozole + 4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel
	After	IIA	T2 N0 MX	2	40	<1	<5	0	1			
<b>Basal-like</b>												
13	Before	I	T1 N0 MX	1	0	0	75-85	5	5	39	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide
	After	I	T0 N0 M0	pCR								
14	Before	IIB	T2-3 N1 MX	0	0	0	70-80	25-35	20	45	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel
	After	IIB	T0 N0 M0	pCR								
15	Before	IIB	T2 N1 MX	0	0	0	35-45	60-70	50	55	IDC	3× fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide + 2× docetaxel
	After	I	T0 N0 MX	pCR								
16	Before	IIB	T3 N0 MX	0	0	0	>90	5	5-10	48	IDC	4× doxorubicin and cyclophosphamide + 4× docetaxel
	After	IIA	T2 N0 M0	0	0	0	10	20-30	40			

\* inv; DCIS; ILC – Invasive Lobular Carcinoma; IDC – Invasive Ductal Carcinoma; pCR – pathological complete response; N/A – not available.

BR62

controls were incubated without the TdT enzyme. The fluorescein-12-dUTP-labeled DNA was observed using a Provis AX70 (Olympus, Japan) fluorescence microscope. TUNEL-positive nuclei were expressed as a percent of the total nuclei (DAPI-positive) per slide.

#### RNA isolation and cDNA preparation

Deparaffinized slides of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, the isolation of total RNA and the synthesis of cDNA were performed by standard procedures described in our previous work [18].

In brief, total RNA was extracted using an RNeasy Micro Kit (Qiagen); reverse transcription was performed by a RevertAid – First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), which employs a random hexamer primer and Moloney-Murine Leukemia Virus (MMLV) reverse transcriptase.

#### Real-Time PCR assay (Gene expression profiling)

The gene expression of 84 key apoptosis genes was profiled by the RT<sup>2</sup> Profiler Apoptosis PCR Array (PAHS-012, SABioscience, Frederick, MD, USA). RT-PCRs were performed in a 96-well plate format using a LightCycler 480 (Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions (SuperArray Bioscience). In brief, approximately 500 pg RNA was first converted to cDNA by using an RT<sup>2</sup> First Strand Kit (C-03, SuperArray Bioscience), then the cDNA was pre-amplified using an RT<sup>2</sup> Nano PreAMP Kit (C-06, SuperArray Bioscience) and a Nano PreAMP Human Apoptosis Primer Mix (PBH-7012, SuperArray Bioscience). Finally, PCR reactions were performed using real-time PCR with an RT<sup>2</sup> Real-Time SYBR Green PCR master mix PA-010; SuperArray Bioscience). The total volume of the PCR reaction was 25 µL. An equivalent of 5 pg of RNA was applied to the PCR reaction. The thermocycler parameters were 95°C for 10 minutes, followed by 45 cycles of 95°C for 15 seconds, and then 60°C for 1 minute. All data was analyzed by an RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis Template v3.0 (SABioscience) and relative changes in gene expression were calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  (cycle threshold) method [19]. An average of the number of cycles of the 5 house-keeping genes –  $\beta$ -2-microglobulin (B2M), hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1), ribosomal protein L13a (RPL13A), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and  $\beta$ -actin (ACTB) – was used to normalize the expression between samples, and a 2.0-fold change in gene expression was used as the cut-off threshold to determine up- or down-regulation, as previously described by Li et al. [20]. In each case, the difference in gene expression between the tumor before and after treatment was calculated.

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using programs RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis Template v3.0 (SABioscience) and Statistica v9.1 (StatSoft, Czech Republic).

The Student's t test was used to evaluate the statistical significance of the results. Differences with P values <0.05 were considered significant.

## RESULTS

### Histologic findings, tumor staging

Out of the 16 patients, 13 (81%) had infiltrating ductal carcinoma, and 3 (19%) had infiltrating lobular carcinoma. Tumor stage was determined both before therapy and after therapy (Table 1). In the pre-therapeutic investigation, 2 patients (12.5%) had tumors of stage I, 9 patients (56.2%) stage II, 3 patients (18.8%) stage III, and 2 patients (12.5%) stage IV. In post-therapeutic investigation, 6 (37.5%) patients had tumor stage I, 5 (31.25%) patients stage II, 2 (12.5%) patients stage III, 2 (12.5%) patients stage IV, and 1 (6.25%) patient stage 0. These results indicate tumor reduction and a decrease of tumor stages after therapy in 8 patients (50%). No significant change was observed in 4 patients (25%). A progression of disease was found in 4 patients (25%). In 4 patients (25%) a pathologically complete response (pCR) was observed. Surprisingly, not only tumors differing in the stage of the disease, but also tumors of the same histology and stage (cases No. 4 vs. 6 and No. 14 vs. 16; see Table 1) reacted differently to neoadjuvant therapy. Disease progressed early in cases No. 6 and 16 (data not shown).

### Immunohistochemistry

The molecular classification of the tumors was determined on the basis of the immunohistochemical profile of Her2, ER, PR, CK5,6, CK8 and CK18. Subsequently, we investigated Ki-67 proliferation index. The status of all markers was determined both before and after the treatment, which allowed us to compare the differences among patients in each group and also the changes in expression after the treatment. The detailed outcome is shown in Table 1 (for CK5,6, CK8 and CK18 data not shown) along with the results of TUNEL and anti-active caspase 3 assay.

### Cleaved Caspase-3 Immunohistochemistry and TUNEL assay

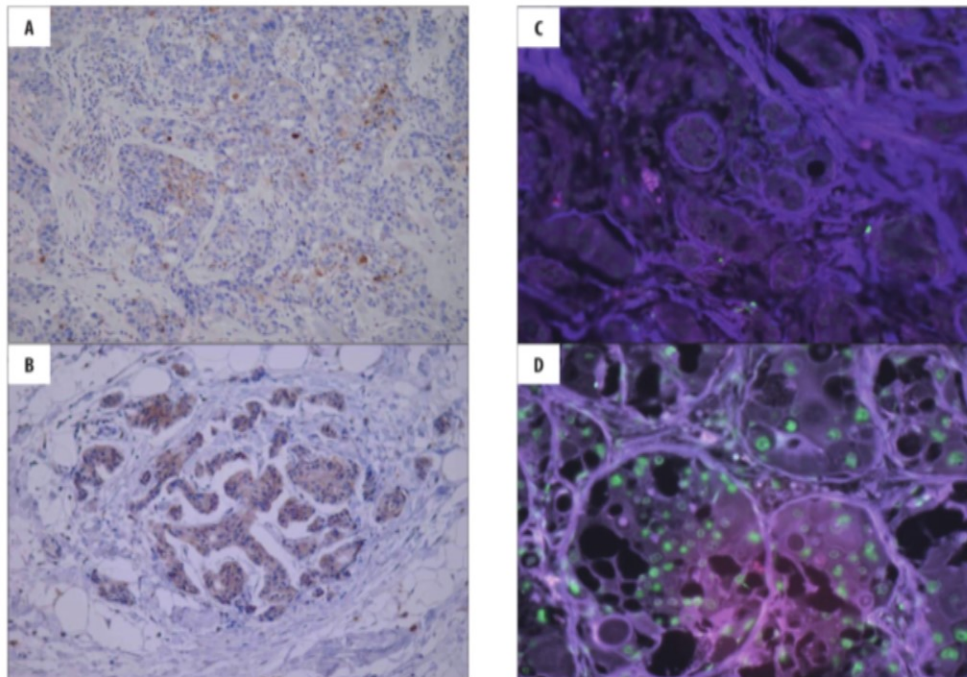
The role of apoptosis in the regression of tumors after neoadjuvant chemotherapy was determined by 2 independent methods: anti-active caspase 3 assay and TUNEL. The activated caspase-3 antibody selectively labeled the cytoplasm of cells (Figure 1A, B), whereas the TUNEL assay showed specific nuclear staining (Figure 1C, D). The cells had morphology consistent with apoptosis (Figure 1B, D).

The apoptotic index (AI), exactly caspase-3 labeling index and TUNEL labeling index were used as quantitative measures of apoptosis in histologic sections as previously reported by Duan et al. [21]. The AIs calculated from these methods showed a similar pattern (Table 1) with good correlation between the TUNEL AI and caspase-3 AI ( $R=0.95$ ), suggesting that these 2 methods are highly comparable for the detection of apoptotic cells.

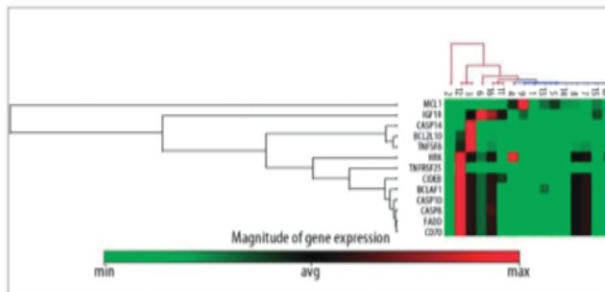
In 1 patient (6.3%) a dramatic decrease of AI was observed after the treatment. In 2 cases (12.5%) we found considerable increased AI after the treatment (Table 1). In 8 cases (50%), minor changes (up to 5%) of the AI were observed after the treatment. For technical reasons, 1 TUNEL and 3 activated caspase-3 assays were not evaluated.

BR





**Figure 1.** Detection of apoptotic cells. Apoptosis was determined by two methods: anti-active caspase 3 immunohistochemistry (A, B) and TUNEL assay (C, D), respectively. In each case, apoptotic cell death assay was performed before (A, C) and after (B, D) the treatment, respectively. The antibody specific for activated caspase-3 selectively labelled the cytoplasm (brown) of apoptotic cells (A, B). Fluorescein-12-dUTP incorporation results in localized green fluorescence within the nucleus of apoptotic cells only (B, D).



**Figure 2.** Dendrogram of 16 breast cancer patients analyzed by hierarchical clustering analysis. Gene expression profiling was performed by qRT-PCR assay. Expression levels above the mean for the gene are shown in red squares and expression levels below the mean for the gene are shown in green squares. Branches representing good responders are shown in blue and those representing bad responders in red.

