

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Studijní obor: **Preventivní medicína**



DISERTAČNÍ PRÁCE

**VLIV BIOTRANSFORMACE A TRANSPORTU NA ÚČINKY
CHEMOTERAPIE A PROGNÓZU RAKOVINY PRSU**

Ing. Miluše Hubáčková

2013

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, 28.6.2013

Ing. Miluše Hubáčková

.....

Poděkování:

Děkuji především školiteli RNDr.Pavlu Součkovi, CSc. za odborné vedení a cenné rady při zpracování disertační práce, dále RNDr.Radce Václavíkové, PhD. a Ing.Marii Ehrlichové za vydatnou pomoc v laboratoři a dále pak celému kolektivu z Laboratoře toxikogenomiky ve Státním zdravotním ústavu v Praze za vytvoření přátelského a podnětného prostředí pro práci. Dále také děkuji kolegům ze spolupracujících laboratoří za možnost využití jejich přístrojového vybavení a vstřícný postoj.

Tato práce byla finančně podpořena granty IGA 8563-5, IGA 9426-3, IGA NT13679-4, GAUK 94507 a MZO 00064203/6704.

V Praze dne 28.6.2013

Ing.Miluše Hubáčková

Identifikační záznam:

HUBÁČKOVÁ, Miluše. *Vliv biotransformace a transportu na účinky chemoterapie a prognózu rakoviny prsu. [Influence of biotransformation and transport to the effects of chemotherapy and prognosis of breast cancer]*. Praha 2013, 84 stran, 6 příloh. Disertační práce (PhD). Univerzita Karlova v Praze, 3.lékařská fakulta. Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Pavel Souček, CSc.

Abstrakt:

Úvod: Cílem této práce bylo sledování vlivu biotransformačních enzymů a enzymů mnohočetné lékové rezistence na prognózu a účinky chemoterapie u pacientek s karcinomem prsu. První část se zabývala genetickými faktory, a to vlivem genetických polymorfismů ve vybraných biotransformačních genech a v genu *ABCB1* a jejich vlivu na vznik a prognózu karcinomu prsu. V další části byly analyzovány expresní profily těchto genů a jsou sledovány jejich případné vztahy ke genotypu, prognóze, a predikci odpovědi na onkologickou léčbu.

Materiál a metody: Polymorfismy biotransformačních genů byly stanoveny pomocí real-time PCR a polymorfismy genu *ABCB1* byly stanoveny pomocí metody NanoChip Assay, která byla provedena na spolupracujícím pracovišti. V obou případech byly polymorfismy stanoveny v DNA získané z krve pacientek. Expresí genů byly stanoveny metodou kvantitativní real-time PCR v párových vzorcích nádorové a okolní nenádorové tkáně. Expresí proteinu NQO1 a p53 byla stanovena imunohistochemicky ve vzorcích nádorové tkáně.

Výsledky: Frekvence studovaných polymorfismů se významně nelišily od dříve publikovaných výsledků, zajímavým však byl SNP *SOD3* rs1799895, u kterého nebyly nalezeny nosičky variantní alely. Pro gen *NQO1* byly v první studii nalezeny významné vztahy, které ale nebyly buď validačním souborem nebo druhou, rozšířenou studií potvrzeny. Pro gen *NQO2* byl nalezen významný vztah alely Leu SNP rs1143684 ke stádiu a prognóze onemocnění. Nosičky genotypu Ala/Ala v *SOD2* rs4880 léčené cyklofosfamidem bez hormonální terapie měly výrazně kratší PFS oproti ostatním pacientkám. Byl nalezen také významný vztah mezi PFS a polymorfismem rs699473 genu *SOD3*, kdy nosičky variantní alely léčené tamoxifenem nebo aromatázovým inhibítorem měly zhoršené PFS oproti ostatním pacientkám. U genu *ABCB1* byl nalezen významný vztah mezi nosičkami variantních alel polymorfismů rs1128503 a rs1045642 a expresí ER, u kterých častěji nebyla exprese ER v nádorech nalezena. V expresní studii *CYPs* byla nalezena nejvyšší exprese v nádorové i okolní nenádorové tkáni u genu *CYP1B1*.

Závěry: Naše výsledky z prvních dvou studií naznačily zásadní význam zařazení validačních souborů do prováděných studií či ověřování výsledků na větších souborech vzorků, které byly původně provedeny na malém počtu vzorků. Dle našich studií se námi studované biotransformační enzymy (především geny *CYP2E1* a *CYP1B1*) a enzymy modifikující oxidativní stres (především geny *SOD2* a *SOD3*) jeví jako nadějně prognostické markery

s využitím v budoucí cílené léčbě karcinomu prsu. Nejzajímavějšími polymorfismy pro další studium rezistence karcinomu prsu se nyní jeví polymorfismy *ABCB1* v exonu 12 a 26.

Klíčová slova: karcinom prsu, biotransformace, oxidativní stres, transport, exprese, polymorfismus

Abstract:

Introduction: The aim of this study was to evaluate the influence of biotransformation enzymes and enzymes of multidrug resistance for the prognosis and effects of chemotherapy of breast cancer patients. The first part dealt with the genetic factors and the influence of genetic polymorphisms in selected biotransformation genes and in *ABCB1* gene and their influence in the formation and prognosis of breast cancer. In the second part, the expression profiles of these genes were analyzed as potential prognostic and predictive properties of a treatment's outcome.

Materials and methods: Polymorphisms of biotransformation genes were determined using real-time PCR and polymorphisms of *ABCB1* gene were determined using NanoChip Assay, which was performed in our cooperated department. In both cases, the polymorphisms were detected in DNA obtained from the blood of patients. The expression of genes was determined using quantitative real-time PCR in paired tumor and adjacent non-tumor tissue of breast cancer samples. The expression of NQO1 and p53 protein was assessed by immunohistochemistry in the tumor breast tissues.

Results: The frequencies of the studied SNPs did not differ from the previous published results, however SNP *SOD3* rs1799895 was interesting because only ancestral allele were found. In the first study significant association for gene *NQO1* were found, but there were not confirmed by validation study or subsequent extended study. The significant association was found for *NQO2* Leu allele of SNP rs1143684, which was associated with lower stadium of disease and with better prognosis of disease. *SOD2* genotype Ala/Ala of SNP rs4880 was associated with worse PFS in the treatment of cyclophosphamide without hormonal therapy outcome. Also significant association with PFS and *SOD3* SNP rs699473 was found, where worse PFS was related to presence of non-ancestral allele and hormonal treatment outcome (tamoxifen or aromatase inhibitor). For gene *ABCB1* significant association was found between non-ancestral allele of SNPs rs1128503 and rs1045642 and ER expression, which was not more often found in tumor tissues samples. In expression study of CYPs the highest expression was found for gene *CYP1B1*.

Conclusions: Our results from first two studies suggested the importance of including of validation sets into the performed studies or the verification of the results on the larger number of samples, which were initially performed on a small number of samples. According to our studies of biotransformation enzymes (especially genes *CYP2E1* and *CYP1B1*) and enzymes modifying oxidative stress (especially genes *SOD2* and *SOD3*) seem to be promising

prognostic markers in the future targeted therapy of breast carcinomas. The most interesting polymorphisms in ABCB1 seem to be SNPs in exon 12 and 26 for the next study of the resistance of breast cancer.

Key words: breast cancer, biotransformation, oxidative stress, transport, expression, polymorphism

Obsah

1. Úvod	4
1.1. Karcinogeneze.....	5
1.2. Možnosti terapie nádorového onemocnění.....	6
1.3. Karcinom prsu.....	8
1.4. Rezistence nádorů.....	9
1.4.1. Gen mnohočetné lékové rezistence MDR1.....	11
1.5. Polymorfismus biotransformačních enzymů.....	12
1.5.1. Cytochromy P450.....	13
1.5.1.1. CYP1B1.....	14
1.5.1.2. CYP2C9.....	14
1.5.1.3. CYP2E1.....	14
1.5.1.4. CYP3A4.....	15
1.5.2. Chinonoxidoreduktázy 1 a 2.....	15
1.5.2.1. NQO1.....	15
1.5.2.2. NQO2.....	16
1.5.3. Superoxiddismutázy.....	17
1.5.3.1. SOD1.....	18
1.5.3.2. SOD2.....	18
1.5.3.3. SOD3.....	19
1.6. Závěr.....	19
2. Hypotéza a cíle práce	21
3. Materiál a Metody	22
3.1. Materiály.....	22
3.2. Pacientky.....	22
3.3. Izolace DNA a genotypizace genů NQO1, NQO2, SOD2 a SOD3.....	25
3.4. Genotypizace ABCB1 pomocí NanoChip Assays.....	26

3.5. Příprava standardů pro qPCR.....	26
3.6. Kvantifikace hladiny transkriptů mRNA.....	26
3.7. Imunohistochemická detekce exprese proteinů p53 a NQO1.....	28
3.8. Statistická analýza.....	29
4. Výsledky.....	31
4.1. Vliv polymorfismu a exprese genu NQO1 na prognózu karcinomu prsu.....	31
4.1.1. Polymorfismus, genová exprese a imunohistochemická analýza exprese proteinu NQO1.....	32
4.1.2. Vztah mezi NQO1 a klinicko-patologickými charakteristikami pacientek.....	36
4.2. Úloha genů kódujících oxidativní stres v prognóze karcinomu prsu.....	37
4.2.1. Charakteristiky studované populace a polymorfismy genů NQO1, NQO2, SOD2 a SOD3.....	37
4.2.2. Míra exprese genů NQO1, NQO2, SOD2 a SOD3.....	40
4.2.3. Vztah mezi expresí a polymorfismy genů NQO1, NQO2, SOD2 a SOD3 a klinicko-patologickými charakteristikami pacientek.....	41
4.2.4. Analýza doby přežití bez progresu (PFS).....	43
4.3. Úloha polymorfismu a exprese genu ABCB1 v prognóze karcinomu prsu.....	48
4.3.1. Frekvence polymorfismů genu ABCB1.....	48
4.3.2. Genová exprese ABCB1 a její vztah k polymorfismu ABCB1.....	49
4.3.3. Vztah mezi klinicko-patologickými charakteristikami pacientek, polymorfismy a expresí ABCB1.....	51
4.4. Expresní profil genů cytochromů P450 u pacientek s karcinomem prsu.....	53
4.4.1. Exprese genů CYP1B1, CYP2C9, CYP2E1 a CYP3A4.....	53
4.4.2. Vztah mezi genovou expresí CYP a klinicko-patologickými charakteristikami pacientek.....	54

5. Diskuze	56
5.1. Význam polymorfismu, genové a proteinové exprese NQO1 u pacientek s karcinomem prsu.....	56
5.2. Význam genů kódujících oxidativní stres a jejich úloha v prognóze pacientek s karcinomem prsu	58
5.3. Význam polymorfismů genu mnohočetné lékové rezistence 1 (ABCB1) na expresi a klinicko-patologické charakteristiky pacientek s karcinomem prsu.....	60
5.4. Význam exprese genů cytochromů P450 u pacientek s karcinomem prsu.....	63
6. Závěry	66
7. Použité zkratky	68
8. Literatura	70
9. Seznam příloh	84

1. Úvod

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

Léčba nádorových onemocnění kombinuje chirurgické zákroky, radioterapii a chemoterapeutickou léčbu. Chemoterapie je založena na podávání cytostatik, které jsou schopny usmrtit nádorové buňky. Jejich použití je však doprovázeno řadou závažných nežádoucích účinků, které mohou poškozovat i zdravé lidské buňky. Nemałym problémem je rovněž rozvoj rezistence nádorů vůči používaným cytostatikům, což následně vede ke snížení účinnosti léčby.

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

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

1.1. Karcinogeneze

Karcinogenezi lze charakterizovat jako neregulovaný růst buněk o autonomní povaze buněčné proliferace spojený s poruchou kontrolních mechanismů a s alterací buněčné diferenciaci. Nekontrolovaný růst vede ke zvětšení postižené tkáně, která může utlačovat okolní struktury, nebo k postupné invazi do okolních struktur a k metastazování [1]. Nádorové onemocnění je geneticky podmíněné a vzniká následkem patologických změn v molekule DNA. Proces vzniku a vývoje nádorů probíhá ve třech hlavních etapách.

První fází karcinogeneze je proces iniciace. Ta je zahájena účinkem zevních a vnitřních faktorů, které způsobují transformaci nenádorové buňky na buňku iniciovanou. V iniciované buňce tak dochází k mutaci DNA, která způsobuje aktivaci onkogenů, deaktivaci tumor supresorových genů a současně toto poškození není opraveno reparačními enzymy. Není-li tato buňka odstraněna imunitním systémem, přetrvává v tomto stavu do té doby, než dojde k nahromadění dalších genetických změn (mutací), které vedou k proliferaci buněk s porušenou diferenciací a mezibuněčnou komunikací [2, 3].

Druhou fází, neboli promoci, lze charakterizovat jako přeměnu iniciované buňky v buňku nádorovou. V této fázi dochází ke zvýšené proliferaci a produkci buněk benigního nádoru. V tomto období existuje ještě možnost zastavení tohoto abnormálního vývoje. V opačném případě proces pokračuje a pokud dojde k působení dalších faktorů (progresorů), dosud částečně kontrolovatelný buněčný růst se změní v růst nekontrolovatelný a vzniká maligní nádor *in situ* [3].

Takto pozměněné buňky přechází do třetí fáze, nazývané progrese, která se vyznačuje ztrátou schopnosti buněk odpovídat na regulační mechanismy a následuje lokální růst nádoru. V posledním stádiu nádorového bujení, tzv. tvorbě metastáz, nastává šíření nádoru mimo prvotní ložisko a dochází k tvorbě dceřiných nádorů [4].

K přeměně normální buňky na nádorovou je třeba několika nezávislých mutací, které se musí odehrát v jediné buňce, aby získala potenciál potřebný k maligní transformaci. Nádorové onemocnění je proto typickou nemocí staršího věku, protože nahromadění velkého množství somatických mutací v jediné buňce trvá mnoho let. Jedinci s vrozenou zárodečnou mutací v onkogenech či tumorsupresorových genech však nepotřebují k rozvoji nádoru tolik mutací a onemocnění se u nich objevuje s vyšší frekvencí a v průměru v mladším věku [1].

1.2. Možnosti terapie nádorového onemocnění

Ve většině případů nestačí k léčbě nádorových onemocnění jen jediná léčebná metoda, ale je nutný komplexní přístup, který kombinuje chirurgickou léčbu s radioterapií a užíváním chemoterapeutik. Chirurgie se využívá jednak k diagnostickým účelům a současně je tzv. paliativní chirurgie důležitou součástí komplexní léčby. Jedná se o operativní odstranění primárního nádoru, kterým se minimalizuje množství nádorových buněk, zabrání se komplikacím bezprostředně ohrožujícím život a dochází zpravidla ke zlepšení kvality života nemocného. Ve zvláštních případech se rovněž uskutečňuje chirurgická léčba metastáz pokud nejsou přítomny v různých dalších orgánech.

Radioterapie využívá pro léčbu nádorů letálních účinků různých druhů ionizujícího záření. Je to záření korpuskulární (částicové) a elektromagnetické (fotonové), přičemž nejčastěji se používá elektromagnetické záření X (rentgenové, brzdné) o různém napěťovém rozsahu. V časných stádiích má léčba zářením kurativní cíl (uzdravení), jehož záměrem je úplné zničení nádoru, ovšem je také významnou metodou paliativní (např.: eliminace kostních nebo CNS metastáz). Cílovou strukturou pro vznik radiačního poškození je DNA. Interakce záření s DNA probíhá jednak přímo působením fotonů záření poškozujícím řetězce DNA a jednak nepřímo prostřednictvím radikálů biomolekul. Účinek záření se přitom projevuje jak na úrovni molekulární, tak na úrovni buněčné a to zejména změnou proliferační aktivity a indukci programované smrti buňky (apoptózy). Přes potenciálně přínosné efekty radioterapie je však nutné počítat s řadou nežádoucích účinků, které touto léčbou mohou vznikat.

Chemoterapie je metoda využívající k léčbě nádorových onemocnění účinek chemických sloučenin nazývaných cytostatika. Hlavním kritériem pro využití chemoterapie jako léčebné metody je citlivost nádorů k chemoterapeutikům. U zvláště citlivých onemocnění má chemoterapie úlohu primární (léčebnou). U karcinomu prsu může mít chemoterapie charakter adjuvantní (doplňková léčba k základní léčebné metodě – chirurgie, radioterapie), případně neoadjuvantní (podaná před operací za účelem zvýšení resekability nádorů) či paliativní (doplňková, udržovací) terapie.

U některých typů nádorů se uplatňuje také imunoterapie [5, 1] nebo hormonální terapie. K hormonální terapii se používají adrenokortikosteroidy, estrogeny, antiestrogeny, progesterony, androgeny a inhibitory aromatázy. Tyto látky se používají v terapii nádorů, kde hormony a jejich exprese hraje důležitou roli v rozvoji a prognóze nádoru. Například u karcinomu prsu je prokázaným rizikovým faktorem prodloužená expozice estrogenům. Estrogeny stimulují proliferaci prsních buněk a tím zvyšují pravděpodobnost, že se bude

buňka dělit s potenciální nádorovou mutací. Proto se v terapii prsu používá tamoxifen, což je antiestrogen [6, 7].

Při chemoterapii cytostatiky však dochází nejen k ničení rychle se množících buněk nádorových, ale i k ničení přirozených rychle se množících buněk jako jsou buňky jaterní tkáně, bílé krvinky, červené krvinky, pohlavní buňky, apod.. Pro organismus pacienta je léčba cytostatiky vždy toxická. Například deriváty platiny jsou těžce jedovaté pro ledviny, jiné působí toxicky na nervovou soustavu, močový měchýř, srdce nebo plíce. Cytostatická léčba působí rovněž velmi nepříznivě na psychiku zejména mladších lidí a způsobuje i další problémy např. závažné snížení imunity.

Cytostatika můžeme rozdělit do skupin dle mechanismu účinku na:

- 1.) antimetabolity:
 - a.) analogy kys. listové – metotrexat
 - b.) purinová analogy – azathioprin, merkaptopurin, fludarabin, kladribin
 - c.) pyrimidinová analogy – 5-fluorouracil, gemcitabin, cytarabin
- 2.) alkylační látky – cisplatina, mitomycin C, cyklofosfamid, ifosfamid, busulfan, melfalan, karmustin, thiotepa
- 3.) protinádorová antibiotika - antracykliny (doxorubicin, epirubicin) a aktinomycin (interkalace do dvoušroubovice DNA), radiomimetikum bleomycin a mitomycin (intracelulárně vytváří alkylační metabolit)
- 4.) inhibitory topoizomeráz – inhibitory topo I (topotecan, irinotecan), topo II (etoposid)
- 5.) inhibitory mitózy – taxany (paklitaxel, docetaxel), vinka alkaloidy (vinkristin, vinblastin)
- 6.) látky s jinými mechanismy účinku - deriváty platiny (cisplatina, karboplatina, oxaliplatina), mitoxantron, hydroxyurea

Nové léčebné možnosti přinesla v posledních letech cílená léčba, která využívá biologické látky, které jsou přímo namířené proti cílovým buněčným strukturám. U karcinomu prsu se stala zlomem léčba monoklonální protilátkou trastuzumabem působící proti extracelulární části EGFR (HER2/Neu) u HER2 pozitivních nádorů, v léčbě CML to bylo zase podávání imatinibu nebo-li inhibitoru bcr-abl kinázy.

Biologická léčba blokuje růst nádorových buněk ovlivněním specifických buněčných cílů - molekul důležitých v procesu karcinogeneze, metastazování a buněčné proliferace. Podání je jak parenterální (pro monoklonální protilátky), tak perorální (pro inhibitory tyrozinkináz).

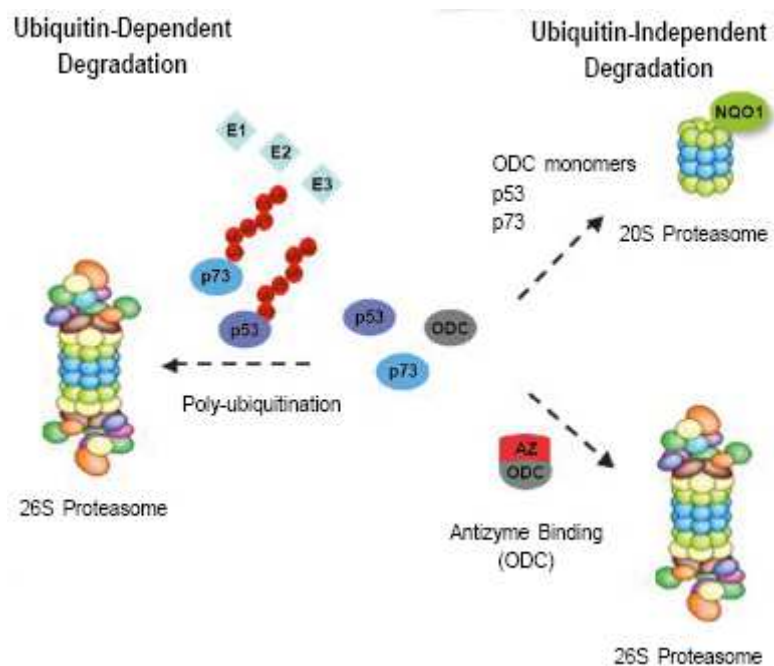
1.3. Karcinom prsu

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem žen. V České republice byl v roce 2009 karcinom prsu nově diagnostikován u 55 mužů (0,7 na 100 tisíc mužů) a u 5 975 žen (111,9 na 100 tisíc žen). Počet úmrtí u mužů v roce 2009 nebyl konkretizován, počet úmrtí u žen činil 1607 (30,1 na 100 tisíc žen, tj. 13,2%; zdroj: ÚZIS). Mortalita v České republice má klesající trend, v roce 2009 zemřelo 1607 žen, oproti tomu v roce 2002 zemřelo 1965 žen či v roce 1998 zemřelo 2596 žen (zdroj: ÚZIS). Incidence i mortalita je tak u nás i v ostatních civilizovaných zemích srovnatelná. Pokles mortality je vysvětlován zavedením řádného mamografického screeningu, včasným záchytem onemocnění a zvýšenou úspěšností systémové léčby.

Karcinom prsu obecně zařazujeme mezi tzv. hormonálně závislé nádory. Jednu ze zásadních úloh zde mají zejména estrogeny. Ty indukují zvýšenou expresi některých růstových faktorů a také pravděpodobně i onkogenů, jejichž produkty ovlivňují proliferační aktivitu buněk. Tyto popsané procesy se uplatňují u většiny tzv. sporadických forem karcinomu prsu, tj. u 75 – 85 % nemocných. Sporadická forma karcinomu prsu je pravděpodobně zapříčiněna kombinací více faktorů genetických a environmentálních (tj. podmíněných faktory životního stylu a prostředí). U 10 – 15% pacientek vzniká karcinom prsu na základě dědičných genetických změn, tzv. hereditární formy karcinomu prsu (familiární případy). Od sporadické formy se liší některými epidemiologickými a klinickými příznaky. Jedinci s dědičnou mutací obvykle onemocní v mladším věku a nádor se u nich vyskytuje často oboustranně. Hereditární formy karcinomu prsu jsou podmíněny mutací genů *BRCA1* nebo *BRCA2*, která se dědí autozomálně dominantně. Kromě těchto majoritních predispozičních genů („high penetrance“) je nyní studována úloha i tzv. genů s nízkou penetrancí. Mezi těmito geny („low“ a „high“) dochází k interakci, např. „high“ *TP53* a „low“ *NQO1*.

TP53 je tumor supresorový gen, u kterého byly prokázány mutace u více než 50% lidských nádorů [8,9]. Jeho tumor supresorová aktivita je schopná potlačit buněčný růst [8, 9] nebo vyvolat apoptózu [10]. Protein p53 má krátkou dobu života („short-lived protein“) [11] a jeho buněčná hladina je kontrolována rychlostí degradace proteazomy. Degradace p53 může probíhat dvěma různými cestami (Obrázek č.1) [12], a to cestou závislou na ubiquitinu a druhou, která je na ubiquitinu nezávislá. Při degradaci, která je závislá na ubiquitinu, je p53 ubiquitinován E3 ubiquitin ligázou Mdm2 na několika lysinových jednotkách [13, 14]. Druhý typ degradace proteinů, který již na ubiquitinu není závislý, je regulován pomocí

ubiquitovaného enzymu NAD(P)H:chinonoxidoreduktázy 1 (NQO1), která se váže k p53 a stabilizuje ho [15,16].



Obrázek č.1. Schéma proteazomální degradace p53 proteinu cestou závislou a nezávislou na ubiquitinu [12].

1.4. Rezistence nádorů

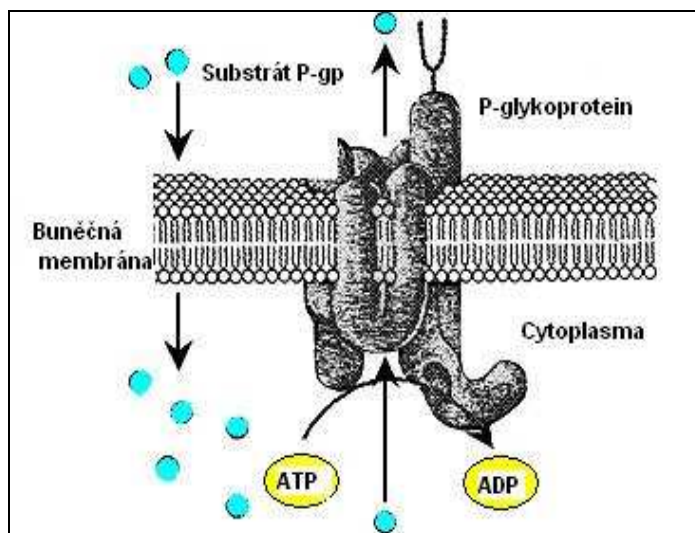
Rezistence maligních nádorů vůči chemoterapeutikům je v současné době jednou z největších překážek v úspěšné terapii nádorových onemocnění. Rezistence přitom nevzniká jen na jedno léčivo, ale zpravidla na celou skupinu léčiv, které se liší strukturou i mechanismem účinku a díky tomu se tento fenomén nazývá mnohočetná léková rezistence neboli multidrug rezistence (MDR) [17]. Mezi léčiva, na která vzniká rezistence, patří antracykliny (doxorubicin, daunomycin), vinka-alkaloidy, actinomycin D, valinomycin, gramicidin D, puromycin a také taxany (paclitaxel a docetaxel) [18]. MDR fenotyp maligních buněk může být vrozený nebo získaný po působení protinádorových léčiv [19].

MDR je multifaktoriálním procesem, na kterém se podílí celá řada mechanismů. Jedním ze základních mechanismů vzniku MDR je transportní funkce některých transmembránových transportních proteinů ze skupiny ABC-transportních proteinů (ATP binding cassette proteins). Tyto proteiny způsobují předčasné a velmi účinné vylučování (efflux) protinádorových léčiv z nádorových buněk, kde jich pak nejsou dostatečné koncentrace pro potřebný cytotoxický účinek [20]. V současné době je známo 49 lidských

ABC-transportních proteinů, které jsou rozděleny na základě sekvenční homologie do sedmi podrodin; ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF a ABCG [<http://nutrigene.4tcom/humanabc.htm>].

Jedním z nejvýznamnějších ABC-transportérů přispívajících k rozvoji rezistence je P-glykoprotein (P-gp). Jedná se o transmembránový glykoprotein o velikosti 170kDa tvořený 1280 aminokyselinami. Jde o ATP-řízenou effluxní pumpu, která využívá pro svou transportní funkci energii z hydrolyzy ATP [21]. Transportní funkce P-gp je znázorněna na Obrázku č.2. Je exprimován nejvíce v játrech, ledvinách, střevech, mozku, děloze, varlatech a placentě [22, 23]. Hlavní fyziologické funkce P-gp jsou řízení absorpce, distribuce a exkrece celé řady xenobiotik a klinicky významných léčiv. I tyto fyziologické funkce ABC transportérů mohou mít vliv na maligní progresi [24]. Brání také průniku xenobiotik do mozku či reprodukčních orgánů [25, 26]. Vysoká exprese P-gp v nádorových buňkách např.nádorů prsu, slinivky, střev, jater, ledvin, vaječníků, nemalobuněčného karcinomu plic či v leukemických buňkách ovšem vede k rozvoji rezistence nádorů díky předčasné a nadměrné exkreci léčiv do extracelulárního prostoru [17, 23]. Mezi substráty P-gp řadíme tato protinádorová léčiva; vinka-alkaloidy (vincristin, vinblastin), antracykliny (doxorubicin, daunorubicin), epipodophylotoxiny (etoposid, teniposid), taxany (paclitaxel, docetaxel), kolchicin a actinomycin D [27, 28, 23]. Vývoj nových léčiv, na která by rezistence nevznikala či použití modulátorů ABC-transportních proteinů účastnících se vzniku MDR je v poslední době velmi intenzivní. Doxorubicin a taxany jsou jedny z nejúspěšnějších léků pokročilého karcinomu prsu. Jejich terapeutické použití je limitováno rozvojem mnohočetné lékové rezistence dané zvýšenou expresí P-gp, která koreluje s rezistencí vůči taxanům a doxorubicinu u pacientek s karcinomem prsu [29]. K rezistenci karcinomů prsu přispívá ovšem také vysoká exprese proteinů MRP1/2, BCRP, MXR a ABCG2 [30, 31].

Za další možné mechanismy přispívající k rozvoji MDR se považují inhibice apoptózy zvýšenou expresí Bcl-2 nebo Bcl-X_L proteinů, mutace tumor-supresorového genu *TP53*, celkově inaktivace chemoterapeutik enzymy I a II fáze biotransformace (např.změna v expresi a aktivitě topoizomerázy II, zvýšená hladina glutathionu, zvýšená aktivita glutathion S-transferáz) a změny v reparaci DNA [32, 33, 34, 35, 36].



Obrázek č.2. Umístění P-glykoproteinu v buněčné membráně a jeho transportní funkce [21].

1.4.1 Gen mnohočetné lékové rezistence MDR1

P-glykoprotein (MDR1) je kódován genem mnohočetné lékové rezistence (*ABCB1* alias *MDR1*, *PGY1*, *P-GP*, *GPI70*). Gen *ABCB1* o velikosti 209 kb je lokalizovaný na chromosomu 7q21 a je tvořen 29 exony [37]. U substrátů MDR1 je míra exprese funkčního genu *ABCB1* a jeho genetická různorodost důležitým molekulárně biologickým parametrem, který je potenciálně zodpovědný za účinnost léčiv [38, 39]. Frekvence výskytu polymorfismů v *ABCB1* se výrazně liší mezi jednotlivými populacemi [40]. Bylo popsáno více než 50 genetických polymorfismů a 3 polymorfismy inzerce/delece genu *ABCB1* a některé z těchto SNPs ovlivňují expresi a funkci P-pg [41, 42]. První studie ukazující souvislosti genetických polymorfismů *ABCB1* a farmakoterapie byly provedeny v roce 2000. V následujících pěti letech byla uveřejněna řada studií týkajících se spojení polymorfismu *ABCB1* a jeho exprese s farmakokinetikou a farmakodynamikou léčiv. Práce byly zaměřeny zejména na polymorfismus v exonu 12 C3435T (rs1045642, C>T) , jak shrnuje Sakaeda a kol. z roku 2005 [43]. Z dalších genetických variant je např. přítomnost SNP v exonu 21 G2677T (rs2032582, Ser893Ala) spojena se změněnou transportní aktivitou P-gp [40]. Ve studii Chang a kol. byly genotypy rs2032582 a rs1045642 genu *ABCB1* označeny jako možný prediktor chemoterapeutické rezistence a může být prognostickým faktorem pro celkové přežití pacientů léčených paclitaxelem u metastatických forem karcinomu prsu [41]. Podobný efekt byl nalezen i pro SNP v exonu 12 C1236T (rs1128503, C>T), u kterého byla nalezena souvislost se slabou odpovědí na chemoterapii antracykliny u pacientů s karcinomem prsu [42].

Genetické polymorfismy v nekódujících oblastech (přiléhající oblasti na 3'-konci nebo 5'-konci, introny) mohou mít za následek změnu regulace exprese či změnu sestřihu vytvořené mRNA. Studium vztahů mezi expresí MDR1 a přítomností genetických SNPs je velmi aktuální vzhledem k faktu, že jde o gen značně polymorfní a přítomnost určitého genetického polymorfismu může expresi MDR1 významně ovlivnit.

Míra exprese MDR1 se značně liší mezi jednotlivci i typem sledované tkáně (např. tenké střevo, játra, prsní tkáň) [111, 44]. Bylo dokázáno, že vysoká exprese MDR1 v primárních karcinomech prsu je jednoznačně spojena s nízkou dobou přežití pacientů a je prediktorem špatné prognózy u pacientek léčených chemoterapií [44]. Z uvedených faktů vyplývá, že individuální stanovení exprese MDR1 v nádorech by mohlo umožnit sledování vztahu míry exprese a citlivosti nádorů k používané chemoterapii a pomoci k návrhu individuální optimalizované chemoterapeutické léčby. Z ekonomického i etického hlediska je rovněž vhodné hledat genetické markery korelující s fenotypem MDR1.

1.5. Polymorfismus biotransformačních enzymů

Biotransformační enzymy zajišťují v prokaryotních i eukaryotních organizmech metabolismus endogenních látek (např. steroidní hormony, vitamíny, oxid dusnatý, žlučové kyseliny), tak i exogenních látek, tzv. xenobiotik (např. léky, polutanty životního prostředí). Xenobiotika jsou převážně látky hydrofobní povahy, které jsou biotransformačními enzymy přeměňovány na látky polárnější, které jsou pak lépe odstranitelné z organismu. Biotransformační enzymy představují pro xenobiotika především detoxikaci, která zabraňuje akumulaci velmi nebezpečných látek a poškození biologických molekul.

Biotransformační reakce se rozdělují na reakce I. fáze (funkční) a II. fáze (konjugační) [45]. V I. fázi většinou vnášejí enzymy hydrofilní funkční skupinu (např. OH) do molekuly substrátu, ve II. fázi pak používají tuto skupinu pro konjugaci např. s glutathionem, sulfátem, kyselinou glukuronovou, glukózou nebo cysteinem a vytváří tak hydrofilní produkty [46].

Biotransformační enzymy se navíc kromě těchto velmi prospěšných detoxikačních reakcí účastní také aktivace „pro-karcinogenů“ na mutageny a karcinogeny, které reagují s biologickými makromolekulami (DNA, RNA, proteiny, lipidy) a způsobují tak jejich poškození [93].

Většina genů biotransformačních enzymů je v populaci polymorfní a u některých navíc existují inaktivující alely [46]. Vyskytují se v kódujících (exony) i v nekódujících (introny) oblastech genomu. Přítomnost polymorfismu v exonech může způsobit změny v aminokyselinových sekvencích proteinových molekul a následně ovlivnit jejich posttranslační modifikace a sbalování. V nekódujících oblastech se vyskytují polymorfismy, které mohou mít například vliv na sestřih RNA a tím pak může dojít ke změně v regulaci exprese příslušného genu. Polymorfismus tedy může ovlivňovat aktivitu, afinitu či inducibilitu (zvýšení exprese enzymu opakovaným podáním xenobiotika) enzymu. Rozdíly v expresi biotransformačních enzymů a rozdíly v odpovědi na přítomnost substrátu v buňce ovlivňují metabolické schopnosti jedince. Projevem těchto rozdílů mohou být rozdílné poměry mezi detoxikací a aktivací potenciálních karcinogenů. Názorným příkladem může být enzym, který je v I. fázi aktivnější a dojde tak ke vzniku většího množství reaktivních intermediátů než u enzymu, který se nachází ve II. fázi, kde dochází k pomalému odstraňování reaktivních intermediátů. Tímto odlišným poměrem pak dochází k akumulaci reaktivních sloučenin, které přispívají k poškození biologických makromolekul [47].