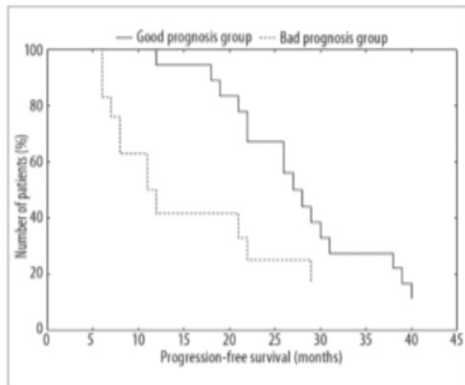
**Gene expression profiling**

In each case, the transcriptional profile of 84 key apoptosis genes was evaluated by using real-time PCR assay.

Firstly, we analyzed all pretreatment samples compared with the control group of 4 cases with pCR, which we selected as a standard of good responders. From the pool of 84 genes, only 13 were significant ( $p < 0.05$ ) across all samples. We analyzed the significant data by hierarchical cluster analysis, which divided patients into 2 groups (Figure 2). One group had a transcriptional profile more similar to patients with pCR than the rest of the cases that we included

in the second group. These 2 groups of patients correlate well with progression-free survival (Figure 3) and therefore these groups of patients could be identified as good and poor prognosis groups.

Finally, we analyzed changes in expression of individual genes before and after the treatment. In the good prognosis group we found a statistically significant down-regulation of the expression of MCL1 and IGF1R genes after neoadjuvant treatment. We also found a statistically significant overexpression of BCL2L10, BCL2AF1, CASP8, CASP10, CASP14, CIDEB, FADD, HRK, TNFRSF25, TNFSF8 and CD70 genes. In contrast, we found an up-regulation of



**Figure 3.** Progression-free survival. Progression free survival (PFS) analysis of patients based on the gene expression analysis of 13 apoptosis associated genes. There is a significant PFS difference between the good and poor prognosis group ( $P < 0.05$ ).

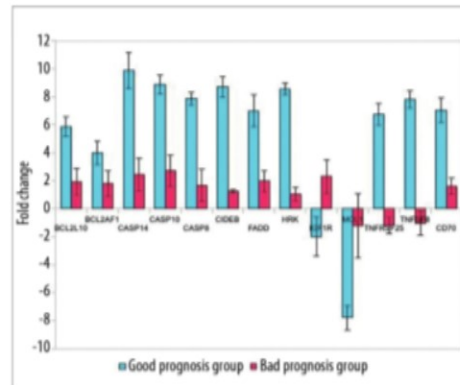
IGF1R after the treatment in the poor prognosis group, while the expression of all the other genes remained almost unchanged (Figure 4).

**DISCUSSION**

Breast cancer is a clinically heterogeneous disease, and existing histopathological classifications do not fully capture its varied clinical course. Current breast cancer TNM staging is based on the anatomical extent (size, lymph node status, distant metastases), but this classification gives only a limited insight into breast cancer biology and clinical outcome. The recent St. Gallen consensus panel [14] established three risk categories: minimal, intermediate and high risk. Hormone receptors, tumor size, tumor grade and age still dominate as key discriminating factors. Newly accepted prognostic factors are Her2 status, lymphatic and vascular invasion in the primary tumor.

Surprisingly, none of these criteria significantly correlated with the clinical outcome in our study. When the St. Gallen risk categories were analyzed, no significant difference in overall survival and progression-free survival was seen (data not shown). Moreover, the high-risk group identified by the St. Gallen criteria included patients with a pathologically complete response and a good outcome. Similar findings were described by Bauer et al. [22], who found that there was very little difference between the low risk and intermediate risk categories when using a 5-year relative survival rate as the single principal criterion. In addition, other indicators, namely proliferation and the apoptotic index, did not correlate with the longer clinical outcome in our study. On the other hand, they correlated well with the regression of the tumor after primary chemotherapy.

Her2, ER and other molecular markers have become important predictive factors with the development of tailored therapies targeting specific molecules. For example, Her2 positivity predicts a response to trastuzumab, and estrogen receptor positivity predicts a response to hormonal therapy



**Figure 4.** Changes in gene expression after the treatment. Up or down regulation (comparing tumors before treatment) of individual genes is expressed as normalized ratios with standard deviation. A 2-fold change in gene expression was used as the cut-off threshold to determine up- or down-regulation. A positive value indicates gene up-regulation and a negative value indicates gene down regulation. There are significant differences between the tumors before and after treatment ( $P < 0.05$ ).

[23]. On the other hand, there are no clinically useful predictive markers of response to conventional chemotherapy [24].

Because many cancer therapies induce classic apoptosis [25], we assume that the regression of tumors after neoadjuvant treatment is executed predominantly by programmed cell death, despite different chemotherapy agents. However, programmed cell death takes many forms distinct from classical apoptosis. Apoptosis-like programmed cell death refers to a cell death process that has similar hallmarks of apoptosis, such as chromatin condensation and the appearance of phosphatidylserine on the outer leaflet of the cell membrane, but not necessarily requiring caspase activity [26]. Necrosis-like programmed cell death describes programmed cell death that does not include chromatin condensation and has varying degrees of other apoptotic features. Caspase-1 and caspase-8 have been implicated in some cases of this type of programmed cell death [26]. Paraptosis describes a cell death that requires gene expression but morphologically does not resemble either apoptosis or necrosis [27]. Unlike necrosis, all of these forms of cell death are programmed because they require gene expression.

In this study, we focused on the end-point of therapy, that is, the death of malignant cells. However, the complexity of apoptosis regulation and the large number of molecular players in the apoptotic signaling pathways result in a crossover of death pathways [26], which may lead eventually to a different phenotypic pattern. Moreover, caspase-independent death or time from death stimulus might explain the low apoptotic index in the good prognosis group.

In spite of the above, or because of it, we determined the expression profile of 84 key apoptosis-associated genes in all tumors, and on this basis we have developed the 13 apoptosis-associated genes expression assay which may be

BR

helpful for the stratification of the patients into groups with different responses to chemotherapy. Among these genes are MCL1, BCL2L10, BCL2AF1, CASP8, CASP10, CASP14, CIDEB, FADD, HRK, IGF1R, TNFRSF25, TNFSF8 and CD70.

An understanding of how these molecules interact gives us an insight into breast cancer biology and allows the development of therapeutics able to induce or modulate the pathway leading to the death of malignant cells.

Apoptosis can be induced in response to many external stimuli, including the activation of cell surface receptors such as Fas, TNFR family members and others [27]. These "death receptors" have 2 distinct signaling motifs – death domains and death effector domains – that allow them to interact with other proteins involved in the apoptosis cascade. The Fas-associated death domain protein (FADD) binds to the ligand-bound receptor through its C-terminal death domain, which leads to the activation of procaspase 8. Caspase 8 is involved in initiating apoptosis induced by Fas and various apoptotic stimuli [28] and is known as an "initiator caspase". It can activate the effector caspases, including caspase 3, 10 and 14, by proteolytic processing. Once caspase 3 is activated, it cleaves downstream targets and irreversibly directs the cell to the apoptotic death. The changes in expression of Bcl2 family members (MCL1, BCL2L10 and BCL2AF1) suggest that not only are the death receptors pathways activated, but the mitochondrial apoptosis pathway also play a role in the chemotherapy treatment. A product of the Harakiri (Hrk) gene is a regulator of cell death that physically interacts with death-repressor proteins Bcl2 and BclX(L), and forms inactive complexes of Bcl2-Hrk and/or BclX(L)-Hrk [29]. In breast cancer, the overexpression of IGF1R and the activation of its downstream signaling molecules have been linked to an inhibition of apoptosis, disease progression, increased resistance to cytotoxic chemotherapeutic drugs or radiotherapy, and to poor prognosis [30,31]. CIDEB is a member of the CIDE (cell death-inducing DFF45 [DNA fragmentation factor 45]-like effector) family of apoptosis-inducing factors [32]. The N-terminal region of CIDEs is homologous to the CIDE-N domains in DFF40/CAD (caspase-activated nuclease) and its inhibitor (DFF45/ICAD [inhibitor of CAD]), which are 2 subunits of the DFF complex [33,34]. Cleavage of DFF45/ICAD by caspase 3 releases DFF40/CAD from the complex, which leads to DNA fragmentation and nuclear condensation [35–37].

Although the precise pathway leading to the chemotherapy-induced cell death is still unclear, it is not surprising that various kinds of molecules – from receptors through caspases to molecules that provide DNA fragmentation – play a significant role. Changes in the expression of these molecules inform us about the nature and sequence of intracellular events leading to programmed cell death, show potential therapeutic targets, and reveal the strategies of cancer cells to escape apoptosis.

## CONCLUSIONS

In order to devise effective, rational treatments, we need a reliable tool for predicting response to the treatment. As we have shown, gene expression profiling after neoadjuvant chemotherapy is a valuable research tool for investigating molecular markers, which may better reflect tumor

biology and treatment response than standard prognostic and predictive factors. Moreover, a pathway-focused real-time PCR assay provides a cheaper alternative to microarrays, which allows easier implementation in clinical practice. However, larger groups of patients need to be studied to verify our findings.

## Acknowledgments:

We wish to thank Štěpánka Melčáková for expert assistance with TUNEL assay.

## REFERENCES:

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2005; 55: 74–108
2. Buchholz TA, Hunt KK, Whitman GJ et al: Neoadjuvant chemotherapy for Breast carcinoma. *Cancer*, 2003; 98: 1150–60
3. Jones C, Ford E, Gillett C et al: Molecular cytogenetic identification of subgroups of grade III invasive ductal breast carcinomas with different clinical outcomes. *Clin Cancer Res*, 2004; 10: 5988–97
4. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD et al: Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005. *Ann Oncol*, 2005; 16: 1569–83
5. Eifel P, Axelson JA, Costa J et al: NIH Consensus Development Panel: Adjuvant Therapy for Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2001; 93: 979–89
6. Oakman C, Santarpia L, Di Leo A: Breast cancer assessment tools and optimizing adjuvant therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010; 7: 725–32
7. Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY: The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J Clin Pathol*, 2006; 59: 225–31
8. Sotiriou C, Powles TJ, Dowsett M et al: Gene expression profiles derived from fine needle aspiration correlate with response to systemic chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2002; 4: R3
9. Phucienik E, Krol M, Nowakowska M et al: Breast cancer relapse prediction based on multi-gene RT-PCR algorithm. *Med Sci Monit*, 2010; 16(3): CR132–36
10. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2000; 406: 747–52
11. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98: 10869–74
12. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM et al: Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100: 10393–98
13. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ et al: Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 2002; 415: 530–36
14. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD et al: Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. *Ann Oncol*, 2009; 20: 1319–29
15. Tavassoli FA, Devilee P: WHO Classification of tumours. Pathology and genetics tumours of the breast and female genital organs. Lyon: IARC Press, 2004
16. Normanno N, De Luca A, Carotenuto P et al: Prognostic Applications of Gene Expression Signatures in Breast Cancer. *Oncology*, 2009; 77(Suppl.1): 2–8
17. Skálová H, Dunder P, Povýšil C et al: Altered expression of Her2/neu after neoadjuvant treatment of breast cancer. *Folia Biologica*, 2011; 57(5): 191–99
18. Tvrdík D, Svatošová J, Dunder P, Povýšil C: Molecular diagnosis of synovial sarcoma: detection of SYT-SSX1/2 fusion transcripts by RT-PCR in paraffin-embedded tissue. *Med Sci Monit*, 2005; 11(3): MT1–7
19. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 2001; 25: 402–8
20. Li Z, Liu B, Maminishkis A et al: Gene expression profiling in autoimmune noninfectious uveitis disease. *J Immunol*, 2008; 181: 5147–57
21. Duan WR, Garner DS, Williams SD et al: Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol*, 2003; 199: 221–28

22. Bauer K, Parise C, Caggiano V: Use of ER/PR/HER2 subtypes in conjunction with the 2007 St Gallen Consensus Statement for early breast cancer. *BMC Cancer*, 2010; 10: 228-40
23. Van de Vijver M: Gene-Expression Profiling and the Future of Adjuvant Therapy. *The Oncologist*, 2005; 10(Suppl.2): 30-34
24. Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A et al: Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet*, 2003; 362: 362-69
25. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV: Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 1994; 73: 2013-26
26. Leist M and Jüttelä M: Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001; 2: 589-98
27. Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE: An alternative, non-apoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000; 97: 14376-81
28. Wajant H, Gerspach J, Pfizenmaier K: Engineering death receptor ligands for cancer therapy. *Cancer Lett*, 2011
29. Daniel PT, Wieder T, Sturm I, Schulze-Osthoff K: The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia*, 2001; 15: 1022-32
30. Inohara N, Ding L, Chen S, Núñez G: Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J*, 1997; 16: 1686-94
31. Rocha RL, Hilsenbeck SG, Jackson JG et al: Insulin-like growth factor binding protein 3 and insulin receptor substrate 1 in breast cancer: correlation with clinical parameters and disease-free survival. *Clinical Cancer Research*, 1997; 3: 103-9
32. Turner BC, Haffty BG, Narayanan I et al: IGF-I receptor and cyclin D1 expression influence cellular radiosensitivity and local breast cancer recurrence after lumpectomy and radiation. *Cancer Research*, 1997; 57: 3079-83
33. Inohara N, Koseki T, Chen S et al: CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J*, 1998; 17: 2526-33
34. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H et al: A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 1998; 391: 43-50
35. Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X: DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 1997; 89: 175-84
36. Liu X, Li P, Widlak P et al: The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95: 8461-66
37. Sakahira H, Enari M, Nagata S: Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 1998; 391: 96-99

**BR**

## Impact of chemotherapy on the expression of claudins and cadherins in invasive breast cancer

HELENA SKÁLOVÁ<sup>1</sup>, NIKOLA HÁJKOVÁ<sup>1</sup>, BARBORA MAJEROVÁ<sup>2</sup>,  
MICHAELA BÁRTŮ<sup>1</sup>, CTIBOR POVÝŠIL<sup>1</sup> and IVANA TICHÁ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Pathology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 12800 Prague; <sup>2</sup>First Faculty of Medicine, Charles University, 12108 Prague, Czech Republic

Received January 22, 2019; Accepted July 5, 2019

DOI: 10.3892/etm.2019.7930

**Abstract.** The importance of the expression profile of claudins in the molecular classification of breast cancer (BC) is currently under investigation. Claudins, together with cadherins, serve an important role in the epithelial-mesenchymal transition and influence the chemosensitivity of cancer cells. Adjuvant chemotherapy is administered following surgical resection in selected cases of BC. Previous neoadjuvant chemotherapy may change the molecular profile of a tumour and subsequently also its chemosensitivity. In the current study, the expression of claudin-1, -3 and -4, E- and N-cadherin and the standard BC biomarkers [oestrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and marker of proliferation Ki-67 (Ki-67)] in formalin-fixed, paraffin-embedded sections from 62 patients with invasive BC was analysed using immunohistochemistry prior to and following neoadjuvant chemotherapy. The results revealed increased expression of claudin-1 (P=0.03) and decreased expression of claudin-3 (P=0.005), PR (P<0.001) and Ki-67 (P=0.01) following the neoadjuvant therapy. No significant changes in the expression of ER, claudin-4 or E- and N-cadherin were observed following therapy. Furthermore, an association between the expression of claudin-1 and the standard BC markers (P<0.05) was identified. A high expression of

claudin-1 was more frequently observed in the triple-negative BC cohort than in the cohort with positive ER, PR and/or HER2 before (P=0.04) and after chemotherapy (P=0.02). The expression of N-cadherin was associated with the expression of ER, PR, HER2 and tumour grade (P<0.05). A positive association between the expression of claudin-3 and E-cadherin (P=0.005) was observed. No association was found between the expression of E- and N-cadherin. In conclusion, significant changes in the expression of claudin-1 and -3 but not in the expression of claudin-4, E- and N-cadherin were observed in samples taken from patients with BC following chemotherapy. These findings indicate that claudins-1 and -3 serve a role in the response of BC to chemotherapy.

### Introduction

Breast cancer (BC), the most frequent malignant tumour in females, is a disease with a heterogenous genetic background and morphology. The prediction of the biological behaviour of a tumour and its response to therapy currently relies on histological classification of the BC tumour. BC subtyping based on molecular profiling, including intrinsic subtypes luminal A, luminal B, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-enriched, basal-like and normal-like, may lead to improved prediction of the tumour's response to therapy (1-3). Novel subgroups with features distinct from the previous ones have been proposed, including the claudin-low and -high subtypes (4,5). However, the additional value of this molecular classification in clinical practice remains unclear (6).

The claudin family currently comprises 27 proteins that form the integral backbone of tight junctions, which are key intercellular connections responsible for maintaining tissue homeostasis (7). The combination of claudins, as well as the level of their expression, are tissue specific and various tumours have been reported to exhibit characteristic patterns (8-11). In non-cancerous breast tissue, the duct epithelium expresses high levels of claudin-1, -3 and -4 (8). In breast tumours, the downregulation or complete loss of claudin-1 and the preservation or upregulation of claudin-3 and -4 were commonly observed in previous studies (8-11). There are, however, some exceptions to these findings, particularly the claudin-low and -high molecular subtypes. The claudin-low subtype is characterized by low expression of claudin-3, -4 and -7 and

*Correspondence to:* Dr Ivana Tichá or Professor Ctibor Povýšil, Institute of Pathology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Studničkova 2, 12800 Prague 2, Czech Republic  
E-mail: ivana.ticha@vfn.cz  
E-mail: ctibor.povysil@lf1.cuni.cz

*Abbreviations:* BC, breast cancer; EMT, epithelial-mesenchymal transition; ER, oestrogen receptor; FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded; FISH, fluorescence in situ hybridization; IHC, immunohistochemistry; NST, (invasive breast carcinoma of) no special type; PR, progesterone receptor; TMA, tissue microarray; TNBC, triple-negative breast cancer

*Key words:* intercellular junctions, carcinogenesis, immunohistochemistry

E-cadherin, and a high frequency of triple-negative tumours [TNBC; negative oestrogen (ER) and progesterone receptors (PR) and HER2]. The claudin-high subtype is characterized by the high expression of claudin-1 and -4 and ER negativity. The claudin-low and -high subtypes are associated with aggressive tumours that tend to be chemosensitive, while other therapy options like hormonal or anti-HER2 therapy are frequently limited due to their ER- or triple-negativity (4,5,12,13).

Chemotherapy is one of the basic therapeutic approaches to BC. There are selected patients who profit from neoadjuvant chemotherapy, which is administered prior to surgery in order to reduce the extent of primary tumour and lymph node metastases, and therefore to reduce the extent of required surgery (14). Since many patients undergo adjuvant chemotherapy following the surgical resection of BC, a question arises as to how a possible previous neoadjuvant chemotherapy changes the expression profile of a tumour and whether such changes influence the response to adjuvant chemotherapy.

Claudins have been previously investigated as potential new predictive markers of BC (4,5,15). Additionally, due to their easily accessible extracellular receptor domains and their involvement in carcinogenesis, claudins are promising targets for novel therapeutic tools, particularly for chemoresistant cancer (16-18). The exact role of claudins in carcinogenesis remains unclear and seems to be very complex, involving proliferation, differentiation and apoptosis on multiple levels (9,10,19). An increasing body of evidence suggests that they serve a role in the epithelial-mesenchymal transition (EMT), during which epithelial neoplastic cells gain a mesenchymal-like phenotype through disruption of intercellular junctions, loss of cell polarity and reorganisation of the cytoskeleton (12,20,21). This process facilitates the growth of a tumour, its invasion into surrounding tissues and metastasis. Furthermore, EMT is thought to be partially responsible for cancer chemoresistance (22). During EMT, intercellular junctions not only come apart but also undergo regulatory changes including a cadherin switch, where epithelial cells lose E-cadherin expression and begin to express N-cadherin, which is typically expressed in tissues of mesodermal origin (23). Even though the expression of E-cadherin is not always entirely lost, a cadherin switch is generally considered to be a marker of EMT (24,25). Claudin-1 facilitates collective migration, by which neoplastic cells detach from the tumour mass at the leading front and penetrate into the surrounding tissues either through partial EMT mechanisms or independently of EMT (26). Claudin-3 and -4 maintain the epithelial phenotype of a cell by modulating the expression of major EMT markers, mainly maintaining the expression of E-cadherin, which is usually highly expressed by the most common type of BC, invasive carcinoma of no special type (NST, ductal) (21). Claudins serve a role in the regulation of cancer stem cells or tumour-initiating cells with self-renewal potential. Therefore, it is possible that they may contribute to drug resistance and tumour recurrence after initial therapy (12,20,22,27).