1.5.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (zkráceně P450, EC 1.14.14.1), kódované geny s označením CYP, jsou terminální oxidoreduktázy monoxygenázového systému a patří k enzymům první fáze biotransformace. Monoxygenázový systém (z angl. mixed-function oxidases, MFO) se skládá z cytochromu P450 a NADPH-cytochrom P450 reduktázy. Nadrodina genů cytochromů P450 je rozdělena podle doporučené klasifikace na základě aminokyselinové sekvence, fylogenetických kritérií a genové organizace [48].

Tyto enzymy metabolizují xenobiotika i látky endogenního původu [49]. Cytochromy P450 jsou nejpočetnější enzymy metabolizující léky a mají nejširší rozsah substrátové specifity [50]. Katalyzují řadu biotransformačních reakcí zahrnující epoxidaci, hydroxylaci, oxidaci, dealkylaci, deaminaci a redukci. CYP je možné nalézt ve všech tkáních u všech organismů. U savců byly poprvé popsány v játrech, kde hrají zásadní roli v metabolismu léčiv [49]. Nicméně významné jsou i jejich hladiny v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku, nadledvinkách, nosní sliznici, varlatech a placentě. V buňkách jsou lokalizovány převážně v membránách hladkého i drsného endoplasmatického retikula, některé rovněž v membránách mitochondrií jako nezbytné složky MFO systému [51, 52].

1.5.1.1. CYP1B1

CYP1B1 byl poprvé izolován a charakterizován v roce 1994 [53]. *CYP1B1* je lokalizován v oblasti 2p21-p22. Gen o velikosti 8,5 kbp je tvořen třemi exony, ale kódující jsou pouze exony dva, které tvoří mRNA dlouhou 5,1 kbp. Translací vzniká protein o velikosti 544 aminokyselin. Exprese genu *CYP1B1* je regulována transkripčním faktorem AhR (aromatic hydrocarbon receptor), regulační sekvence jsou na 5' konci genu [54].

Protein P450 1B1 svojí hydroxylázovou aktivitou metabolizuje 17 β -estradiol na 4-hydroxyestradiol, což je endogenní karcinogen, u kterého se předpokládá vztah k rozvoji karcinomu prsu a dělohy [55]. *CYP1B1* také aktivuje řadu PAH (polycyklické aromatické uhlovodíky) a arylaminů [56].

Gen je vysoce exprimován v estrogen senzitivních tkáních jako je prsní tkáň, děloha a vaječníky [57,58,59]. U řady lidských nádorů byla zjištěna zvýšená exprese *CYP1B1* [60]. Imunohistochemická analýza odhalila lokalizaci *CYP1B1* v mikrosomech karcinomů prsu [61].

CYP1B1 se podílí na metabolismu některých protinádorových léčiv a to jak na jejich aktivaci (resveratrol), tak i inaktivaci (tamoxifen, docetaxel) [62, 63, 64, 65].

1.5.1.2. CYP2C9

CYP2C9 je dlouhý asi 50 kbp a je lokalizován v oblasti 10q24. Jeho translací vzniká protein o velikosti 491 aminokyselin. Tento enzym se hojně vyskytuje v lidských játrech a byl také nalezen v ledvinách, nadledvinkách, pankreatických ostrůvcích, ve žlázách hypofýzy, prostatě a gastrointestinálním traktu [66]. Gen *CYP2C9* se podílí na biotransformaci farmakologicky významných léčiv a metabolizuje endogenní mastné kyseliny, prostanoidy a steroidní hormony [67]. Exprese *CYP2C9* v lidských mléčných žlázách může vést k aktivaci protinádorového léčiva ifosfamidu [68].

1.5.1.3. CYP2E1

CYP2E1 je dlouhý 11,7 kbp a skládá se z devíti exonů lokalizovaných v 10q24.3. Translací mRNA o velikosti 1,6 kbp vzniká protein se 494 aminokyselinami. P450 2E1 metabolizuje především malé a hydrofóbní molekuly. Metabolicky aktivuje také některé známé prokarcinogeny, např. chlorované uhlovodíky a nitrosaminy [69]. Tento enzym je

indukovatelný etanolem. Vyskytuje se hlavně v játrech, ledvinách a plicích. V literatuře byl sledován vztah k různým typům rakoviny (plic, močového měchýře, nosohltanu, jater) a jaterní cirhóze [46, 70]. Z protinádorových léčiv inaktivuje etoposid a dacarbazin [62].

1.5.1.4. CYP3A4

CYP3A4 je dlouhý 27 kbp, obsahuje třináct exonů a je exprimován v podobě proteinu o velikosti 504 aminokyselin lokalizovaných v 7q21.1. P450 3A4 metabolizuje většinu známých léků [71] a přeměňuje endogenní estrony a estradioly na 16-hydroxy metabolity [72]. Tento enzym je exprimován v játrech, střevech, tlustém střevě, prostatě a prsní tkáni [59, 73]. P450 3A4 může v nádorových buňkách inaktivovat léčiva jako etoposid, gefitinib, paclitaxel, tamoxifen, topotecan, vincristin a vinblastin. Na druhou stranu může aktivovat např. cyklofosfamid, doxorubicin, ifosfamid, imatinib a thiotepa [74, 62, 63, 65, 75].

1.5.2. Chinonoxidoreduktázy 1 a 2

Chinonoxidoreduktázy jsou flavoproteiny účastníci se druhé fáze biotransformace. V lidském genomu se vyskytují dva geny kódující enzymy NAD(P)H:chinonoxidoreduktázu 1 (NQO1, EC 1.6.5.2) a NRH:chinonoxidoreduktázu 2 (NQO2, EC 1.10.99.2). Tyto enzymy katalyzují dvouelektronové redukce chinonů a chinoidních sloučenin na relativně stabilní hydrochinony. Ty mohou být dále konjugovány a vylučovány. Nedochozí tak ke tvorbě toxických semichinonových radikálů, které vznikají jako meziprodukty jednoelektronových, spontánních i enzymatických přechodů mezi oxidovanou a redukovanou formou. Ne všechny hydrochinony jsou však stabilní. Labilní hydrochinony mohou reagovat s kyslíkem za vzniku zmíněných semichinonů. Chinony a hydrochinony jsou známými mutageny a tvoří adukty s DNA. Navíc látky s chinoidními strukturami patří mezi nejpoužívanější cytostatika (antracykliny).

1.5.2.1. NQO1

NQO1 je cytosolický enzym lokalizovaný v 16q22.1 a jako donor elektronů využívá kofaktory NADH nebo NAD(P)H. NQO1 se vyskytuje jako homodimer, v každém aktivním centru má jednu prosthetickou skupinu FAD (flavin adenin dinukleotid) [76]. Gen je

lokalizován na chromosomu 16q22. Obsahuje 6 exonů a kóduje protein s 275 aminokyselinami. V roce 1992 byla popsána tranzice C na T v pozici 609, která způsobuje záměnu prolinu na serin v kodonu 187 výsledného proteinu (Pro187Ser). Tento polymorfismus rs1800566 tak vede ke třem fenotypům: normální homozygot (Pro/Pro) s kompletní aktivitou NQO1, dále heterozygot (Pro/Ser), kdy dochází k poklesu aktivity (3x) a variantní homozygot (Ser/Ser), který se vyznačuje úplnou ztrátou aktivity NQO1.

Z našich předchozích pilotních studií [77] již víme, že tento polymorfismus Pro187Ser, způsobující ztrátu enzymové aktivity NQO1, je rizikovým faktorem vzniku karcinomu prsu. Tohoto vztahu by se mohlo využít při vyhledávání jedinců náchylných k onemocnění na něž by bylo vhodné zaměřit preventivní strategie. Další možnou příčinou vzniku nádorů může být také ztráta schopnosti aktivace vitamínu K, který funguje jako antioxidant a má antimutagenní účinky proti působení heterocyklických aminů z potravin [78]. NQO1 tak hraje důležitou roli v ochraně buněk proti toxicitě chinonů a jejich mutagenicitě a karcinogenitě. Chinony vznikají jak při metabolismu cizorodých látek (např.: benzen, polycyklické aromáty) tak při metabolismu endogenních substrátů (estron, estradiol apod.). Byla také publikována významná úloha genu *NQO1* v karcinogenezi, která je založená na chemické indukci [79, 80].

K indukci exprese NQO1 dochází oxidativním stresem, aromatickými uhlovodíky, fenolickými antioxidanty, průmyslovými akryláty a kovy. Bylo prokázáno, že exprese NQO1 indukovaná právě antioxidanty je zprostředkována pomocí NRF2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) [81]. Vysoká hladina NQO1 byla popsána u řady nádorů a byly nalezeny i rozdíly v hladinách exprese mezi nádorovou i nenádorovou tkání [82]. NQO1 navíc také reguluje proces, pomocí kterého dochází v těle k degradaci proteinů, např. již zmíněný p53 nebo p73 či ornitindekarboxyláza (ODC) (Obrázek č.1). Tento proces je zprostředkován 20S proteasomem a je nezávislý na ubiquitinu, avšak samotný NQO1 je ubiquitinován a přítomný ve všech typech tkání. Z protinádorových léčiv, u kterých byla prokázána úloha genu *NQO1*, se jedná o aktivaci β -lapachonu a benzoquinon ansamycin, u léčiva mitomycin C zůstává úloha genu *NQO1* stále kontroverzní [83].

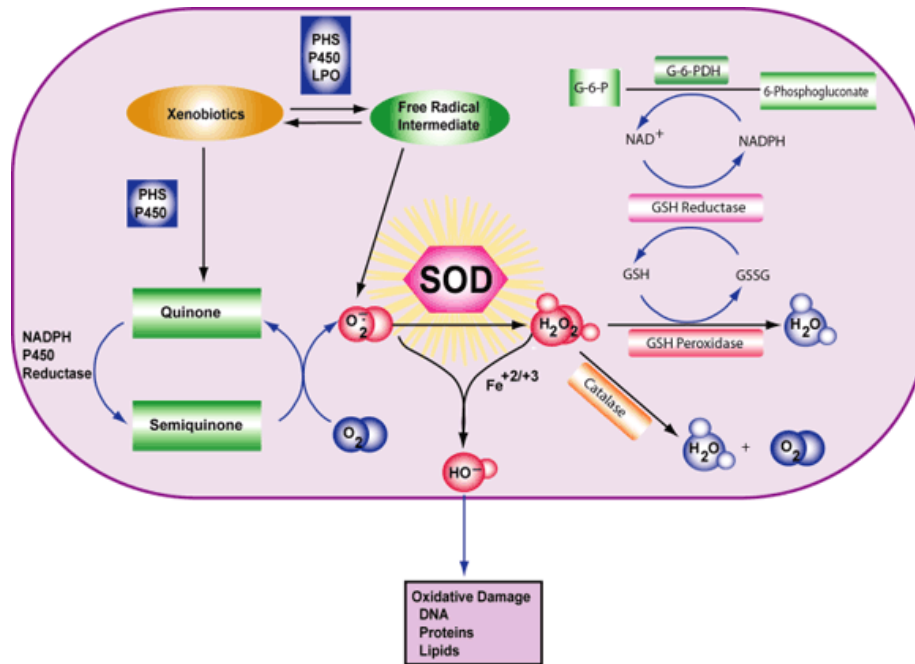
1.5.2.2. NQO2

Enzym NQO2 lokalizovaný se také jako NQO1 vyskytuje v cytosolu a jako kofaktor využívá ribosid dihydronikotinamid (NRH) spíše než NAD(P)H. Gen *NQO2* kóduje protein s 231 aminokyselinami. Gen je lokalizován na chromosomu 6p25 a tento genový lokus je

vysoce polymorfní. Obsahuje 7 exonů, ale první exon je nekódující. NQO2 katalyzuje nejen dvouelektronovou redukci chinonů, ale také čtyřelektronovou redukci, při které jako elektronový akceptor využívá methyl červeň (methyl red). U *NQO2* bylo také nalezeno specifické místo pro vazbu kovů (metal binding site), které u *NQO1* není přítomno [84]. Enzym NQO2, podobně jako NQO1, chrání buňky proti chemickým karcinogenům [85]. NQO2 metabolicky aktivuje protinádorové léky zahrnující např. CB1954 (5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide), čímž zvyšuje jejich cytotoxicitu a stimuluje buněčnou smrt [86]. Ve studii z roku 2006 bylo prokázáno, že exprese lidského *NQO2* je indukována antioxidanty [87]. Ze známých SNPs se jako nejzajímavější jeví studování inserce/delece 29 bp v promotorové oblasti a tranzice T na C v pozici 139 exonu 3, která způsobuje záměnu phenylalaninu za leucin v pozici 47 výsledného proteinu (Phe47Leu). Doposud však polymorfismus Phe47Leu nebyl podrobněji studován a proto o jeho funkci podrobnější informace nemáme.

1.5.3. Superoxiddismutázy

Pokud dojde ke tvorbě semichinonových radikálů, např.: při snížené funkci NQO1/2 enzymů, pak je jejich zpětná konverze na chinony umožněna reakcí s molekulárním kyslíkem za vzniku superoxidového anionradikálu, který je přeměněn na peroxid vodíku pomocí superoxiddismutázy (SOD, superoxid:superoxid oxidoreduktáza, EC 1.15.1.1) (Obrázek č.3). Ten je poté vyloučen ve formě vody za katalýzy katalázy (CAT) nebo glutathionperoxidázy (GPX). Reaktivní kyslíkové radikály mohou být také vytvářeny v metabolismu estrogenu během tvorby katecholu.



Obrázek č.3. Schéma působení superoxiddismutázy v návaznosti na ostatní enzymatické děje (zdroj sigmaaldrich.com).

Superoxiddismutáza se v lidském těle vyskytuje ve formě tří izoenzymů (cytosolická Cu/Zn SOD = SOD1, mitochondriální Mn-SOD = SOD2, a extracelulární EC-SOD = SOD3).

1.5.3.1. SOD1

SOD1 lokalizovaná na chromozomu 21q22.1 je tvořena dvěma podjednotkami obsahující jeden atom mědi a zinku a je lokalizována v cytosolu a jádře všech typů buněk [88].

1.5.3.2. SOD2

SOD2 je tvořena čtyřmi identickými podjednotkami obsahujícími jednotku manganu a byla nalezena v matrix mitochondrií lokalizovaná na 6q25.3 [89]. K syntéze SOD2 dochází v cytoplasmě ve formě proteinového prekurzoru, který je pak transportován do mitochondrií, kde se z něho tvoří aktivní homotetramer. SOD2 hraje úlohu ve vývoji rakoviny, která je založena na její bazální expresi. Studium exprese *SOD2* ukázalo vysokou expresi v nenádorových epiteliálních buňkách v porovnání s invazivními karcinomy prsu [90]. Zvýšená exprese *SOD2* v tkáňových liniích rakoviny prsu vedla k up-regulaci *GADI53* a redox-

senzitivních transkripčních faktorů [91]. Podle některých hypotéz se *SOD2* může chovat jako tumor supresorový gen v epiteliálních buňkách mléčné žlázy [91, 92]. Nízká exprese *SOD2* korelovala s vysokou rychlostí růstu nádorových buněk, zatímco vysoká hladina exprese *SOD2* je asociována s invazivními a metastatickými schopnostmi nádorových buněk [94]. Byla nalezena overexprese genu *SOD2* v nádorech, které byly asociovány se zvýšenou frekvencí nádorové invaze a vývoje metastáz [95, 96]. V lidské *SOD2* bylo nalezeno mnoho polymorfních variant. Nejzajímavější je Ala9Val (někde uváděn jako Ala16Val), kdy dochází k substituci C na T v pozici 47 [97]. Dochází tak ke změně sekundární struktury proteinu, což by mohlo ovlivnit transport *SOD2* do mitochondrií [97, 98]. Právě tento polymorfismus byl v některých studiích označen jak podstatný rizikový faktor pro karcinom prsu [109, 110].

1.5.3.2. SOD3

EC-SOD je na rozdíl od ostatních izoenzymů glykoproteinem a je tvořena čtyřmi podjednotkami obsahujícími atomy mědi a zinku. Je lokalizována na chromozomu 4p15.3-p15.1. Je vylučována několika odlišnými typy buněk [99] a je primárně lokalizovaná v intersticiálním matrixu tkání a glykokalyxu. V lidském těle byly nalezeny frakce proteinu *SOD3* jak v plazmě, tak v lymfě, synoviální tekutině a cerebrospinální tekutině [100], kde může být aktivita *SOD3* měřena. Nejvíce byl zatím studován polymorfismus pro lidskou *SOD3* lokalizován na C-konci shluku pozitivně nabitých aminokyselin, který vymezuje vazebnou doménu heparinu. Jedná se o záměnu argininu na glycin v pozici 213, která vede k 8-15-násobnému zvýšení koncentrace *SOD3* v plasmě [101]. Dalším zajímavým polymorfismem by mohla být záměna threoninu za alanin v pozici 58 (Thr58Ala). Tento polymorfismus však zatím ještě nebyl funkčně charakterizován.

1.6. Závěr

Rakovina je v současné době stále jedním z nejproblematictějších onemocnění, kde včasná diagnóza onemocnění je jedním z hlavních kritérií úspěšné léčby. V současné době probíhá výzkum se snahou nalézt co nejvíce ukazatelů, které by co nejdříve upozornily na výskyt či formování nádoru nebo na jeho prognózu. Studium polymorfismů a genových expresí se jeví jako jedna z nadějných možností. Nalezení a validace genetických biomarkerů

by mohlo vést ke zlepšení predikce rizika vzniku tohoto onemocnění či k odhadu jeho prognózy a stanovit tak vhodný léčebný režim. Následné porovnání zjištěných výsledků ve vztahu k fenotypu (genové expresi) by navíc mohlo naznačit možnosti volby individualizované chemoterapie.

Dalším závažným problémem v úspěšné léčbě je mnohočetná léková rezistence nádorových buněk vůči cytostatikům. Jednou z hlavních příčin vzniku mnohočetné rezistence nádorů je vysoká exprese membránového transportního proteinu P-gp kódovaného *ABCB1*. Sledování vlivu exprese a přítomnosti genetických polymorfismů na rozvoj mnohočetné lékové rezistence se zdá být klíčem k porozumění rozvoje onemocnění a zvýšení úspěšnosti chemoterapie. Po důkladném poznání výše naznačených vztahů bude snažší určit citlivost nádorů vůči konkrétním cytostatikům a navrhnout optimalizovanou individuální chemoterapii.

2. Hypotéza a cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda genetické polymorfismy lidských biotransformačních enzymů (*NQO1/2*) a enzymů oxidativního stresu (*SOD2/3*) jsou významnými prognostickými faktory vývoje karcinomu prsu a ověřit tak hypotézu, že polymorfismy v genech biotransformačních enzymů mají vliv na riziko vzniku nádorového onemocnění a na jeho prognózu. Dalším cílem této práce bylo sledování exprese genů *NQO1/2*, *SOD2/3*, *CYP1B1*, *CYP2E1*, *CYP2C9* a *CYP3A4* v nádorové a okolní nenádorové tkáni karcinomu prsu a posouzení jejich významu pro predikci a prognózu vývoje karcinomu prsu. Rozdílné poměry mezi detoxikací a aktivací potenciálních karcinogenů mohou vést k akumulaci reaktivních sloučenin, které následně přispívají k poškození buněčných struktur. Sledování exprese by tak mohlo umožnit stanovit prognózu vývoje onemocnění a snazší predikci výsledku chemoterapie s případným návrhem nejvhodnější chemoterapie. Dalším cílem práce bylo i srovnání vlivu genetických polymorfismů na míru exprese sledovaných genů a hodnocení jejich vztahu k výsledkům léčby. V neposlední řadě bylo cílem studie ověřit, na pacientkách s karcinomem prsu, v literatuře na *in vitro* modelech nalezený mechanismus, podle kterého protein NQO1 stabilizuje proces degradace proteinu p53.

Druhým úkolem bylo zjistit, zda jsou účinky cytostatik u pacientek s karcinomem prsu významně ovlivněny mnohočetnou lékovou rezistencí. Cílem práce proto bylo stanovení významných genetických polymorfismů a exprese genu *ABCBI* v nádorové a v okolní nenádorové tkáni karcinomu prsu. Tento záměr vyšel z faktu, že pacienti s nádorovými onemocněními rozdílně reagují na podanou léčbu. V literatuře byla identifikována řada genů, které ovlivňují účinky cytostatik používaných k léčbě karcinomu prsu. Mezi těmito geny je i *ABCBI* a další ABC transportéry. Sledování rozdílu a míry exprese genu *ABCBI* by mohlo umožnit identifikaci a rozdělení pacientů na ty, kteří budou na léčbu reagovat a na ty, kteří budou vůči navržené léčbě rezistentní. Optimalizace chemoterapeutické léčby, např.: pomocí biomarkerů účinku, což je náš hlavní cíl, má za cíl zvýšit procento vyléčených pacientů i zlepšit kvalitu jejich života. Z hlediska ekonomického by tak mohlo dojít k výraznému snížení finančních nákladů, které jsou v případě neúspěšné léčby velmi vysoké.

3. Materiál a Metody

3.1. Materiály

Histopaque (Ficoll), fenol, chloroform, RNáza A, proteináza K, RedTaq polymeráza, histidin a chemikálie pro přípravu pufrů byly získány od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika). Deoxyribonukleotidy (dATP, dCTP, dGTP and dTTP) byly produkty firmy Invitex (Berlin, Německo). Molekulární standardy pro elektroforézu (ϕ X174DA/HaeIII digest, λ EcoRI/HindIII) byly zakoupeny od firmy New England Biolabs, Inc. (Ipswich, Massachusetts, USA). Ultrapure agarose byla dodána firmou Life Technologies (Paisley, UK). Taq-Purple DNA-polymeráza byla objednána z firmy Top-Bio (Praha, Česká Republika). Kvantitativní polymerázová reakce v reálném čase (qPCR) byla provedena pomocí TaqMan Universal PCR Master Mix (kit no. 4304437) a TaqMan Gene Expression Assays pro jednotlivé geny (specifikováno v kap. 3.6) od firmy Applied Biosystems (Foster City, Kalifornie). Všechny potřebné primery byly navrženy pomocí softwaru Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) a syntetizovány firmou Invitrogen (Carlsbad, California, USA).

3.2. Pacientky

Do studie bylo zahrnuto 321 vzorků krve nemocných s histologicky potvrzenou diagnózou karcinomu prsu z období únor 2000 až prosinec 2006 ze třech fakultních nemocnic v Praze (souhrnná Tabulka č.1). Z této skupiny bylo navíc získáno 120 vzorků tkáně karcinomu prsu a k tomu 51 párových kontrol z okolní tkáně bez morfologických známek karcinomu. V průběhu operačního výkonu byl nemocným odebrán vzorek tkáně z makroskopicky suspektního ložiska nádoru (pro účely peroperační biopsie) s okamžitým zmražením v tekutém dusíku. Kryostatové řezy byly obarveny hematoxylinem a eosinem a histologicky zpracovány pathology. Přítomnost nádorových buněk ve vzorcích byla histologicky ověřena v prvním a posledním řezu odebrané tkáně. Ke zvýšení obsahu nádorových buněk ve vzorcích byla před provedením řezu oddělena okolní nenádorová tkáň (spojovací a tuková tkáň). Vzorky okolní, k nádoru přiléhající tkáně, byly odebrány v místech, které byly od nádorové tkáně prokazatelně vzdálené. Ve většině případů byla tato vzdálenost větší než 10 mm. Po hloubkovém zmrazení tkáně byly tyto histologické řezy mikroskopicky

zkontrolovány, zda neobsahují žádné nádorové buňky. V některých případech bylo možné provést pouze přípravu nádorového vzorku v nativním stavu (nefixovaný ve standardním neutrálním pufru formaldehydu). Některé nenádorové vzorky byly z důvodu nálezu nádorových buněk po mikroskopické kontrole zmrazených řezů vyloučeny. Kryostatové řezy tkání o velikosti 5- μ m (10-20 ks na vzorek) byly uchovávány v tekutém dusíku a následně byly použity pro izolaci celkové RNA. V některých vzorcích nebyl počet nenádorových buněk okolní tkáně dostatečný k izolaci nukleové kyseliny (ve vzorcích tkáně byla přítomna pouze tuková nebo fibrózní tkáň). Celková RNA byla také izolována z archivních vzorků parafinových bločků fixovaných formalinem (FFPE) za pomoci kitu High Pure RNA Paraffin Kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana, USA). Histologická klasifikace karcinomů byla provedena podle standardních diagnostických procedur [102].

Ze zdravotních záznamů pacientek byla získána následující data: věk při diagnóze, menopauzální status, osobní anamnéza, rodinná anamnéza (počet rodinných příslušníků s karcinomem prsu, ovarií nebo jinými maligními onemocněními), stádium, velikost nádoru, histologický typ a grade nádoru, exprese estrogenových a progesteronových receptorů (ER a PR) a doba přežití bez progresu (z *angl.* progression-free survival = PFS). Expresce receptorů pro estrogen a progesteron byla stanovena podle publikované procedury [103] s obvykle užívanou 10% mezní hodnotou. Progrese nemoci byla určena stejnou technikou u všech sledovaných pacientek, tj. zobrazovacími metodami (počítačová tomografie, abdominální ultrasonografie, rentgen hrudníku, mamografie nebo scintigrafie), a klinicky v případech kožních metastáz. Lokální recidiva byla potvrzena histologicky. Zvýšení nádorového markeru bez jakýchkoliv klinických nebo radiologických znaků nebylo považováno za progresi onemocnění. Všechny pacientky byly informovány o účelu a průběhu studie a podepsaly formulář informovaného souhlasu. Studie byla schválena etickou komisí Státního zdravotního ústavu v Praze.

Tabulka č.1: Souhrnná tabulka klinicko-patologických charakteristik studovaného souboru pacientek

<i>Charakteristika</i>	<i>Medián ± S.D.</i>	<i>N (%)¹</i>
<i>Medián věku při diagnóze, v letech</i>	61,5 ±12,1	321 (100)
<i>Menopauzální stav</i>		
před menopauzou		59 (18,4)
po menopauze nebo perimenopauza		262 (81,6)
<i>Stádium nemoci</i>		
I ²		119 (39,7)
II		137 (45,7)
III		42 (14,0)
IV		2 (0,6)
Nezjištěno		21
<i>Stav lymfatických uzlin</i>		
pozitivní (pN1-3)		120 (40,0)
negativní (pN0)		180 (60,0)
Nezjištěno		21
<i>Průměrná velikost nádoru v mm</i>	17,0 ± 12,8	284 (89,5)
Nezjištěno		37 (11,5)
<i>Histologický typ</i>		
invazivní duktální karcinom		255 (79,4)
ostatní typy karcinomu		66 (20,6)
<i>Histologický grade³</i>		
1		48 (17,1)
2		147 (52,3)
3		86 (30,6)
<i>Expresse estrogenových receptorů</i>		
Pozitivní		178 (63,3)
Negativní		103 (36,7)
Nezjištěno		40
<i>Expresse progesteronových receptorů</i>		
Pozitivní		140 (49,8)
Negativní		141 (50,2)
Nezjištěno		40
<i>Adjuvantní terapie</i>		

obsahující antracykliny (AT, AC, FAC, FEC)	74
obsahující cyclofosfamidy (FAC, FEC, CMF, AC)	89
hormonální léčba (tamoxifen nebo aromatázové inhibitory)	179
Radioterapie	77
PFS nebo terapie nezjištěna z důvodu ztráty pacientky během sledování	101

¹N = počet pacientek, v závorce v procentech

²Zahrnuje i 5 pacientek se stádiem 0 DCIS

³DCIS, LCIS, invazivní lobulární, medulární a mucinózní karcinomy nebyly do analýzy gradu zahrnuty

3.3. Izolace DNA a genotypizace genů *NQO1*, *NQO2*, *SOD2* a *SOD3*

Vzorky krve byly během diagnostických vyšetření odebrány do zkumavek s antikoagulantem K3EDTA. Poté byla genomová DNA izolována z periferních krevních lymfocytů pomocí BioSprint 15 DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) za použití přístroje KingFisher a protokolu dodaného výrobcem (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Polymorfismy (SNPs) genů *NQO1* (dbSNP číslo rs1800566), *NQO2* (rs1143684), *SOD2* (rs4880) a *SOD3* (rs2536512, rs1799895 a rs699473) byly stanoveny alelickou diskriminací pomocí TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays (Assay ID: C_2091255_30 pro *NQO1*; C_8774861_1 pro *NQO2*; C_8709053_10 pro *SOD2*; C_2668728_10, C_2307506_10 a C_2668727_1 pro *SOD3*) od firmy Applied Biosystems (Foster City, CA) na přístroji RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Austrálie). Reakční směs pro PCR v reálném čase obsahovala 5 µl 2x TaqMan Genotyping Master Mix (kit č.4371355, Applied Biosystems), 0,25 µl TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assay a 4,75 µl templátu DNA naředěného na koncentraci 0,7 ng/µl. Nastavení parametrů PCR reakce bylo následující: počáteční denaturace při 95°C 10 min, následovaná 45 cyklů složenými z denaturace při 95°C po dobu 15 s a annealingem/extenzí při 60°C po dobu 60 s pro *NQO1*, *NQO2*, *SOD2*, rs2536512 a rs1799895 pro *SOD3* a annealingem/extenzí při 58°C po dobu 60 s pro *SOD3* rs699473. Mezi vzorky byly zařazeny negativní kontroly reakce, v nichž byla DNA nahrazena vodou. Deset procent náhodně vybraných vzorků bylo reanalyzováno. Výsledky reanalýz se 100% shodovaly s původními výsledky.

3.4. Genotypizace ABCB1 pomocí NanoChip Assays

Genomová DNA byla izolována z periferních krevních lymfocytů fenol/chloroformovou extrakcí. Šest polymorfismů v genu *ABCB1* [(-1)G>A, rs2214102; 61A>G, Asn21Asp, rs9282564;1199G>A, Ser400Asn, rs2229109; 1236C>T, Gly412Gly, rs1128503; (+44)C>T, rs2032588 a 3435C>T, Ile1145Ile, rs1045642] bylo stanoveno pomocí NanoChip Molecular Biology Workstation (Nanogen Inc.) na pracovišti zahraničního spolupracovníka (Oddělení genetiky, Ústav pro výzkum rakoviny v Oslu a Lékařská fakulta University v Oslu, Norsko) dříve popsanou metodou [103].

3.5. Příprava standardů pro qPCR

Kompletní kódující sekvence *CYP1B1*, *CYP2C9*, *CYP2E1*, *CYP3A4*, fragmenty kódujících sekvencí *NQO1* (825 bp), *NQO2* (696 bp) a *SOD2* (863 bp), exony 1-2 (208 bp) genu *SOD3*, exony 18-28 (1500 bp) genu *ABCB1* a exony 3-5 (738 bp) peptidylprolylizomerázy A (*PPIA*, GeneID: 5478) byly zaklonovány do vektoru pDONR201 použitím GatewayTM Cloning Technology (Invitrogen, Carlsbad, CA). Plasmidy nesoucí tyto klony byly pěstovány v baktériích *Escherichia coli* DH5 α Maximum Efficiency Cells (Invitrogen) a izolovány pomocí kitu Plasmid Midi Kit (Qiagen). Koncentrace a čistota plasmidů byla stanovena spektrofotometricky.

3.6. Kvantifikace hladiny transkriptů mRNA

Celková RNA byla izolována z řezů tkání s využitím Trizol reagent (Invitrogen) dle procedury doporučené výrobcem. RNA byla uchovávána při teplotě -80°C. Kvalita výsledného preparátu celkové RNA byla ověřena horizontální agarózovou elektroforézou. Koncentrace celkové RNA byla určena spektrofotometricky pomocí přístroje Cary 300 (Varian, Palo Alto, CA). Komplementární DNA (cDNA) byla syntetizována s použitím 0,5 μ g celkové RNA v celkovém objemu 20 μ l reakční směsi pomocí kitu RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit s náhodnými hexamerovými primery dle protokolu výrobce (MBI Fermentas, Vilnius, Lotyšsko). cDNA byla uchovávána při -20°C. Případná kontaminace genomovou DNA byla posouzena PCR amplifikací fragmentu kontrolního genu *ubiquitinu C* (*UBC*, GeneID: 7316) za vzniku produktu z cDNA (190 bp) a z genomové DNA (1 009 bp)

popsanou metodou [104]. Do následujících analýz byly zařazeny pouze vzorky cDNA, které nebyly genomovou DNA kontaminovány (nebyl přítomen band velikosti 1 009 bp ve vzorku, který byl inkubován bez reverzní transkriptázy). Následně byla provedena qPCR na přístroji RotorGene 6000 (Corbett Research) za pomoci TaqMan Gene Expression Assays kit (*ABCB1*, kit č. Hs00184491_m1; *CYP1B1*, kit č. Hs00164383_m1; *CYP2C9*, kit č. Hs00426397_m1; *CYP3A4*, kit č. Hs00430021_m1; *NQO1*, kit č. Hs01045994_m1; *NQO2*, kit č. Hs01056948_m1; *SOD2*, kit č. Hs00167309_m1; *SOD3*, kit č. Hs00160290_m1; *PPIA* endogenní kontrola, kit č.4333763F). Gen *PPIA* byl použit jako referenční gen, který byl již dříve popsán jako vhodná endogenní kontrola pro porovnání rozdílů expresních profilů mezi nádorovými a nenádorovými tkáněmi [105]. qPCR pro *CYP2E1* byla provedena pomocí kitu ThermoStart Polymerase Kit (AB Gene, Surrey, UK). Fluorescenční próba s primery byla dodána firmou Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). Sekvence primerů a próby pro qPCR genu *CYP2E1* je podrobně popsána v publikaci Haufroid a kol. [106]. Reakční směs pro qPCR obsahovala: 10 μ l 2xTaqMan Universal PCR Master Mix (kit č.4304437) pro geny *NQO1*, *NQO2*, *ABCB1* a *PPIA* nebo 10 μ l ABSolute QPCR ROX Mix (ABgene) pro geny *SOD2* a *SOD3*, 1.0 μ l FAM-značené próby a set primerů (TaqMan Gene Expression Assay specifikované výše), 5 μ l naředěného templátu cDNA a doplněno MQ vodou do celkového objemu 20 μ l. Parametry PCR reakce pro jednotlivé geny jsou uvedeny v Tabulce č.2. Fluorescence byla měřena na konci každého cyklu. Negativní kontrola reakce obsahovala MQ vodu místo cDNA. K vyloučení možné kontaminace z předchozích kroků přípravy RNA a cDNA byla rovněž použita negativní cDNA kontrola (cDNA připravená současně se vzorkovou cDNA bez přidání reverzní transkriptázy). Každý běh qPCR obsahoval naředěnou koncentrační řadu standardu plasmidové DNA (*CYP1B1*, *CYP2C9*, *CYP2E1*, *CYP3A4*, *NQO1*, *NQO2*, *SOD2*, *ABCB1* v rozsahu $10^2 - 10^6$ kopií/reakci; *SOD3* v rozsahu $10^2 - 10^6$ a $5 \cdot 10^6$ kopií/reakci; *PPIA* v rozsahu $5 \cdot 10^2 - 5 \cdot 10^6$ kopií/reakci, kde 100 kopií/reakci bylo stanoveno jako limit detekce), která byla použita pro vytvoření kalibrační křivky. Hladiny transkriptů byly zanalyzovány pomocí softwaru RotorGene v6 (Corbett Research). Pro vyhodnocení výsledků byla použita metoda absolutní kvantifikace s využitím externí kalibrační křivky s účinností reakcí nad 90% a linearitou s r^2 nad 0.99, která byla stanovena na základě naředění příslušných standardů. Hladiny všech studovaných transkriptů byly normalizovány na hladinu interní kontroly genu *PPIA* (počet kopií_{cílový gen}/počet kopií_{PPIA}). Každý vzorek byl stanoven v duplikátu a pro analýzu byla použita průměrná hodnota. Vzorky s variací větší než 15% mezi duplikáty byly reanalyzovány.

Tabulka č.2: Parametry pro PCR reakce v reálném čase všech studovaných genů.

Gen	PCR program					
	Počáteční reakce	Počáteční denaturace	Počet cyklů	Denaturace	Annealing	Extenze
<i>ABCB1</i>	2 min 50°C	10 min 95°C	55	15 s 95°C	60 s 58°C	-
<i>CYP1B1</i>	2 min 50°C	15 min 95°C	55	10 s 95°C	60 s 60°C	15 s 72°C
<i>CYP2C9</i>	2 min 50°C	10 min 95°C	50	15 s 95°C	60 s 60°C	-
<i>CYP2E1</i>	-	15 min 95°C	45	15 s 95°C	50 s 60°C	-
<i>CYP3A4</i>	2 min 50°C	10 min 95°C	50	15 s 95°C	60 s 60°C	15 s 72°C
<i>NQO1</i>	2 min 50°C	10 min 95°C	50	15 s 95°C	50 s 56°C	-
<i>NQO2</i>	2 min 50°C	10 min 95°C	50	15 s 95°C	50 s 56°C	-
<i>SOD2</i>	2 min 50°C	10 min 95°C	50	15 s 95°C	60 s 60°C	-
<i>SOD3</i>	2 min 50°C	10 min 95°C	50	15 s 95°C	60 s 60°C	-
<i>PPIA</i>	2 min 50°C	10 min 95°C	50	15 s 95°C	60 s 58°C	-

3.7. Imunohistochemická detekce exprese proteinů p53 a NQO1

Čerstvé vzorky tkáně byly fixovány ve standardním neutrálně pufovaném 4% formaldehydu 26 hodin a poté byly zality do parafinu pomocí klasických histologických metod. Pro imunohistochemické vyšetření byly použity 3 µm silné histologické řezy. Primární protilátka proti NQO1 (A180; monoklonální myší protilátka získána proti čistému rekombinantnímu lidskému proteinu NQO1) byla dodána firmou Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, USA). Protilátka proti p53 (klon DO-7; monoklonální myší protilátka detekující mutovaný i normální protein) byla dodána firmou Dako (Glostrup, Dánsko). Protilátky byly naředěny pomocí Dako Antibody diluent (1:100, anti-NQO1; 1:50, anti-p53). Pro detekci p53 byly řezy dále tepelně deparafinovány v 10 mmol/l citrátového pufru, pH 6.0, ve vodní lázni (zahřívání 40 min na 95-99°C a poté 20 min ochlazení na pokojovou teplotu). Tkáně byly přes noc inkubovány s primárními protilátkami proti proteinu NQO1 a p53 při 4°C. Detekce byla provedena pomocí systému peroxidáza/diaminobenzidin. Vyhodnocení navázání obou primárních protilátek bylo provedeno pomocí Dako REAL Detection System (Dako). Jako chromogen byl použit 0.04% DAB (3,3'-diaminobenzidintetrahydrochlorid dihydrát; Fluka, Buchs, Switzerland) v 50 mmol/l Tris (Tris-hydroxymethylaminometan)/0.015% H₂O₂. Jako interní pozitivní kontrola ve všech

zkoumaných vzorcích proteinu NQO1 sloužily shluky buněk nenádorové prsní žlázy v okolí nádorové tkáně. V případě proteinu p53 byly ve všech analyzovaných vzorcích nalezeny shluky p53-pozitivních buněk. Imunohistochemické hladiny proteinu NQO1 byly skórovány podle intensity barvení (0, 1+, 2+ a 3+). Rozložení pozitivních buněk (difúzní nebo fokální pozitivita, a rozptýlená buněčná pozitivita) bylo také hodnoceno. Na závěr byly vzorky rozděleny do skupin s negativní expresí (0 nebo 1+ s jakýmkoliv rozložením positivity nebo 2+ nebo 3+ v rozptýlených nádorových buňkách) nebo pozitivní expresí (difúzní 2+ nebo 3+ pozitivitou). Stav exprese p53 byl vyhodnocen jako pozitivní, pokud bylo více než 50% nádorových buněk imunohistochemicky obarveno podle dříve publikované metody [107, 108]. Imunohistochemické stanovení bylo provedeno na spolupracujícím pracovišti 2.lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Nemocnice Motol v Praze (Oddělení patologie a molekulární medicíny).

3.8. Statistická analýza

Pro statistickou analýzu byly hladiny transkriptů všech stanovených genů logaritmicky transformovány za účelem normalizace rozložení dat. Transformované hladiny genů byly analyzovány parametrickým ANOVA testem (vzhledem ke genotypu a kategorizovaným klinicko-patologickým charakteristikám pacientek) či oboustranným *t*-testem pro nezávislé vzorky (vzhledem ke genotypu, imunohistochemické expresi proteinů a klinicko-patologickým charakteristikám pacientek). Pro porovnání exprese *ABCBI* mezi nádorovými a nenádorovými vzorky tkání byl použit oboustranný *t*-test a *Kendallův W* test. Hladiny transkriptů všech stanovených genů byly korelovány s velikostí tumoru nebo s věkem při diagnóze použitím lineární regrese *Spearmanovým* testem.

Pro hodnocení polymorfismů byly použity dominantní (homozygotní vs. variantní homozygotní a homozygotní vs. heterozygotní nosič) a recesivní (homozygotní nosič vs. nosič variantní alely) modely. Vztah mezi kategorizovanými hodnotami genotypu, imunohistochemického skóre a klinicko-patologickými daty uvedené níže byly analyzovány použitím oboustranného *Fisherova* exaktního testu. Testované klinické a patologické charakteristiky byly následující: věk při diagnóze (v letech), menopauzální status (pre- vs. post- nebo perimenopauzální status), stádium, metastatické postižení lymfatických uzlin (N0 vs.N1-3), histologický typ (invazivní duktální vs. jiný invazivní typ karcinomu prsu) a grade, exprese estrogenových a progesteronových receptorů a exprese proteinu p53 (negativní vs.

pozitivní). Genetické modely byly rovněž hodnoceny logistickou regresí. PFS byl hodnocen pomocí metodou Kaplan-Meier a pro porovnání byl použit long-rank test. PFS byl definován jako čas, který uplynul mezi chirurgickou léčbou a progresí nemoci nebo smrtí z jakékoliv příčiny. Pacientky, s nekompletními daty a pacientky se stádiem nemoci IV ($n = 2$) byly z analýzy PFS vyloučeny. Hodnoty p byly vždy stanoveny pomocí oboustranných testů. Hodnota p nižší než 0,05 byla považována za statisticky významnou. Všechny statistické analýzy byly provedeny použitím softwaru SPSS v15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Studie měla 80% sílu detekce OR = 2,0 nebo vyšší s 5% chybovostí typu I při uvažování nejnižší minoritní frekvenci alel 17% (*NQO1*, rs1800566) při analýze menopauzálního stavu, histologického typu a gradu. Studie měla 80% sílu detekce OR = 1.8 nebo vyšší při analýze stádia, stavu lymfatických uzlin nebo exprese hormonálních receptorů při stejném uvažování. Software QUANTO (verze 1.2.4) byl použit pro výpočet statistické síly studie.

4. Výsledky

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

Pro hodnocení výsledků studie genu *NQO1* byla nejprve provedena analýza evaluačního souboru pacientek ($n = 52$). Pro zopakování a potvrzení výsledků byl vytvořen validační soubor pacientek ($n = 53$) a to na základě dostupnosti dalších vzorků a jejich charakteristik. Klinicko-patologické charakteristiky obou souborů jsou shrnuty v Tabulce č.3.

Tabulka č.3: Klinicko-patologické charakteristiky pacientek evaluačního a validačního souboru.

<i>Charakteristika</i>	Evaluační soubor	N (%)¹	Validační soubor	N (%)¹
<i>Medián věku při diagnóze, v letech</i>	58,0 ± 10,4	52 (100)	60,0 ± 10,8	51 (100)
<i>Menopauzální stav</i>				
před menopauzou		7 (13,5)		10 (18,9)
po menopauze		45 (86,5)		41 (78,3)
nezjištěno		0 (0)		2 (3,8)
<i>Stádium nemoci</i>				
0		1 (1,9)		2 (3,8)
I		17 (32,7)		20 (37,7)
II		22 (42,3)		22 (41,5)
III		5 (9,6)		42 (14,0)
IV		1 (1,9)		0 (0)
nezjištěno		6 (11,6)		4 (7,6)
<i>Průměrná velikost nádoru v mm</i>	20,6 ± 12,5	50 (96,1)	16,6 ± 10,6	46 (86,8)
nezjištěno		2 (3,9)		7 (13,2)
<i>Stav lymfatických uzlin</i>				
pozitivní (pN1-3)		19 (36,5)		20 (38,8)
negativní (pN0)		26 (50,0)		28 (52,8)
nezjištěno		7 (13,5)		5 (9,4)
<i>Histologický typ</i>				
invazivní duktální karcinom		41 (78,9)		44 (83,0)
invazivní lobulární karcinom		4 (7,7)		6 (11,3)

ostatní typy karcinomu	6 (11,5)	3 (5,7)
nezjištěno	1 (1,9)	0 (0)
<i>Histologický grade</i>		
1	7 (13,5)	9 (17,0)
2	32 (57,6)	34 (64,2)
3	12 (23,1)	8 (15,0)
nezjištěno	3 (5,8)	2 (3,8)
<i>Expresa estrogenových receptorů</i>		
pozitivní	32 (61,5)	40 (75,5)
negativní	19 (36,5)	13 (24,5)
nezjištěno	1 (1,9)	0 (0)
<i>Expresa progesteronových receptorů</i>		
pozitivní	28 (53,8)	33 (62,3)
negativní	23 (44,2)	20 (37,7)
nezjištěno	1 (1,9)	0 (0)
<i>Stav p53</i>		
pozitivní	11 (21,1)	12 (22,6)
negativní	40 (77,0)	40 (75,5)
nezjištěno	1 (1,9)	1 (1,9)

¹Počet pacientek, v závorce v procentech

4.1.1. Polymorfismus, genová exprese a imunohistochemická analýza exprese proteinu NQO1

Pomocí alelické diskriminace byla v obou souborech ($n = 105$, Tabulka č.4) nalezena 19 % frekvence variantní alely Ser SNP rs1800566. Hladina transkriptu genu *NQO1* byla detekována pomocí qPCR u všech 52 vzorků evaluačního souboru a u 24 vzorků tkání získaných z FFPE validačního souboru ($n = 53$). Zbývající vzorky z validačního souboru nebyly získány z důvodu nedostatečného množství či kvality RNA při extrakci nebo se extrakce RNA z parafinových bločků nepovedla. Při statistické analýze byl jeden vzorek („outlier“) s extrémně nízkou hladinou transkriptu *NQO1* z evaluačního souboru vyřazen. Průměrná hladina transkriptu *NQO1* byla 894 kopií *NQO1* normalizovaného k *PPIA*/ng celkové RNA ($n = 51$, Tabulka č.4) u evaluačního souboru a 111 kopií *NQO1*

normalizovaného k *PPIA*/ng celkové RNA ($n = 24$, Tabulka č.4) u validačního souboru. Byla také nalezena vysoká interindividuální variabilita mezi nádorovými vzorky tkání a to více než 294krát (Obrázek č.4 a Tabulka č.4).

Tabulka č.4: Genotyp a hladina transkriptů *NQO1*.

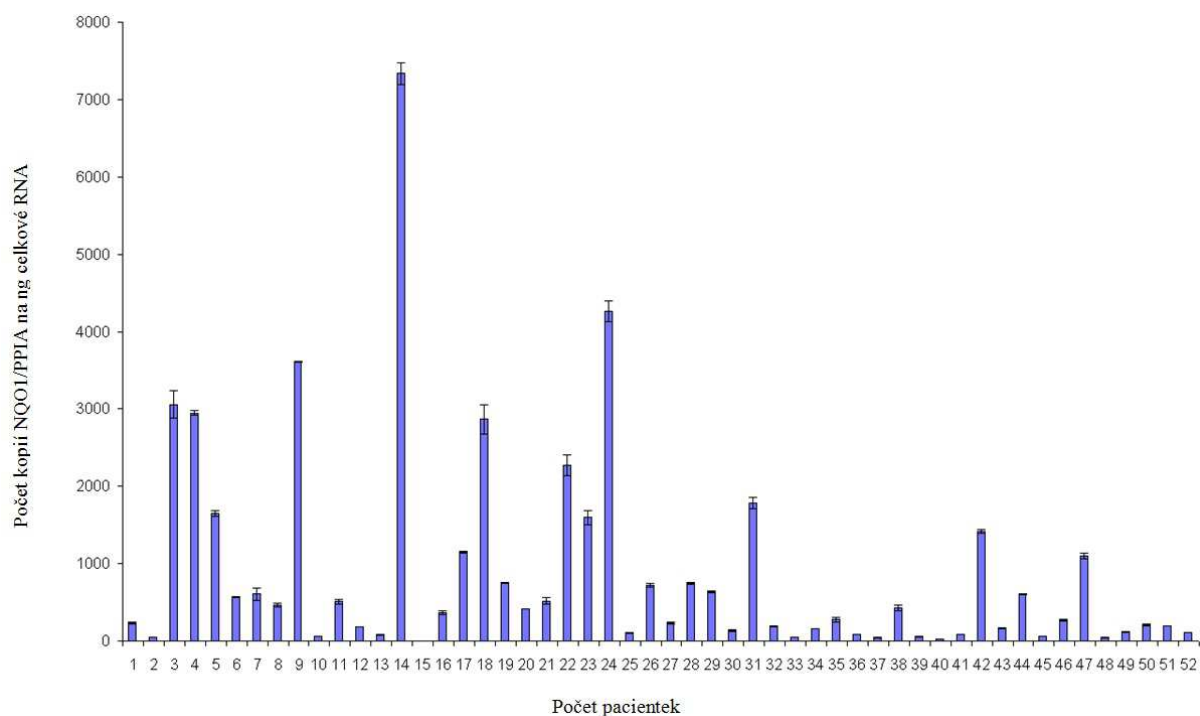
Genotyp <i>NQO1</i> Pro187Ser					
	Evaluální soubor	Validační soubor	Kombinovaný soubor		
Pro/Pro ^a	34 (65,4)	36 (67,9)	70 (66,6)		
Pro/Ser ^a	16 (30,8)	14 (26,4)	30 (28,6)		
Ser/Ser ^a	2 (3,8)	3 (5,7)	5 (4,8)		
qSer ^b	0,19	0,19	0,19		
Celkem	52	53	105		

Hladiny transkriptů <i>NQO1</i> (počet kopií <i>NQO1</i>/<i>PPIA</i>/ng celkové RNA)					
	Minimum	Maximum	Průměr	SD	Variabilita
Evaluální soubor ($n = 51$) ^c	25	7337	894	1368	294krát
Validační soubor ($n = 24$) ^c	12	321	111	89	27krát

^a Počet nosičů genotypu s procentuálním přepočtem výskytu, rozdílnost mezi oběma soubory nebyla významná ($p = 0,827$; Pearsonův χ^2 test).

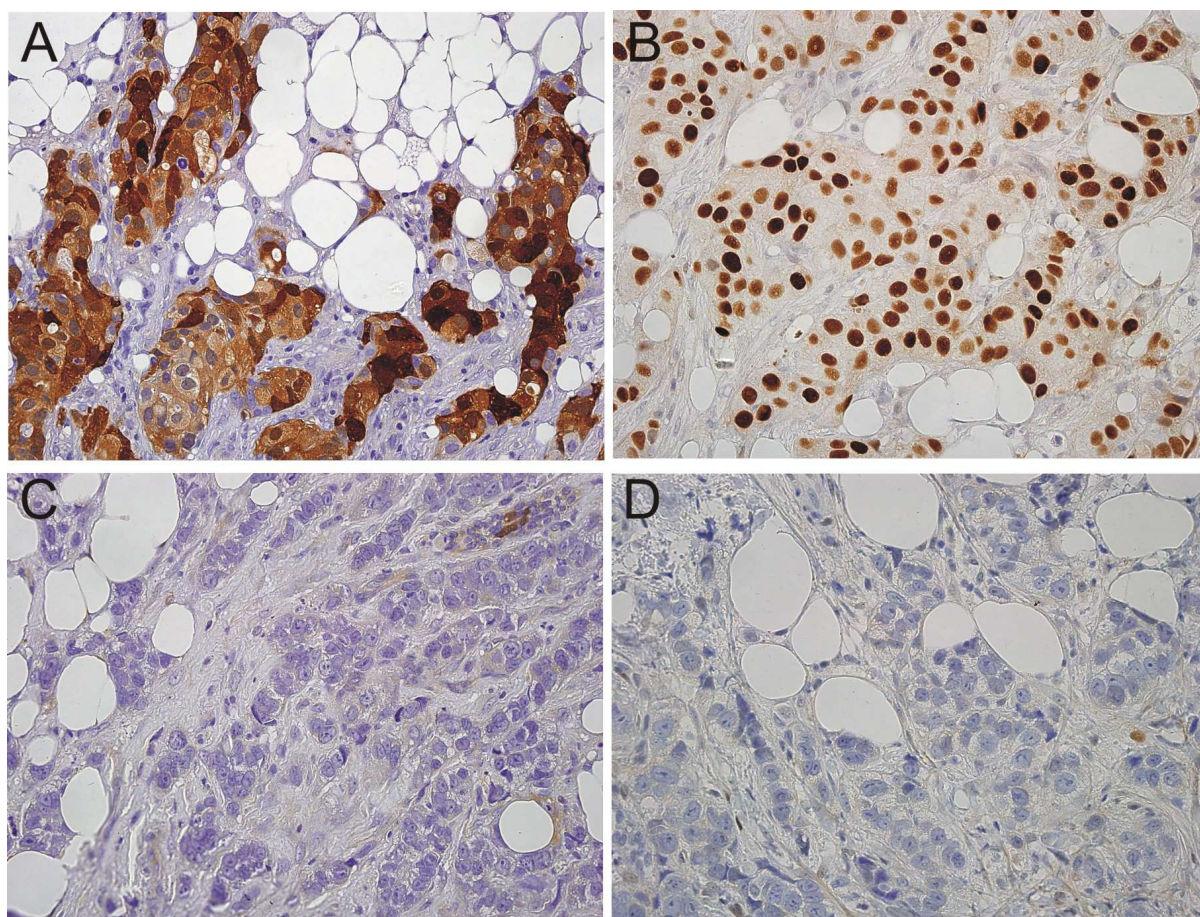
^b frekvence variantní alely

^c počet stanovených vzorků. Jeden vzorek (outlier) byl z analýzy vyloučen. Byl nalezen významný rozdíl mezi oběma soubory ($p < 0,001$; Mann-Whitney U test).



Obrázek č.4: Hladina transkriptů *NQO1* v jednotlivých nádorových tkáních evaluačního souboru. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD stanovených duplikátů.

Expresí proteinu *NQO1* byla stanovena u 50 vzorků nádorové tkáně evaluačního souboru a u 53 vzorků validačního souboru pomocí imunohistochemie. Dva vzorky evaluačního souboru nebyly pro analýzu exprese proteinu dostupné, protože již nebylo dostatečné množství tkáně v parafinových bločcích. Protein *NQO1* byl detekován v cytoplasmě nádorové populace buněk. V buňkách stromatu naopak exprese většinou nebyla nalezena (Obrázek č. 5A). Na Obrázku č. 5C je ukázka vzorku bez exprese proteinu *NQO1* v nádorových buňkách se zjevnou expresí v nenádorové populaci buněk sloužících jako interní kontrola k potvrzení správného zavedení metody. Celkově bylo 24 pacientek z evaluačního souboru (48%) klasifikováno jako *NQO1*-pozitivní a zbytek jako *NQO1*-negativní (52%). Výsledky analýzy proteinové exprese *NQO1* ve validačním souboru byly velmi podobné výsledkům evaluačního souboru (47% *NQO1*-pozitivních vs. 53% *NQO1*-negativních).



Obrázek č.5: Příklady imunohistochemického stanovení exprese proteinů NQO1 a p53. Přítomnost proteinu NQO1 (A) a p53 (B) je porovnána s absencí NQO1 (C) a p53 (D) v řezech ze stejných preparátů. Absence NQO1 barvení s pozitivní kontrolou v nenádorové populaci buněk je ukázána na (C). Absence p53 barvení v jádrech buněk bez exprese ve stromálních buňkách je ukázána na (D).

V evaluačním, validačním souboru ani v kombinaci obou těchto souborů nebyl nalezen žádný významný vztah mezi genotypem *NQO1* a hladinou transkriptu NQO1. Pacientkám, s nejméně jednou variantní Ser alelou z obou souborů významně častěji chyběla exprese proteinu NQO1 v nádorové tkáni ve srovnání s pacientkami s divokým genotypem Pro/Pro ($p = 0,032$ pro evaluační soubor a $p = 0,018$ pro validační soubor). Tento vztah byl u kombinace obou souborů vysoce významný ($p = 0,001$, Tabulka č. 5). Hladina transkriptu *NQO1* také velmi dobře korelovala s expresí proteinu NQO1. Pacientky s expresí NQO1 v nádoru měly významně vyšší hladinu transkriptu oproti pacientkám bez exprese NQO1 (evaluační soubor; $p = 0,042$, Tabulka č.5). Tato asociace byla také potvrzena ve validačním souboru ($p = 0,017$) a při kombinaci obou souborů byla ještě významnější ($p = 0,007$).

Tabulka č.5: Vztahy mezi genotypem, hladinou transkriptu a expresí proteinu NQO1

<i>Genotyp vs. exprese proteinu, kombinovaný soubor^a</i>			
Genotyp	negativní NQO1	pozitivní NQO1	<i>p^b</i>
Pro/Pro	27 (51,9)	43 (84,3)	-
Pro/Ser	20 (38,5)	8 (15,7)	0,004
Ser/Ser	5 (9,6)	0 (0)	0,012
Pro/Ser nebo Ser/Ser	25	8	0,001
<i>Hladina transkriptu NQO1 vs. exprese proteinu, evaluační soubor^c</i>			
	negativní NQO1	pozitivní NQO1	<i>p^b</i>
Hladina transkriptu NQO1 ^d	623 ± 950	1197 ± 1685	0,042
<i>n</i>	24	25	

^aNQO1 exprese nemohla být stanovena u dvou pacientek (obě s heterozygotním genotypem)

^bOboustranný Fisherův exaktní test – uvedený genotyp vs. Pro/Pro wild-type

^cJeden vzorek (outlier – negativní NQO1) byl z analýzy vyloučen z důvodu podezřele nízké hladiny transkriptu NQO1 a u dvou pacientek nebyla stanovena exprese proteinu NQO1

^dPrůměr ± SD v počtu kopií NQO1/PPIA/ng celkové RNA

4.1.2. Vztah mezi NQO1 a klinicko-patologickými charakteristikami pacientek

Mezi polymorfismem *NQO1* a klinicko-patologickými charakteristikami pacientek ani mezi hladinou transkriptu *NQO1* a klinicko-patologickými charakteristikami pacientek nebyl nalezen žádný významný vztah. Na druhou stranu byl nalezen vztah mezi expresí proteinu NQO1 a stádiem nemoci. V nádorech pacientek se stádiem nemoci 0, I a II (méně pokročilé stádium onemocnění) byla významně častěji nalezena exprese proteinu NQO1 v porovnání s pacientkami s pokročilým stádiem nemoci III nebo IV ($p = 0,022$; Tabulka č.6). Tento vztah však nebyl potvrzen analýzou validačního souboru (Tabulka č.6) ani kombinovaného souboru ($p = 0,231$; oboustranný Fisherův exaktní test). Dále byla nalezena korelace exprese proteinu NQO1 s expresí proteinu p53 v evaluačním souboru. Ve vzorcích bez exprese proteinu NQO1 obvykle nebyla nalezena ani exprese proteinu p53 ($n = 22$, Obrázek č.2C a 2D). Simultánní exprese proteinů NQO1 a p53 byla mnohem vzácnější ($n = 9$, Obrázek č.2A a 2B; $p = 0,037$, Tabulka č.6). Ve validačním souboru (Tabulka č.6) a ani v kombinaci obou souborů ($p > 0,999$; oboustranný Fisherův exaktní test) však nebyl tento vztah potvrzen. Žádné další významné vztahy nebyly nalezeny.

Tabulka č.6: Vztahy mezi expresí proteinu NQO1 a klinicko-patologickými charakteristikami pacientek

<i>Exprese proteinu NQO1 vs.stádium nemoci, evaluační soubor</i>		
	bez exprese NQO1	s expresí NQO1
Stádium 0,I nebo II ^a	17 (73,9)	21 (100)
Stádium III nebo IV ^a	6 (26,1)	0 (0)
<i>p</i> = 0,022; oboustranný Fisherův exaktní test		
<i>Exprese proteinu NQO1 vs.stádium nemoci, validační soubor</i>		
	bez exprese NQO1	s expresí NQO1
Stádium 0,I nebo II ^a	21 (87,5)	21 (84,0)
Stádium III nebo IV ^a	3 (12,5)	4 (16,0)
<i>p</i> > 0,999; oboustranný Fisherův exaktní test		
<i>Exprese proteinu NQO1 vs.exprese p53, evaluační soubor</i>		
	bez exprese NQO1	s expresí NQO1
negativní p53 ^b	22 (91,7)	16 (64,0)
pozitivní p53 ^b	2 (8,3)	9 (36,0)
<i>p</i> = 0,037; oboustranný Fisherův exaktní test		
<i>Exprese proteinu NQO1 vs.exprese p53, validační soubor</i>		
	bez exprese NQO1	s expresí NQO1
negativní p53 ^b	19 (67,9)	21 (87,5)
pozitivní p53 ^b	9 (32,1)	3 (12,5)
<i>p</i> = 0,113; oboustranný Fisherův exaktní test		

^aPočet pacientek, v závorce v procentech. U šesti pacientek evaluačního souboru nebyla informace o stádiu nemoci dostupná a u dvou pacientek nemohla být stanovena exprese proteinu NQO1. U čtyř pacientek validačního souboru nebylo stádium nemoci zjištěno.

^bPočet pacientek, v závorce v procentech. U jedné pacientky evaluačního souboru nebyl k dispozici údaj o expresi p53 a u dvou pacientek nebyla stanovena exprese proteinu NQO1. U jedné pacientky validačního souboru nebyl k dispozici údaj o expresi p53.

4.2. Úloha genů kódujících oxidativní stres v prognóze karcinomu prsu

4.2.1. Charakteristiky studované populace a polymorfismy genů NQO1, NQO2, SOD2 a SOD3

Celkem bylo shromážděno 321 vzorků pacientek s karcinomem prsu. Klinicko-patologické charakteristiky pacientek jsou shrnuty v Tabulce č.1. Polymorfismy v genech kódujících oxidativní stres byly stanoveny ve všech dostupných vzorcích DNA (Tabulka č.7).

Z důvodu nedostatku množství a kvality DNA nebylo možné stanovit polymorfismus v genu *NQO2* u 6 pacientek, polymorfismus rs1799895 v genu *SOD3* u 2 pacientek a polymorfismus genu *SOD2* a polymorfismus rs699473 genu *SOD3* u jedné pacientky. Z výsledků tabulky č.7 je patrné, že oproti předchozí studii nebyly v rozdělení mezi jednotlivými genotypy a frekvencí variantních alel u bělošské populace (vzorky bělošské evropské populace) nalezeny významné rozdíly, s výjimkou polymorfismu rs4880 genu *SOD2* [112]. Nicméně zastoupení alel tohoto polymorfismu stanovené v naší studii se neodlišuje od dříve publikované studie norské populace podobného rozsahu (12, $n = 329$).

Pozitivní rodinnou anamnézu (karcinom prsu a/nebo ovárií) mělo 23,7 % pacientek ($n = 76$). Zastoupení genotypů ve skupině pacientek s pozitivní rodinnou anamnézou se významně nelišilo od skupiny pacientek s negativní rodinnou anamnézou (Pearsonův chi-kvadrát test). Medián doby sledování pacientek byl 43 měsíců a průměrná doba sledování byla 47 měsíců (rozsah doby sledování byl 3 – 110 měsíců).

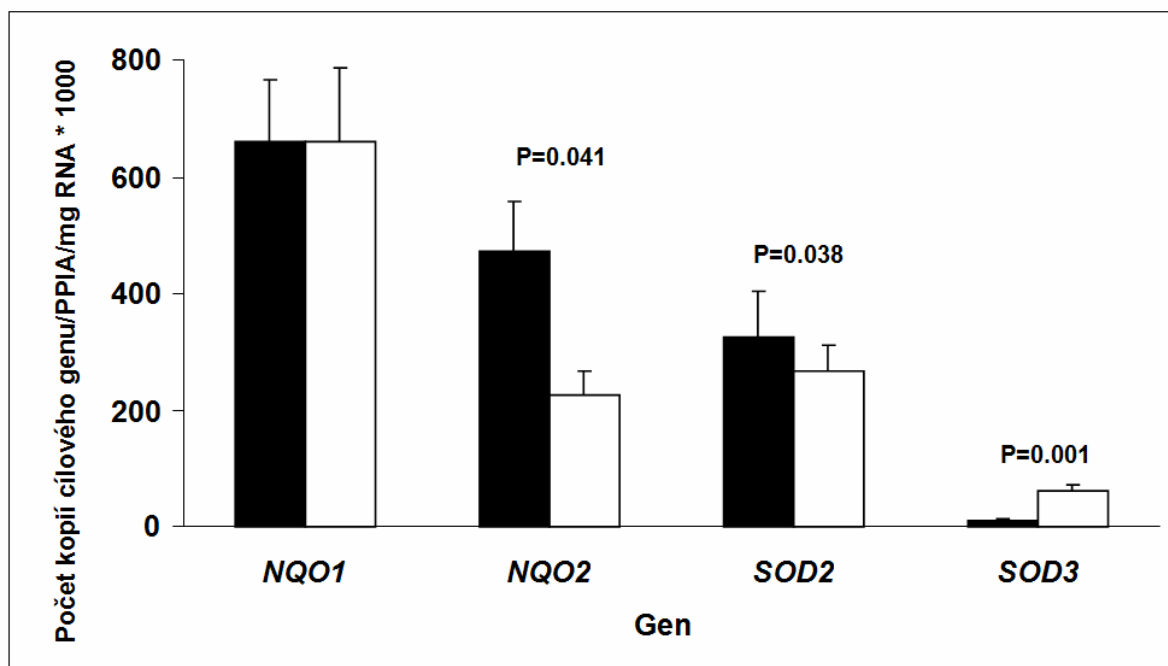
Tabulka č.7: Rozdělení genotypů *NQO1*, *NQO2*, *SOD2* a *SOD3*

Gen (SNP)	Genotyp	N (%)
<i>NQO1</i> (rs1800566)	Pro187Pro	225 (70,1)
	Pro187Ser	83 (25,9)
	Ser187Ser	13 (4,0)
	qSer ¹	0,17
<i>NQO2</i> (rs1143684)	Phe47Phe	204 (64,8)
	Phe47Leu	97 (30,8)
	Leu47Leu	14 (4,4)
	qLeu ¹	0,20
<i>SOD2</i> (rs4880)	Val16Val	77 (24,1)
	Val16Ala	170 (53,1)
	Ala16Ala	73 (22,8)
	qAla ¹	0,49
<i>SOD3</i> (rs2536512)	Ala58Ala	131 (40,9)
	Thr58Ala	147 (45,9)
	Thr58Thr	42 (13,1)
	qThr ¹	0,36
<i>SOD3</i> (rs1799895)	Arg231Arg	319 (100,0)
	Arg231Gly	0
	Gly231Gly	0
	qGly ¹	0
<i>SOD3</i> (rs699473)	CC	40 (12,5)
	CT	152 (47,5)
	TT	128 (40,0)
	qT ¹	0,64

¹ Frekvence variatní alely

4.2.2. Míra exprese genů *NQO1*, *NQO2*, *SOD2* a *SOD3*

Hladiny transkriptů byly stanoveny pomocí qPCR u 120 vzorků nádorové a u 51 vzorků okolní nenádorové tkáně karcinomu prsu (Obrázek č.6). Hladiny transkriptů nádorové a okolní nenádorové tkáně genů *NQO2*, *SOD2* a *SOD3* se od sebe významně lišily (Obrázek č.6). V nádorové tkáni byla nalezena zvýšená (upregulovaná) míra exprese genů *NQO2* a *SOD2*. Naopak, u genu *SOD3* byla míra exprese v nádorové tkáni silně snižena (downregulovaná). Průměrná hladina exprese v nádorové tkáni měla tento charakteristický trend: $NQO1 > NQO2 > SOD2 > SOD3$. V okolní nenádorové tkáni byla míra exprese v tomto pořadí: $NQO1 > SOD2 > NQO2 > SOD3$. Naměřené hladiny transkriptů všech sledovaných genů nevykazovaly hodnoty normálního Gaussova rozdělení a proto musela být před statistickou analýzou provedena logaritmická transformace všech naměřených dat. Pomocí testu ANOVA, který mohl být použit po logaritmické transformaci dat, však nebyl nalezen žádný významný vztah mezi sledovanými polymorfismy a hladinami jejich transkriptů.



Obrázek č.6: Hladiny transkriptů *NQO1*, *NQO2*, *SOD2* a *SOD3* v nádorové ($n = 120$) a nenádorové ($n = 51$) tkáni.

Hladiny transkriptů byly stanoveny pomocí qPCR s absolutní kvantifikací. Rozdíly v logaritmicky transformovaných hladinách transkriptů mezi vzorky nádorové (■) a nenádorové (□) tkáni byly vyhodnoceny oboustranným párovým t -testem. U jedné pacientky nebyla stanovena hladina transkriptu v genu *NQO1* ani *NQO2*.

4.2.3. Vztah mezi expresí a polymorfismy genů *NQO1*, *NQO2*, *SOD2* a *SOD3* a klinicko-patologickými charakteristikami pacientek

Tabulka č.8 shrnuje výsledky provedené statistické analýzy. Hlavním statistickým testem byl oboustranný *Fisherův* exaktní test a doplňkovým testem pak logistická regrese, která sloužila jako ověřovací nástroj k potvrzení nalezených vztahů.