To the best of our knowledge, this is the first study to investigate the routinely assessed markers of BC such as ER, PR, HER2 and Ki-67, as well as the changes in expression of the intercellular junction proteins claudin-1, -3 and -4, E- and N-cadherin following neoadjuvant chemotherapy. An improved understanding of their expression following chemotherapy may

contribute to the elucidation of their role in tumour response to chemotherapy. Furthermore, the current study investigated the associations between the expression of claudins, cadherins, standard BC biomarkers, tumour grade and the extent of histological regressive changes after chemotherapy that may reveal the role of claudins in BC carcinogenesis and EMT.

## Materials and methods

**Tissue samples.** Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue samples of invasive breast carcinoma NST from 62 patients who underwent neoadjuvant chemotherapy between January 2006 and June 2015 were selected from the archive of the Institute of Pathology of the General University Hospital and the First Faculty of Medicine of The Charles University in Prague, Czech Republic. All patients were females whose age at the first biopsy ranged from 23 to 70 years (mean, 53.5 years). The tumour tissue was obtained from a diagnostic core needle biopsy before treatment, and from the definitive resection of the residual tumour following neoadjuvant chemotherapy using mostly anthracyclines or taxanes, in combination with the HER2-antibody trastuzumab in HER2-positive tumours. Patient and tumour characteristics are summarized in Table I. In mastectomy specimens, optimal fixation was ensured by scoring the tissue with parallel incisions (every 10 mm of tissue) immediately upon the delivery of the specimen to the Institute of Pathology, allowing equal permeation of the tissue by the fixative. This process prevented suboptimal fixation of the specimen and any subsequent alterations in the results of immunohistochemistry (IHC) reactions, specifically the presence of false negativity. Such preparation, together with the inking of the resection margins, enabled the preservation of the anatomical context without hindering macroscopic evaluation of the specimen. All specimens were fixed in 10% neutral buffered formalin for 6-24 h at room temperature and embedded in paraffin wax. Haematoxylin and eosin-stained 3 µm sections were subsequently examined by a pathologist using a light microscope. The histological grade was assessed in the two sample sets according to the Nottingham grading system of Elston and Ellis (1). The effect of therapy in the residual tumour tissue was scored according to the Chevallier classification: i) Class I, no residual carcinoma; ii) class II, carcinoma *in situ*; iii) class III, invasive carcinoma with stromal fibrosis and class IV, no or minimal regressive changes in the invasive carcinoma (28). Only samples containing residual invasive cancer with either marked (class III) or minor signs of regression after chemotherapy (class IV) were selected. Patients with Chevallier class I and II tumour regression following chemotherapy were not included in the current study due to the absence of invasive cancer.

Samples with a sufficient amount of residual tumour were chosen for tissue microarray (TMA). Representative areas of the tumour were marked and their respective FFPE blocks were used for TMA construction based on the haematoxylin and eosin-stained slides. Three or four tissue cores of 2.0 mm in diameter were drilled from each donor block and implanted into the recipient block using the tissue microarray instrument TMA Master (3DHISTECH Ltd.).

Table I. Clinicopathological characteristics of 62 patients with invasive breast carcinoma, including the comparison of tumour stage and grade prior to and following neoadjuvant chemotherapy.

Variable	N (%)
Age at the time of core needle biopsy, years	
<40	10 (16)
40-60	34 (55)
>60	18 (29)
Extent of surgery	
Mastectomy	32 (52)
Breast-conserving surgery	30 (48)
Neoadjuvant chemotherapy	
Doxorubicin, cyclophosphamide	5 (8)
Doxorubicin, cyclophosphamide, docetaxel	34 (55)
Doxorubicin, cyclophosphamide, paclitaxel	3 (5)
Fluorouracil, epirubicin, cyclophosphamide	3 (5)
Letrozole	4 (6)
Paclitaxel	2 (3)
Other combinations	11 (18)
Neoadjuvant anti-HER2 therapy (trastuzumab)	
Yes	8 (13)
No	54 (87)
Stage prior to therapy	
I	4 (6)
II	39 (63)
III	16 (26)
IV	2 (3)
Unknown	1 (2)
Stage following therapy	
I	15 (25)
II	30 (48)
III	12 (19)
IV	2 (3)
Unknown	3 (5)
Stage changes after neoadjuvant chemotherapy	
Decreased	31 (50)
Increased	11 (18)
Unchanged	17 (27)
Unknown	3 (5)
Chevallier class <sup>a</sup>	
III	48 (77)
IV	14 (23)
Tumour grade prior to therapy	
G1	6 (10)
G2	33 (53)
G3	23 (37)
Tumour grade following therapy	
G1	6 (10)
G2	30 (48)
G3	26 (42)
Histological type of breast cancer	
Invasive carcinoma of NST	62 (100)

Table I. Continued.

Variable	N (%)
Minor histological component in invasive carcinoma NST <sup>b</sup>	
Mixed NST and lobular	4 (6)
Mixed NST and tubular	1 (2)
NST with neuroendocrine features	1 (2)
NST with micropapillary component	1 (2)
Total	7 (11)

<sup>a</sup>Extent of histological tumour regression after therapy; <sup>b</sup>5-20% of primary tumour mass. NST, no special type.

**IHC staining and evaluation.** IHC evaluation of expression of all following markers was conducted by a pathologist using a light microscope. The IHC assessment of standard BC biomarkers included HER2, ER, PR and Ki-67. Evaluation of HER2 was performed using HerceptTest (complete kit, original dilution by manufacturer; Agilent Technologies, Inc.; K5204) or rabbit monoclonal anti-human anti-HER2 4B5 PATHWAY antibody (original dilution by manufacturer; Ventana Medical Systems; 790-2991) according to the manufacturers' instructions on the device Ventana BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems). The evaluation of HER2 expression was performed according to the World Health Organization 2012 scoring guidelines (1): i) Negative (score 0 and 1+); ii) weakly positive (2+) and iii) strongly positive (3+) for HER2 protein overexpression. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with ZytoLight<sup>®</sup> HER2/CEN 17 Dual Colour probe (ZytoVision; Z-2077) was performed according to the manufacturer's instructions on samples that were scored by IHC as weakly positive (2+) and also on the samples that were scored as negative (0 and 1+) and ER and/or PR negative. For the FISH evaluation,  $\geq 20$  cells located in the area of invasive cancer were counted using a fluorescence microscope (magnification,  $\times 100$  and immerse oil). A positive result was defined as the ratio of HER2: Centromere of chromosome 17 being  $\geq 2$ . For the evaluation of the other markers, the following antibodies were used according to the manufacturer's instructions: Mouse monoclonal anti-human antibody clone ER-6F11 for the ER receptor (1:50; Novocastra, Leica Microsystems; NCL-L-ER-6F11), two clones PGR-312 and 16 for the PR receptor (1:50; Leica Microsystems Inc.; NCL-PGR-312; ORG-8721) and a mouse monoclonal anti-human clone Mib-1 for the evaluation of Ki-67 (1:50; Agilent Technologies, Inc.; M7240). After that, slides were incubated in N-Histofine Simple Stain Max-Peroxidase (multi) (original dilution by manufacturer, Nichirei Biosciences Inc., 41415) for 30 min and then in chromogen DAB-3S (original dilution by manufacturer, Nichirei Biosciences Inc., 415194S) for 5 min at room temperature. The evaluation of these markers was expressed as the percentage of positive cells. The data for ER and PR was categorized into groups as either positive or negative, a positive score was defined as  $\geq 1\%$  of tumour cells showing nuclear staining. A high cell proliferation was defined as  $\geq 20\%$  of Ki-67-positive tumour cells.

Examination of claudins and cadherins was performed either on whole-tissue sections from the FFPE tissue blocks, which were core needle biopsies and samples containing minimal residual tumour tissue insufficient for the implementation of TMA, or on TMAs. The tissue sections (4 µm) were deparaffinised in xylene at room temperature and rehydrated in a graded alcohol series. Antigen retrieval was performed using the heat-induced epitope retrieval technique with a citrate buffer (pH 6.0 for claudin-3 and -4; pH 9.0 for claudin-1, E-cadherin and N-cadherin) at 98°C for 40 min. Endogenous peroxidase was quenched by 3% hydrogen peroxide solution in methanol at room temperature for 20 min prior to incubation with the primary antibodies: Polyclonal rabbit anti-human anti-claudin-1 (1:100; Cell Marque Corporation; 359A) and anti-claudin-3 (1:800; Abcam; ab15102), polyclonal goat anti-human anti-claudin-4 (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Inc.; sc-17664), monoclonal mouse anti-human anti-E-cadherin (1:100; Thermo Fisher Scientific, Inc.; I8-0223) and anti-N-cadherin (1:300; Agilent Technologies, Inc.; M3613). After that, slides for claudin-1, claudin-3 and E-cadherin were incubated in N-Histofine Simple Stain Max-Peroxidase (multi) (original dilution by manufacturer, Nichirei Biosciences Inc.; 41415) and for claudin-4 in N-Histofine Simple Stain Max-Peroxidase (g) (original dilution by manufacturer, Nichirei Biosciences Inc.; 41416) for 30 min and then in chromogen DAB-3S (original dilution by manufacturer, Nichirei Biosciences Inc.; 415194S) for 5 min at room temperature. Slides for N-cadherin were stained by the kit EnVision+ System-HRT (original dilution by manufacturer; Agilent Technologies Inc.; K4006) according to the manufacturers' instructions. Different semi-quantitative scales were used to evaluate the expression of the claudins and cadherins in order to distinguish particular subtypes with a possible impact on tumour biology and/or response to chemotherapy. The evaluation of the expression of claudins was based on a combined score, as previously described (29,30): Scores 0-3 were used to classify the percentage of positive tumour cells (0, 0%; 1, <25%; 2, 25-50%; 3, >50%) and the intensity of membrane staining (0, 0; 1, 1+; 2, 2+; 3, 3+). These two scores were subsequently multiplied. In the resulting overall score of 0-9, 0 was considered as negative, 1 or 2 as weakly positive, 3-6 as moderately positive and 9 as strongly positive. Negative and weak positive staining were designated as low expression, while moderate and strong positivity were designated as high expression. For the identification of tumours that could be classified as either molecular claudin-low or -high, the IHC criteria suggested in previous studies were used (4,31,32). The criteria for the claudin-low subgroup included triple negativity and a low or absent expression of at least two of four of the following intercellular junction proteins: Claudin-3, -4, -7 and E-cadherin. Previous studies have added low or absent expression of claudin-1 to these criteria (31,32). The criteria for the claudin-high subgroup included ER negativity and a high expression of claudin-1 and -4 (4). A three-tier scale was applied for the evaluation of E-cadherin (0, 0%; 1, <70%; 2, ≥70%). A strong membrane positivity in >70% of tumour tissue (score 2) was considered as normal, lower positivity (score 1) or negativity (score 0) were considered as aberrant (33). A four-tier scale was applied for the evaluation of N-cadherin (0, 0%; 1, <25%; 2, 25-50%; 3, >50%). The result was considered

as positive when >1% of the tumour cells exhibited membrane staining.