U polymorfismu rs1143684 genu *NQO2* byla nalezena významná spojitost se stádiem nemoci a expresí progesteronového receptoru. U pacientek se stádiem nemoci 0 nebo I (méně pokročilé stádium nemoci) se častěji vyskytovala variantní Leu alela genu *NQO2* než u pacientek se stádiem nemoci II-IV ($p = 0,033$; Tabulka č.8). Doplňkový statistický test tento vztah potvrdil ($p = 0,031$; Tabulka č.8). Pacientky, které měly karcinom exprimující progesteronový receptor, měly i častěji přítomnou variantní Leu alelu genu *NQO2* než pacientky, které expresi progesteronového receptoru neměly ($p = 0,028$; Tabulka č.8). Nicméně, doplňkový statistický test tento nalezený vztah nepotvrdil ($p = 0,053$; Tabulka č.8). Další významnou asociací byla korelace mezi expresí progesteronového receptoru a stádiem nemoci ($p = 0,032$) s následnou analýzou podskupin. Skupina pacientek, které neměly expresi progesteronového receptoru a které měly stádium nemoci 0 nebo I, měly významně častější výskyt variantní Leu alely genu *NQO2* než pacientky, které měly stádium nemoci II-IV ($p = 0,029$; doplňkový test). Naproti tomu u pacientek s expresí progesteronového receptoru nebyl nalezen žádný významný vztah.

Další významná asociace byla nelezena mezi polymorfismem rs2536512 genu *SOD3* a expresí estrogenového receptoru. Pacientky, které měly karcinom exprimující estrogenový receptor, měly také častější frekvenci výskytu variantní Thr alely než pacientky, které měly karcinomy bez exprese estrogenových receptorů ($p = 0,007$; Tabulka č.8). Tento vztah byl nalezen také u pacientek, které měly karcinomy exprimující oba receptory, jak estrogenový, tak i progesteronový ($p = 0,018$; Tabulka č.8). Oba tyto vztahy byl potvrzeny i doplňkovým statistickým testem (Tabulka č.8). Žádné další významné vztahy mezi polymorfismy pacientek a klinicko-patologickými charakteristikami nebyly nalezeny.

Tabulka č.8: Vztahy mezi polymorfismy a klinicko-patologickými charakteristikami pacientek.

Gen (SNP), genotyp	Charakteristika, N (%)¹				
	<i>Stádium I³</i>	<i>Stádium II-IV</i>	<i>OR²</i>	<i>95% CI²</i>	<i>p²</i>
<i>NQO2 (rs1143684)</i>					
Phe47Phe	67 (58,3)	126 (70,4)	1,00	reference	
Phe47Leu	41 (35,6)	47 (26,3)	1,64		0,059
Leu47Leu	7 (6,1)	6 (3,3)	2,19		0,173
Leu alela ⁴	48	53	1,70		0,033
Phe alela ⁵	108	173	0,54		0,272
Doplňkový test ⁶	115	179	1,57		0,031
<i>NQO2 (rs1143684)</i>	<i>PR negativní⁷</i>	<i>PR pozitivní⁷</i>	<i>OR²</i>	<i>95% CI²</i>	<i>p²</i>
Phe47Phe	98 (70,0)	79 (57,2)	1,00	reference	
Phe47Leu	36 (25,7)	52 (37,7)	1,79		0,027
Leu47Leu	6 (4,3)	7 (5,1)	1,45		0,521
Leu alela ⁴	42	59	1,73		0,028
Phe alela ⁵	134	131	0,83		0,756
Doplňkový test ⁶	140	138	1,51		0,053
<i>SOD3 (rs2536512)</i>	<i>ER negativní⁷</i>	<i>ER pozitivní⁷</i>	<i>OR²</i>	<i>95% CI²</i>	<i>p²</i>
Ala58Ala	53 (51,5)	62 (34,8)	1,00	reference	
Ala58Thr	40 (38,8)	89 (50,0)	1,90		0,016
Thr58Thr	10 (9,7)	27 (15,2)	2,31		0,044
Thr alela ⁴	50	116	1,98		0,007
Ala alela ⁵	93	151	0,60		0,196
Doplňkový test ⁶	103	178	1,64		0,009
<i>SOD3 (rs2536512)</i>	<i>ER/PR negativní⁷</i>	<i>ER/PR pozitivní⁷</i>	<i>OR²</i>	<i>95% CI²</i>	<i>p²</i>
Ala58Ala	45 (52,3)	44 (35,8)	1,00	reference	
Ala58Thr	33 (38,4)	61 (49,6)	1,89		0,035
Thr58Thr	8 (9,3)	18 (14,6)	2,30		0,079
Thr alela ⁴	41	79	1,97		0,018
Ala alela ⁵	78	105	0,60		0,254
Doplňkový test ⁶	86	123	1,64		0,023

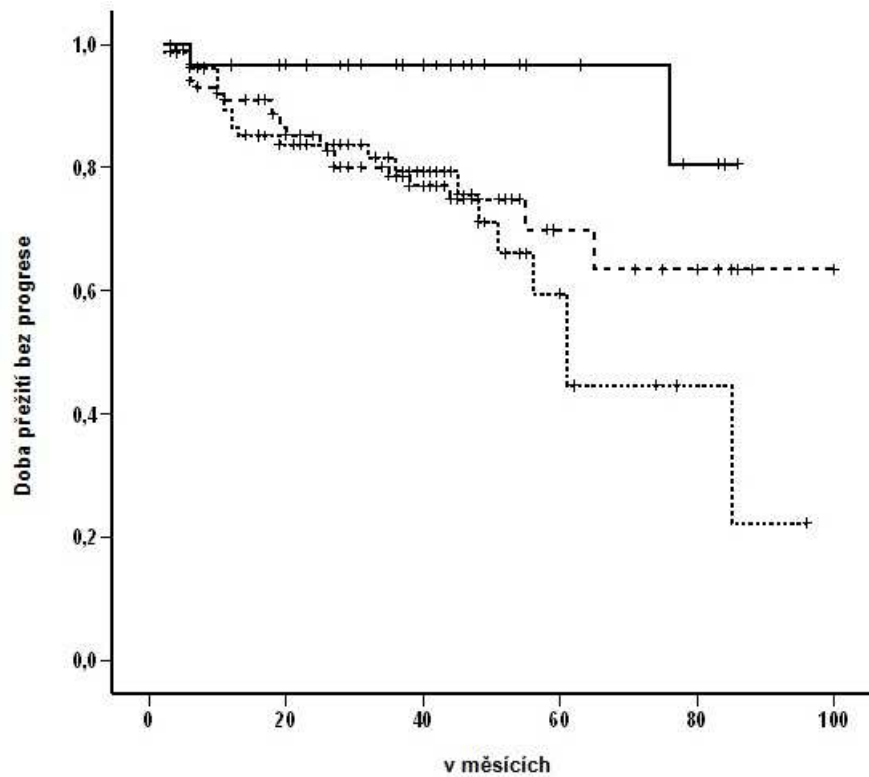
¹Počet nositelů daných genotypů (procentuálně). Pacientky, které neměly kompletními data, nebyly analyzovány. ²Mantel-Haenszel common odds ratio (OR) s 95% intervalem spolehlivosti (z angl. confidence interval; 95% CI) a oboustranným *p*-testem. ³Zahrnuto 5 pacientek se stádiem nemoci 0 DCIS. ⁴Nosiči heterozygotního nebo homozygotního genotypu variantní alely (dominantní model). ⁵Nositelé heterozygotního nebo homozygotního genotypu normální alely (recesivní model). Nositelé homozygotního genotypu variantní alely sloužili jako referenční skupina. ⁶ Doplnkový genetický model byl hodnocen pomocí logistické regrese. ⁷PR: exprese progesteronového receptoru; ER:exprese estrogenového receptoru.

Hladina transkriptu genu *SOD3* byla významně vyšší u karcinomů s gradem 1 nebo 2 (průměr \pm SD; $13,4 \pm 2,4$ kopií *SOD3/PPIA*/ $\mu\text{g RNA} \cdot 1000$, $n = 77$) než u karcinomů s gradem 3 ($5,6 \pm 1,9$; $n = 28$). Statistická analýza byla provedena pomocí testu ANOVA s logaritmickou normalizací dat, $p = 0.006$. Nebyly nalezeny žádné další vztahy mezi polymorfismy, hladinami transkriptů a ostatními klinicko-patologickými charakteristikami pacientek (věk při diagnóze, menopauzální stav, velikost nádoru, histologický typ).

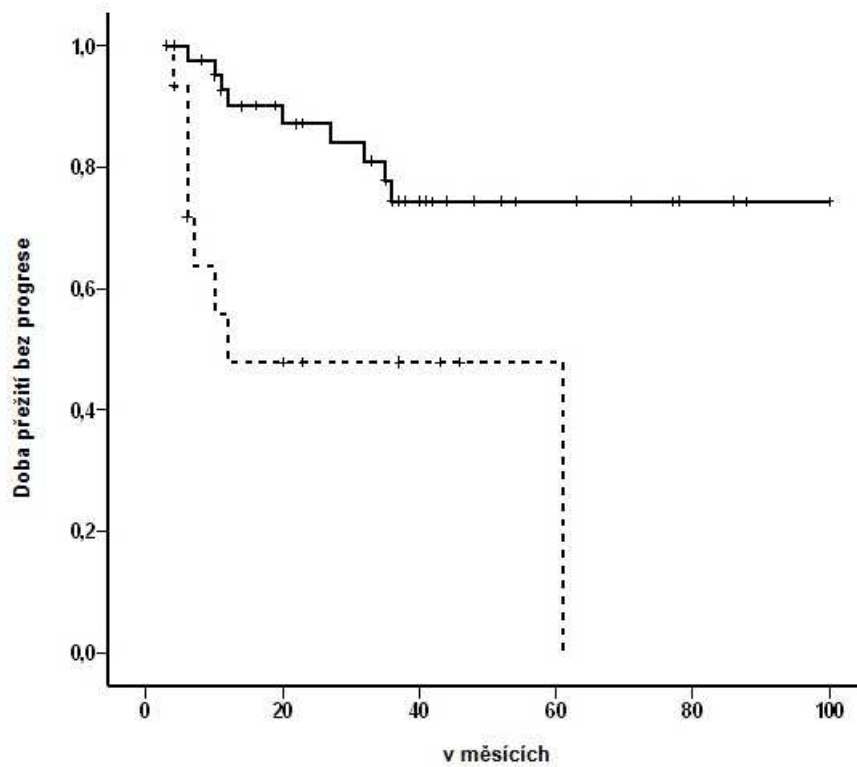
4.2.4. Analýza doby přežití bez progrese (PFS)

Pro analýzu PFS byly pacientky rozděleny do skupin podle jejich logaritmicky transformovaných hladin transkriptů. Skupiny byly vytvořeny na základě 50. percentil a poté použity pro rozvrstvení PFS analýzy. Pacientky byly také rozděleny podle režimu léčby (léčba obsahující cyklofosamid: ano vs.ne; léčba obsahující antracykliny: ano vs.ne; hormonální léčba: ano vs.ne; radioterapie: ano vs.ne). Nebyl nalezen významný rozdíl mezi PFS pacientek a použitým režimem léčby. Typ karcinomu (invazivní duktální vs. ostatní karcinomy) a ani grade karcinomu významně neovlivnily PFS pacientek. Naproti tomu, PFS celé skupiny pacientek byla významně změněna stavem lymfatických uzlin ($p < 0,001$), stádiem nemoci ($p < 0,001$) a expresí obou receptorů ($p = 0,011$). Hladiny transkriptů významně neovlivnily PFS v celé skupině pacientek ($n = 101$) ani u pacientek rozdělených podle jejich režimu léčby. Polymorfismus rs699473 v genu *SOD3* významně modifikoval PFS všech pacientek ($n = 217$; Obrázek č.7, $p = 0,038$, log-rank test). Naproti tomu ostatní studované polymorfismy již významně PFS pacientek neovlivnily. Nebyl nalezen ani žádný významný vztah mezi studovanými polymorfismy a PFS u pacientek s pozitivními ($n = 88$) nebo negativními lymfatickými uzlinami ($n = 118$). Nebyla také nalezena žádná významná spojitost mezi studovanými polymorfismy a PFS u pacientek s expresí obou receptorů ($n = 94$). V dominantním modelu významně modifikoval PFS polymorfismus rs4880 genu *SOD2* skupinu pacientek bez exprese receptorů ($n = 59$, $p = 0,001$; Obrázek č.8). Polymorfismy významně neovlivnily PFS pacientek léčených antracykliny, cyklofosamidou nebo radioterapií (stratifikovaná analýza). V dominantním modelu bylo PFS významně modifikováno u polymorfismu rs699473 genu *SOD3* ve skupině pacientek léčených hormonální léčbou obsahující tamoxifen nebo aromatázový inhibitor ($n = 179$; Obrázek č.9; $p = 0,021$; log-rank test). V recesivním modelu bylo PFS významně změněno u polymorfismu rs699473 genu *SOD3* u pacientek léčených oběma hormonálními terapiemi a zároveň i chemoterapií ($n = 59$; $p = 0,026$; log-rank test). V dominantním modelu bylo PFS významně modifikováno u

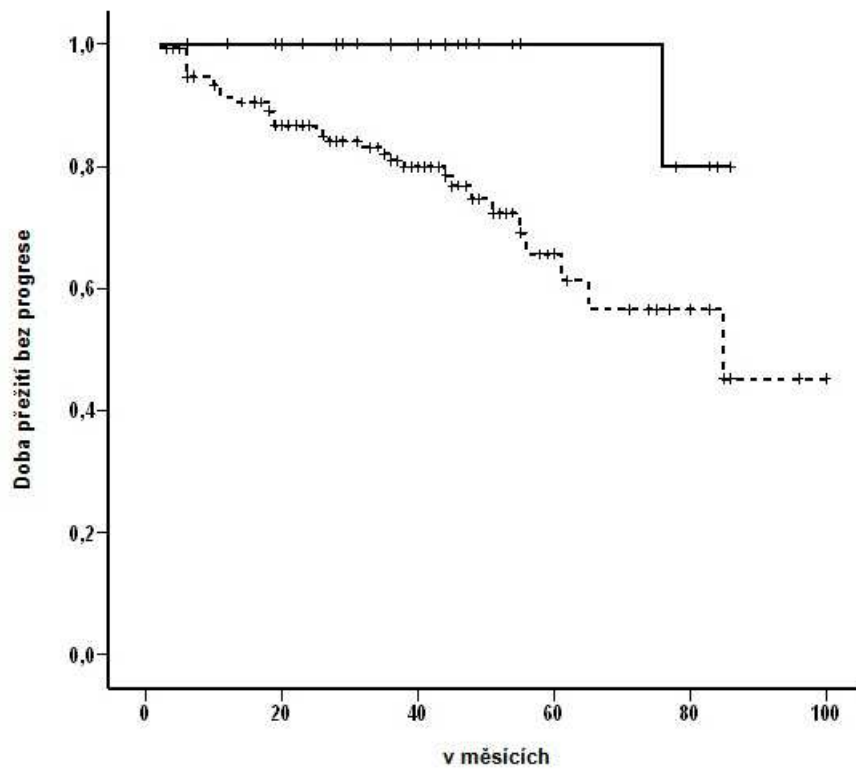
polymorfismu rs4880 genu *SOD2* u pacientek bez hormonální terapie, ale léčených léky obsahujícími cyklofosfamid ($n = 30$; Obrázek č.10; $p = 0,004$; long-rank test).



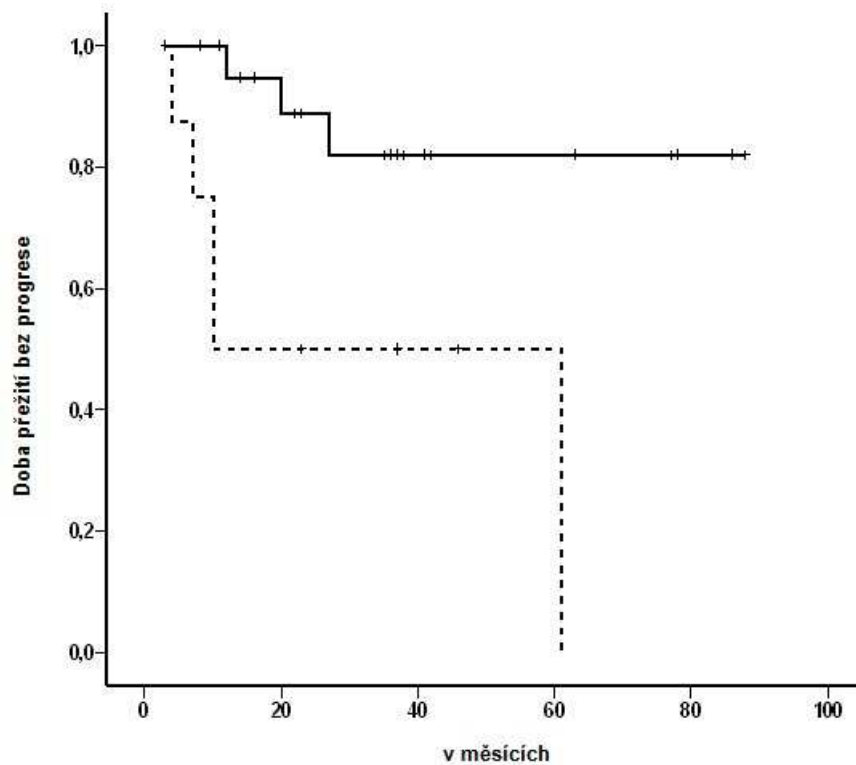
Obrázek č.7: Vztah mezi PFS všech studovaných pacientek s karcinomem prsu a polymorfismem rs699473 genu *SOD3*. Kaplan-Meierova křivka přežívání pacientek s genotypem CC (plná čára, $n = 30$), CT (přerušovaná čára, $n = 106$) a TT (tečkovaná čára, $n = 80$) s $p = 0,038$ (long-rank test).



Obrázek č.8: Vztah mezi PFS patientek s karcinomem prsu, bez exprese estrogenového a progesteronového receptoru v nádoru, a polymorfismem rs4880 genu *SOD2*. Kaplan-Meierova křivka přežívání patientek nesoucích alelu Val (plná čára, $n = 44$) a genotyp Ala/Ala (přerušovaná čára, $n = 15$) s $p = 0,001$ (long-rank test).



Obrázek č.9: Vztah mezi PFS pacientek s karcinomem prsu léčených hormonálními léky a polymorfismem rs699473 genu *SOD3*. Kaplan-Meierova křivka přežívání pacientek nesoucích genotyp CC (plná čára, n = 24) a CT nebo TT (přerušovaná čára, n = 155) s $p = 0,021$ (long-rank test).



Obrázek č.10: Vztah mezi PFS pacientek s karcinomem prsu, léčených režimy obsahujícími cyklofosfamidy, a polymorfismem rs4880 genu *SOD2*. Kaplan-Meierova křivka přežívání pacientek nesoucích alelu Val (plná čára, n = 22) a genotyp Ala/Ala (přerušovaná čára, n = 8) s $p = 0,004$. Všechny pacientky v této skupině měly nádory bez exprese progesteronových a estrogenových receptorů a nedostaly hormonální léčbu.

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

4.3.1. Frekvence polymorfismů genu ABCB1

V Tabulce č.9 jsou uvedeny stanovené frekvence variantních alel šesti sledovaných polymorfismů. Nejvyšší frekvence byly nalezeny pro variantní alely v exonu 12 (1236T, 38%) a exonu 26 (3435T, 54%).

Tabulka č.9: Distribuce genotypů *ABCB1*

Polymorfismus ABCB1 ¹	Genotyp	N (%)
<i>(-1)G>A (rs2214102)</i>	GG	77 (88,5)
	GA	8 (9,2)
	AA	2 (2,3)
	qA ²	0,07
	celkem	87
<i>61A>G, Asn21Asp (rs9282564)</i>	Asn21Asn	75 (84,3)
	Asn21Asp	13 (14,6)
	Asp21Asp	1 (1,1)
	qAsp ²	0,08
	celkem	89
<i>1199G>A, Ser400Asn (rs2229109)</i>	Ser400Ser	86 (95,6)
	Ser400Asn	4 (4,4)
	Asn400Asn	0 (0)
	qAsn ²	0,02
	celkem	90
<i>1236C>T, Gly412Gly</i>	CC	32 (35,6)
	CT	47 (52,2)
	TT	11 (12,2)
	qT ²	0,38
	celkem	90

<i>12(+44)C>T (rs2032588)</i>		
	CC	79 (89,9)
	CT	7 (8,0)
	TT	2 (2,2)
	qT ²	0,06
	celkem	88
<i>3435C>T, Ile1145Ile</i>		
<i>(rs1045642)</i>		
	CC	17 (19,5)
	TC	46 (52,9)
	TT	24 (27,6)
	qT ²	0,54
	celkem	87

¹Záměny aminokyselin uvedeny pouze pro polymorfismy v exonech. Záměny bází vycházejí z cDNA sekvence v GenBank pod číslem M14758.

²Frekvence variantní alely.

4.3.2. Genová exprese ABCB1 a její vztah k polymorfismu ABCB1

Hladiny transkripů *ABCB1* byly stanoveny u 88 vzorků nádorových tkání a u 40 vzorků okolní nenádorové tkáně. U ostatních pacientek nebyla pro analýzu okolní nenádorová tkáň dostupná (nedostatečné množství vzorku pro izolaci nukleové kyseliny; mikroskopicky byla nalezena infiltrace nádorovými buňkami; během operace byly odebrány pouze vzorky nádorové tkáně). Exprese genu *ABCB1* byla nalezena u 87 z 88 nádorových tkání (98,9%) a u 39 ze 40 (97,5%) okolní nenádorové tkáně. Při porovnání exprese nádorové a okolní nenádorové tkáně byla odhalena významně vyšší průměrná exprese *ABCB1* v okolní nenádorové než v nádorové tkáni pacientek ($p < 0,001$ Kendallův W test; Tabulka č.10). Byla nalezena také vysoká variabilita mezi jednotlivými vzorky, u nádorové tkáně 1427-krát a 1120-krát u okolní nenádorové tkáně (Tabulka č.10). Ve sledované skupině pacientek bylo nalezeno 8 pacientek s vyšší expresí v nádorové tkáni v porovnání s okolní nenádorovou tkáni. Porovnání hladiny exprese *ABCB1* v nádorové tkáni pacientek léčených neoadjuvantní terapií (před operací, $n = 18$) s hladinou exprese neléčených pacientek ($n = 65$) neukázalo významný rozdíl ($p = 0,527$; t -test).

Tabulka č.10: Hladina exprese *ABCBI* v nádorové a okolní nenádorové tkáni pacientek s karcinomem prsu.

Hladiny transkriptů <i>ABCBI</i> (počet kopií <i>ABCBI/PPIA/ng celkové RNA</i>)					
	Minimum	Maximum	Průměr²	SD	Variabilita
nádorová tkáň ¹	0,03	42,82	7,37	11,0	1427-krát
nenádorová tkáň ¹	0,44	492,74	39,43	105,8	1120-krát

¹Počet stanovených vzorků $n = 39$

²Průměrná variabilita exprese mezi nádorovou a okolní nenádorovou tkání byla 5,4-krát.

Byl také analyzován vztah mezi hladinou transkriptů *ABCBI* v nádorové tkáni ($n = 87$) a frekvencí genotypů jednotlivých polymorfismů. Pacientky byly rozděleny podle genotypů na normální homozygotky (obě alely normální), heterozygotky (jedna variantní a jedna normální alela) a na variantní homozygotky (obě alely variantní). Rozdíly mezi hladinou transkriptu *ABCBI* a jednotlivými skupinami nosiček byly analyzovány pomocí *t*-testu. Variantní homozygoty s genotypem TT v pozici 3435 exonu 26 genu *ABCBI* měly významně sníženou expresi *ABCBI* v nádorové tkáni v porovnání s nositelkami normálního CC genotypu (5,4-násobný rozdíl v expresi; oboustranný test; $p = 0,043$; Tabulka č.11). Hladina transkriptu *ABCBI* byla také významně ovlivněna přítomností polymorfismu 1236C>T v exonu 12. Nositelky nesoucí alespoň jednu variantní alelu měly významně sníženou expresi genu *ABCBI* oproti nositelkám normální alely (3krát rozdílná exprese, oboustranný test; $p = 0,029$; Tabulka č.11). Naproti tomu u nositelek obou variantních alel už tento významný rozdíl nalezen nebyl. Ostatní studované polymorfismy neměly významný vliv na expresi *ABCBI*.

Tabulka č.11: Vztah mezi polymorfismy v exonu 12 a 26 a genovou expresí *ABCBI* exprese *ABCBI* (*ABCBI/PPIA* v ng celkové RNA)

Genotyp <i>ABCBI</i>	N¹	Průměr±SD	95% Interval spolehlivosti průměru		<i>p</i>
			Dolní mez	Horní mez	
<i>Exon 12 (1236C>T)</i>					
CC	30	15,0 ± 23,2	6,4	23,7	
CT	47	5,0 ± 7,8	2,7	7,3	0,029 ²
TT	10	8,1 ± 15,0	2,6	18,9	NS

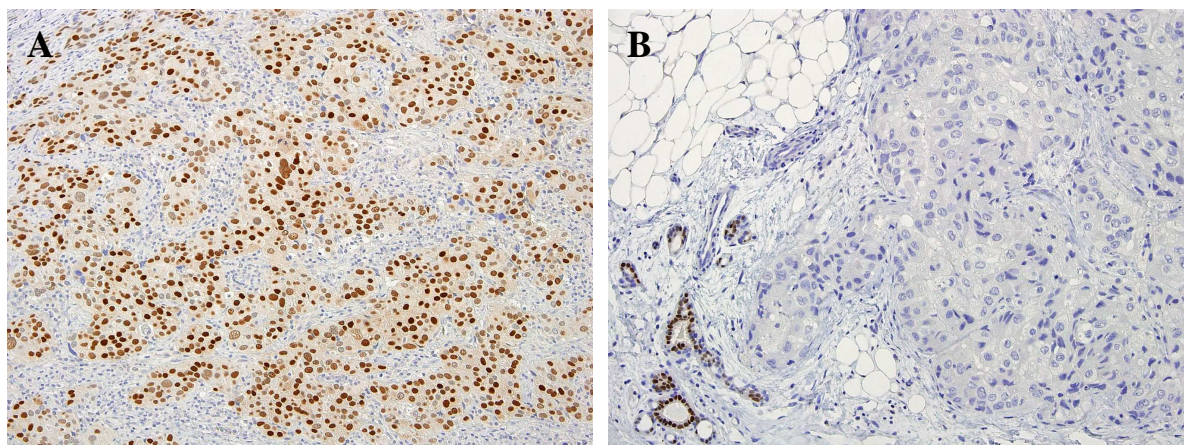
CT + TT	57	5,6 ± 9,4	3,1	8,1	0,039 ²
Exon 26 (3435C>T)					
CC	15	12,9 ± 18,3	2,8	23,1	
CT	46	11,2 ± 18,6	5,6	16,7	NS
TT	23	2,4 ± 3,9	0,7	4,0	0,043 ²
CT+TT	69	8,2 ± 15,9	4,4	12,0	NS

¹Počet stanovených vzorků

²Oboustranný t-test

4.3.3. Vztah mezi klinicko-patologickými charakteristikami pacientek, polymorfismy a expresí ABCB1

Vztah mezi SNPs *ABCB1* a klinicko-patologickými charakteristikami pacientek byl analyzován pomocí *Fisherova* exaktního testu. V nádorové tkáni byl nalezen významný vztah mezi expresí estrogenového receptoru a polymorfismy v exonech 12 a 26 (Obrázek č.11). Nosičky variantního genotypu 1236TT v exonu 12 měly významně častěji karcinomy bez exprese estrogenového receptoru v porovnání s pacientkami s normálním genotypem CC ($p = 0,011$; Tabulka č.12). Podobný trend byl nalezen u heterozygotek ve srovnání s nosičkami normálního genotypu v exonu 26, avšak s hraniční významností ($p = 0,051$; Tabulka č.12). U ostatních studovaných polymorfismů byla nalezena významná asociace už pouze u intronu 1. Nosičky variantní alely (-1)AA v intronu 1 měly invazivní lobulární karcinom na rozdíl od pacientek, které nesly normální genotyp, které měly častěji invazivní duktální karcinom ($p = 0,014$). Žádný další významný vztah mezi polymorfismy a ostatními klinicko-patologickými charakteristikami nebyl nalezen. Obdobně tomu bylo i při porovnání hladiny transkriptů *ABCB1* se studovanými klinicko-patologickými charakteristikami, kde nebyla nalezena vůbec žádná významná korelace.



Obrázek č.11: Imunohistochemické stanovení, exprese estrogenového receptoru se liší mezi nosičkami genotypů *ABCB1* v exonu 12. (A) Normální genotyp CC v exonu 12: jádra nádorových buněk jsou pozitivní, stromální buňky negativní. (B) Variantní genotyp TT v exonu 12: jádra nenádorové prsní duktální a lobulární tkáně jsou pozitivní (na levé straně) jako interní kontrola imunohistochemické reakce kdežto nádorové buňky jsou negativní.

Tabulka č.12: Významné vztahy mezi polymorfismy *ABCB1* a klinicko-patologickými charakteristikami pacientek.

Genotyp <i>ABCB1</i> ¹	negativní estrogenový receptor	pozitivní estrogenový receptor	<i>p</i> ¹
<i>Exon 12 (1236C>T)</i>			
CC	8	23	-
CT	18	26	0,222
TT	8	3	0,011
CT nebo TT	26	29	0,067
N ²	34	52	
<i>Exon 26 (3435C>T)</i>			
CC	3	14	-
CT	21	21	0,039
TT	10	14	0,173
CT nebo TT	31	35	0,051
N ²	34	49	

¹Fisherův oboustranný exaktní test

²Počet stanovených vzorků

Tučně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly.

4.4. Expresní profil genů cytochromů P450 u pacientek s karcinomem prsu

4.4.1. Exprese genů CYP1B1, CYP2C9, CYP2E1 A CYP3A4

Hladiny transkriptů *CYP2C9* a *CYP3A4* byly detekovány ve všech vzorcích ve velmi nízkých hladinách (Tabulka č.13). Hladiny transkriptu *CYP2C9* byly pod limitem kvantifikace (50 kopií na μg celkové RNA) u jednoho vzorku nádorové tkáně a u 9 vzorků okolní nenádorové tkáně. Hladiny transkriptu *CYP3A4* byly o něco málo vyšší než hladiny *CYP2C9* (Tabulka č.13). Hladiny transkriptu *CYP3A4* byly pod limitem kvantifikace u 14 vzorků ze 40 vzorků nádorové tkáně a u 5 vzorků ze 40 okolní nenádorové tkáně.

Transkript *CYP2E1* byl jednoznačně detekován ve všech vzorcích nádorové a okolní nenádorové tkáně (Tabulka č.13). Hladina transkriptu *CYP1B1* byla nejvyšší ve všech vzorcích a průměrné hodnoty přesahovaly hladinu transkriptu *CYP2E1* více než 50-krát (Tabulka č.13). Pouze jeden vzorek okolní nenádorové tkáně nevykazoval expresi genu *CYP1B1*.

Hladiny transkriptů byly v okolní nenádorové tkáni vyšší než v nádorové tkáni ve 22 vzorcích ze 30 u genu *CYP2C9* a ve 32 vzorcích ze 40 u genu *CYP3A4*.

Hladina transkriptu *CYP2E1* byla vyšší v okolní nenádorové tkáni oproti nádorové tkáni u 23 pacientek ze 40 a nižší u 17 pacientek. Hladina transkriptu *CYP1B1* byla vyšší v okolní nenádorové oproti nádorové tkáni u 27 pacientek ze 40.

Dále byly porovnány hladiny transkriptů *CYP2E1* a *CYP1B1* v periferních krevních lymfocytech s hladinami v nádorové a v okolní nenádorové tkáni. Byla nalezena vyšší hladina transkriptu *CYP2E1* v periferních krevních lymfocytech než v nádorové a v okolní nenádorové tkáni (v průměru téměř 5-krát vyšší hladina, Tabulka č.13). Hladina transkriptu *CYP2E1* v lymfocytech nekorelovala s hladinami v nádorové ani okolní nenádorové tkáni. Hladina transkriptu *CYP1B1* v periferních krevních lymfocytech všech pacientek byla významně vyšší než hladina *CYP2E1* (v průměru téměř 20-krát vyšší exprese, Tabulka č.13). Hladina transkriptu *CYP1B1* v lymfocytech byla v průměru 2-krát vyšší než v prsní tkáni (nádorové i okolní nenádorové, Tabulka č.13). Zajímavé také bylo, že hladina transkriptu *CYP1B1* v lymfocytech korelovala s hladinou v okolní nenádorové tkáni ($R^2 = 0,67$) i v nádorové tkáni ($R^2 = 0,42$).

Tabulka č.13: Hladiny transkriptů cytochromů P450 v nádorové, v nenádorové tkáni a v periferních krevních lymfocytech.

exprese <i>CYP/PPIA</i> v μ g celkové RNA					
Gen	Typ vzorku	Minimum	Maximum	Průměr \pm S.E.	Variabilita ²
CYP1B1	Lymfocyty	5,0	483,2	89,2 \pm 32,0	97
	Nádorová tkáň	0,2	300,5	47,6 \pm 11,5	1252
	Nenádorová tkáň	4,1	292,7	55,1 \pm 11,2	72
CYP2C9	Lymfocyty	BLQ	1,2x10 ⁻³	0,2x10 ⁻³ \pm 0,1x10 ⁻³	· ¹
	Nádorová tkáň	BLQ	279,3x10 ⁻³	19,3x10 ⁻³ \pm 7,1x10 ⁻³	· ¹
	Nenádorová tkáň	BLQ	404,7x10 ⁻³	50,9x10 ⁻³ \pm 13,9x10 ⁻³	· ¹
CYP2E1	Lymfocyty	0,1	77,1	4,6 \pm 4,3	857
	Nádorová tkáň	0,1	3,5	1,0 \pm 0,1	25
	Nenádorová tkáň	0,1	3,2	0,9 \pm 0,1	53
CYP3A4	Lymfocyty	BLQ	0,5x10 ⁻³	0,4x10 ⁻³ \pm 0,3x10 ⁻³	· ¹
	Nádorová tkáň	BLQ	217,6x10 ⁻³	24,1x10 ⁻³ \pm 8,1x10 ⁻³	· ¹
	Nenádorová tkáň	BLQ	910,8x10 ⁻³	136,3x10 ⁻³ \pm 36,1x10 ⁻³	· ¹

¹Nebyla stanovena žádná variabilita, protože hodnota minima byla pod limitem kvantifikace (BLQ).

²Poměr maxima ku minimu

4.4.2. Vztah mezi genovou expresí CYP a klinicko-patologickými charakteristikami pacientek

Hladiny transkriptů *CYP1B1* a *CYP2E1*, které byly nejvyšší ze sledovaných genů *CYP*, byly porovnány s klinicko-patologickými charakteristikami pacientek. Hladina transkriptu *CYP1B1* nekorelovala s žádnými klinicko-patologickými charakteristikami. Naproti tomu hladina *CYP2E1* byla významně vyšší v invazivních lobulárních karcinomech oproti invazivním duktálním karcinomům ($p = 0,028$; Tabulka č.14). Dále, hladina transkriptu *CYP2E1* byla vyšší v okolní nenádorové tkáni pacientek s nádory bez exprese progesteronového receptoru ve srovnání s pacientkami s expresí progesteronového receptoru ($p = 0,026$; Tabulka č.14). Hladina *CYP2E1* v nádorové tkáni pacientek s klinickým stádiem nemoci I byla vyšší než u pacientek ve vyšším stádiu nemoci (II, III nebo IV; $p = 0,070$; Tabulka č.14). Věk ani menopauzální stav pacientek neovlivnily sledované vztahy.