**Statistical analysis.** STATISTICA software (version 10; StatSoft, Inc.) was used for data analysis. The Wilcoxon signed-rank test was used to evaluate the differences in the expression of the markers (ordered categorical) of interest in the paired tumour samples (prior and following treatment). The  $\chi^2$  test was used to reveal associations between pathological characteristics (dichotomous variables; Tables SI-III). All data used for statistical calculations are in Table SIV. However, the sample set in the current study is limited in size and in the number of cases in the respective categories. Therefore, the outcome of the statistical analysis should be interpreted with caution. All tests were two-sided, and  $P < 0.05$  was considered to indicate a statistically significant difference.

## Results

**Comparison of the expression of observed markers before and after therapy.** The IHC assessment (Table SIV) of the paired tumour samples (before and after chemotherapy) from 62 female patients with invasive breast carcinoma NST revealed a lower expression of PR (median before-/after treatment 25/2;  $Z = 3.7$ ;  $P < 0.001$ ) and Ki-67 (median 25/10;  $Z = 2.7$ ;  $P = 0.01$ ) following chemotherapy. No significant differences were observed in the expression of E-cadherin, N-cadherin, ER or HER2, or in the frequency of TNBC ( $P > 0.05$ ) when comparing tumours prior to and following treatment. In 4 cases, the expression of HER2 changed from negative to positive, and in 3 of these the positive IHC result of 2+ was confirmed by FISH (the remaining tumour had the positive result of 3+ determined by IHC; Fig. S1). The tumour grade was not significantly affected following therapy ( $P > 0.05$ ). The assessment of the histological grade of residual tumours was often limited by the small amount of residual tumour tissue and/or the cytopathic effects of the drugs. The current study included a sample set made up of patients chosen for neoadjuvant chemotherapy, and therefore it included tumours of a higher grade when compared with other studies that analysed cohorts of unsorted patients with BC (34). The residual tumours following chemotherapy displayed either strong or minor regressive changes with fibrosis corresponding to Chevallier class III (48/62; 77%) or class IV (14/62; 23%), respectively (Fig. 1).

Membrane staining of claudin-1 was punctate and less intense when compared with the more continuous moderate-to-strong staining of claudin-3 and -4 found in the majority of the samples. Cytoplasmic and nuclear staining of claudin-1 appeared in approximately one-third of the samples. In ~20% of samples, cytoplasmic staining of claudin-3 and -4 was observed. The apicolateral polarity of claudin expression, which is common in non-tumour breast epithelium (8), was absent in the tumour tissue for all three examined claudins (Fig. S2). The expression of claudin-1 increased following neoadjuvant chemotherapy (median before-/after treatment 1.5/3;  $Z = 2.2$ ;  $P = 0.03$ ), but a decrease in claudin-3 expression was observed (median 6/5;  $Z = 2.8$ ;  $P = 0.005$ ). Furthermore, a reduction in the expression of claudin-4 following chemotherapy was observed (mean, 7.56 vs. 6.87), but this difference was not statistically significant ( $P > 0.05$ ; Figs. 2 and 3).



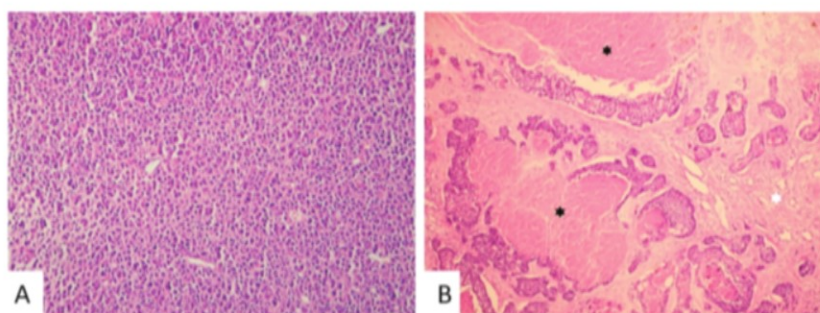


Figure 1. Representative images of invasive breast carcinoma NST prior and following neoadjuvant chemotherapy. (A) Invasive breast carcinoma NST of a solid architecture in a core needle biopsy prior to therapy. Haematoxylin and eosin staining, magnification, x200. (B) Residual carcinoma of a predominantly solid architecture with scattered cribriform pattern with regressive changes [focal necrosis (black asterisks) and fibrosis (white asterisk)] following therapy. Haematoxylin and eosin staining, magnification, x100. NST, no special type.

Table II summarizes simplified dichotomously categorized results from IHC analysis of expression of claudins and other observed markers.

No tumour tissues with low expression of all three claudins (claudin-1, -3 and -4) prior to therapy were observed in the current study; however, four such cases (4/62; 6%) were observed following therapy, all with simultaneous loss of E-cadherin. Only one of these cases was TNBC and matched the suggested criteria for IHC identification of claudin-low subtype. Another case of TNBC in the post-therapy cohort (1/62; 2%) with low expression of claudin-1 and -3 and reduced E-cadherin expression matched the criteria only partially, as the present study did not include the analysis of claudin-7. There were 11 cases (11/62; 18%) pre- and 10 cases (10/62; 16%) post-therapy that matched the suggested criteria for the claudin-high subtype. Upregulation of HER2 was observed in 2 (2/11; 17%) claudin-high tumours pre- and in 1 tumour (1/10; 6%) post-therapy.

**Association of the observed markers.** A statistical analysis of the association of the expression of claudins and cadherins with other variables was performed (Tables SI-III). However, the results have to be interpreted with caution due to the limited sample set. A negative association between the expression of claudin-1 and ER [ $\chi^2=5.79$ ; degrees of freedom (df)=1;  $P=0.02$ ] was observed in tumours prior to chemotherapy but not in the residual tumour tissue following neoadjuvant chemotherapy. Claudin-1 was inversely associated with PR ( $\chi^2=4.66$ ; df=1;  $P=0.03$ ) and HER2 ( $\chi^2=5.35$ ; df=1;  $P=0.02$ ) in the residual tumours following therapy, but not in the core biopsies prior to therapy. TNBC was associated with a high expression of claudin-1 in tumours prior to ( $\chi^2=4.29$ ; df=1;  $P=0.04$ ) and following therapy ( $\chi^2=5.95$ ; df=1;  $P=0.02$ ). High expression of claudin-1 was only associated with a high Ki-67 expression following therapy ( $\chi^2=4.98$ ; df=1;  $P=0.03$ ). No association between claudin-1 and either N-cadherin or E-cadherin was observed ( $P>0.05$ ; Table SI).

Following therapy, the expression of claudin-3 was positively associated with the expression of E-cadherin ( $\chi^2=7.77$ ; df=1;  $P=0.005$ ). No association between claudin-3 and the standard BC biomarkers or N-cadherin was observed

( $P>0.05$ ). A statistical evaluation for claudin-3 before therapy and claudin-4 in both sample sets was not performed due to the unequal distribution of data in the cohorts with high and low expression. Low expression of claudin-3 was only observed in 3 cases and low expression of claudin-4 was observed in 1 case before therapy and 4 cases after therapy (Table SII).

The expression of N-cadherin had a negative association with ER ( $\chi^2=6.68$ ; df=1;  $P=0.01$ ) and PR expression ( $\chi^2=4.45$ ; df=1;  $P=0.04$ ) in tumours before therapy and a positive association with HER2 ( $\chi^2=6.40$ ; df=1;  $P=0.01$ ) in tumours after therapy. Positive N-cadherin expression was more frequently observed in tumours with a higher grade both before ( $\chi^2=4.45$ ; df=1;  $P=0.04$ ) and after therapy ( $\chi^2=6.46$ ; df=1;  $P=0.01$ ). An association between the expression of E-cadherin and standard BC biomarkers was not observed ( $P>0.05$ ). Interestingly, no association between the expression of E-cadherin and N-cadherin was observed ( $P>0.05$ ). Although reduction or loss of E-cadherin was observed in 15 tumours before (15/62, 24%) and 18 after therapy (18/62, 29%), and N-cadherin positivity was observed in 15 tumours before (15/62, 24%) and 14 after therapy (14/62, 23%), both of these features simultaneously were detected only in 5 tumours pre- (5/62; 8%) and 4 post- (4/62; 6%) therapy (Table SIII).

A larger extent of tumour regression after therapy (Chevallier class III) was associated with higher Ki-67 before treatment ( $\chi^2=5.97$ ; df=1;  $P=0.02$ ), when considering only the histological characteristics of the primary tumour and not other clinicopathological data (data not shown). Other markers did not show any association with the histologically assessed tumour regression after therapy ( $P>0.05$ ). However, this finding was not conclusive as tumours with a regression of Chevallier class I and II were not included in the current study due to the absence of invasive cancer in these samples.