Tabulka č.14: Vztahy mezi hladinou transkriptu CYP2E1 a klinicko-patologickými charakteristikami pacientek.

Typ tkáň	Charakteristika	N ¹	CYP2E1 exprese	95% Interval spolehlivosti	
				Průměr ±SE ²	Dolní mez
Nádorová tkáň F=5,29; <i>p</i> = 0,028	duktální invazivní karcinom	30	0,85±0,12	0,60	1,10
	lobulární invazivní karcinom	7	1,61±0,45	0,51	2,71
Nenádorová tkáň F=5,33; <i>p</i> = 0,026	exprese PR	18	0,62±0,08	0,45	0,79
	bez exprese PR	22	1,10±0,17	0,73	1,46
Nádorová tkáň F=3,47; <i>p</i> = 0,070	stádium I	12	1,32±0,32	0,60	2,03
	stádium II-IV	28	0,81±0,17	0,58	1,04

¹Počet stanovených vzorků

²CYP2E1/PPIA v µg celkové RNA, průměr a standardní chyba průměru

5. Diskuze

5.1. Význam polymorfismu, genové a proteinové exprese NQO1 u pacientek s karcinomem prsu

V několika předchozích studiích byl nalezen významný vztah mezi funkčně důležitým polymorfismem Pro187Ser genu *NQO1* a rizikem karcinomu prsu [77, 113, 114]. Skupina kolem Fagerholm a kol. testovala dvě velké nezávislé skupiny pacientek s karcinomem prsu, u kterých našli spojitost mezi variantním genotypem Ser/Ser genu *NQO1* a přežitím pacientek [115]. Závěrem této studie také bylo, že odpověď na chemoterapii, založené na účincích antracyklinů, je neúčinná právě u karcinomů prsu, které díky knock-out SNP Pro187Ser nemají dostatek funkčního proteinu NQO1 [115]. Z tohoto důvodu byl tento SNP v genu *NQO1* navržen jako možný cíl studia cílené terapie. Naším cílem bylo ověřit dříve publikovaná data a prozkoumat funkční aspekty výše uvedených nálezů u pacientek s karcinomem prsu.

Nejprve jsme se zaměřili na studium vztahů mezi genotypem *NQO1* Pro187Ser v DNA lymfocytů a hladinou transkriptů a expresí proteinů ve vzorcích tkání karcinomů prsu. Poté jsme vyhodnotili vztahy mezi *NQO1* (polymorfismem, hladinou transkriptu a expresí proteinu) a klinicko-patologickými charakteristikami pacientek s karcinomem prsu.

Pacientky, u kterých nebyla nalezena exprese proteinu NQO1, měly významně nižší hladiny transkriptů než pacientky, u kterých byla exprese proteinu NQO1 prokázána. Tento významný vztah mezi transkriptem *NQO1* a hladinami proteinu NQO1 byl ve validačním souboru zopakován. Navíc, rozdělení imunohistochemického skóre proteinu NQO1 v naší studii (41% skóre 0, 12% skóre 1+, 18% 2+, 29% 3+) bylo srovnatelné s dříve publikovanou studií Cleton-Jansen et al u 354 pacientů s karcinomem prsu (43% negativní, 37% slabé zbarvení, 20% silné zbarvení)[116].

Některé naše další výsledky rovněž potvrzují dříve publikované nálezy. Jedinci nesoucí variantní genotyp *NQO1* Ser/Ser mají z důvodů zvýšené degradace ubiquitin proteazomálním systémem nedostatek proteinu NQO1 [117, 118, 119]. U obou námi studovaných souborů se nám podařilo potvrdit absence proteinu NQO1 v nádorových buňkách u pacientek, které byly nosičkami variantního genotypu *NQO1*. Naproti tomu, absence proteinu NQO1, kterou jsme našli v nádorových buňkách u 38,6 % pacientek s normální genotypem, může být přisuzováno nádorově řízenému tlumení exprese *NQO1* [120].

U jedinců české a rakouské populace byly variantní alely *NQO1* (rs1800566; Pro187Ser) a *TP53* (rs60388830; Pro72Ser) spojeny s vysokým rizikem vzniku karcinomu prsu (odds ratio = 1,88, P = 0,011) [113]. Posléze byl jinými autory navržen nový model buněčné odpovědi na léčbu antracykliny (chinoidní struktury) u karcinomu prsu, který je zprostředkován geny *NQO1* a *TP53* [115]. Z funkčního hlediska je známo, že *NQO1* stabilizuje *TP53* před 20S proteazomální degradací [121, 122, 123]. Nicméně informace o charakteru vztahu mezi expresí proteinů *NQO1* a *p53* u lidských nádorových tkání nebyly před naší studií známy. Karcinom prsu je pro tento účel optimálním modelem, protože imunohistochemické stanovení *p53* je rutinně používáno v jeho diagnostice. V námi sledovaném evaluačním souboru měly pacientky, v jejichž nádorech nebyla nalezena exprese proteinu *NQO1*, významně častěji nedetekovatelnou expresi proteinu *p53*. Skupina pacientek bez nalezené exprese *NQO1* a *p53* byla nejvíce zastoupenou skupinou v námi studovaném souboru (45% všech hodnocených vzorků). Nicméně, následná analýza validačního souboru odhalila spíše opačný trend (Hubáčková a kol. – Příloha č.1). Z tohoto důvodu nelze zatím tvrdit, že by vztah mezi hladinou proteinů *NQO1* a *p53* u pacientek s karcinomem prsu hrál významnou úlohu.

Analýza klinicko-patologických charakteristik pacientek v evaluačním souboru ukázala absenci exprese proteinu *NQO1* v nádorech pacientek s pokročilým stádiem nemoci (stádium III nebo IV) ve srovnání s pacientkami s méně pokročilým stádiem nemoci (stádium I nebo II), kde bylo nalezeno 21 pozitivních a 17 negativních vzorků. Tento nález však analýzou validačního souboru nebyl potvrzen.

Na závěr lze konstatovat, že naše studie potvrdila dříve publikovaný vztah mezi „knock-out“ SNP v *NQO1* a hladinou proteinu a přinesla novou informaci ve formě nálezu korelace hladin transkriptu a proteinu *NQO1*. Původně nalezená korelace mezi expresí proteinu *p53* a *NQO1*, která nebyla analýzou validačního souboru potvrzena, zdůraznila zásadní význam začlenění validačních souborů do budoucích studií.

5.2. Význam genů kódujících oxidativní stres a jejich úloha v prognóze pacientek s karcinomem prsu

Oxidativní stres ovlivňuje v lidské populaci mnoho nemocí, např. aterosklerózu, infarkt myokardu nebo Parkinsonovu chorobu, na druhé straně však může mít krátkodobé působení oxidativního stresu důležitou úlohu v prevenci proti stárnutí [124]. Pro buněčnou signalizaci jsou prospěšné reaktivní formy kyslíku, které při zánětu organismu pomocí imunitního systému napadají patogeny. Navíc má oxidativní stres i velmi rozporuplnou úlohu v karcinogenezi. Reaktivní formy kyslíku ovlivňují apoptózu [125], proliferaci nebo vznik karcinomu [126]. Působením antracyklinů a cyklofosamidů dochází během nádorové terapie k tvorbě oxidativního stresu [127, 128]. Ačkoli již mnoho studií prozkoumalo vztah mezi geny kódujícími enzymy, které ovlivňují oxidativní stres, a rizikem karcinomu prsu, pouze pár z těchto studií studovalo také jejich možné účinky na prognózu, přežívání či výsledek použité terapie pacientek s karcinomem prsu. Většina těchto studií byla zaměřena na sledování jednoho genu nebo analýzy SNPs a haplotypů v několika vybraných kandidátních genech [115, 129, 130, 131]. Naše studie proto zkombinovala jak hodnocení funkčních SNPs tak i hladin transkriptů kandidátních genů (*NQO1*, *NQO2*, *SOD2* a *SOD3*) s významnými prognostickými faktory a PFS. Pro vyhodnocení hladiny transkriptů *NQO1* byla použita metoda qPCR s absolutní kvantifikací dle předchozí studie [Hubáčková a kol. – Příloha č.1]. V naší studii byly nalezeny významně zvýšené hladiny transkriptů *NQO2* a *SOD2* v nádorové tkáni v porovnání s okolní nenádorovou tkání karcinomu prsu. Analýza klinicko-patologických charakteristik pacientek však již neukázala žádný další významný vztah hladin transkriptů genů *NQO1*, *NQO2* nebo *SOD2* s prognostickými markery nebo PFS.

Gen *NQO1* byl v této studii podrobněji studován na větším souboru pacientek a snahou bylo ověřit námi nalezené významné vztahy z předchozí studie [Hubáčková a kol. – Příloha č.1]. Byl potvrzen nález, že úloha genu v karcinogenezi prsu nesouvisí s klasickými klinicko-patologickými faktory. Nebyly nalezeny žádné významné vztahy mezi klinicko-patologickými charakteristikami pacientek a hladinami transkriptů a SNP rs1800566 genu *NQO1*. Nebyla potvrzena ani silná prediktivní a prognostická úloha u pacientek s karcinomem prsu dostávajících antracykliny ani nebyla prokázána interakce se stavem proteinu p53 nalezených v předchozí studii [115]. Tato studie navíc nepotvrdila ani vztah mezi PFS a SNP rs1800566 genu *NQO1* u pacientek léčených antracykliny.

Dalším naším předpokladem bylo, že gen *NQO2* může přispět k progresi karcinomu prsu [123]. V naší studii jsme našli, že pacientky, nesoucí alelu Leu v SNP rs1143684 *NQO2* spojenou s nízkou aktivitou proteinu, měly mírně nižší riziko vzniku pokročilejších stádií nemoci (stádium II-IV) nebo nemoci se špatnou prognózou (nádory bez nalezené exprese PR) než pacientky nesoucí genotyp Phe/Phe kodující protein s normální aktivitou. Tyto výsledky tak naznačovaly možné spojení mezi genem *NQO2* a prognózou karcinomu prsu v podskupině pacientek bez nalezené exprese PR, které však analýzou PFS ani vyhodnocením hladin transkriptů *NQO2* nebylo možné vysvětlit. Vztah SNP rs1143684 genu *NQO2* k PFS pacientek s karcinomem prsu jsme v souladu s předchozí publikovanou studií nenašli [132].

Funkce genu *SOD2* může být ovlivněna expresí ER a p53, a tudíž může být velmi důležitá pro progresi a léčbu karcinomu prsu [126, 133]. Pacientky s karcinomem prsu, kteří byli nosiči alely Ala v SNP rs4880 genu *SOD2*, kteří byli léčeni cyklofosfamidem, měli horší přežití než pacienti s genotypem Val/Val kodujícím protein s nízkou aktivitou [129, 134]. V naší studii, SNP rs4880 genu *SOD2* významně nemodifikoval PFS pacientek léčených cyklofosfamidem (n=89). Nicméně, po vyřazení pacientek, které byly navíc ještě léčeny i hormonální terapií (např. tamoxifen nebo aromatázové inhibitory), byl účinek tohoto SNP odhalen. Nosičky genotypu Ala/Ala v SNP rs4880 genu *SOD2*, který kóduje protein o vysoké aktivitě, léčené režimy obsahujícími cyklofosfamid bez hormonální terapie měly významně horší PFS než nosičky alely Val ($p = 0,004$). Tento výsledek byl později potvrzen i analýzou pacientek rozdělených podle exprese ER a PR. Ve skupině pacientek bez nalezené exprese receptorů (tj. kandidátky pro chemoterapii) SNP rs4880 genu *SOD2* významně změnil PFS stejně jako ve skupině pacientek léčených cyklofosfamidem. Naše výsledky tak podpořily výše citované studie. V naší studii nebyl nalezen žádný další významný vztah mezi hladinami transkriptu *SOD2*, SNPs, prognostickými faktory a PFS. Nebyl tak ověřen nálezný skupiny McAtee a kol., kteří našly významný vztah mezi hladinou transkriptu *SOD2*, proteinu a aktivity, která byla významně nižší u nositelů genotypu Val/Val než Ala/Ala v SNP rs4880 genu *SOD2* [135].

Úloha a význam genu *SOD3* v prognóze pacientek s karcinomem prsu nebyla zatím podrobněji studována. Naše studie v tomto ohledu přinesla kompletně nové výsledky. Dříve publikovaná studie používající buněčné modely karcinomů prsu ukázala, že zvýšená exprese *SOD3* může být nadějnou strategií pro zvýšení účinků heparin/LMWH (heparin s nízkou molekulovou hmotností = low molecular weight heparin) tím, že by inhibovala heparanázu. Tento nálezný by tak mohl mít důsledky pro léčbu pacientek s karcinomem prsu [136]. V naší

studii jsme objevili následující trend v expresi genu *SOD3*: nádory grade 3 < grade 1 nebo 2 < nenádorová tkáň. Tento náález potvrzuje dříve publikované studie a poukazuje na protektivní vlastnosti genu *SOD3* proti tumorigenezi [136]. Snížená exprese genu *SOD3* v plicních nádorech byla publikována již dříve a autoři navrhli, že by to mohlo mít potenciální účinky na extracelulární regulaci faktorů regulujících angiogenezi a invazi [137, 138]. Naše data tak podpořila dříve předpokládanou úlohu genu *SOD3* v karcinogenezi [139, 140]. Pacientky s nalezenou expresí ER (nebo obou ER a PR) v nádorech nesly významně častěji alelu Thr SNP rs2536512 genu *SOD3*. Funkční význam SNP rs2536512 včetně dalšího studovaného SNP rs699473 genu *SOD3* je neznámý a nebyly publikovány ani jiné studie, které by se vztahem těchto SNPs k prognóze pacientů s jakýmkoliv typem karcinomů zabývaly. Kromě toho, naše studie nenašla žádný významný vztah mezi hladinami transkriptu *SOD3* a PFS. Často studovaný SNP genu *SOD3*, rs1799895, je znám jako funkční [101], ale překvapivě jsme nenašli žádné nosičky variantní alely (n = 321). Nejzajímavějším nálezem v naší studii byl vztah SNP rs699473 genu *SOD3* v intronu 1 k PFS u všech sledovaných pacientek, který byl ještě významnějším ve skupině pacientek léčených pouze hormonálním režimem. Naše výsledky tak naznačily možnou úlohu genu *SOD3* v prognóze pacientek s karcinomem prsu.

Závěrem můžeme konstatovat, že naše studie ukázala, že enzymy modifikující oxidativní stres představují nadějnou oblast pro hledání prognostických markerů karcinomu prsu. Nicméně vztahy, které jsme identifikovali, jsou poměrně složité. Tato skutečnost je dobře prokázána objevem řady zajímavých vztahů mezi prognostickými faktory a doposud málo studovaným genem *SOD3*.

5.3. Význam polymorfismů genu mnohočetné lékové rezistence 1 (*ABCB1*) na expresi a klinicko-patologické charakteristiky pacientek s karcinomem prsu

Tato studie poskytla komplexní analýzu genetické variability a exprese genu *ABCB1* v souvislosti s klinicko-patologickými charakteristikami 90 českých pacientek s karcinomem prsu. Komplexní analýza tohoto rozsahu, která by se zabývala vztahem genetické variability a fenotypu *ABCB1* ke karcinomu prsu do té doby neexistovala. Nalezené frekvence alel u 6 stanovených polymorfismů (rs2214102, rs9282564, rs2229109, rs1128503, rs2032588 a rs1045642) byly v souladu s již dříve publikovanými frekvencemi alel amerických bělochů (n

= 120) [141] a s německou studií (n = 464) [142]. Frekvence alely 3435T zjištěná u slovanské populace (Rusové) je téměř identická s našimi výsledky ($q_T = 0,54$, n = 290) [143] a je vysoce podobná výsledkům publikovaných na španělské populaci (n = 408, $q_T = 0,48$) [144]. Překvapivě se naše výsledky odlišovaly od údajů publikovaných na jiné slovanské populaci (polská) ($q_T = 0,38$, m = 122) [145]. Podobně jako u jiných genů, tak byla nalezena variabilita mezi etniky pro některé studované polymorfismy genu *ABCB1* [146].

Hlavním cílem naší studie bylo vyhodnotit účinky některých SNPs genu *ABCB1* na expresní profil genu *ABCB1* u pacientek s karcinomem prsu. Pro vyhodnocení hladiny transkriptů genu *ABCB1* jsme vyvinuli vysoce citlivou metodu založenou na qPCR s absolutní kvantifikací, která již byla použita i v předchozích dvou studiích (Hubáčková a kol. – Příloha č.1 a č.2). Gen *ABCB1* byl jednoznačně exprimován ve většině párových vzorků nádorové a okolní nenádorové tkáně. Nalezli jsme sníženou expresi *ABCB1* u většiny vzorků nádorové tkáně oproti okolní nenádorové tkáni. Naproti tomu v předchozí studii byla publikována významně vyšší hladina *ABCB1* karcinomu prsu v porovnání s okolní nenádorovou tkání (n=40) [147]. Hladina mRNA *ABCB1* byla významně indukována chemoterapií (n=40) a tato indukce byla označena jako mírně vyšší v nenádorové tkáni v porovnání s nádorovou tkání [148]. Výsledky jiných autorů tedy naznačily, že exprese *ABCB1* může být významně změněna během progresu nádoru a/nebo při vystavení protinádorovým lékům. U pacientek léčených neoadjuvantní chemoterapií ani u pacientek, které před operací nebyly léčeny, jsme však v nádorových tkáních žádné rozdíly nenašli. V naší studii mělo 8 ze 39 pacientek vyšší expresi *ABCB1* v nádorové tkáni oproti okolní nenádorové tkáni. Vysoká exprese *ABCB1* v nádorové tkáni je považována za rizikový faktor selhání antracyklinové chemoterapie či chemoterapie založené na taxanech [149, 150]. Pacientky se zvýšenou expresí *ABCB1* tak mohou být kandidátkami pro cílenou terapii, zahrnující *ABCB1* inhibitory jako verapamil, cyklosporin A, quinidin apod. [151].

Naše výsledky ukázaly, že SNP v exonu 12 rs1128503 (1236C>T) a 26 rs1045642 (3435C>T) ovlivňují expresi genu *ABCB1*. Proto se tyto polymorfismy jeví jako ideální kandidáti studií zaměřených na objasnění funkce polymorfismů *ABCB1*. V literatuře jsou k dispozici především údaje o analýze SNP 3435C>T ovlivňujícího expresi *ABCB1*. Jedna z prvních prací ukázala souvislost variantního genotypu 3435TT v exonu 26 se sníženou hladinou mRNA genu *ABCB1* ve dvanáctníku a výslednou vyšší koncentrací digoxinu v plasmě [152]. Obdobné to bylo i v další studii SNP 3435C>T, kde byly v periferních krevních buňkách nalezeny významně vyšší hladiny mRNA *ABCB1* u pacientů s genotypem CC v porovnání s homozygoty TT [153]. Kromě toho, ve vzorcích lidských jater byly

publikovány významně vyšší hladiny exprese mRNA *ABCB1* u nosičů 3435C alely v porovnání s nosiči 3435T alely. Snížená hladina mRNA souvisela se změnou stability mRNA [154]. U SNP 1236C>T byla nalezena souvislost s expresí mRNA *ABCB1* ve střevě [155] a kostní dřeni [156]. Je zřejmé, že dostupné informace o funkčním významu SNPs *ABCB1* jsou nejednoznačné a detailní studie haplotypů SNPs je velmi potřebná. Kroetz a kol. popsal existenci 64 haplotypů *ABCB1* [141]. U bělochů byly na základě analýzy 10 SNPs odhaleny 4 hlavní haplotypy, které se vyskytovaly s frekvencí vyšší než 4%. Kromě hlavních haplotypů byly sledovány také subhaplotypy. Subhaplotyp SNP složený z T alel v exonech 12, 21 a 26, byl zastoupen s vysokou frekvencí (33,8%) [157]. Navzdory tomu, že někteří autoři publikovali vliv exprese *ABCB1* na výsledky chemoterapie [149, 150], vztah mezi SNP *ABCB1* a fenotypem v tkáni pacientek s karcinomem prsu nebyl dosud publikován.

Ze studovaných klinicko-patologických charakteristik pacientek, byla nalezena souvislost mezi expresí ER a SNP *ABCB1* v exonu 12 a 26. Pacientky nesoucí variantní alely, které snižovaly expresi *ABCB1*, měly významně častěji nádory bez nalezené exprese ER v porovnání s pacientkami nesoucími normální alelu. Exprese ER a PR je velmi dobře zavedený prognostický i prediktivní faktor u karcinomu prsu a představuje tak důležitou informaci pro volbu chemoterapie nebo hormonálního režimu v léčbě. V době kdy probíhala naše studie nebyly v literatuře dostupné žádné informace, které by naznačovaly možné vztahy jednotlivých SNP *ABCB1* s expresí ER. Turgut a kol. publikovali, že SNP 3435C>T nesouvisí s klinicko-patologickými charakteristikami pacientek s karcinomem prsu (n=57), nicméně, žádné informace o genové expresi *ABCB1* ani o stavu ER/PR nebyly publikovány [158]. Nordgard a kol. publikovali vztah mezi několika haplotypy *ABCB1* a stavem ER a PR ($P < 0,05$) [170]. Seymour a kol., rovněž našli významný vztah mezi hladinami *ABCB1* proteinu a pacienty s expresí ER [159]. Další studie pak nenalezly korelaci mezi expresí *ABCB1* proteinu a stavem ER nebo PR [147, 160].

Závěrem lze říci, že exprese *ABCB1* byla nižší ve většině nádorových vzorků v porovnání s okolními nenádorovými vzorky. Nalezený vztah polymorfismů *ABCB1* s expresí ER pacientek je třeba potvrdit na rozšířené analýze haplotypů. Polymorfismy v exonu 12 a 26 ovlivnily expresi *ABCB1*, a proto se jeví jako vhodné kandidáty pro další studium příčin rezistence karcinomu prsu.

5.4. Význam exprese genů cytochromů P450 u pacientek s karcinomem prsu

Naše výsledky ukázaly, že hladiny transkriptů *CYP2C9* a *CYP3A4* v nádorové i okolní nenádorové tkáni byly přítomny ve velmi nízkých koncentracích. Hodnoty těchto expresí v nádorové a okolní nenádorové tkáni byly v souladu s předchozími studii [67, 71, 161, 59]. Hladiny exprese *CYP2C9* a *CYP3A4* byly obvykle vyšší v okolní nenádorové tkáni než v nádorové tkáni. Nález rozdílné exprese *CYP3A4* mezi nádorovou a okolní nenádorovou tkání tak potvrdil již dříve publikované výsledky [72, 162], u genu *CYP2C9* však tento jev dříve pozorován nebyl [72]. Naše data spolu s nálezy ostatních skupin ukázaly, že exprese genů *CYP2C9* a *CYP3A4* je během karcinogeneze většinou snížena. Hladina proteinu P450 3A4 v nádorové tkáni je dle Miyoshi a kol. údajně spojena s nízkou odpovědí na léčbu docetaxelu [163]. V námi sledované skupině pacientek však velmi nízká exprese transkriptu *CYP3A4* ve všech vzorcích nádorové tkáně tuto možnou prediktivní úlohu nepotvrdila. Důvodem však může být to, že my jsme sledovali hladinu mRNA, kdežto skupina Miyoshi a kol. sledovala hladinu proteinu. To samé platí pro gen *CYP2C9*.

Údaje o expresi *CYP2E1* ve tkáních karcinomu prsu byly v literatuře protichůdné. Ve studii Modugno a kol. nebyla exprese *CYP2E1* detekován v nádorové ani v okolní nenádorové tkáni [72], i když dvě předchozí studie prokázali jeho expresi v nádorové [164] tak i okolní nenádorové tkáni [165]. Přítomnost proteinu P450 2E1 byla ve tkáních karcinomů prsu stanovena imunohistochemicky [166], ve studii Haas a kol. to bylo pouze u 45% vzorků karcinomů, tedy ve 175 z 393 [59]. Přitom v naší studii byla exprese transkriptu *CYP2E1* jednoznačně nalezena ve všech vzorcích nádorové i okolní párové nenádorové tkáně pacientek s karcinomem prsu. U čtyř ze 40 pacientek byla v nádorové tkáni navíc pozorována zvýšená exprese (3-krát) genu *CYP2E1*. Tyto pacientky by tak mohly potenciálně těžit z proléčiv aktivovaných právě P450 2E1 (např. etoposide) [75]. Na druhou stranu stojí také za zmínku, že u metabolismu řady substrátů P450 2E1 dochází ke zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku a deregulaci apoptotických drah [167]. Přesto se gen *CYP2E1* jeví jako možný potenciální prognostický marker v karcinogenezi.

V průměru nejvyšší exprese ze všech studovaných genů *CYP* byla nalezena u genu *CYP1B1*. To podporuje skutečnost, že P450 1B1 je extrahepatální enzym. Naše výsledky tak potvrdily nálezy z předchozích studií, ve kterých byla exprese *CYP1B1* v nádorové a nenádorové tkáni pacientů s karcinomem prsu prokázána [72, 161, 164]. Murray a kol. ve své

studii detekovali P450 1B1 imunohistochemicky ve všech vzorcích invazivního duktálního karcinomu (12/12) oproti žádnému vzorku normální tkáně (0/12) [61]. Naproti tomu studie Haas a kol. našla expresi P450 1B1 pouze u 16,5% (65 z 393) ze sledovaných pacientek s karcinomem prsu (imunohistochemicky) [59]. Přitom v naší studii byla exprese *CYP1B1* prokázána ve všech sledovaných vzorcích karcinomu prsu. Podle našeho názoru tak tento výsledek naznačuje, že detekce exprese mRNA genu *CYP1B1* může být citlivější než imunohistochemické stanovení proteinu a tím lépe odrážet jednotlivé vlastnosti tkání. Hladiny exprese genu *CYP1B1* byly v okolní nenádorové tkáni vyšší než v nádorové tkáni většiny pacientek což souhlasí s výsledky předchozí studie [72]. V naší studii byla, tak jako v případě *CYP2E1*, stanovena vyšší exprese *CYP1B1* v nádorové tkáni několika pacientek (3,3-, 7,2-, a 22,9-krát). Tyto pacientky by mohly podobně jako u P450 2E1 potenciálně těžit z účinků léčiv založených na enzymatické aktivaci pomocí P450 1B1. V současné době jsou vyvíjena imunoterapeutika P450 1B1, proléčiva aktivovaná P450 1B1 a inhibitory P450 1B1, které by byly schopné využít přítomnost a aktivitu tohoto enzymu v nádorových buňkách [168].

Naše studie navíc jako první porovnávala expresi genů *CYP* v tkáních karcinomu prsu s expresí v lymfocytech. Expresí *CYP2C9* a *CYP3A4* ve všech dostupných vzorcích lymfocytů pacientek byla zanedbatelná (soubor 18 vzorků). Expresí *CYP1B1* a *CYP2E1* v lidských lymfocytech, která byla detekovaná v předchozích studiích [58, 106], byla v naší studii potvrzena. Významná korelace byla nalezena pro expresi genu *CYP1B1* mezi nenádorovou tkáni a lymfocyty. To naznačuje, že lymfocyty by mohly sloužit jako maker pro monitorování hladiny *CYP1B1* v lidské nenádorové prsní tkáni. Naše studie však byla provedena na velmi malém souboru vzorků lymfocytů, a proto potvrzení na větším nezávislém souboru je nezbytné.

Hladiny exprese *CYP1B1* a *CYP2E1* byly také porovnány s klinicko-patologickými charakteristikami pacientek. Expresí *CYP1B1* nekorelovala s žádným ze sledovaných charakteristik. Expresí *CYP2E1* byla vyšší v nenádorových tkáních pacientek, které neměly expresi PR v nádorech. Podobný nález byl již dříve publikován skupinou Haas a kol., kde byla vyšší hladina P450 1B1 nalezena v nádorech bez exprese ER ($p=0,006$) [59]. Významně vyšší exprese *CYP2E1* námi nalezená v tumorech pacientek s invazivním lobulárním typem karcinomu v porovnání s pacientkami s invazivním duktálním karcinomem ukazuje, že exprese *CYP2E1* může být indikátorem rozdílných typů karcinomu prsu. Souvislost mezi expresí *CYP2E1* a typem karcinomů prsu nebyla dříve publikována. V literatuře je velký nedostatek informací, které by se zabývaly spojitostí mezi mRNA *CYP* a hladinami exprese proteinů P450 v nádorových tkáních. Tudíž, podle našeho názoru, mRNA a hladiny proteinů

je třeba zatím považovat za nezávislé markery prognózy a profilování genové exprese by se tak mohlo stát vysoce hodnotným nástrojem v molekulární patologii karcinomu prsu [169].

Závěrem můžeme konstatovat, že exprese *CYP2C9* a *CYP3A4* byla ve většině sledovaných vzorcích zanedbatelná. Gen *CYP2E1* byl exprimován na významné hladině v nádorové a okolní nenádorové tkáni a našli jsme i souvislosti s některými klinicko-patologickými charakteristikami pacientek. Rozdíly v expresi genu *CYP1B1* v nádorové tkáni pacientek mohou vyvolat rozdílnou odpověď na léky, které jsou substráty P450 1B1. Dále může vysoká hladina *CYP1B1* ovlivnit metabolismus estrogenu nebo přispět k aktivaci environmentálních prokarcinogenů. Můžeme také potvrdit dříve navržené potenciální využití exprese *CYP1B1* v nádorech prsu k aktivaci nových proléčiv a ve strategii očkování proti nádorovým buňkám.

6. Závěry

▪ Významem polymorfismu, genové a proteinové exprese NQO1 u pacientek s karcinomem prsu

Studie potvrdila dříve publikovaný vztah mezi „knock-out“ SNP rs1800566 genu *NQO1* a hladinou proteinu, kde u všech pacientek s variantním genotypem nebyla v nádorové tkáni imunohistochemicky nalezená hladina proteinu NQO1. Novou informaci pak přinesla korelace mezi hladinou transkriptu a proteinu NQO1. Pacientky, u kterých nebyla nalezena exprese proteinu NQO1, měly významně nižší také hladinu transkriptů NQO1. Původně nalezená korelace mezi expresí proteinu p53 a NQO1 v evaluačním souboru, kdy pacientky s absencí proteinu NQO1 měly častěji nedetekovatelnou expresi proteinu p53, nebyla analýzou validačního souboru potvrzena. Tímto byl zdůrazněn význam začlenění validačních souborů do budoucích studií.

▪ Význam genů kódujících oxidativní stres a jejich úlohu v prognóze pacientek s karcinomem prsu

Expresce byla detekována ve všech sledovaných genech, významně zvýšené hladiny byly nalezeny u genu *NQO2* a *SOD2* a to v nádorové tkáni v porovnání s okolní nenádorovou tkáni. U genu *NQO2* byl nalezen významný vztah v SNP rs1143684, který byl asociován se stádiem nemoci. Pacientky s Leu alelu genu *NQO2* měly nižší riziko vzniku pokročilejších stádií nemoci (stádium II-IV) nebo nemoci s horší prognózou (nádory s absencí exprese hormonálních receptorů). Nosičky genotypu Ala/Ala v SNP rs4880 *SOD2*, které byly léčené režimy obsahujícími cyklofosfamid bez hormonální terapie, měly významně horší PFS než ostatní pacientky. Podobný nález byl odhalen také ve skupině pacientek jejichž nádory byly bez exprese ER a PR. U genu *SOD3* byl odhalen protektivní trend exprese transkriptu, která byla nejvyšší v okolní nenádorové tkáni a nejnižší v nádorové tkáni s grade 3. Nejzajímavějším nálezem byl vztah SNP rs699473 genu *SOD3* k PFS.

▪ Význam genu *ABCB1* v prognóza pacientek s karcinomem prsu

Byl nalezen vztah mezi expresí a genetickými polymorfismy rs1128503 a rs1045642 genu *ABCB1*. Byl nalezen také vztah těchto polymorfismů s expresí ER v nádorech. Pacientky, které nesly variantní alely těchto SNPs *ABCB1* měly významně častěji nádory, ve

kterých nebyla nalezena exprese ER. Nalezená exprese genu *ABCB1* byla nižší ve většině nádorových vzorků v porovnání s okolními nenádorovými vzorky.

▪ **Význam cytochromů P450 v prognóze pacientek s karcinomem prsu**

Expresce genů *CYP2C9* a *CYP3A4* byly ve většině sledovaných vzorků nalezeny ve velmi nízkých hladinách. Expresce genu *CYP2E1* byla jednoznačně prokázána jak v nádorové tkáni i v okolní nenádorové tkáni. Expresce genu *CYP2E1* byla vyšší v nenádorové tkáni u pacientek, u kterých nebyla nalezena exprese PR. Vyšší exprese *CYP2E1* v nádorové tkáni byla nalezena i u pacientek s invazivním lobulárním typem karcinomu. Nejvyšší exprese byla nalezena u genu *CYP1B1*, jehož exprese byla vyšší v okolní nenádorové tkáni oproti nádorové tkáni a významně korelovala s hladinou v leukocytech.

7. Použité zkratky

Zkratka	Plný název
18S	Gen 18S (18S ribosomal RNA)
20S	Gen 20S (20S ribosomal RNA)
95% CI	95% konfidenční interval (Confidence Interval)
A	Adenin (6-aminopurin; purinová báze)
ABC transportéry	ATP-binding cassette transporters
ABCB1	ABC transportér- člen 1 podrodiny ABCB
AC	Doxorubicin a cyklofosfamid
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
Ala	Alanin (α -aminopropanová kyselina)
AT	Doxorubicin a paklitaxel
bp	base pairs- počet párů bazí označující velikost DNA fragmentu
BRCA1/2	Gen BRCA1/2 (Breast Cancer gene 1, Breast Cancer gene 2)
C	Cytosin (2-oxo-4-aminopyridin; pyrimidinová báze)
CAT	Kataláza
cDNA	Komplementární DNA
CMF	Cyklofosfamid, metotrexa a 5FU
CML	Chronická myeloidní leukémie
CYP	Cytochrom P 450
CYP1B1	CYP- člen 1 podrodiny CYP1B
CYP2C9	CYP- člen 9 podrodiny CYP2C
CYP2E1	CYP- člen 1 podrodiny CYP2E
CYP3A4	CYP- člen 4 podrodiny CYP3A
DICS	Duktální invazivní karcinom in situ
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	DeoxyriboNucleoside triphosphate- stavební jednotky při syntéze DNA
EC	Enzyme Commission number (EC number) – číselné schéma klasifikace enzymů dle reakcí, které katalyzují
EDTA	disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny
EGFR	Receptor pro epidermální růstový faktor
ER	Estrogenový receptor
FAC	5FU, doxorubicin a cyklofosfamid
FEC	5FU, epirubicin a cyklofosfamid
FFPE	Parafinové bločky fixované parafinem
G	Guanin (2-amino-6-hydroxypurin; purinová báze)
Ile	Isoleucin ((2S,3S)-2-amino-3-methylpentanová kyselina)
LCIS	Lobulární karcinom in situ
Leu	Leucin (2-amino-4-methylpentanová kyselina)
MDR	Mnohočetná léková rezistence (Multidrug Resistance)
MDR1	Gen MDR1 (Multidrug resistance 1, synonymum ABCB1)
MFO	Monooxygenázový systém
MQ	MiliQ voda (ultračistá voda)
mRNA	Messenger RNA – ribonukleová kyselina nesoucí informaci pro syntézu polypeptidů
MRP	Multidrug Resistant Protein
NADPH	Redukovaná forma Nikotinamidu adeninu dinucleotidfosfátu (Nicotinamide Adenine Dinucleotide)

	Phosphate)
NQO	NAD(P)H:chinon dehydrogenáza
NQO1	Gen NQO1 (NADPH Quinone Oxidoreductase 1)
NQO2	Gen NQO2 (NADPH Quinone Oxidoreductase 2)
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man-databáze všech známých onemocnění spolu s jejich genetickými komponentami
OR	Odds Ratio- angl. poměr dvou odds, neboli podílů pravděpodobností. Je mírou relativního rizika.
p	p-value- udává jaké chyby se dopouštíme, pokud zamítneme nulovou hypotézu
P 450	Cytochrom P 450
PCR	Polymérázová řetězová reakce
PFS	Doba přežití bez progresu
P-pg	P-glykoprotein
Phe	Fenylalanin ((2S)-2-amino-3-fenylpropanová kyselina)
PPIA	Gen PPIA (Peptidyl-Prolyl Isomerase A, synonymum Cyclophilin A)
PR	Progesteronový receptor
Pro	Prolin ((2S)-Pyrrolidin-2-karboxylová kyselina, (2S)-Azacyklopentan-2-karboxylová kyselina)
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (real-time polymerase chain reaction, také Quantitative real time polymerase chain reaction; Q-PCR/qPCR/qrt-PCR) je metoda založena na principu klasické PCR, umožňuje však kvantifikaci sledovaného úseku DNA.
r^2	Determinační koeficient užívaný v regresních modelech
RNA	Ribonukleová kyselina (Ribonucleic Acid)
rs	Referenční číslo polymorfismu (reference SNP ID number) v databázi; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP
Ser	Serin ((2S)-2-amino-3-hydroxypropanová kyselina)
SNP(s)	Jednonukleotidový polymorfismus/polymorfismy; (s)-označuje množné číslo
SOD2	Gen SOD2 (Superoxide dismutase 2)
SOD3	Gen SOD3 (Superoxide dismutase 3)
T	Thymin (2,6-dihydroxy-5-methylpyrimidin, 5-methyluracil; pyrimidinová báze)
Thr	Threonin
TP53	Gen TP53 (Tumor protein p53)
Tyr	Tyrosin ((2S)-2-Amino-3-(4-hydroxyfenyl)-propanová kyselina)
UBC	Ubiquitin C
Val	Valin ((2S)-2-amino-3-methyl-butanová kyselina)

8. Literatura

1. Klener P. Klinická onkologie. Galén a Karolinum, Praha 2002.
2. Klener P. Protinádorová chemoterapie. Galén, Praha 1996.
3. Stiborova M, Rupertova M, Aimova D, Ryslava H, Frei E. Formation and persistence of DNA adducts of anticancer drug ellipticine in rats. *Toxicology* 2007;236:50-60.
4. Koutecký J. Klinická Onkologie. Riopress, Praha 2004.
5. Hořejší V, Bartůňková J. Základy imunologie. Triton Praha, Praha 1998.
6. Jefcoate CR, Liehr JG, Santen RJ, Sutter TR, Yager JD, Yue W, Santner SJ, Tekmal R, Demers L, Pauley R, Naftolin F, Mor G, Berstein L. Tissue-specific synthesis and oxidative metabolism of estrogens. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2000;27:95-112.
7. Nandi S, Guzman RC, Yang J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:3650-57.
8. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997;88:323-31.
9. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000;408:307-10.
10. Lowe SW, Schmidt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature.* 1993;362:847-49.
11. Maltzman W, Czyzyk L. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol.* 1984;4:1689-94.
12. Asher G, Shaul Y. Ubiquitin-independent degradation: lessons from the p53 model. *Isr Med Assoc J.* 2006;8:229-32.
13. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature.* 1997;387(6630):296-9.
14. Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature.* 1997;387(6630):299-303.
15. Asher G, Lotem J, Tsvetkov P, Reiss V, Sachs L, Shaul Y. P53 hot-spot mutants are resistant to ubiquitin-independent degradation by increased binding to NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:15065-70.
16. Asher G, Tsvetkov P, Kahana C, Shaul Y. A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. *Genes Dev.* 2005;19:316-21.
17. Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:385-427.

- 18.Higgins CF, Gottesman MM. Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci.* 1992;17(1):18-21.
- 19.Sikic BI, Fisher GA, Lum BL, Halsey J, Beketic-Oreskovic L, Chen G. Modulation and prevention of multidrug resistance by inhibitors of P-glycoprotein. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1997;40:S13-19.
- 20.Leonessa F, Clarke R. ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2003;10(1):43-73.
- 21.Zhang JT. The multi-structural feature of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein: implications for its mechanism of action (hypothesis). *Mol Membr Biol.* 2001;18:145-52.
- 22.Hugger ED, Novak BL, Burton PS, Audus KL, Borchardt RT. A comparison of commonly used polyethoxylated pharmaceutical excipients on their ability to inhibit P-glycoprotein activity in vitro. *J Pharm Sci.* 2002;91(9):1991-2002.
- 23.Kuwano M, Uchiumi T, Hayakawa H, Ono M, Wada M, Izumi H, Kohno K. The basic and clinical implications of ABC transporters, Y-box-binding protein-1 (YB-1) and angiogenesis-related factors in human malignancies. *Cancer Sci.* 2003;94(1):9-14.
- 24.Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, Norris MD. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(2):147-56.
- 25.Troutman MD, Luo G, Gan LS, Thakker DR: v Drug-Drug Interactions (Rodrigues AD ed), Marcel Dekker, NY, USA, pp 295-357, 2002.
- 26.Wang Y, Cao J, Zeng S. Establishment of a P-glycoprotein substrate screening model and its preliminary application. *World J Gastroenterol.* 2004;10(9):1365-68.
- 27.Kusunoki N, Takara K, Tanigawara Y, Yamauchi A, Ueda K, Komada F, Ku Y, Kuroda Y, Saitoh Y, Okumura K. Inhibitory effects of a cyclosporin derivative, SDZ PSC 833, on transport of doxorubicin and vinblastine via human P-glycoprotein. *Jpn J Cancer Res.* 1998;89(11):1220-28.
- 28.Ling V. Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1997;40:S3-8.
- 29.Mechetner E, Kyshtoobayeva A, Zonis S, Kim H, Stroup R, Garcia R, Parker RJ, Fruehauf JP. Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin. *Clin Cancer Res.* 1998;4(2):389-98.
- 30.Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* 1999;59(1):8-13.

31. Nakanishi T, Karp JE, Tan M, Doyle LA, Peters T, Yang W, Wei D, Ross DD. Quantitative analysis of breast cancer resistance protein and cellular resistance to flavopiridol in acute leukemia patients. *Clin Cancer Res.* 2003;9(9):3320-28.
32. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell.* 1993;74(4):597-608.
33. Chao CC, Huang YT, Ma CM, Chou WY, Lin-Chao S. Overexpression of glutathione S-transferase and elevation of thiol pools in a multidrug-resistant human colon cancer cell line. *Mol Pharmacol.* 1992;41(1):69-75.
34. Potmesil M, Hsiang YH, Liu LF, Bank B, Grossberg H, Kirschenbaum S, Forlenza TJ, Penziner A, Kanganis D, et al. Resistance of human leukemic and normal lymphocytes to drug-induced DNA cleavage and low levels of DNA topoisomerase II. *Cancer Res.* 1988;48(17):3537-43.
35. Ritke MK, Roberts D, Allan WP, Raymond J, Bergoltz VV, Yalowich JC. Altered stability of etoposide-induced topoisomerase II-DNA complexes in resistant human leukaemia K562 cells. *Br J Cancer.* 1994;69(4):687-97.
36. Selvakumaran M, Lin HK, Miyashita T, Wang HG, Krajewski S, Reed JC, Hoffman B, Liebermann D. Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene.* 1994;9(6):1791-98.
37. Bodor M, Kelly EJ, Ho RJ. Characterization of the human MDR1 gene. *AAPS J.* 2005;7(1):E1-5.
38. Allabi AC, Horsmans Y, Issaoui B, Gala JL. Single nucleotide polymorphisms of ABCB1 (MDR1) gene and distinct haplotype profile in a West Black African population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2005;61(2):97-102, 2005.
39. Bercovich D, Friedlander Y, Korem S, Houminer A, Hoffman A, Kleinberg L, Shochat C, Leitersdorf E, Meiner V. The association of common SNPs and haplotypes in the CETP and MDR1 genes with lipids response to fluvastatin in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2006;185(1):97-107.
40. Niemi M, Backman JT, Kajosaari LI, Leathart JB, Neuvonen M, Daly AK, Eichelbaum M, Kivisto KT, Neuvonen PJ. Polymorphic organic anion transporting polypeptide 1B1 is a major determinant of repaglinide pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;77(6):468-78.
41. Salama NN, Yang Z, Bui T, Ho RJ. MDR1 haplotypes significantly minimize intracellular uptake and transcellular P-gp substrate transport in recombinant LLC-PK1 cells. *J Pharm Sci.* 2006;95(10):2293-308.
42. Fromm MF. The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(10):1295-310.

43. Sakaeda T. MDR1 genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction? *Drug Metab Pharmacokinet.* 2005;20(6):391-414.
44. Burger H, Foekens JA, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, Wiemer EA, Stoter G, Nooter K. RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. *Clin Cancer Res.* 2003;9(2):827-36.
45. Daly AK, Cholerton S, Gregory W, Idle JR. Metabolic polymorphisms. *Pharmacol Ther.* 1993;57:129-60.
46. Vineis P, Malats N, Lang M, d'Errico A, Caporaso N, Cuzick J, Boffetta P. Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer. IARC Scientific Publication No. 148, IARC, Lyon, pp. 403-408.
47. Wormhoudt LW, Commandeur JN, Vermeulen NP. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit Rev Toxicol.* 1999;29(1):59-124.
48. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics.* 1996;6(1):1-42.
49. Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* 2000;1(6):reviews 3003.
50. Gonzalez FJ, Nebert DW. Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant 'warfare', molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet.* 1990;6(6):182-86.
51. Gut I, Souček P, Hodek P. Monooxygenázy závislé na cytochromu P-450: Jedinečné aktivační a detoxikační systémy. *Prac Lékařství.* 1993;45:15-20.
52. Topham JC. Relationship between difference spectra and metabolism. Barbiturates, drug interaction and species difference. *Biochem Pharmacol.* 1970;19:1695-1701.
53. Sutter TR, Tang YM, Hayes CL, Wo YY, Jabs EW, Li X, Yin H, Cody CW, Greenlee WF. Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. *J Biol Chem.* 1994;269(18):13092-9.
54. Tang YM, Wo YY, Stewart J, Hawkins AL, Griffin CA, Sutter TR, Greenlee WF. Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene. *J Biol Chem.* 1996;271(45):28324-30.
55. Tuominen R, Warholm M, Moller L, Rannug A. Constitutive CYP1B1 mRNA expression in human blood mononuclear cells in relation to gender, genotype, and environmental factors. *Environ Res.* 2003;93(2):138-48.

56. Guengerich FP, Shimada T. Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes. *Mutat Res.* 1998;400(1-2):201-13.
57. Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H, Amin S, Hecht SS, Guengerich FP, Sutter TR. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res.* 1996;56:2979-84.
58. Hakkola J, Pasanen M, Pelkonen O, Hukkanen J, Evisalmi S, Anttila S, Rane A, Mantyla M, Purkunen R, Saarikoski S, Tooming M and Raunio H. Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cells. *Carcinogenesis.* 1997;18:391-97.
59. Haas S, Pierl C, Harth V, Pesch B, Rabstein S, Bruning T, Ko Y, Hamann U, Justenhoven C, Brauch H, Fischer HP. Expression of xenobiotic and steroid hormone metabolizing enzymes in human breast carcinomas. *Int J Cancer.* 2006;119:1785-91.
60. Murray GI, Melvin WT, Greenlee WF, Burke MD. Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:297-316.
61. Murray GI, Taylor MC, McFadyen MCE, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD, Melvin WT. Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res.* 1997;57:3026-31.
62. McFadyen MC, Melvin WT, Murray GI. Cytochrome P450 enzymes: novel options for cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther.* 2004;3:363-71.
63. Mathijssen RH, Van Schaik RH. Genotyping and phenotyping cytochrome P450: perspectives for cancer treatment. *Eur J Cancer.* 2006;42:141-48.
64. Sissung TM, Price DK, Spareboom A and Figg WD. Pharmacogenetics and regulation of human cytochrome P450 1B1: implications in hormone-mediated tumor metabolism and a novel target for therapeutic intervention. *Mol Cancer Res.* 2006;4:135-50.
65. Crewe HK, Notley LM, Wunsch RM, Lennard MS, Gillam EM. Metabolism of tamoxifen by recombinant human cytochrome P450 enzymes: formation of the 4-hydroxy, 4'-hydroxy and N-desmethyl metabolites and isomerization of trans-4-hydroxytamoxifen. *Drug Metab Dispos.* 2002;30:869-74.
66. Enayetallah AE, French RA, Thibodeau MS, Grant F. Distribution of soluble epoxide hydrolase and of cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 in human tissues. *J Histochem Cytochem.* 2004;52:447-54.
67. Kirchheiner J, Brockmoller J. Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;77:1-16.
68. Knupfer H, Schmidt R, Stanitz D, Brauckhoff M, Schonfelder M, Preiss R. CYP2C and IL-6 expression in breast cancer. *Breast.* 2004;13:28-34.
69. Guengerich FP, Kim DH, Iwasaki M. Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the

oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem Res Toxicol*. 1991;4(2):168-79.

70.Thier R, Bruning T, Roos PH, Rihs HP, Golka K, Ko Y, Bolt HM. Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes. *Int J Hyg Environ Health*. 2003;206(3):149-71.

71.Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:737-47.

72.Modugno F, Knoll C, Kanbour-Shakir A, Romkes M. A potential role for the estrogen-metabolizing cytochrome P450 enzymes in human breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat*. 2003;82:191-97.

73.Keshava C, McCanlies EC and Weston A. CYP3A4 polymorphisms--potential risk factors for breast and prostate cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2004;160:825-41.

74.Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev*. 2002;34:83-448.

75.Kawashiro T, Yamashita K, Zhao XJ, Koyama E, Tani M, Chiba K and Ishizaki T. A study on the metabolism of etoposide and possible interactions with antitumor or supporting agents by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;286:1294-1300.

76. Siegel D, Ross D. Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues. *Free Radic Biol Med*. 2000;29:246-53.

77. Sarmanova J, Susova S, Gut I, Mrhalova M, Kodet R, Adamek J, Roth Z, Soucek P. Breast cancer: role of polymorphisms in biotransformation enzymes. *Eur J Human Genet*. 2004;12:848-54.

78.Lafuente MJ, Casterad X, Trias M, Ascaso C, Molina R, Ballesta A, Zheng S, Wiencke JK, Lafuente A. NAD(P)H:quinone oxidoreductase-dependent risk for colorectal cancer and its association with the presence of K-ras mutations in tumors. *Carcinogenesis*. 2000; 21:1813-19.

79. Kwak MK, Ramos-Gomez M, Wakabayashi N, Kensler TW. Chemoprevention by 1,2-dithiole-3-thiones through induction of NQO1 and other phase 2 enzymes. *Methods Enzymol*. 2004;382:414-23.

80. Shen J, Barrios RJ, Jaiswal AK. Inactivation of the quinone oxidoreductases NQO1 and NQO2 strongly elevates the incidence and multiplicity of chemically induced skin tumors. *Cancer Res*. 2010;70(3):1006-14.

81. Singh B, Bhat NK, Bhat HK. Induction of NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 by antioxidants in female ACI rats is associated with decrease in oxidative DNA damage and inhibition of estrogen-induced breast cancer. *Carcinogenesis*. 2012;33(1):156-63.

82.Ross D. Encyclopedia of Molecular Medicine, 2001, p.208.

83. Siegel D, Yan C, Ross D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. *Biochem Pharmacol.* 2012;83(8):1033-40.
84. Foster CE, Bianchet MA, Talalay P, Amzel LM. Crystal structure of human quinone reductase type 2, a metalloflavoprotein. *Biochemistry.* 1999;38:9881-86.
85. Iskander K, Paquet M, Brayton C, Jaiswal A. Deficiency of NRH:quinone oxidoreductase 2 increases susceptibility to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and benzo(a)pyrene-induced skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 2004;64:5925-28.
86. Knox RJ, Jenkins TC, Hobbs SM, Chen S, Melton RG, Burke PJ. Bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB 1954) by human NAD(P)H quinone oxidoreductase 2: a novel co-substrate-mediated antitumor prodrug therapy. *Cancer Res.* 2000;60:4179-86.
87. Wang W, Jaiswal AK. Nuclear factor Nrf2 and antioxidant response element regulate NRH:quinone oxidoreductase 2 (NQO2) gene expression and antioxidant induction. *Free Radic Biol Med.* 2006;40:1119-30.
88. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969;244:6049-55.
89. Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem.* 1973;248:4793-96.
90. Soini Y, Vakkala M, Kahlos K, Paakko P, Kinnula V. MnSOD expression is less frequent in tumour cells of invasive breast carcinomas than in in situ carcinomas or non-neoplastic breast epithelial cells. *J Pathol.* 2001;195:156-62.
91. Li Z, Khaletsky A, Wang J, Wong J, Oberley L, Li J. Genes regulated in human breast cancer cells overexpressing manganese-containing superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med.* 2001;30:260-67.
92. Li J, Oberley L, St Clair D, Ridenour L, Oberley T. Phenotypic changes induced in human breast cancer cells by overexpression of manganese-containing superoxide dismutase. *Oncogene.* 1995;10:1989-2000.
93. Stiborová M, Hudeček J, Hodek P, Frei E. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. listy.* 1999;93:229-37.
94. Nelson KK, Ranganathan AC, Mansouri J, Rodriguez AM, Providence KM, Rutter JL, Pumiglia K, Bennett JA, Melendez JA. Elevated sod2 activity augments matrix metalloproteinase expression: evidence for the involvement of endogenous hydrogen peroxide in regulating metastasis. *Clin Cancer Res.* 2003;9(1):424-32.
95. Connor KM, Hempel N, Nelson KK, Dabiri G, Gamarra A, Belarmino J, Van De Water L, Mian BM, Melendez JA. Manganese superoxide dismutase enhances the invasive and migratory activity of tumor cells. *Cancer Res.* 2007;67(21):10260-7.

96. Hempel N, Carrico PM, Melendez JA. Manganese superoxide dismutase (Sod2) and redox-control of signaling events that drive metastasis. *Anticancer Agents Med Chem.* 2011;11(2):191-201.
97. Rosenblum J, Gilula N, Lerner R. On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:4471-73.
98. Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Capanec C, Pessayre D, Degoul F. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics.* 2003;13:145-57.
99. Marklund SL. Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines. *Biochem J.* 1990;266:213-19.
100. Karlsson K, Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase in the vascular system of mammals. *Biochem J.* 1988;255:223-28.
101. Sandstrom J, Nilsson P, Karlsson K, Marklund SL. 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J Biol Chem.* 1994;269:19163-66.
102. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics tumours of the breast and female genital organs. Tavassoli, FA, Devilee, P, eds. Lyon, France: IARC Press. 2003.
103. Vaclavikova R, Nordgard SH, Alnaes GIG, Hubackova M, Kubala E, Kodet R, Mrhalova M, Novotny J, Gut I, Kristensen VN, Soucek P. Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance gene 1 (ABCB1): effects on its expression and clinicopathological characteristics in breast cancer patients. *Pharmacogenet Genomics.* 2008;18(3):263-73.
104. Soucek P, Anzenbacher P, Skoumalova I, Dvorak M. Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hemopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells.* 2005;23:1417-22.
105. Jung M, Ramankulov A, Roigas J, Johannsen M, Ringdorf M, Kristiansen G, Jung K. In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. *BMC Mol Biol.* 2007;8:47.
106. Haufroid V, Toubreau F, Clippe A, Buysschaert M, Gala JL, Lison D. Real-time quantification of cytochrome P4502E1 mRNA in human peripheral blood lymphocytes by reverse transcription-PCR, Method and practical application. *Clin Chem.* 2001;47:1126-29.
107. Kai K, Nishimura R, Arima N, Miyayama H, Iwase N. p53 expression status is a significant molecular marker in predicting the time to endocrine therapy failure in recurrent breast cancer: a cohort study. *Ing J Clin Oncol.* 2006;11:426-33.
108. Von Minckwitz G, Sinn HP, Raab G, Loibl S, Blohmer JU, Eidtmann H, et al. German Breast Group. Clinical response after two cycles compared to HER2, Ki-67, p53, and bcl-2 in independently predicting a pathological complete response after preoperative chemotherapy in patients with operable carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res.* 2008;10:R30.

109. Bica CG, de Moura da Silva LL, Toscani NV, da Cruz IB, Sá G, Graudenz MS, Zettler CG. MnSOD gene polymorphism association with steroid-dependent cancer. *Pathol Oncol Res.* 2009;15(1):19-24.
110. Cox DG, Tamimi RM, Hunter DJ. Gene x Gene interaction between MnSOD and GPX-1 and breast cancer risk: a nested case-control study. *BMC Cancer.* 2006;6:217.
111. Albermann N, Schmitz-Winnenthal FH, Z'graggen K, Volk C, Hoffmann MM, Haefeli WE, Weiss J. Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver. *Biochem Pharmacol.* 2005;70(6):949-58.
112. <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>; B36 assembly accessed 22 June 2010
113. Menzel HJ, Sarmanova J, Soucek P, Berberich R, Grünewald K, Haun M, Kraft HG. Association of NQO1 polymorphism with spontaneous breast cancer in two independent populations. *Br J Cancer.* 2004;90:1989-94.
114. Fowke JH, Shu XO, Dai Q, Jin F, Cai Q, Gao YT, Zheng W. Oral contraceptive use and breast cancer risk: modification by NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) genetic polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(8):1308-15.
115. Fagerholm R, Hofstetter B, Tommiska J, Aaltonen K, Vrtel R, Syrjäkoski K, Kallioniemi A, Kilpivaara O, Mannermaa A, Kosma VM, Uusitupa M, Eskelinen M, Kataja V, Aittomäki K, von Smitten K, Heikkilä P, Lukas J, Holli K, Bartkova J, Blomqvist C, Bartek J, Nevanlinna H. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 NQO1*2 genotype (P187S) is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer. *Nat Genet.* 2008;40(7):844-53.
116. Cleton-Jansen AM, van Eijk R, Lombaerts M, Schmidt MK, Van't Veer LJ, Philippo K, Zimmerman RM, Peterse JL, Smit VT, van Wezel T, Cornelisse CJ. ATBF1 and NQO1 as candidate targets for allelic loss at chromosome arm 16q in breast cancer: absence of somatic ATBF1 mutations and no role for the C609T NQO1 polymorphism. *BMC Cancer.* 2008;8:105.
117. Siegel D, McGuinness SM, Winski SL, Ross D. Genotype-phenotype relationships in studies of a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Pharmacogenetics.* 1999;9(1):113-21.
118. Zhang J, Schulz WA, Li Y, Wang R, Zotz R, Wen D, Siegel D, Ross D, Gabbert HE, Sarbia M. Association of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) C609T polymorphism with esophageal squamous cell carcinoma in a German Caucasian and a northern Chinese population. *Carcinogenesis.* 2003;24(5):905-9.
119. Siegel D, Anwar A, Winski SL, Kepa JK, Zolman KL, Ross D. Rapid polyubiquitination and proteasomal degradation of a mutant form of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Mol Pharmacol.* 2001;59(2):263-8.
120. Sarbia M, Bitzer M, Siegel D, Ross D, Schulz WA, Zotz RB, Kiel S, Geddert H, Kandemir Y, Walter A, Willers R, Gabbert HE. Association between NAD(P)H:quinone

oxidoreductase 1 (NQO1) inactivating C609T polymorphism and adenocarcinoma of the upper gastrointestinal tract. *Int J Cancer*. 2003;107(3):381-6.

121. Asher G, Lotem J, Cohen B, Sachs L, Shaul Y. Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(3):1188-93.

122. Anwar A, Dehn D, Siegel D, Kepa JK, Tang LJ, Pietenpol JA, Ross D. Interaction of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) with the tumor suppressor protein p53 in cells and cell-free systems. *J Biol Chem*. 2003;278(12):10368-73.

123. Gong X, Kole L, Iskander K, Jaiswal AK. NRH:quinone oxidoreductase 2 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 protect tumor suppressor p53 against 20s proteasomal degradation leading to stabilization and activation of p53. *Cancer Res*. 2007;67(11):5380-8.

124. Gems D, Partridge L. Stress-response hormesis and aging: "that which does not kill us makes us stronger". *Cell Metab*. 2008;7(3):200-3.

125. Costantini P, Jacotot E, Decaudin D, Kroemer G. Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(13):1042-53.

126. Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, Ichimiya M, Sengupta S, Mechanic L, Okamura S, Hofseth LJ, Moake M, Nagashima M, Forrester KS, Harris CC. p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res*. 2004;64(7):2350-6.

127. Sun W, Kalen AL, Smith BJ, Cullen JJ, Oberley LW. Enhancing the antitumor activity of adriamycin and ionizing radiation. *Cancer Res*. 2009;69(10):4294-300.

128. Tripathi DN, Jena GB. Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes. *Mutat Res*. 2010;696(1):69-80.

129. Glynn SA, Boersma BJ, Howe TM, Edvardsen H, Geisler SB, Goodman JE, Ridnour LA, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Naume B, Kristensen VN, Chanock SJ, Wink DA, Ambs S. Mitochondrial target sequence polymorphism in manganese superoxide dismutase predicts inferior survival in breast cancer patients treated with cyclophosphamide. *Clin Cancer Res*. 2009;15:4165-73.

130. Ambrosone CB, Ahn J, Singh KK, Rezaishiraz H, Furberg H, Sweeney C, Coles B, Trovato A. Polymorphisms in genes related to oxidative stress (MPO, MnSOD, CAT) and survival after treatment for breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65(3):1105-11.

131. Udler M, Maia AT, Cebrian A, Brown C, Greenberg D, Shah M, Caldas C, Dunning A, Easton D, Ponder B, Pharoah P. Common germline genetic variation in antioxidant defense genes and survival after diagnosis of breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25(21):3015-23.

132. Choi JY, Barlow WE, Albain KS, Hong CC, Blanco JG, Livingston RB, Davis W, Rae JM, Yeh IT, Hutchins LF, Ravdin PM, Martino S, Lyss AP, Osborne CK, Abeloff MD, Hayes DF, Ambrosone CB. Nitric oxide synthase variants and disease-free survival among treated

and untreated breast cancer patients in a Southwest Oncology Group clinical trial. *Clin Cancer Res.* 2009;15(16):5258-66.

133. Razmara A, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V. Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Res.* 2007;1176:71-81.

134. Yao S, Barlow WE, Albain KS, Choi JY, Zhao H, Livingston RB, Davis W, Rae JM, Yeh IT, Hutchins LF, Ravdin PM, Martino S, Lyss AP, Osborne CK, Abeloff MD, Hortobagyi GN, Hayes DF, Ambrosone CB. Manganese superoxide dismutase polymorphism, treatment-related toxicity and disease-free survival in SWOG 8897 clinical trial for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;124(2):433-9.

135. McAtee BL, Yager JD. Manganese superoxide dismutase: effect of the Ala16Val polymorphism on protein, activity, and mRNA levels in human breast cancer cell lines and stably transfected mouse embryonic fibroblasts. *Mol Cell Biochem.* 2010;335(1-2):107-18.

136. Teoh ML, Fitzgerald MP, Oberley LW, Domann FE. Overexpression of extracellular superoxide dismutase attenuates heparanase expression and inhibits breast carcinoma cell growth and invasion. *Cancer Res.* 2009;69(15):6355-63.

137. Svensk AM, Soini Y, Pääkkö P, Hiravikoski P, Kinnula VL. Differential expression of superoxide dismutases in lung cancer. *Am J Clin Pathol.* 2004;122(3):395-404.

138. Yoo DG, Song YJ, Cho EJ, Lee SK, Park JB, Yu JH, Lim SP, Kim JM, Jeon BH. Alteration of APE1/ref-1 expression in non-small cell lung cancer: the implications of impaired extracellular superoxide dismutase and catalase antioxidant systems. *Lung Cancer.* 2008;60(2):277-84.

139. Wheeler MD, Smutney OM, Samulski RJ. Secretion of extracellular superoxide dismutase from muscle transduced with recombinant adenovirus inhibits the growth of B16 melanomas in mice. *Mol Cancer Res.* 2003;1(12):871-81.

140. Teoh ML, Sun W, Smith BJ, Oberley LW, Cullen JJ. Modulation of reactive oxygen species in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(24):7441-50.

141. Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, DeYoung J, Taylor T, Carlson EJ, Herskowitz I, Giacomini KM, Clark AG; Pharmacogenetics of Membrane Transporters Investigators. Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics.* 2003;13(8):481-94.

142. Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):169-74.

143. Gaikovitch EA, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Brockmüller J, Frötschl R, Köpke K, Gerloff T, Chernov JN, Roots I. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003;59(4):303-12.

144. Bernal ML, Sinues B, Fanlo A, Mayayo E. Frequency distribution of C3435T mutation in exon 26 of the MDR1 gene in a Spanish population. *Ther Drug Monit.* 2003;25(1):107-11.
145. Jamroziak K, Balcerczak E, Młynarski W, Mirowski M, Robak T. Distribution of allelic variants of functional C3435T polymorphism of drug transporter MDR1 gene in a sample of Polish population. *Pol J Pharmacol.* 2002;54(5):495-500.
146. Sarmanova J, Tynkova L, Susova S, Gut I, Soucek P. Genetic polymorphisms of biotransformation enzymes: allele frequencies in the population of the Czech Republic. *Pharmacogenetics.* 2000;10(9):781-8.
147. Ro J, Sahin A, Ro JY, Fritsche H, Hortobagyi G, Blick M. Immunohistochemical analysis of P-glycoprotein expression correlated with chemotherapy resistance in locally advanced breast cancer. *Hum Pathol.* 1990;21(8):787-91.
148. Arnal M, Franco N, Fargeot P, Riedinger JM, Brunet-Lecomte P, Lizard-Nacol S. Enhancement of *mdr1* gene expression in normal tissue adjacent to advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2000;61(1):13-20.
149. Burger H, Foekens JA, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, Wiemer EA, Stoter G, Nooter K. RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. *Clin Cancer Res.* 2003;9(2):827-36.
150. Chintamani, Singh JP, Mittal MK, Saxena S, Bansal A, Bhatia A, Kulshreshtha P. Role of p-glycoprotein expression in predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer--a prospective clinical study. *World J Surg Oncol.* 2005;3:61.
151. Nobili S, Landini I, Giglioni B, Mini E. Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. *Curr Drug Targets.* 2006;7(7):861-79.
152. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, Johné A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(7):3473-8.
153. Owen A, Chandler B, Bray PG, Ward SA, Hart CA, Back DJ, Khoo SH. Functional correlation of P-glycoprotein expression and genotype with expression of the human immunodeficiency virus type 1 coreceptor CXCR4. *J Virol.* 2004;78(21):12022-9.
154. Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadée W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics.* 2005;15(10):693-704.
155. Goto M, Masuda S, Saito H, Uemoto S, Kiuchi T, Tanaka K, Inui K. C3435T polymorphism in the MDR1 gene affects the enterocyte expression level of CYP3A4 rather than Pgp in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics.* 2002;12(6):451-7.

156. Illmer T, Schuler US, Thiede C, Schwarz UI, Kim RB, Gotthard S, Freund D, Schäkel U, Ehninger G, Schaich M. MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Res.* 2002;62(17):4955-62.
157. Tang K, Wong LP, Lee EJ, Chong SS, Lee CG. Genomic evidence for recent positive selection at the human MDR1 gene locus. *Hum Mol Genet.* 2004;13(8):783-97.
158. Turgut S, Yaren A, Kursunluoglu R, Turgut G. MDR1 C3435T polymorphism in patients with breast cancer. *Arch Med Res.* 2007;38(5):539-44.
159. Seymour L, Bezwoda WR, Dansey RD. P-glycoprotein immunostaining correlates with ER and with high Ki67 expression but fails to predict anthracycline resistance in patients with advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1995;36(1):61-9.
160. Lacave R, Coulet F, Ricci S, Touboul E, Flahault A, Rateau JG, Cesari D, Lefranc JP, Bernaudin JF. Comparative evaluation by semiquantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of MDR1, MRP and GSTp gene expression in breast carcinomas. *Br J Cancer.* 1998;77(5):694-702.
161. Huang Z, Fasco MJ, Figge HL, Keyomarsi K, Kaminsky LS. Expression of cytochromes P450 in human breast tissue and tumors. *Drug Metab Dispos.* 1996;24(8):899-905.
162. El-Rayes BF, Ali S, Heilbrun LK, Lababidi S, Bouwman D, Visscher D, Philip PA. Cytochrome p450 and glutathione transferase expression in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2003;9(5):1705-9.
163. Miyoshi Y, Taguchi T, Kim SJ, Tamaki Y, Noguchi S. Prediction of response to docetaxel by immunohistochemical analysis of CYP3A4 expression in human breast cancers. *Breast Cancer.* 2005;12(1):11-5.
164. Iscan M, KLaavuniemi T, Coban T, Kapucuoglu N, Pelkonen O, Raunio H. The expression of cytochrome P450 enzymes in human breast tumours and normal breast tissue. *Breast Cancer Res Treat.* 2001;70(1):47-54.
165. Hellmold H, Rylander T, Magnusson M, Reihner E, Warner M, Gustafsson JA. Characterization of cytochrome P450 enzymes in human breast tissue from reduction mammoplasties. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(3):886-95.
166. Kapucuoglu N, Coban T, Raunio H, Pelkonen O, Edwards RJ, Boobis AR, Iscan M. Immunohistochemical demonstration of the expression of CYP2E1 in human breast tumour and non-tumour tissues. *Cancer Lett.* 2003;196(2):153-9.
167. Gonzalez FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res.* 2005;569(1-2):101-10.
168. McFadyen MC, Murray GI. Cytochrome P450 1B1: a novel anticancer therapeutic target. *Future Oncol.* 2005;1(2):259-63.

169. Lønning PE, Sørli T, Børresen-Dale AL. Genomics in breast cancer-therapeutic implications. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005;2(1):26-33.

170. Nordgard SH, Ritchie MD, Jensrud SD, Motsinger AA, Alnaes GI, Lemmon G, Berg M, Geisler S, Moore JH, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Kristensen VN. ABCB1 and GST polymorphisms associated with TP53 status in breast cancer. *Pharmacogenet Genomics*. 2007;17(2):127-36.