## Discussion

Claudins are involved in carcinogenesis and cancer progression. Their involvement in the EMT and response to chemotherapy has previously been investigated (12,20-22,26). However, their exact role and relevant regulatory mechanisms remain unclear. The expression pattern of several members

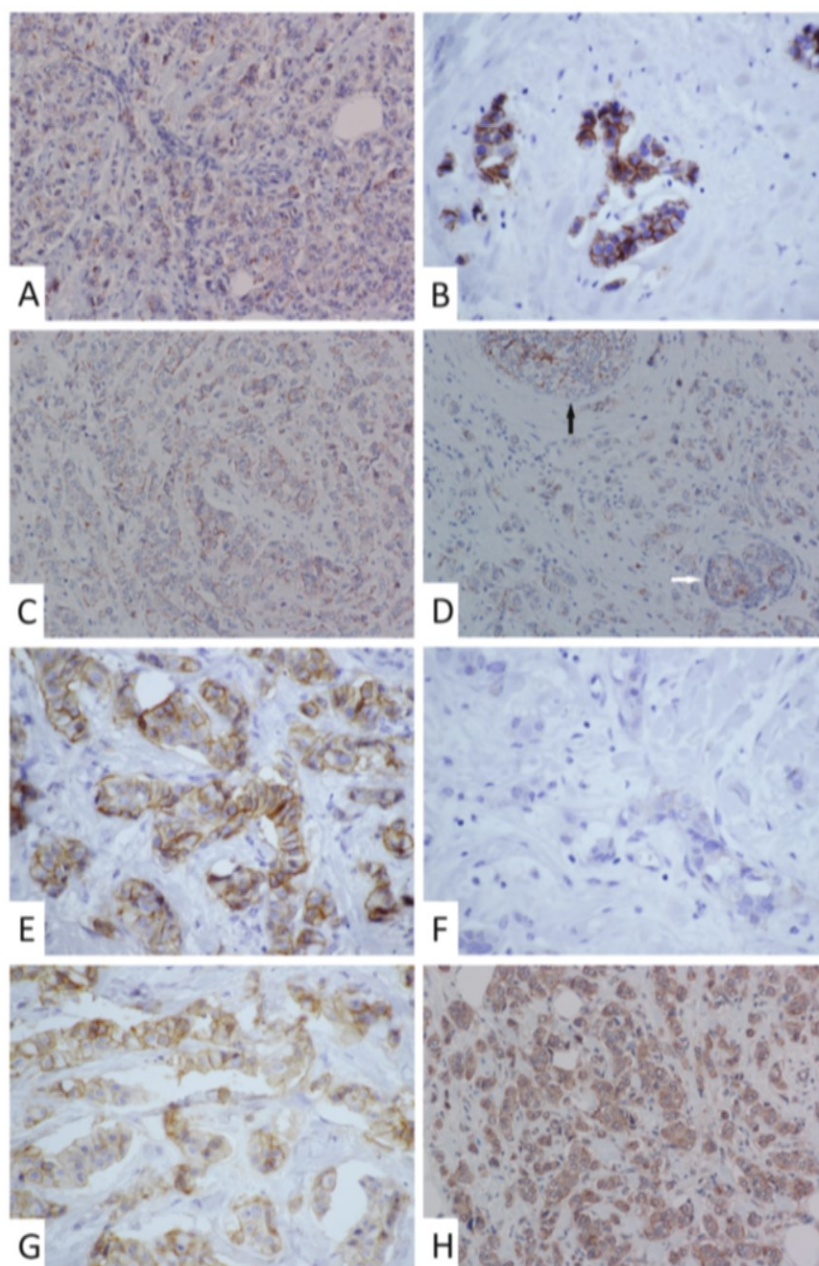


Figure 2. Representative images of changes in the expression of claudins in invasive breast carcinoma no special type following neoadjuvant chemotherapy. (A) Punctate membranous positivity of claudin-1 in a core needle biopsy prior to therapy. Magnification, x200. (B) Strong and continuous membrane staining of claudin-1 in the residual cancer from the same patient. Magnification, x600. (C) Punctate-to-continuous membranous positivity of claudin-1 in a core needle biopsy prior to therapy. Magnification, x200. (D) Similar staining pattern of claudin-1 in the residual cancer from the same patient. Continuous and intense positivity was observed in ductal carcinoma *in situ* (black arrow) and in the small residual non-tumour duct (white arrow). Magnification, x200. (E) Strong and continuous membranous staining of claudin-3 in a core needle biopsy prior to therapy. Magnification, x600. (F) Faint claudin-3 staining in the residual cancer from the same patient. Magnification, x600. (G) Moderate membranous positivity of claudin-4 in a majority of the tumour cells in a core needle biopsy before therapy (retraction artefacts). Magnification, x600. (H) Similar staining pattern of claudin-4 (comparing membranous positivity only) in the residual cancer from the same patient. Magnification, x200.

Table II. Immunohistochemical characteristics of invasive breast carcinoma prior and following therapy.

Marker	Pre therapy, n (%)	Post therapy, n (%)
<b>Claudin-1</b>		
High	25 (40)	34 (55)
Low	37 (60)	28 (45)
<b>Claudin-3</b>		
High	59 (95)	51 (82)
Low	3 (5)	11 (18)
<b>Claudin-4</b>		
High	61 (98)	58 (94)
Low	1 (2)	4 (6)
<b>E-cadherin</b>		
Normal	47 (76)	44 (71)
Aberrant	15 (24)	18 (29)
<b>N-cadherin</b>		
Negative	47 (76)	48 (77)
Positive	15 (24)	14 (23)
<b>ER</b>		
Positive	45 (73)	48 (77)
Negative	17 (27)	14 (23)
<b>PR</b>		
Positive	39 (63)	35 (56)
Negative	23 (37)	27 (44)
<b>HER2</b>		
Positive	8 (13)	12 (19)
Negative	54 (87)	50 (81)
<b>Ki-67</b>		
High	43 (70)	25 (40)
Low	19 (30)	37 (60)
<b>Triple-negative breast cancer</b>	12 (19)	10 (16)

The level of expression is categorized high-low, positive-negative or normal-aberrant according to the expected impact on tumour biology and/or response to therapy. ER, oestrogen receptor; PR, progesterone receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; Ki-67, marker of proliferation Ki-67.

of the claudin family has been described in numerous types of tumours including breast, ovarian, pancreatic or prostate cancer and can be employed in the diagnostic process namely in gynecological and renal carcinomas or mesothelioma (29,35,36). Analysis of claudin expression has been suggested to enhance the molecular classification of BC and may therefore affect the indication for chemotherapy in the future, although the use of molecular classification in clinical practice remains questionable (1,6). A large number of patients with BC selected for neoadjuvant therapy receive chemotherapy twice during treatment. The selective pressure of chemotherapy on cancer cells may change the expression profile of a tumour and thereby lead to a loss of sensitivity to anticancer drugs (37,38).

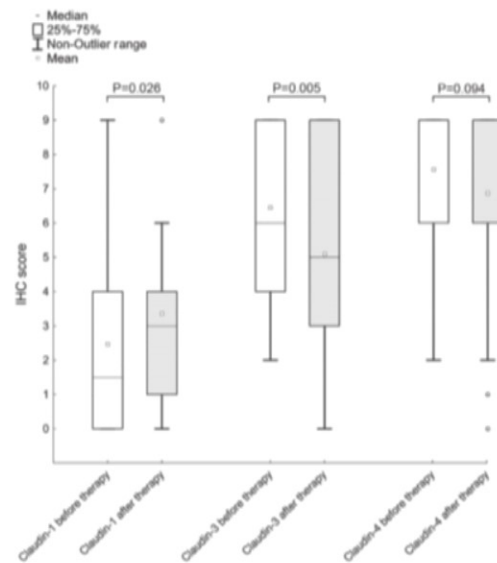


Figure 3. Changes in claudin expression following neoadjuvant chemotherapy. Expression of claudin-1 increased after therapy, while a decrease in expression was observed for claudin-3. Expression of claudin-4 did not change significantly.

Previous studies have compared the expression of the standard IHC BC markers in diagnostic core needle biopsies and surgical specimens in patients who did and did not receive neoadjuvant chemotherapy. In patients who did not receive neoadjuvant chemotherapy, a high concordance was found for all four markers (39-41). However, the majority of studies focusing on patients after chemotherapy revealed substantial changes in these markers (42-51). We observed a decrease of cell proliferation (Ki-67) and PR expression, and only insignificant changes of ER after therapy. This result is in accordance with previous studies that reported similar IHC evaluation of the expression of standard BC markers (43,49-51). The decrease of Ki-67 expression after chemotherapy may be due to the anti-proliferative effects of common anticancer drugs (47,48,52). The data obtained in the current study suggested that HER2 expression was unchanged after chemotherapy, which was also reported in a previous study (42). However, this finding is not in agreement with previous studies that described either downregulation (45) or upregulation of HER2 after therapy (53). In other studies, the IHC evaluation of the HER2 status pre- and post- therapy revealed stronger discrepancies, while the status of gene amplification assessed by FISH was reported as rather stable (44,46). In the present study, both techniques (IHC and FISH) were used according to the American Society of Clinical Oncology guidelines (54), with concordant results. However, in certain tumours the areas of HER2 overexpression are only focal and might be missed in the core needle biopsy (55), which may result in the ambiguity of the results reported in literature.

The present study revealed a significant upregulation of claudin-1 and a downregulation of claudin-3 after chemotherapy. Furthermore, claudin-4 expression was downregulated

but not significantly. The expression of claudin-1 is frequently decreased or lost in cancer cells when compared with the luminal cells of non-tumour breast tissue (30), a feature that was also observed in the current study. Claudin-1 may act as a tumour suppressor or tumour enhancer, depending on cancer type and other not yet well understood conditions (12,26). As the role of claudin-1 is possibly not limited to tight junctions, cytoplasmic or nuclear expression is a common finding (26,56). As a tumour suppressor, its reduced expression may facilitate the EMT and collective migration and may contribute to chemoresistance (26,57,58). However, the current study revealed an increased expression of claudin-1 after therapy, suggesting that other mechanisms may be involved. Our data also showed an association between high expression of claudin-1 and increased rates of cell proliferation.

In the current study, a high expression of claudin-1 was more frequently observed in TNBC irrespective of the administered treatment, which is in concordance with studies that described a higher expression of claudin-1 in basal-like BC, which includes mainly TNBC (30,59). Furthermore, the data obtained in the current study suggested that a high expression of claudin-1 was more common in ER-negative breast tumours before treatment, and in PR-negative or HER2-negative tumours after treatment. A higher expression of claudin-1 in ER-negative compared with ER-positive BC has been previously described (26,60). Additionally, in the current study, positive expression of N-cadherin was more frequently observed in ER- or PR-negative BC prior to treatment, and in HER2-positive BC following treatment. The upregulation of N-cadherin contributes to the invasive phenotype and metastatic potential of moderately-to-poorly differentiated breast carcinomas, which often lose the expression of hormonal receptors and/or overexpress HER2 (61,62). The current study did not reveal an association between claudin-1 and N-cadherin expression, despite the fact that they share some common features in relation to standard BC markers, namely, expression of ER and PR.

The expression of claudin-3 and -4 is high in the luminal cells of non-tumour breast tissue, and typically remains high in BC (8-11). Concordantly, a high expression of these claudins was found in the majority of breast tumour samples in the current study, despite a decrease in expression after chemotherapy. Claudin-3 and -4 are considered to maintain the epithelial phenotype of epithelial cells by modulating the expression of major EMT proteins, specifically by maintaining the expression of E-cadherin (21). The results obtained in the current study suggest an association between the expression of E-cadherin and claudin-3.

Considering the interactions between claudins and cadherins, the reduced expression of claudin-3 and -4 in neoplastic cells may increase the resistance to chemotherapy. The results obtained in the current study support this theory, as a reduction of the expression of both these markers after therapy was observed. However, previous studies reported conflicting results and may be difficult to interpret in relation to the current study as the majority of those studies focused on ovarian cancer and platinum-based chemotherapy (57,58,63). While platinum-based chemotherapy may be used in the treatment of BC, drugs such as anthracyclines and taxanes are more commonly indicated. Nevertheless, a summary of the aforementioned studies suggests the possibility that a

reduced expression of claudin-3 and -4 increases the resistance to chemotherapy, although the influence of factors such as the type of cancer or chemotherapy used cannot be excluded (12).

Despite the fact that high expression of claudin-3, claudin-4 and E-cadherin is common in invasive breast carcinoma NST, their association with standard BC markers remains unclear. Previous studies detected a slightly higher expression of claudin-3 in ER-positive compared with ER-negative tumours, a higher expression of claudin-4 in ER-negative and basal-like tumours (TNBC) and a more frequent aberrant expression of E-cadherin in ER-negative tumours. However, these associations were not observed in other studies (30,33,60,64,65). The data obtained in the current study were insufficient for statistical evaluation of the association between claudin-4 and any other marker, and only partially sufficient for the evaluation of claudin-3. No associations between claudin-3 and the hormonal receptors, HER2 and Ki-67 were observed. Similarly, E-cadherin was not found to be associated with any of the standard BC markers.

Claudin-low BC is more frequent among residual tumours after chemotherapy, which is also supported by our experience from the current study (12,66). However, the suggested IHC criteria for the identification of this subgroup do not fully overlap with the molecular claudin-low subtype. Since earlier studies presented claudin-low tumours as mostly TNBC, this feature has been included in the IHC criteria (5,15). Later, however, it was demonstrated that this molecular subtype contains a proportion of ER-positive and non-TNBC tumours, suggesting a large heterogeneity of this subtype (66). The relevance of the claudin-low and -high subgroups remains to be established (1,6).

Assessment of the tumour grade post-chemotherapy has its limitations and must be considered with caution. The results obtained in the current study do not indicate marked changes in tumour differentiation after therapy. The only marker from the studied proteins that reliably associated with tumour grade was N-cadherin, the expression of which is associated with increased invasiveness of poorly differentiated tumours (61,62). The results obtained in the current study did not reveal an association between tumour grade and E-cadherin, the expression of which is more frequently reduced in poorly differentiated carcinomas when compared with well-differentiated invasive breast carcinomas NST (62,67). However, this feature may have been obscured by the limited number of well-differentiated tumours (grade 1) in the current study.

Previous studies reported a wide range (0-45%) of aberrant E-cadherin expression in invasive breast carcinoma NST (33,62,67). Positive expression of N-cadherin in invasive breast carcinoma NST reaching 50% has been reported, which is twice that observed in the current study; however, the studies reporting this only took into account moderately and/or poorly differentiated tumours (61,62). The involvement of both cadherins in the chemotherapy response may be due to their role in the EMT (68,69). The downregulation of E-cadherin and the upregulation of N-cadherin increase chemoresistance (68,69). However, in the current study, the changes in expression of the two cadherins following the therapy were not statistically significant. The upregulation of N-cadherin does not have to be accompanied by the downregulation of E-cadherin, despite

the already described phenomenon of cadherin switch (24,25). Furthermore, a significant dependence was not observed in the current study. Although E-cadherin downregulation was observed in approximately one-quarter of the examined tumours, and N-cadherin positive expression was observed in a similar proportion of the tumours, only one-third of the tumours exhibited these features simultaneously.

In summary, the current study described significant changes in the expression of claudin-1 and -3 but not in the expression of claudin-4, E- and N-cadherin in BC following chemotherapy. Moreover, the current study revealed a number of associations between the expressed markers, recently described in other studies (21,26,30,59,60-62), which suggested that such phenomena may frequently occur in BC. The present study revealed that high expression of claudin-1 was observed more frequently in ER- and triple-negative tumours. The association of claudin-1 expression with Ki-67 and HER2 requires further investigation. The association between claudin-3 and E-cadherin corresponds with their role in maintaining epithelial phenotype. The higher frequency of N-cadherin positive expression in poorly differentiated tumours corresponded with the loss of hormonal receptors and HER2 upregulation. The current study was limited by the value of the statistical analyses performed due to the small sample size. Further validations on larger cohorts of patients are required to elucidate the underlying regulatory mechanisms.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank Mr. Zachary H. K. Kendall (Institute for History of Medicine and Foreign Languages, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic) for the English language corrections.

#### Funding

This study was supported by the Ministry of Health (Conceptual Development of Research Organization 64165, General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic), by Charles University (Project Progress Q28/LF1, UNCE 204065 and SVV 260367), by the European Regional Development Fund (project no. BBMRI-CZ; grant no. EF16\_013/0001674) and by European Regional Developmental Fund, Operational Program Prague-Competitiveness (Research Laboratory of tumour Diseases; grant no. CZ.2.16/3.1.00/24509).

#### Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

#### Authors' contributions

HS and CP conceived and designed the study. HS, NH, IT, MB and BM collected patient material and clinical data, evaluated the data and performed the analyses. HS, IT and MB drafted the manuscript. MB and CP proofread the manuscript. HS, NH, BM, MB, CP and IT critically reviewed the manuscript and approved the final version of the manuscript.

#### Ethics approval and consent to participate

The current study was approved by the Ethics Committee of the General University Hospital in Prague (Prague, Czech Republic) in compliance with the Helsinki Declaration. Additional informed consent signed by patients was not required as the project was approved by Ethics Committee and the data was used for scientific purposes.

#### Patient consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### References

- Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH and van de Vijver MJ: WHO classification of tumours of the breast. Fourth edition. IARC, Lyon, 2012.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, et al: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747-752, 2000.
- Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, et al: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumour subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10869-10874, 2001.
- Myal Y, Leygue E and Blanchard AA: Claudin 1 in breast tumorigenesis: Revelation of a possible novel 'claudin high' subset of breast cancers. *J Biomed Biotechnol* 2010: 956897, 2010.
- Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JJ, He X and Perou CM: Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 12: R68, 2010.
- Ellis IO, Carder P, Hales S, Lee A, Pinder S, Rakha E and Stephenson T: Pathology reporting of breast disease in surgical excision specimens incorporating the dataset for histological reporting of breast cancer. *Royal College of Pathologists*, 2016.
- Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, Tamura A, Igarashi M, Endo T, Takeuchi K and Tsukita S: Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett* 585: 606-612, 2011.
- Kulka J and Tökés AM: Claudin expression in breast tumours. *Hum Pathol* 36: 859-860, 2005.
- Ding L, Lu Z, Lu Q and Chen YH: The claudin family of proteins in human malignancy: A clinical perspective. *Cancer Manag Res* 5: 367-375, 2013.
- Turksen K and Troy TC: Junctions gone bad: Claudins and loss of the barrier in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1816: 73-79, 2011.
- Singh AB, Sharma A and Dhawan P: Claudin family of proteins and cancer: An overview. *J Oncol* 2010: 541957, 2010.
- Kwon MJ: Emerging roles of claudins in human cancer. *Int J Mol Sci* 14: 18148-18180, 2013.
- Herschkowitz JJ, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, et al: Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol* 8: R76, 2007.
- Buchholz TA, Hunt KK, Whitman GJ, Sahin AA and Hortobagyi GN: Neoadjuvant chemotherapy for breast carcinoma: Multidisciplinary considerations of benefits and risks. *Cancer* 98: 1150-1160, 2003.
- Prat A and Perou CM: Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* 5: 5-23, 2011.
- Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Tsunoda S, Mochizuki Y, Hamakubo T, Tsutsumi Y, Horiguchi Y and Yagi K: A novel tumour-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. *Mol Pharmacol* 76: 918-926, 2009.