9. Seznam příloh

1. Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace (s IF):

Hubackova M, Vaclavikova R, Mrhalova M, Kubackova K, Kodet R, Gut I, Soucek P. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 Pro187Ser polymorphism and expression do not cosegregate with clinico-pathological characteristics of human mammary tumors. *Pharmacogenet Genomics*. 2009;19(7):505-12.

Hubackova M, Vaclavikova R, Ehrlichova M, Mrhalova M, Kodet R, Kubackova K, Vrana D, Gut I, Soucek P. Association of superoxide dismutases and NAD(P)H quinone oxidoreductases with prognosis of patients with breast carcinomas. *Int J Cancer*. 2012;130(2):338-48.

Vaclavikova R, Nordgard SH, Alnaes GI, **Hubackova M**, Kubala E, Kodet R, Mrhalova M, Novotny J, Gut I, Kristensen VN, Soucek P. Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance gene 1 (ABCB1): effects on its expression and clinicopathological characteristics in breast cancer patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18(3):263-73.

Vaclavikova R, **Hubackova M**, Stribrna-Sarmanova J, Kodet R, Mrhalova M, Novotny J, Gut I, Soucek P. RNA expression of cytochrome P450 in breast cancer patients. *Anticancer Res*. 2007;27(6C):4443-50.

2. Publikace in extenso, se vztahem k tématu disertace (bez IF):

Hubáčková M, Václavíková R, Kubala E, Kodet R, Mrhalová M, Novotný J, Vrána D, Gut I, Souček P. Úloha exprese genů chinonoxidoreduktázy 1 a 2 v rozvoji karcinomu prsu. *Klin Onkol*. 2007;20(5):335-39.

Václavíková R, **Hubáčková M**, Kubala E, Kodet R, Mrhalová M, Novotný J, Gut I, Souček P. Exprese genu mnohočetné lékové rezistence 1 (mdr1) a její význam v rozvoji a terapii karcinomu prsu. *Klin Onkol*. 2007;20(3):253-59.

Příloha č. 1

Hubackova M, Vaclavikova R, Mrhalova M, Kubackova K, Kodet R, Gut I, Soucek P. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 Pro187Ser polymorphism and expression do not cosegregate with clinico-pathological characteristics of human mammary tumors. *Pharmacogenet Genomics*. 2009;19(7):505-12. (IF₂₀₁₂ = 3,6)

NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 Pro187Ser polymorphism and expression do not cosegregate with clinico-pathological characteristics of human mammary tumors

Miluse Hubackova^{a,b}, Radka Vaclavikova^a, Marcela Mrhalova^c, Katerina Kubackova^d, Roman Kodet^c, Ivan Gut^a and Pavel Soucek^a

Objective The aim of this study was to further clarify the recently reported role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) as a strong prognostic and predictive factor in breast cancer.

Methods NQO1 transcript levels were monitored in mammary tumors by real-time polymerase chain reaction. NQO1 protein levels were immunohistochemically determined in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. NQO1 polymorphism (Pro187Ser, rs1800566) was also assessed. Evaluation ($N=52$) and validation ($N=53$) sets were analyzed subsequently.

Results Carriers of variant NQO1-Ser allele had significantly more frequently NQO1-negative protein expression ($P=0.001$) in both sets. NQO1 transcript levels in samples with negative protein expression were significantly lower than in those with positive NQO1 protein expression ($P=0.007$) in both sets. Patients with stages 0/I/II had more often positive NQO1 protein expression than patients with stages III/IV ($P=0.022$) in the evaluation set. Significant association between NQO1 protein expression and TP53 protein status was also found ($P=0.037$). However, both associations were not replicated by analysis of the validation set. Analysis of both sets combined did not show significant

association of NQO1 protein expression either with stage ($P=0.231$) or with TP53 protein status ($P>0.999$). Thus, the results observed in the evaluation set were effects of small sample size.

Conclusion The role of NQO1 in human mammary gland carcinogenesis does not seem to be directly associated with classical clinico-pathological factors. *Pharmacogenetics and Genomics* 19:505–512 © 2009 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Pharmacogenetics and Genomics 2009, 19:505–512

Keywords: breast cancer, immunohistochemistry, NQO1, polymorphism, transcript

^aLaboratory of Toxicogenomics, National Institute of Public Health, Prague, ^b3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Departments of ^cPathology and Molecular Medicine and ^dRadiotherapy–Oncology, Charles University in Prague, 2nd Medical School and Hospital Motol, Prague, Czech Republic

Correspondence to Dr Pavel Soucek, PhD, Head of Laboratory of Toxicogenomics, National Institute of Public Health, Srobarova 48, 100 42 Prague 10, Czech Republic
Tel: +420 2 6708 2709; fax: +420 2 6731 1236;
e-mail: psoucek@szu.cz; www.szu.cz

Received 24 October 2008 Accepted 16 April 2009

Introduction

NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1, EC 1.6.99.2, OMIM: 125860) is an integral flavoprotein predominantly expressed in cytosol. The NQO1 exists as a homodimer and in each active center has one prosthetic group of flavine adenine dinucleotide [1]. As an electron donor, this enzyme can use either NADH or NADPH. NQO1 catalyzes two-electron reduction of quinones and quinoid compounds to hydroquinones without the accumulation of a dissociated semiquinone and accompanying superoxide. Thus, NQO1 plays an important role in protecting cells against the mutagenic, carcinogenic, and cytotoxic effects of quinones and oxidative stress. NQO1 regulates MDM2 (OMIM: 164785) and ubiquitin-independent degradation of TP53 (OMIM: 191170) by the core 20S proteasome [2].

High levels of NQO1 transcript and protein were found in human tissues and high degree of variation in expression

levels between normal and tumor tissues was observed [3] suggesting a possible use in anticancer therapy. In fact, NQO1 bioactivates quinoid agents mitomycin C [4] and EO9 to experimental anticancer drugs [5]. A well-characterized single nucleotide polymorphism in NQO1 results in a proline to serine substitution at position 187 (rs1800566) and ubiquitination with rapid degradation of the variant protein [6]. This ‘knockout’ polymorphism was associated with increased risk of breast cancer in Czech population [7] and the result was replicated by Austrian case–control study [8]. Interestingly, carriers of variant alleles in both NQO1 and TP53 (Pro72Ser, rs60388830) were under significantly higher risk than carriers of wild-type alleles [8]. The most recent study suggested that NQO1 rs1800566 variant genotype is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer [9].

In this study, the NQO1 transcript and protein levels were followed in samples of tumors of the mammary

gland. *NQO1* levels were correlated with *NQO1* Pro187Ser genotype in lymphocytes of the same patients to check its functional relevance. Association of *NQO1* expression with clinico-pathological data of patients was evaluated to gain additional insight into the previously suggested prognostic role of *NQO1* in breast cancer.

Materials and methods

Materials

Chemicals for preparation of buffers were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Deoxyribonucleotides (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP) were products of Invitex (Berlin, Germany). Taq-Purple DNA-polymerase was purchased from Top-Bio (Prague, Czech Republic). Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed using TaqMan Universal PCR Master Mix (kit no. 4304437) and TaqMan Gene Expression Assays (*NQO1*, kit no. Hs01045994_m1; Human *PPIA* Endogenous Control, kit no. 4333763F) obtained from Applied Biosystems (Foster City, California, USA).

Participants

Blood and mammary tissue samples were obtained from 105 incident breast cancer patients diagnosed at the Faculty Hospital Motol in Prague during the period between February 2003 and November 2005. Tissue samples were collected during surgery and snap-frozen in liquid nitrogen (evaluation set, $n = 52$). Cryostat sections were stained by hematoxylin and eosin and reviewed by an experienced pathologist. Five-micrometer thin cryostat sections were cut for isolation of total RNA. Content of tumor cells was histologically verified in the first and in the last section. The sections cut in the layers between the aforementioned histological controls were used for total RNA isolations. To increase the content of tumor cells in samples, the surrounding nontumor tissue (stromal cells, adipose tissue) was removed before sectioning. For replication of results of the evaluation set, total RNA was also isolated from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) archival samples (validation set, $n = 53$) by using High Pure RNA Paraffin Kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana, USA). Histological classification of carcinomas of the mammary gland was performed according to the standard diagnostic procedures [10]. The following data on patients were retrieved from medical records: date of diagnosis, menopausal status, personal history, family history (number of relatives affected by breast cancer, ovarian cancer, or other malignant diseases), stage, tumor size, histological type and grade of tumor, expression of TP53, estrogen and progesterone receptors. All patients were asked to read and sign an informed consent in agreement with requirements of the Ethics Commission of the National Institute of Public Health in Prague.

NQO1 genotyping

Peripheral blood lymphocytes were prepared by using Histopaque (Sigma-Aldrich) from fresh blood samples of patients. Genomic DNA was then isolated with BioSprint 15 DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) using KingFisher instrument and protocol supplied by the manufacturer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). *NQO1* polymorphism rs1800566 was determined by TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assay (ID: C_2091255_30, obtained from Applied Biosystems). Reaction mixtures for real-time PCR contained 5 μ l of 2x TaqMan Universal PCR Master Mix, 0.25 μ l of TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assay, and 4.75 μ l of DNA template diluted to concentration of 0.7 ng/ μ l. Cycling parameters were: initial hold at 50°C for 2 min and initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles consisting of denaturation at 95°C for 15 s and annealing at 60°C for 60 s. The nontemplate control consisted of a reaction tube in which water was used in place of DNA sample. Real-time PCR was performed using the RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia).

Preparation of *NQO1* and *PPIA* standards for quantitative real-time PCR

For preparation of standards, fragments spanning all coding sequences of *NQO1* (825 bp) and exons 3–5 (738 bp) of peptidylprolyl isomerase A (*PPIA*) were subcloned into vector *pDONR201* using Gateway Cloning Technology (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). The entry clones were propagated in *Escherichia coli* DH5 α Maximum Efficiency Cells (Invitrogen) and isolated by Plasmid Midi Kit (Qiagen). Concentrations of plasmids were determined spectrophotometrically.

Quantification of *NQO1* transcript levels

Total RNA was isolated from tissue sections using Trizol Reagent (Invitrogen) according to the procedure recommended by the manufacturer. The quality of RNA was verified by horizontal agarose gel electrophoresis. RNA quantity was assessed by UV spectrophotometry on a Cary 300 spectrophotometer (Varian, Palo Alto, California, USA). cDNA was synthesized using 0.5 μ g of total RNA by using RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) with random hexamer primers. Quality of cDNA in terms of DNA contamination was then confirmed by PCR amplification of ubiquitin C fragment discriminating between product from cDNA (190 bp) and from genomic DNA (1009 bp) as described earlier [11]. Subsequently, quantitative real-time PCR was performed in RotorGene 6000 (Corbett Research). *PPIA* was used as a reference gene. The real-time PCR reaction mixtures contained 10 μ l of 2x TaqMan Universal PCR Master Mix, 1.0 μ l of specific probe (final concentration 250 nmol/l, labeled with 6-FAM at the 5' end and with nonfluorescent quencher at the 3' end), and primers for either *PPIA* or *NQO1*.

amplification (final concentration of 900 nmol/l each), 5 μ l of diluted cDNA template and water to a final volume of 20 μ l. Cycling parameters were: initial hold at 50°C for 2 min and initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 50 cycles consisting of denaturation at 95°C for 15 s and annealing/extension at 58°C for 60 s for *PPIA* or 56°C for 50 s for *NQO1*. Fluorescence was acquired after each extension step. Samples were analyzed in duplicates. The nontemplate control contained water instead of cDNA. Negative cDNA synthesis controls (RNA transcribed without reverse transcriptase) were also used to show possible carry-over contamination. Each real-time PCR run contained serially diluted concentrations of standard plasmid DNA (*NQO1*, range 10^2 – 10^6 copies/reaction; *PPIA*, range $5 \cdot 10^2$ – $5 \cdot 10^6$ copies/reaction) for generation of calibration curve. Transcript levels were analyzed using RotorGene v6 software (Corbett Research). Absolute quantification with external standard curves generated from five decimal dilutions of the respective plasmid was performed. *NQO1* transcript levels (target) were normalized to levels of *PPIA* as internal control ($\text{copies}_{\text{target}}/\text{copies}_{\text{control}}$). Each sample was assessed in duplicate and the mean value was used for further analyses. Samples with larger than 15% variation between duplicates were reanalyzed.

Immunohistochemical detection of TP53 and NQO1 protein expression

Fresh tissue samples of the mammary tumors were fixed in standard neutral buffered 4% formaldehyde for up to 26 h and embedded into paraffin with classical histological techniques. For immunohistochemical investigation 3- μ m thick histological sections were used. Primary antibody against the NQO1 (A180; monoclonal mouse antibody raised against purified recombinant human NQO1 protein) was purchased from Santa Cruz (California, USA) and TP53 (clone DO-7; monoclonal mouse antibody detecting both mutant and wild-type TP53 protein) was purchased from Dako (Glostrup, Denmark). Antibodies were diluted with Dako Antibody diluent (1:100, anti-NQO1; 1:50, anti-TP53). For TP53 detection, the sections were further processed with heat-induced epitope retrieval in 10 mmol/l citrate buffer, pH 6.0, on water bath (40 min heating at 95–99°C and then 20 min cooling at room temperature). Tissues were incubated with NQO1 and TP53 primary antibodies overnight at 4°C. Detection was performed with peroxidase/diaminobenzidine system. Evaluation of binding of both primary antibodies was performed with Dako REAL Detection System (Dako; LSAB +, biotinylated secondary goat anti-mouse antibodies/streptavidin conjugated to horseradish peroxidase). As a chromogen, 0.04% DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride dihydrate; Fluka, Buchs, Switzerland) in 50 mmol/l Tris (Tris-hydroxymethyl amino methane)/0.015% H₂O₂ was used. For NQO1, a remnant of normal mammary gland in a vicinity of the tumor tissue served as an

internal positive control in each sample investigated. In case of TP53, several TP53-positive cells were present in each sample analyzed. Immunohistochemical levels of NQO1 protein were scored according to the intensity of staining (0, 1+, 2+, and 3+). Proportion of the positive cells (diffuse or focal positivity, and scattered cells positivity) was also considered in the evaluation. Finally, cases were divided to groups with negative (0 or 1+ with any type of positivity or 2+ or 3+ in scattered tumor cells) or positive (diffuse 2+ or 3+ positivity) expression. TP53 status was evaluated as positive, if more than 50% of tumor cells were immunohistochemically stained according to the previously published evaluation procedure [12,13].

Statistical analyses

For statistical analyses, NQO1 transcript levels were logarithmically transformed to normalize value distribution. Transformed levels were then analyzed by parametric tests, such as analysis of variance or two-sided independent samples *t*-test toward categorized values (*NQO1* genotype, NQO1 immunohistochemical protein expression and clinico-pathological data on patients). NQO1 transcript levels were correlated with size of the tumor or age at diagnosis using bivariate regression. Associations between categorized values, such as genotype, immunohistochemical score, and clinico-pathological data were analyzed using two-sided Fisher's exact test. The tested clinical and pathological variables were as follows: age at diagnosis in years, menopausal status, stage, tumor size in millimeter, nodal status (N0 vs. N1–3), histological type and grade, expression of TP53, estrogen and progesterone receptors. All *P* values are derived from two-sided tests. A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS v15.0 program (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Results

Clinico-pathological data on all examined patients are described in Table 1. At first, the evaluation set (*n* = 52) was analyzed. For replication of results, the validation set (*n* = 53) was then selected on the basis of sample and data availability.

NQO1 polymorphism, transcript levels and immunohistochemical protein expression

The *NQO1*-Ser frequency assessed by real-time PCR was 19% in both evaluation and validation sets combined (*N* = 105, Table 2). The NQO1 transcript levels were detected by real-time PCR in all 52 samples from the evaluation set and in 24 FFPE samples from the validation set (*n* = 53). The remaining samples from the validation set were not available in sufficient amount or quality for RNA extraction or RNA extraction failed. For statistical analyses, one outlier sample with extremely low NQO1 transcript level was excluded from the

Table 1 Clinico-pathological characteristics of patients involved in the study

Characteristics	Evaluation set	N	Validation set	N
Median age at diagnosis (years)	58.0 ± 10.4	52 (100)	60.0 ± 10.8	53 (100)
Menopausal status				
Premenopausal		7 (13.5)		10 (18.9)
Postmenopausal		45 (86.5)		41 (78.3)
Not available		0 (0)		2 (3.8)
Stage				
0		1 (1.9)		2 (3.8)
I		17 (32.7)		20 (37.7)
II		22 (42.3)		22 (41.5)
III		5 (9.6)		5 (9.4)
IV		1 (1.9)		0 (0)
Not available		6 (11.6)		4 (7.6)
Average tumor size (mm)	20.6 ± 12.5	50 (96.1)	16.6 ± 10.6	46 (86.8)
Not available		2 (3.9)		7 (13.2)
Nodal status				
Positive (N1–3)		19 (36.5)		20 (38.8)
Negative (NO)		26 (50.0)		28 (52.8)
Not available		7 (13.5)		5 (9.4)
Histological type				
Invasive ductal carcinoma of the mammary gland		41 (78.9)		44 (83.0)
Invasive lobular carcinoma of the mammary gland		4 (7.7)		6 (11.3)
Other type		6 (11.5)		3 (5.7)
Not available		1 (1.9)		0 (0)
Histological grade				
1		7 (13.5)		9 (17.0)
2		32 (57.6)		34 (64.2)
3		12 (23.1)		8 (15.0)
Not available		3 (5.8)		2 (3.8)
Estrogen receptor status				
Positive		32 (61.5)		40 (75.5)
Negative		19 (36.5)		13 (24.5)
Not available		1 (1.9)		0 (0)
Progesterone receptor status				
Positive		28 (53.8)		33 (62.3)
Negative		23 (44.2)		20 (37.7)
Not available		1 (1.9)		0 (0)
TP53 status				
Positive		11 (21.1)		12 (22.6)
Negative		40 (77.0)		40 (75.5)
Not available		1 (1.9)		1 (1.9)

N, number of patients with percentage in parentheses.

evaluation set. The average NQO1 transcript level was 894 copies of NQO1 normalized to PPIA/ng of total RNA in the evaluation set ($n = 51$, Table 2) and 111 copies in the validation set ($n = 24$, Table 2). More than 294-fold interindividual variability between tumor samples was found (Fig. 1 and Table 2). The NQO1 protein expression was determined in 50 tumor tissues from the evaluation set and 53 samples from the validation set. Two samples from the evaluation set were not available for this analysis because of unsatisfactory amount of tumor cells in paraffin blocks after extensive investigation. NQO1 staining was in cytoplasm and largely confined to the tumor cell population with no staining in stromal cells admixed between tumor cells (Fig. 2a). Negative NQO1 staining with positivity in nontumor population as an internal control confirmed that the method was well established (Fig. 2c). Twenty-four patients (48%) were

Table 2 NQO1 genotypes, transcript levels, and immunohistochemical protein expression

	Evaluation set	Validation set	Combined		
NQO1 genotype Pro187Ser by real-time PCR					
Pro/Pro ^a	34 (65.4)	36 (67.9)	70 (66.6)		
Pro/Ser ^a	16 (30.8)	14 (26.4)	30 (28.6)		
Ser/Ser ^a	2 (3.8)	3 (5.7)	5 (4.8)		
Total	52	53	105		
NQO1 transcript levels (number of copies NQO1/PPIA/ng of total RNA)					
	Minimum	Maximum	Mean	SD	Variability
Evaluation set	25	7337	894	1368	294-fold
Validation set	12	321	111	89	27-fold
	Evaluation set		Validation set		Combined
NQO1 protein expression and immunohistochemical score					
Negative expression ^c					
Score 0	19 (38.0)		23 (43.4)		42 (40.8)
Score 1	7 (14.0)		5 (9.5)		12 (11.6)
Positive expression ^c					
Score 2	11 (22.0)		8 (15.1)		19 (18.5)
Score 3	13 (26.0)		17 (32.0)		30 (29.1)
Total	50		53		103

NQO1, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1.

^aNumber of genotype carriers with percentage in parentheses, difference between both sets was not significant ($P = 0.827$, Pearson's χ^2 test).

^bNumber of examined samples. One outlier was excluded from analyses, difference between both sets was significant ($P < 0.001$, Mann-Whitney U test).

^cNumber of examined samples with percentage in parentheses. In two patients from the evaluation set NQO1 expression could not be determined, difference between both sets was not significant ($P = 0.924$, Pearson's χ^2 test).

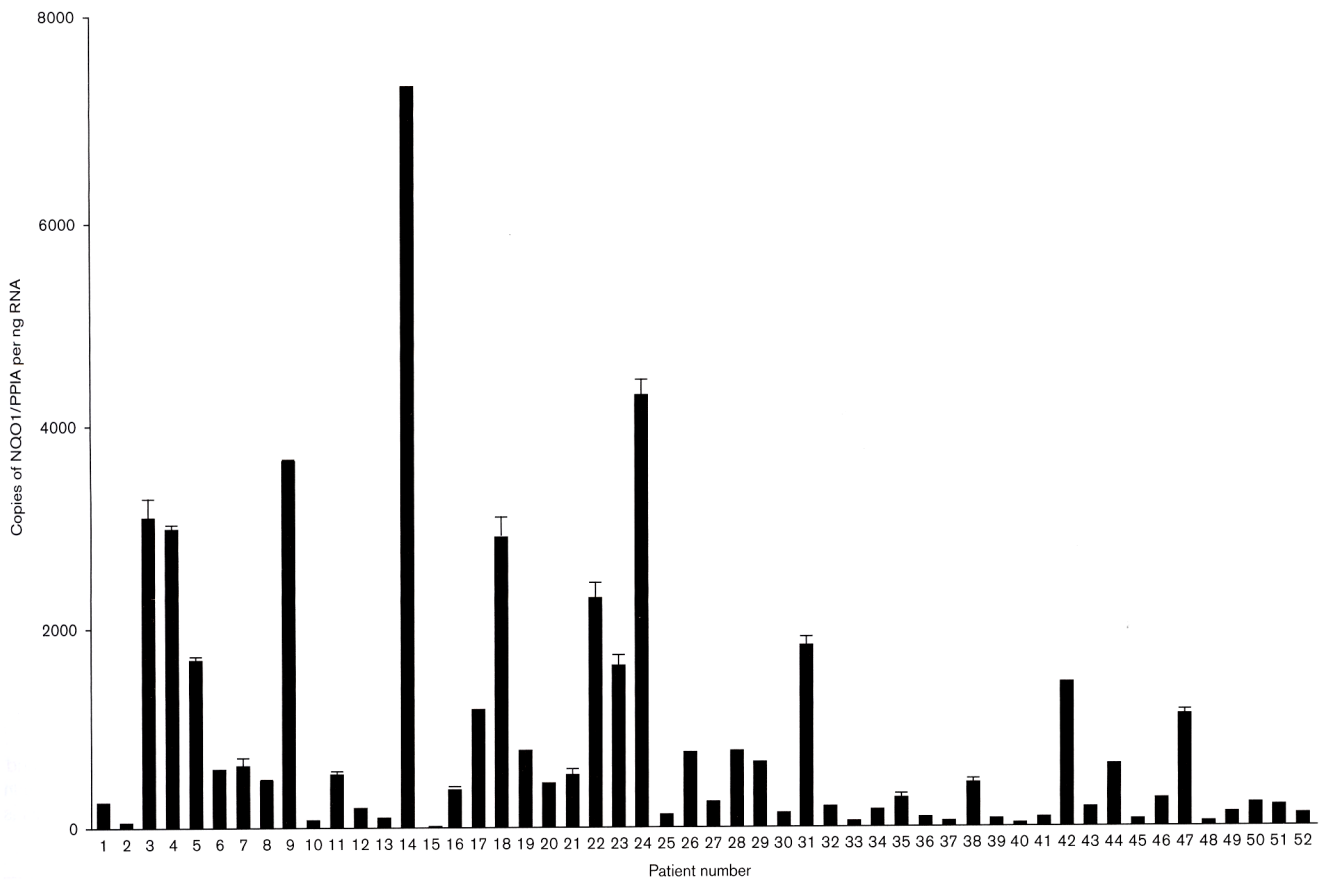
classified as NQO1-positive and the rest as negative in the evaluation set. The results of NQO1 protein expression in the validation set were highly similar to that in the evaluation set (47% positive vs. 53% negative).

The association between NQO1 genotype and transcript levels was nonsignificant in both evaluation and validation sets and also when both sets were combined (results not shown). Patients carrying at least one variant Ser allele had significantly more often NQO1-negative protein expression in both evaluation ($P = 0.032$) and validation sets ($P = 0.018$). When both sets were combined, association became highly significant ($P = 0.001$, Table 3). NQO1 transcript levels also well correlated with NQO1 protein expression. Patients with positive NQO1 protein expression had significantly higher transcript levels than patients with negative NQO1 expression (evaluation set, $P = 0.042$, Table 3). This association was also significant in the validation set ($P = 0.017$) and gained more strength when both sets were combined ($P = 0.007$).

Associations between NQO1 and clinico-pathological data

No significant association between NQO1 'knockout' polymorphism and clinico-pathological data on patients was found. The same was true for NQO1 transcript levels. An association between NQO1 protein expression

Fig. 1



NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) transcript levels in individual mammary tumor tissue samples from the evaluation set. Data are expressed as means \pm SD from duplicate determinations ($N=52$). PPIA, peptidylprolyl isomerase A.

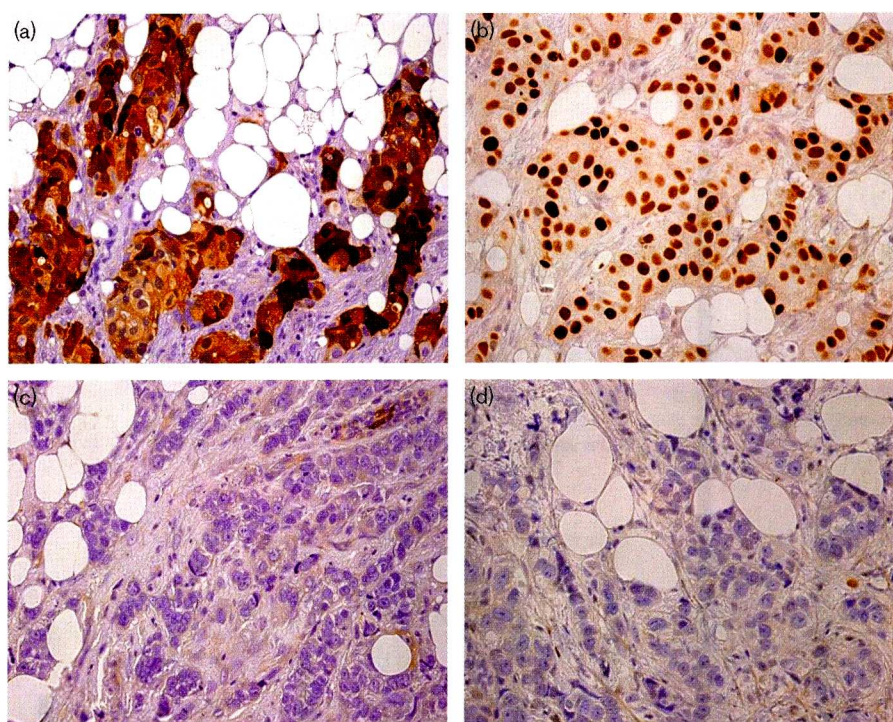
and disease stage was observed. The patients with stages 0, I, or II (less advanced disease) had often positive NQO1 protein expression in comparison with stage III or IV patients ($P=0.022$, Table 4). However, this association was not replicated by analysis of either the validation set or both sets combined ($P=0.231$, two-sided Fisher's exact test). NQO1 protein expression cosegregated with TP53 protein status in the evaluation set. Samples with negative NQO1 expression were often negative for TP53 ($n=22$, Fig. 2c and d). Combination of positive NQO1 and positive TP53 was significantly less frequent ($n=9$, Fig. 2a and b; $P=0.037$, Table 4). This association was not replicated by analysis of either the validation set or both sets combined ($P>0.999$, two-sided Fisher's exact test). The validation set was comparable with the evaluation set because no significant differences in clinico-pathological characteristics including TP53 status were found (results not shown).

Discussion

A functionally important single nucleotide polymorphism Pro187Ser in *NQO1* was associated with risk of breast

cancer in several studies [7,8,14]. A recent study found that *NQO1* variant Ser/Ser genotype strongly predicts poor survival in two large independent cohorts of breast cancer patients [9]. This study also suggested that response to anthracycline-based chemotherapy is defective in NQO1-deficient breast tumors showing the possible predictive role of the *NQO1* knockout polymorphism for this kind of treatment [9]. With regard to other cancer types, pancreatic [15,16] but not ovarian [17] or bladder [17,18] tumors were suggested to be a possible target of NQO1-directed therapies. The aim of this study was to investigate functional aspects of the above findings in breast cancer patients. First, we followed relationships between *NQO1* Pro187Ser genotype in lymphocyte DNA and transcript levels and protein expression in samples of human carcinomas of the mammary gland. For the assessment of NQO1 transcript level, we developed a highly sensitive method based on real-time PCR with absolute quantification, which is superior to relative or semiquantitative approaches. Second, we inspected possible associations between NQO1 (polymorphism, transcript levels, and protein expression) and clinico-pathological characteristics of breast cancer patients under

Fig. 2



Examples of immunohistochemical protein staining of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and TP53. Positive staining of NQO1 (a) and TP53 (b) compared with negative staining of NQO1 (c) and TP53 (d) in sections of the same patients. Negative NQO1 staining with positivity in nontumor population as an internal control is presented in (c). Positive TP53 staining of cores of the cells with negative staining in stromal cells is presented in (d).

Table 3 Associations between NQO1 polymorphism, transcript level and protein expression

	NQO1 negative	NQO1 positive	<i>P</i> ^a
NQO1 polymorphism versus protein expression, combined sets			
Pro/Pro	27 (51.9)	43 (84.3)	–
Pro/Ser	20 (38.5)	8 (15.7)	0.004
Ser/Ser	5 (9.6)	0 (0)	0.012
Pro/Ser or Ser/Ser	25	8	0.001
In two patients (both heterozygous) NQO1 expression could not be determined			
			<i>P</i> ^b
NQO1 transcript levels versus protein expression, the evaluation set			
NQO1 transcript level ^c	623 ± 950	1197 ± 1685	0.042
<i>n</i>	24	25	
One outlier (NQO1 negative) was excluded from analyses because of low NQO1 transcript level and in two patients NQO1 protein expression could not be determined			

NQO1, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1.

^aTwo-sided Fisher's exact test – given genotype versus Pro/Pro wild-type.

^bTwo-sided independent samples *t*-test.

^cMean ± SD in number of copies NQO1/PPIA/ng of total RNA.

study. The evaluation and validation sets of patients were analyzed subsequently to replicate results.

Patients with NQO1-negative protein expression had significantly lower transcript levels than patients with NQO1-positive expression. NQO1 transcript levels in

Table 4 Associations between NQO1 protein expression and clinico-pathological data

	NQO1 negative	NQO1 positive
NQO1 protein expression versus stage, the evaluation set		
Stages 0, I, or II ^a	17 (73.9)	21 (100)
Stages III or IV ^a	6 (26.1)	0 (0)
<i>P</i> = 0.022, two-sided Fisher's exact test		
NQO1 protein expression versus stage, the validation set		
Stages 0, I, or II ^a	21 (87.5)	21 (84.0)
Stages III or IV ^a	3 (12.5)	4 (16.0)
<i>P</i> > 0.999, two-sided Fisher's exact test		
NQO1 protein expression versus TP53 status, the evaluation set		
TP53 negative ^b	22 (91.7)	16 (64.0)
TP53 positive ^b	2 (8.3)	9 (36.0)
<i>P</i> = 0.037, two-sided Fisher's exact test		
NQO1 protein expression versus TP53 status, the validation set		
TP53 negative ^b	19 (67.9)	21 (87.5)
TP53 positive ^b	9 (32.1)	3 (12.5)
<i>P</i> = 0.113, two-sided Fisher's exact test		

NQO1, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1.

^aNumber of patients with percentage in parentheses. In six patients from the evaluation set, stage was not available and in two patients NQO1 expression could not be determined. In four patients from the validation set, stage was not assessed.

^bNumber of patients with percentage in parentheses. In one patient from the evaluation set, TP53 status was not available and in two patients NQO1 expression could not be determined. In one patient from the validation set, TP53 status was not available.

samples isolated from FFPE tissues (validation set) were on average 8-fold lower than those in samples isolated from the freshly frozen material (evaluation set). Despite the concern that RNA of considerably lower quality was recovered from FFPE, the replication of significant relationship between NQO1 transcript and protein levels previously observed in the evaluation set advocates for use of FFPE-derived material for validation purposes. The distribution of NQO1 protein immunochemical score in this study (41% score 0, 12% 1+, 18% 2+, 29% 3+) was similar to that recently reported on 354 breast cases by Cleton-Jansen *et al.* [19] (43% negative, 37% weak, 20% strong staining). A correlation between NQO1 protein activity and transcript level was reported in series of bladder cancer patients ($N=34$, $P=0.006$; Ref. [17]).

Our results, in particular, confirm some of the reported findings. Individuals carrying the variant *NQO1* genotype Ser/Ser should lack the NQO1 protein [20,21] because of accelerated degradation by the ubiquitin proteasomal system [6]. This is true in both of the studied sets because all individuals with variant genotype had immunochemically undetectable NQO1 protein levels in tumor cells. In contrast, the lack of NQO1 protein we found in tumor cells of 38.6% of wild-type carriers could be attributed to the previously mentioned tumor-driven silencing of NQO1 expression [22]. In control nontumor cells of wild-type samples we inspected, the NQO1 protein expression was found (unpublished data).

Carriage of variant alleles in both *NQO1* (Pro187Ser) and *TP53* (Pro72Ser) was reported to be a high risk factor in Czech and Austrian populations (odds ratio = 1.88, $P=0.011$; Ref. [8]). In addition, the study of Fagerholm *et al.* [9] presented a novel model of NQO1-mediated and TP53-mediated cellular response to breast cancer in response to anthracycline (quinoid structure) treatment. Functionally, there is ample evidence that NQO1 stabilizes TP53 against 20S proteasomal degradation [2,23,24]. However, there are no reports on association between NQO1 and TP53 protein expression in series of tumor samples. Breast cancer is ideal for such comparison as immunohistochemical status of TP53 is usually routinely assessed. In our evaluation study set, patients with negative NQO1 protein expression assessed by immunohistochemistry were significantly overrepresented among patients with TP53-negative protein status. In fact, the group NQO1-negative-TP53-negative was the most prevalent group in the studied cohort (45% of all evaluated samples). However, subsequent analysis of the validation set revealed rather an opposite trend. No association of either *NQO1* polymorphism or transcript levels with TP53 status was found as well.

Analysis of clinico-pathological characteristics of patients in the evaluation set showed that all patients with

advanced disease (stages III and IV) had negative NQO1 protein expression. In contrast, the majority of patients with less advanced disease had NQO1-positive protein expression (21 positive, 17 negative). This observation again was not replicated by analysis of the validation set. On account of the relatively short time for recruitment of majority of patients, the survival analysis was not yet possible.

Taken together, this study confirmed the previously published association between NQO1 knockout genotype and protein levels. Additional information on the role of transcription level in this association was observed. The initially detected cosegregation between TP53 and NQO1 protein expression was not replicated by the analysis of validation set, which underlines the importance of inclusion of validation sample sets into future studies.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health, no: 8563-5, 9426-3, a grant from the Grant Agency of Charles University, no: 94507 and Research Project of the Ministry of Health and Faculty Hospital Motol no: MZO 00064203/6704.