17. Walther W, Petkov S, Kuvardina ON, Aumann J, Kobelt D, Fichtner I, Lemm M, Piontek J, Blasig IE, Stein U and Schlag PM: Novel *Clostridium perfringens* enterotoxin suicide gene therapy for selective treatment of claudin-3- and -4-overexpressing tumors. *Gene Ther* 19: 494-503, 2012.
18. Morin PJ: Claudin proteins in human cancer: Promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res* 65: 9603-9606, 2005.
19. Singh AB and Dhawan P: Claudins and cancer: Fall of the soldiers entrusted to protect the gate and keep the barrier intact. *Semin Cell Dev Biol* 42: 58-65, 2015.
20. Osanai M, Takasawa A, Murata M and Sawada N: Claudins in cancer: Bench to bedside. *Pflugers Arch* 469: 55-67, 2017.
21. Lin X, Shang X, Manorek G and Howell SB: Regulation of the epithelial-mesenchymal transition by claudin-3 and claudin-4. *PLoS One* 8: e67496, 2013.
22. Singh A and Settleman J: EMT, cancer stem cells and drug resistance: An emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29: 4741-4751, 2010.
23. Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L and Aaronson SA: Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 148: 779-790, 2000.
24. Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR and Wheelock MJ: N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol* 147: 631-644, 1999.
25. Rai H and Ahmed J: N-cadherin: A marker of epithelial to mesenchymal transition in tumour progression. *Internet J Oncol* 10: 1-8, 2014.
26. Zhou B, Moodie A, Blanchard AA, Leygue E and Myal Y: Claudin 1 in breast cancer: New insights. *J Clin Med* 4: 1960-1976, 2015.
27. Baccelli I and Trumpp A: The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J Cell Biol* 198: 281-293, 2012.
28. Chevallier B, Roche H, Olivier JP, Chollet P and Hurteloup P: Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction chemotherapy (FEC-HD) results in a high histologic response rate. *Am J Clin Oncol* 16: 223-228, 1993.
29. Lechpammer M, Resnick MB, Sabo E, Yakirevich E, Greaves WO, Sciandra KT, Tavares R, Noble LC, DeLellis RA and Wang LJ: The diagnostic and prognostic utility of claudin expression in renal cell neoplasms. *Mod Pathol* 21: 1320-1329, 2008.
30. Lu S, Singh K, Mangray S, Tavares R, Noble L, Resnick MB and Yakirevich E: Claudin expression in high-grade invasive ductal carcinoma of the breast: Correlation with the molecular subtype. *Mod Pathol* 26: 485-495, 2013.
31. Dias K, Dvorkin-Gheva A, Hallett RM, Wu Y, Hassell J, Pond GR, Levine M, Whelan T and Bane AL: Claudin-low breast cancer: Clinical & pathological characteristics. *PLoS One* 12: e0168669, 2017.
32. Gerhard R, Ricardo S, Albergaria A, Gomes M, Silva AR, Logullo AF, Cameselle-Teijeiro JF, Paredes J and Schmitt F: Immunohistochemical features of claudin-low intrinsic subtype in metaplastic breast carcinomas. *Breast* 21: 354-360, 2012.
33. Kowalski PJ, Rubin MA and Kleer CG: E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res* 5: R217-R222, 2003.
34. Dewis R and Gribbin J: Breast cancer: Diagnosis and treatment: An assessment of need. National Collaborating Centre for Cancer (UK). Cardiff, UK, 2009.
35. Ordóñez NG: Value of claudin-4 immunostaining in the diagnosis of mesothelioma. *Am J Clin Pathol* 139: 611-619, 2013.
36. Szabó I, Kiss A, Schaff Z and Sobel G: Claudins as diagnostic and prognostic markers in gynecological cancer. *Histol Histopathol* 24: 1607-1615, 2009.
37. Worsley CM, Mayne ES and Veale RB: Clone war: The evolution of therapeutic resistance in cancer. *Evol Med Public Health* 2016: 180-181, 2016.
38. Sun D, Dalin S, Hemann MT, Lauffenburger DA and Zhao B: Differential selective pressure alters rate of drug resistance acquisition in heterogeneous tumor populations. *Sci Rep* 6: 36198, 2016.
39. Asogan AB, Hong GS and Arni Prabhakaran SK: Concordance between core needle biopsy and surgical specimen for oestrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 status in breast cancer. *Singapore Med J* 58: 145-149, 2017.
40. Dekker TJ, Smit VT, Hooijer GK, Van de Vijver MJ, Mesker WE, Tollenaar RA, Nortier JW and Kroep JR: Reliability of core needle biopsy for determining ER and HER2 status in breast cancer. *Ann Oncol* 24: 931-937, 2013.
41. You K, Park S, Ryu JM, Kim I, Lee SK, Yu J, Kim SW, Nam SJ and Lee JE: Comparison of core needle biopsy and surgical specimens in determining intrinsic biological subtypes of breast cancer with immunohistochemistry. *J Breast Cancer* 20: 297-303, 2017.
42. Kinsella MD, Nassar A, Siddiqui MT and Cohen C: Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and HER2 expression pre- and post-neoadjuvant chemotherapy in primary breast carcinoma: A single institutional experience. *Int J Clin Exp Pathol* 5: 530-536, 2012.
43. Yin HF, Wang YH, Qin XQ, Zhang H, Li T, Ye JM and Liu YH: Effect of neoadjuvant chemotherapy on histologic grade and expression of biological markers in breast cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 31: 858-862, 2009 (In Chinese).
44. van de Ven S, Smit VT, Dekker TJ, Nortier JW and Kroep JR: Discordances in ER, PR and HER2 receptors after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 37: 422-430, 2011.
45. Yoshida A, Hayashi N, Suzuki K, Takimoto M, Nakamura S and Yamauchi H: Change in HER2 status after neoadjuvant chemotherapy and the prognostic impact in patients with primary breast cancer. *J Surg Oncol* 116: 1021-1028, 2017.
46. Li P, Liu T, Wang Y, Shao S, Zhang W, Lv Y, Yi J and Wang Z: Influence of neoadjuvant chemotherapy on HER2/neu status in invasive breast cancer. *Clin Breast Cancer* 13: 53-60, 2013.
47. Cabrera-Galeana P, Muñoz-Montaño W, Lara-Medina F, Alvarado-Miranda A, Pérez-Sánchez V, Villarreal-Garza C, Quintero RM, Porras-Reyes F, Bargallo-Rocha E, Del Carmen I, *et al*: Ki67 Changes identify worse outcomes in residual breast cancer tumors after neoadjuvant chemotherapy. *Oncologist* 23: 670-678, 2018.
48. Moazed V, Jafari E, Kalantari Khandani B, Nemati A, Roozdar A and Ben Razavi SA: Prognostic significance of reduction in Ki67 index after neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer in kerman between 2009 And 2014. *Iran J Pathol* 13: 71-77, 2018.
49. Dede DS, Gumuskaya B, Guler G, Onat D, Altundag K and Ozisik Y: Evaluation of changes in biologic markers ER, PR, HER 2 and Ki-67 index in breast cancer with administration of neoadjuvant dose dense doxorubicin, cyclophosphamide followed by paclitaxel chemotherapy. *J BUON* 18: 366-371, 2013.
50. Lee HC, Ko H, Seol H, Noh DY, Han W, Kim TY, Im SA and Park IA: Expression of immunohistochemical markers before and after neoadjuvant chemotherapy in breast carcinoma, and their use as predictors of response. *J Breast Cancer* 16: 395-403, 2013.
51. Zhou X, Zhang J, Yun H, Shi R, Wang Y, Wang W, Lagercrantz SB and Mu K: Alterations of biomarker profiles after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: Tumor heterogeneity should be taken into consideration. *Oncotarget* 6: 36894-36902, 2015.
52. Yoshioka T, Hosoda M, Yamamoto M, Taguchi K, Hatanaka KC, Takakuwa E, Hatanaka Y, Matsuno Y and Yamashita H: Prognostic significance of pathologic complete response and Ki67 expression after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer* 22: 185-191, 2015.
53. Adams AL, Eltoum I, Krontiras H, Wang W and Chheng DC: The effect of neoadjuvant chemotherapy on histologic grade, hormone receptor status, and HER2/neu status in breast carcinoma. *Breast J* 14: 141-146, 2008.
54. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, McShane LM and Dowsett M: HER2 testing in breast cancer: American society of clinical oncology/college of American pathologists clinical practice guideline focused update summary. *J Oncol Pract* 14: 437-441, 2018.
55. Davila E and Amazon K: The clinical importance of the heterogeneity of HER2 neu. *Case Rep Oncol* 3: 268-271, 2010.
56. Dhawan P, Singh AB, Deane NG, No Y, Shiou SR, Schmidt C, Neff J, Washington MK and Beauchamp RD: Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest* 115: 1765-1776, 2005.
57. Fortier AM, Asselin E and Cadrin M: Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation. *J Biol Chem* 288: 11555-11571, 2013.

58. Li M, Balch C, Montgomery JS, Jeong M, Chung JH, Yan P, Huang TH, Kim S and Nephew KP: Integrated analysis of DNA methylation and gene expression reveals specific signaling pathways associated with platinum resistance in ovarian cancer. *BMC Med Genomics* 2: 34, 2009.
59. Blanchard AA, Ma X, Dueck KJ, Penner C, Cooper SC, Mulhall D, Murphy LC, Leygue E and Myal Y: Claudin 1 expression in basal-like breast cancer is related to patient age. *BMC Cancer* 13: 268, 2013.
60. Blanchard AA, Skliris GP, Watson PH, Murphy LC, Penner C, Tomes L, Young TL, Leygue E and Myal Y: Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. *Virchows Arch* 454: 647-656, 2009.
61. Qian X, Anzovino A, Kim S, Suyama K, Yao J, Hulit J, Agiostratidou G, Chandiramani N, McDaid HM, Nagi C, *et al*: N-cadherin/FGFR promotes metastasis through epithelial-to-mesenchymal transition and stem/progenitor cell-like properties. *Oncogene* 33: 3411-3421, 2014.
62. ElMoneim HM and Zaghoul NM: Expression of E-cadherin, N-cadherin and snail and their correlation with clinicopathological variants: An immunohistochemical study of 132 invasive ductal breast carcinomas in Egypt. *Clinics (Sao Paulo)* 66: 1765-1771, 2011.
63. Shang X, Lin X, Manorek G and Howell SB: Claudin-3 and claudin-4 regulate sensitivity to cisplatin by controlling expression of the copper and cisplatin influx transporter CTR1. *Mol Pharmacol* 83: 85-94, 2013.
64. Kulka J, Szász AM, Németh Z, Madaras L, Schaff Z, Molnár IA and Tokés AM: Expression of tight junction protein claudin-4 in basal-like breast carcinomas. *Pathol Oncol Res* 15: 59-64, 2009.
65. Soini Y: Claudins 2, 3, 4, and 5 in Paget's disease and breast carcinoma. *Hum Pathol* 35: 1531-1536, 2004.
66. Sabatier R, Finetti P, Guille A, Adelaide J, Chaffanet M, Viens P, Birnbaum D and Bertucci F: Claudin-low breast cancers: Clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. *Mol Cancer* 13: 228, 2014.
67. Singhai R, Patil VW, Jaiswal SR, Patil SD, Tayade MB and Patil AV: E-Cadherin as a diagnostic biomarker in breast cancer. *N Am J Med Sci* 3: 227-233, 2011.
68. Wang W, Wang L, Mizokami A, Shi J, Zou C, Dai J, Keller ET, Lu Y and Zhang J: Down-regulation of E-cadherin enhances prostate cancer chemoresistance via Notch signaling. *Chin J Cancer* 36: 35, 2017.
69. Nakamura T, Kato Y, Fujii H, Horiuchi T, Chiba Y and Tanaka K: E-cadherin-dependent intercellular adhesion enhances chemoresistance. *Int J Mol Med* 12: 693-700, 2003.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) License.