Conflicts of interest: none declared.

References

- Hosoda S, Nakamura W, Hayashi K. Properties and reaction mechanism of DT-diaphorase from rat liver. *J Biol Chem* 1974; **249**:6416–6423.
- Asher G, Lotem J, Cohen B, Sachs L, Shaul Y. Regulation of TP53 stability and TP53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**:1188–1193.
- Siegel D, Ross D. Immunodetection of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues. *Free Radic Biol Med* 2000; **29**:246–253.
- Siegel D, Beall H, Senekowitsch C, Kasai M, Arai H, Gibson NW, Ross D. Bioreductive activation of mitomycin C by DT-diaphorase. *Biochemistry* 1992; **31**:7879–7885.
- Walton MI, Smith PJ, Workman P. The role of NAD(P)H: quinone reductase (EC 1.6.99.2, DT-diaphorase) in the reductive bioactivation of the novel indoloquinone antitumor agent EO9. *Cancer Commun* 1991; **3**:199–206.
- Siegel D, Anwar A, Winski SL, Kepa JK, Zolman KL, Ross D. Rapid polyubiquitination and proteasomal degradation of a mutant form of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Mol Pharmacol* 2001; **59**:263–268.
- Sarmanova J, Susova S, Gut I, Mrhalova M, Kodet R, Adamek J, Roth Z, Soucek P. Breast cancer: role of polymorphisms in biotransformation enzymes. *Eur J Hum Genet* 2004; **12**:848–854.
- Menzel HJ, Sarmanova J, Soucek P, Berberich R, Grünewald K, Haun M, Kraft HG. Association of NQO1 polymorphism with spontaneous breast cancer in two independent populations. *Br J Cancer* 2004; **90**:1989–1994.
- Fagerholm R, Hofstetter B, Tommiska J, Aaltonen K, Vrtel R, Syrjäkoski K, *et al.* NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 NQO1*2 genotype (P187S) is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer. *Nat Genet* 2008; **40**:844–853.
- Tavassóli FA, Devilee P. *WHO Classification of Tumours, No. 4: Pathology and Genetics, Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon: IARC; 2003. pp. 432.
- Soucek P, Anzenbacher P, Skoumalova I, Dvorak M. Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells* 2005; **23**:1417–1422.
- Kai K, Nishimura R, Arima N, Miyayama H, Iwase N. p53 expression status is a significant molecular marker in predicting the time to endocrine therapy

- failure in recurrent breast cancer: a cohort study. *Int J Clin Oncol* 2006; **11**:426–433.
- 13 Von Minckwitz G, Sinn HP, Raab G, Loibl S, Blohmer JU, Eidtmann H, *et al.* German Breast Group. Clinical response after two cycles compared to HER2, Ki-67, p53, and bcl-2 in independently predicting a pathological complete response after preoperative chemotherapy in patients with operable carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res* 2008; **10**:R30.
 - 14 Fowke JH, Shu XO, Dai Q, Jin F, Cai Q, Gao YT, Zheng W. Oral contraceptive use and breast cancer risk: modification by NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) genetic polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; **13**:1308–1315.
 - 15 Lewis AM, Ough M, Du J, Tsao MS, Oberley LW, Cullen JJ. Targeting NAD(P)H:Quinone oxidoreductase (NQO1) in pancreatic cancer. *Mol Carcinog* 2005; **43**:215–224.
 - 16 Awadallah NS, Dehn D, Shah RJ, Russell Nash S, Chen YK, Ross D, *et al.* NQO1 expression in pancreatic cancer and its potential use as a biomarker. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008; **16**:24–31.
 - 17 Jamieson D, Wilson K, Pridgeon S, Margetts JP, Edmondson RJ, Leung HY, *et al.* NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and nrh:quinone oxidoreductase 2 activity and expression in bladder and ovarian cancer and lower NRH:quinone oxidoreductase 2 activity associated with an NQO2 exon 3 single-nucleotide polymorphism. *Clin Cancer Res* 2007; **13**:1584–1590.
 - 18 Basu S, Brown JE, Flannigan GM, Gill JH, Loadman PM, Martin SW, *et al.* NAD(P)H:Quinone oxidoreductase-1 C609T polymorphism analysis in human superficial bladder cancers: relationship of genotype status to NQO1 phenotype and clinical response to Mitomycin C. *Int J Oncol* 2004; **25**:921–927.
 - 19 Cleton-Jansen AM, van Eijk R, Lombaerts M, Schmidt MK, Van't Veer LJ, Philippo K, *et al.* ATBF1 and NQO1 as candidate targets for allelic loss at chromosome arm 16q in breast cancer: absence of somatic ATBF1 mutations and no role for the C609T NQO1 polymorphism. *BMC Cancer* 2008; **8**:105.
 - 20 Siegel D, McGuinness SM, Winski SL, Ross D. Genotype-phenotype relationships in studies of a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Pharmacogenetics* 1999; **9**:113–121.
 - 21 Zhang J, Schulz WA, Li Y, Wang R, Zotz R, Wen D, *et al.* Association of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) C609T polymorphism with esophageal squamous cell carcinoma in a German Caucasian and a northern Chinese population. *Carcinogenesis* 2003; **24**:905–909.
 - 22 Sarbia M, Bitzer M, Siegel D, Ross D, Schulz WA, Zotz RB, *et al.* Association between NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) inactivating C609T polymorphism and adenocarcinoma of the upper gastrointestinal tract. *Int J Cancer* 2003; **107**:381–386.
 - 23 Anwar A, Dehn D, Siegel D, Kepa JK, Tang LJ, Pietenpol JA, Ross D. Interaction of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) with the tumor suppressor protein p53 in cells and cell-free systems. *J Biol Chem* 2003; **278**:10368–10373.
 - 24 Gong X, Kole L, Iskander K, Jaiswal AW. NRH:quinone oxidoreductase 2 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 protect tumor suppressor TP53 against 20S proteasomal degradation leading to stabilization and activation of TP53. *Cancer Res* 2007; **67**:5380–5388.

Příloha č. 2

Hubackova M, Vaclavikova R, Ehrlichova M, Mrhalova M, Kodet R, Kubackova K, Vrana D, Gut I, Soucek P. Association of superoxide dismutases and NAD(P)H quinone oxidoreductases with prognosis of patients with breast carcinomas. *Int J Cancer*. 2012;130(2):338-48. (IF₂₀₁₂ = 6,2)

Association of superoxide dismutases and NAD(P)H quinone oxidoreductases with prognosis of patients with breast carcinomas

Miluse Hubackova^{1,2}, Radka Vaclavikova¹, Marie Ehrlichova¹, Marcela Mrhalova³, Roman Kodet³, Katerina Kubackova⁴, David Vrána^{1,5}, Ivan Gut¹ and Pavel Soucek¹

¹Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic

²Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

³Department of Pathology and Molecular Medicine, 2nd Faculty of Medicine and Hospital Motol, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

⁴Department of Oncology and Radiotherapy, 2nd Faculty of Medicine and Hospital Motol, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

⁵Department of Medicine, Nemocnice Atlas, Zlin, Czech Republic

Associations of transcript levels of oxidative stress-modifying genes *SOD2*, *SOD3*, *NQO1* and *NQO2* and their functional single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs4880, rs1799895, rs2536512, rs699473, rs1800566 and rs1143684 with prognosis of breast cancer patients were studied. SNPs were assessed by allelic discrimination in a cohort of 321 breast cancer patients from the Czech Republic. Transcript levels were determined by real-time polymerase chain reaction (PCR) with absolute quantification in tumor and adjacent non-neoplastic control tissues. Both genotypes and transcript levels were then compared with available clinical data on patients. Patients carrying low activity allele Leu in *NQO2* rs1143684 had a greater incidence of stage 0 or I disease (*i.e.*, better prognosis) than patients with the Phe/Phe genotype. This association was more evident in patients without expression of progesterone receptors ($p = 0.031$). Patients carrying the Thr allele in *SOD3* rs2536512 SNP had a significantly greater incidence of tumors expressing estrogen receptors than patients carrying the Ala/Ala genotype ($p = 0.007$). *SOD3* transcript level was significantly higher in grade 1 or 2 tumors than in grade 3 tumors ($p = 0.006$). Patients carrying T allele in *SOD3* rs699473 SNP had significantly poorer progression-free survival (PFS) than patients carrying the CC genotype ($p = 0.038$). The same applied to the subgroup of patients treated by hormonal regimens ($p = 0.021$). Patients carrying the high activity Ala/Ala genotype in *SOD2* (rs4880) had significantly poorer PFS than Val allele carriers in the group treated by cyclophosphamide but not hormonal regimens ($p = 0.004$). Our results suggest that *NQO2*, *SOD2* and *SOD3* may significantly modify prognosis of breast cancer patients and that their significance should be further characterized.

Breast cancer is the most common cancer in women. In 2008, about 1,383,523 new cases of invasive breast cancer were diagnosed worldwide.¹ The necessity of treating such a large number of patients calls for efficient tools that can be used for subgrouping patients according to estimated prognosis. A different spectrum of treatment modalities with diverse mechanisms of action and adverse effects could then be offered to various prognostic groups. Besides well-established classical prognostic factors such as tumor size, nodal status,

grading and expression of hormonal receptors, numerous biological molecules are under investigation as potential prognostic biomarkers in breast carcinomas.

Excess of oxidative stress, mediated by reactive oxygen species, may cause cellular deregulation leading to cell apoptosis,² proliferation or tumor promotion.³ Alkylation and topoisomerase poisoning present the major mechanisms of action of cyclophosphamide and anthracyclines, respectively. Oxidative stress represents an additional cytotoxic mechanism.^{4,5} One of the initial molecules of oxidative stress, superoxide anion radical, is formed by the univalent reduction of triplet-state molecular oxygen. This process is mediated by enzymes such as NAD(P)H oxidases and xanthine oxidase or non-enzymatically by redox-reactive compounds such as the semiubiquinone compound of the mitochondrial electron transport chain.⁶ NAD(P)H:quinone oxidoreductases (*NQO1* and *NQO2*) protect cells from oxidative damage by catalyzing reduction of carcinogenic quinone compounds to their hydroquinone forms.⁷ Ahn *et al.* suggested that deletion of *NQO2* plays a differential role in the tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway by downregulation of cell survival signals and by upregulation of TNF-induced apoptosis.⁸ *NQO2* was also shown to reduce estrogen orthoquinones,

Key words: breast, cancer, prognosis, superoxide dismutase, quinone oxidoreductase

Grant sponsor: Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health; **Grant number:** 9799-4; **Grant sponsor:** Faculty Hospital Motol; **Grant number:** MZO FNM 2005/6704; **Grant sponsor:** Grant Agency of Charles University; **Grant number:** 94507

DOI: 10.1002/ijc.26006

History: Received 27 Aug 2010; Accepted 3 Feb 2011; Online 23 Feb 2011

Correspondence to: Pavel Soucek, Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Srobarova 48, 10042 Prague 10, Czech Republic, Tel.: +420-2-6708-2709, Fax: +420-2-6731-1236, E-mail: psoucek@szu.cz

indicating that it could be a novel target for prevention of breast cancer initiation.⁹ NQO1 (as well as NQO2) is also involved in the protection of a “gatekeeper,” TP53, from 20S proteasomal degradation.^{10–12} Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in exon 6 of *NQO1* (Pro187Ser, rs1800566) and exon 3 of *NQO2* (Phe47Leu, rs1143684) were associated with lower enzyme activities.^{13,14} A recent study suggested that the genotype Ser/Ser in *NQO1* SNP rs1800566 is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer.¹⁵ Fagerholm *et al.* proposed that *NQO1* influences the outcome of epirubicin treatment through at least three mechanisms: the TP53 and TNF-NF- κ B pathways and direct detoxification of reactive oxygen species.¹⁵ Our study at both mRNA and protein levels did not find additional evidence about the mechanism of NQO1-TP53 association.¹⁶ Thus, more complex mechanism may be behind the reported association.

Manganese superoxide dismutase (*SOD2*) converts the superoxide anion radical into hydrogen peroxide and oxygen in mitochondria and plays a key role in protecting cells from oxidative damage.¹⁷ The *SOD2* SNP (Val16Ala, rs4880) in gene sequence leads to a conformational change in the helical structure of the protein. The Val allele of the enzyme has lower efficiency of transport into mitochondria.¹⁸ A recent study suggested that higher antioxidant activity due to SNP rs4880 in *SOD2* may lead to poorer survival after cyclophosphamide-containing breast cancer chemotherapy,¹⁹ and these results were partly confirmed by another study.²⁰ Patients with alleles related to a higher antioxidant activity experienced significantly less grade 3–4 neutropenia but had poorer progression-free survival (PFS) than women with low-activity genotypes.²⁰ The extracellular superoxide dismutase EC-SOD (*SOD3*) has Cu and Zn in the catalytic center and is highly expressed in blood vessels, heart, lungs, kidney, placenta and extracellular fluids.²¹ Of all three human SODs tested in pancreatic tumor xenograft nude mice, direct injections of the *SOD3* expressing AdEcSOD vector had the greatest effect in inhibiting *in vivo* tumor growth and increasing survival.²² The most studied Gly allele in *SOD3* SNP Arg231Gly (rs1799895) leads to 10-times higher concentration of *SOD3* in plasma.²³ The more frequent *SOD3* SNPs (Ala58Thr, rs2536512 and $-1257C>T$, rs699473) have unknown functional effects. No report on association of *SOD3* with prognosis of breast carcinomas has been published so far.

This study intended to evaluate a possible association between important modifiers of oxidative stress and routinely used prognostic factors in breast cancer. Functional SNPs in *NQO1* (Pro187Ser, rs1800566), *NQO2* (Phe47Leu, rs1143684), *SOD2* (Val16Ala, rs4880) and unexplored SNPs in *SOD3* (Ala58Thr, rs2536512; Arg231Gly, rs1799895 and $-1257C>T$, rs699473) as well as transcript levels in tumor tissues were followed in order to assess their potential use as biomarkers of breast cancer prognosis. The genotype–phenotype relationship was also addressed.

Material and Methods

Subjects

Blood samples were obtained from 321 incident breast cancer patients consecutively diagnosed in three faculty hospitals in Prague during the period between February 2000 and December 2006. From this cohort, 120 samples of mammary carcinomas and 51 paired adjacent control tissues without morphological signs of carcinoma were also collected. Tissue samples were collected during surgery and snap-frozen in liquid nitrogen. Cryostat sections were stained by hematoxylin and eosin and reviewed by a staff pathologist. Five-micrometer cryostat sections were prepared for isolation of total RNA. The presence of tumor cells in the sample was histologically verified in the first and in the last section of a row. The sections cut in the layers between the aforementioned histological controls were used for total RNA isolations. To increase the content of tumor cells in samples, the surrounding non-neoplastic tissue (connective and adipose tissue) was removed before sectioning. Samples of normal adjacent breast tissue were taken in areas remote from a grossly apparent tumor tissue in resection specimens. In the majority of cases, the distance from the tumor was greater than 10 mm. After deep freezing of this tissue, histological sections were evaluated microscopically to confirm that samples were tumor free. In some cases, excision from the tumor sample was available only in a native state (non fixed in standard neutral buffered formaldehyde). Some non-tumor samples were excluded because infiltration by tumor cells was found after microscopic evaluation of the frozen section. In some samples, the number of non-neoplastic cells in the adjacent tissue was not satisfactory for isolation of nucleic acid (only adipose or fibrous tissues were present in these tissue samples).

Histological classification of carcinomas was performed according to standard diagnostic procedures.²⁴ The following data on patients were retrieved from medical records: age at diagnosis, menopausal status, personal history, family history (number of relatives affected by breast cancer, ovarian cancer or other malignant diseases), stage, tumor size, histological type and grade of the tumor, expression of estrogen and progesterone receptors and PFS. Expression of estrogen and progesterone receptors was assessed according to the published procedure²⁵ with the commonly used 10% cut-off value. Disease progression was determined by the same technique in all the patients followed up, *i.e.*, radiological assessment (computer tomography, abdominal ultrasonography, chest x-ray, mammography or bone scan), and clinically in case of skin metastases. Locoregional relapse was histologically confirmed. Tumor marker elevation without any clinical or radiological signs was not considered as disease progression. All patients were asked to read and sign informed consent in accordance with the requirements of the Ethical Commission of the National Institute of Public Health in Prague.

DNA isolation and genotyping

Blood samples were collected during the diagnostic procedures using tubes with K3EDTA anticoagulant. Genomic DNA was isolated with BioSprint 15 DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) using a KingFisher mL instrument and the protocol supplied by the manufacturer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). SNPs in *NQO1* (rs1800566), *NQO2* (rs1143684), *SOD2* (rs4880) and *SOD3* (rs2536512, rs1799895 and rs699473) were determined by TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays (Assay ID: C_2091255_30 for *NQO1*; C_8774861_1 for *NQO2*; C_8709053_10 for *SOD2*; C_2668728_10, C_2307506_10 and C_2668727_1 for *SOD3*, respectively) obtained from Applied Biosystems (Foster City, CA) using real-time polymerase chain reaction (PCR) in a RotorGene 6000 instrument (Corbett Research, Sydney, Australia). Reaction mixtures for real-time PCR contained 5 μ l of 2x TaqMan Genotyping Master Mix (kit no.4371355, Applied Biosystems), 0.25 μ l of TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assay and 4.75 μ l of DNA template diluted to concentration of 0.7 ng/ μ l. Cycling parameters were initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles consisting of denaturation at 95°C for 15 sec and annealing at 60°C for 60 sec for *NQO1*, *NQO2*, *SOD2*, rs2536512 and rs1799895 in *SOD3* or 58°C for 60 sec for rs699473 in *SOD3*. The non-template control consisted of a reaction tube in which water was used in place of the DNA sample. Ten percent of randomly selected samples were reanalyzed with 100% concordance of results.

Preparation of standards for quantitative real-time PCR

Fragments spanning all coding sequences of *NQO1* (825 bp), *NQO2* (696 bp) and *SOD2* (863 bp) and exons 1–2 (208 bp) of *SOD3* and exons 3–5 (738 bp) of peptidylprolyl isomerase A (*PPIA*) were subcloned into vector *pDONR201* using Gateway™ Cloning Technology (Invitrogen, Carlsbad, CA). The entry clones were propagated in *Escherichia coli* DH5 α Maximum Efficiency Cells (Invitrogen) and isolated by Plasmid Midi Kit (Qiagen). Concentrations and purity of plasmids were determined spectrophotometrically. Sequences of primers and PCR conditions for cloning are available upon request.

Quantification of mRNA transcript levels

Total RNA was isolated from tissue sections using Trizol Reagent (Invitrogen) according to the procedure recommended by the manufacturer and stored at –80°C. The quality of RNA was verified by horizontal agarose gel electrophoresis. RNA quantity was assessed by UV spectrophotometry on a Cary 300 spectrophotometer (Varian, Palo Alto, CA). cDNA was synthesized using 0.5 μ g of total RNA in 20 μ l of final volume by help of RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit with random hexamer primers according to the manufacturer's protocol (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) and stored at –80°C. The quality of cDNA in terms of DNA con-

tamination was then confirmed by PCR amplification of ubiquitin C fragment discriminating between product from cDNA (190 bp) and genomic DNA (1,009 bp) as described previously.²⁶ All cDNA samples that were free of DNA contamination (absence of 1,009 bp band in sample incubated without reverse transcriptase) were further analyzed. Subsequently, quantitative real-time PCR was performed in RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia) and TaqMan Gene Expression Assays were used (*NQO1*, kit no.Hs01045994_m1; *NQO2*, kit no.Hs01056948_m1; *SOD2*, kit no.Hs00167309_m1; *SOD3*, kit no.Hs00162090_m1; Human *PPIA* Endogenous Control, kit no. 4333763F). *PPIA* was used as a reference gene. The real-time PCR reaction mixtures contained 10 μ l of 2x TaqMan Universal PCR Master Mix (kit no.4304437) for *NQO1*, *NQO2* and *PPIA* or 10 μ l of ABSolute QPCR ROX Mix (ABgene) for *SOD2* and *SOD3*, 1.0 μ l of FAM-labeled probe and primers set (TaqMan Gene Expression Assay specified above), 5 μ l of diluted cDNA template and water to a final volume of 20 μ l. Cycling parameters were initially held at 50°C for 2 min and initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 50 cycles consisting of denaturation at 95°C for 15 sec and annealing/extension at 58°C for 60 sec for *PPIA*, 56°C for 50 sec for *NQO1* and *NQO2* or 60°C for 60 sec for *SOD2* and *SOD3*. Fluorescence was acquired after each extension step. The non-template control contained water instead of cDNA. Negative cDNA synthesis controls (RNA transcribed without reverse transcriptase) were also employed to reveal possible carry-over contamination. Each real-time PCR run contained serially diluted concentrations of standard plasmid DNA (*NQO1*, *NQO2*, *SOD2* range 10²–10⁶ copies/reaction; *SOD3*, range 10²–10⁶ and 5.10⁶ copies/reaction; *PPIA*, range 5.10²–5.10⁶ copies/reaction where 100 copies/reaction were set as limit of detection) for generation of the calibration curve. Transcript levels were analyzed using RotorGene v6 software (Corbett Research). Absolute quantification with external standard curves (efficiency above 90% and $r^2 > 0.99$) generated from five decimal dilutions of the respective plasmid was performed. *NQO1*, *NQO2*, *SOD2* and *SOD3* transcript levels (target) were normalized to levels of *PPIA* as internal control (copies_{target}/copies_{control}). Each sample was assessed in duplicate and the mean value was used for further analyses. Samples with more than 15% variation between duplicates were reanalyzed.

Statistical analyses

For statistical analyses, transcript levels of all established genes were logarithmically transformed to normalize value distribution. Transformed levels were then analyzed by parametric ANOVA test toward categorized values (genotype and categorical clinicopathological data on patients). Transcript levels of all target genes were correlated with size of the tumor or age at diagnosis using bivariate regression. Genotypes were evaluated as homozygote for ancestral allele vs. homozygote for nonancestral allele, homozygote for ancestral allele

Table 1. Clinicopathological characteristics of patients involved in the study

Characteristics	Median \pm SD	N (%) ¹
Median age at diagnosis, years	61.5 \pm 12.1	321 (100)
Menopausal status		
Premenopausal		59 (18.4)
Postmenopausal or perimenopausal		262 (81.6)
Stage		
I ²		119 (39.7)
II		137 (45.7)
III		42 (14.0)
IV		2 (0.6)
Not available		21
Lymph node status		
Positive (N1-3)		120 (40.0)
Negative (N0)		180 (60.0)
Not available		21
Average tumor size, mm	17.0 \pm 12.8	284 (89.5)
Not available		37 (11.5)
Histological type³		
Invasive duct carcinoma of the mammary gland		255 (79.4)
Other types of carcinoma of the mammary gland		66 (20.6)
Histological grade^c		
1		48 (17.1)
2		147 (52.3)
3		86 (30.6)
Expression of estrogen receptors		
Positive		178 (63.3)
Negative		103 (36.7)
Data not available		40
Expression of progesterone receptors		
Positive		140 (49.8)
Negative		141 (50.2)
Data not available		40
Adjuvant therapy		
Anthracycline-containing (AT, AC, FAC, FEC)		74
Cyclophosphamide-containing (FAC, FEC, CMF, AC)		89
Hormonal treatment (tamoxifen or aromatase inhibitors)		179
Radiotherapy		77
PFS or therapy not available due to the loss of patients during the follow-up		101

¹N = number of patients with percentage in parentheses. ²Including five patients with stage 0 DCIS. ³DCIS, LCIS, invasive lobular, medullary and mucinous carcinomas were not included in analyses of grade.

vs. heterozygote or homozygote for ancestral allele vs. nonancestral allele (dominant model) or homozygote for nonancestral allele vs. ancestral allele (recessive model). Associations between categorized values as genotype and clinicopathological data listed below were analyzed using two-sided Fisher's Exact test. The tested clinical and pathological variables were

as follows: menopausal status (pre- vs. post- or perimenopausal), stage, lymph node metastasis (N0 vs. N1-3), histological type (invasive duct vs. other invasive carcinoma) and grade and expression of estrogen and progesterone receptors (negative vs. positive). The additive genetic model was assessed by logistic regression as well. PFS was calculated by

the Kaplan–Meier method and the log-rank test was used for comparisons. PFS was defined as the time elapsed between surgical treatment and disease progression or death from any cause. Patients lost to follow-up and patients with stage IV disease ($n = 2$) were excluded from PFS analyses. p values are departures from two-sided tests. A p value of less than 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using SPSS v15.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL). The study had 80% power to detect OR = 2.0 or higher at the 5% type I error rate when considering the lowest minor allele frequency of 17% (*NQO1*, rs1800566) for analyses of menopausal status, histological type and grade. The study had 80% power to detect OR = 1.8 or higher for analyses of stage, lymph node status and expression of hormonal receptors under the same considerations. QUANTO (version 1.2.4) software was used to calculate the statistical power of the study.

Results

Study population characteristics and SNPs

We collected blood samples from patients with breast carcinoma ($n = 321$). Clinicopathological data on all patients are presented in Table 1. SNPs in oxidative stress modifying genes were assessed in all available DNA samples (Table 2). With the exception of rs4880 in *SOD2*, the genotype distribution and nonancestral allele frequencies of the studied SNPs did not significantly differ from Caucasian populations (CEU sample) genotyped previously.²⁷ However, the distribution of genotypes in *SOD2* rs4880 in our study did not differ from a recently published Norwegian cohort of a similar size (Ref. 19, $n = 329$). None of the followed SNPs deviated from Hardy-Weinberg equilibrium at $p < 0.05$ level of significance (data not shown). A total of 23.7% of all patients ($n = 76$) had a positive family history of breast and/or ovarian cancer. The genotype distribution in the group of patients with a positive family history did not differ from the group of patients with no history of breast and/or ovarian cancers (Pearson chi-square test, data not shown). The median and mean times of follow-up were 43 and 47 months (with the range of 3–110 months), respectively.

NQO1, *NQO2*, *SOD2* and *SOD3* transcript levels

Transcript levels were detected by real-time PCR in 120 samples of tumor tissues and 51 paired samples of adjacent non-neoplastic tissue (Fig. 1). Transcript levels of *NQO2*, *SOD2* and *SOD3* significantly differed between tumor and non-neoplastic tissues (Fig. 1). *NQO2* and *SOD2* were upregulated in the tumor tissue. The opposite was true for *SOD3*, *i.e.*, strong downregulation in tumor tissue samples. The average transcript levels in tumors followed this trend: *NQO1* > *NQO2* > *SOD2* > *SOD3*. The following trend *NQO1* > *SOD2* > *NQO2* > *SOD3* was observed in non-neoplastic tissues. Raw transcript levels did not show normal value distribution and therefore logarithmic transformation was performed prior to statistical analyses.

Table 2. *NQO1*, *NQO2*, *SOD2* and *SOD3* genotype distributions

Gene (SNP)	Genotype	N (%)
<i>NQO1</i> (rs1800566)		
	Pro187Pro	225 (70.1)
	Pro187Ser	83 (25.9)
	Ser187Ser	13 (4.0)
	qSer ²	0.17
<i>NQO2</i> (rs1143684) ¹		
	Phe47Phe	204 (64.8)
	Phe47Leu	97 (30.8)
	Leu47Leu	14 (4.4)
	qLeu ²	0.20
<i>SOD2</i> (rs4880) ¹		
	Val16Val	77 (24.1)
	Val16Ala	170 (53.1)
	Ala16Ala	73 (22.8)
	qAla ²	0.49
<i>SOD3</i> (rs2536512) ¹		
	Ala58Ala	131 (40.9)
	Thr58Ala	147 (45.9)
	Thr58Thr	42 (13.1)
	qThr ²	0.36
<i>SOD3</i> (rs1799895) ¹		
	Arg231Arg	319 (100.0)
	Arg231Gly	0 (0)
	Gly231Gly	0 (0)
	qGly ²	0
<i>SOD3</i> (rs699473) ¹		
	CC	40 (12.5)
	CT	152 (47.5)
	TT	128 (40.0)
	qT ²	0.64

¹In six patients *NQO2*, in two patients *SOD3* (rs1799895), in one patient *SOD2* and *SOD3* (rs699473) genotypes could not be determined due to inadequate quantity or quality of DNA. ²Frequency of the nonancestral allele.

No significant association between the studied SNPs and transcript levels was found by ANOVA test using logarithmically transformed transcript levels (results not shown).

Associations between transcript levels, SNPs and clinicopathological data

The functional SNP rs1143684 in *NQO2* was significantly associated with disease stage and expression of progesterone receptors. Patients with stages 0 or I (less advanced disease) had a greater incidence of the *NQO2* nonancestral Leu allele than those with more advanced stages II–IV ($p = 0.033$, Table 3), and this association was confirmed by the additive model ($p = 0.031$, Table 3). Patients with tumors expressing

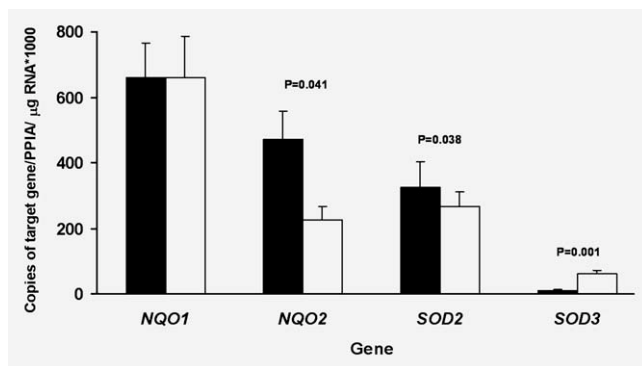


Figure 1. *NQO1*, *NQO2*, *SOD2* and *SOD3* transcript levels in tumor ($n = 120$) and non-tumor ($n = 51$) tissues. Transcript levels were assessed by quantitative real-time PCR with absolute quantification as described in the Material and Methods section. Differences in logarithmically transformed transcript levels between tumor (■) and non-tumor (□) samples were evaluated by two-sided paired *T*-test for 51 samples for which paired tissues were available. In one patient, the *NQO1* and *NQO2* transcript levels could not be determined.

progesterone receptors had a greater incidence of the *NQO2* nonancestral Leu allele than those without expression of progesterone receptors ($p = 0.028$, Table 3). However, analysis of the additive model did not confirm this association ($p = 0.053$, Table 3). Expression of progesterone receptors was significantly associated with stage ($p = 0.032$). Subgroup analyses were therefore performed. In the group of patients without expression of progesterone receptors, those with stages 0 or I had a significantly greater incidence of the *NQO2* nonancestral Leu allele than those with stages II-IV ($p = 0.029$, additive model). No association was found in patients with expression of progesterone receptors. The missense SNP rs2536512 in *SOD3* was significantly associated with expression of estrogen receptors. Patients with tumors expressing estrogen receptors carried the nonancestral Thr allele with significantly higher frequency than those without expression ($p = 0.007$, Table 3). This association was also significant in patients with tumors expressing both estrogen and progesterone receptors ($p = 0.018$, Table 3). Both associations were confirmed by the additive model (Table 3). No other association was observed in the analyses of SNPs in patients divided by clinicopathological data.

SOD3 transcript level was significantly higher in grade 1 or 2 tumors (mean \pm SE, 13.4 ± 2.4 copies of *SOD3*/PPIA/ μ g RNA*1000, $n = 77$) than in grade 3 tumors (5.6 ± 1.9 , $n = 28$) (ANOVA with logarithmic normalization, $p = 0.006$). No association between age at diagnosis, menopausal status, tumor size, histological type and SNPs or transcript levels was found (results not shown).

Progression-free survival analysis

For PFS analysis, patients were divided into groups according to their logarithmically transformed transcript levels. Groups

were divided into 50th percentiles and quartiles. This grouping was then used for the stratification of PFS analysis. Patients were also divided according to regimens received (cyclophosphamide-containing regimens: yes vs. no; anthracycline-containing regimens: yes vs. no; hormonal regimens: yes vs. no; radiotherapy: yes vs. no). PFS of patients did not significantly differ according to the type of therapy (data not shown). Tumor type (invasive ductal vs. other) and grade did not significantly modify PFS. Lymph node status ($p < 0.001$), stage ($p < 0.001$) and expression of both receptors ($p = 0.011$) significantly modified the PFS of the whole group of patients. Transcript levels alone did not significantly modify PFS in either the whole patient group ($n = 101$) or in patients stratified according to their therapy (data not shown). SNP rs699473 in *SOD3* significantly modified the PFS of all patients ($n = 217$, Fig. 2a, $p = 0.038$, log-rank test). Other studied SNPs did not significantly modify PFS (data not shown). No significant association of the studied SNPs with PFS in patients with node-positive ($n = 88$) or node-negative ($n = 118$) disease was observed (data not shown). No significant association of the studied SNPs with PFS in patients expressing both receptors in their tumors ($n = 94$) was found. In the group of patients without expression of receptors ($n = 59$), SNP rs4880 in *SOD2* significantly modified the PFS in the dominant model ($p = 0.001$, Fig. 3a). In stratified analyses, SNPs did not significantly modify PFS in patients treated by anthracyclines, cyclophosphamide or by radiotherapy (data not shown). In the group of patients treated by hormonal regimens (containing tamoxifen or aromatase inhibitors), the PFS was significantly modified by *SOD3* SNP rs699473 in the dominant model ($n = 179$, Fig. 2b, $p = 0.021$, log-rank test). In patients treated by both hormonal regimens and chemotherapy ($n = 59$), PFS was significantly modified by *SOD3* SNP rs699473 in the recessive model ($p = 0.026$, log-rank test, data not shown). In patients treated by regimens containing cyclophosphamide without hormonal therapy ($n = 30$) the PFS was significantly modified by *SOD2* rs4880 SNP in the dominant model (Fig. 3b, $p = 0.004$, log-rank test).

Discussion

In humans, oxidative stress is involved in many diseases, e.g., atherosclerosis, myocardial infarction or Parkinson's disease, but short-term oxidative stress may also be important in prevention of aging.²⁸ Reactive oxygen species are beneficial for cell signaling and mediate inflammation used by the immune system as a way to attack and kill pathogens. Oxidative stress has a quite ambivalent role in cancer. Reactive oxygen species influence apoptosis,² proliferation or tumor promotion.³ Anthracyclines and cyclophosphamide generate oxidative stress during cancer therapy.^{5,29} Antioxidants and oxidative stress-modifying enzymes may thus interact with their antitumor effect. Although a number of studies have explored the associations between genes coding enzymes modifying oxidative stress and breast cancer risk (susceptibility), only a few

Table 3. Associations between SNPs and clinicopathological data

Gene (SNP), genotype	Characteristics, N (%) ¹		OR ²	95% CI ²	P ²
	Stage I ³	Stage II–IV			
<i>NQO2</i> (rs1143684)					
Phe47Phe	67 (58.3)	126 (70.4)	1.00	reference	
Phe47Leu	41 (35.6)	47 (26.3)	1.64	0.98–2.74	0.059
Leu47Leu	7 (6.1)	6 (3.3)	2.19	0.71–6.79	0.173
Leu allele ⁴	48	53	1.70	1.04–2.78	0.033
Phe allele ⁵	108	173	0.54	0.18–1.63	0.272
Additive model ⁶	115	179	1.57	1.04–2.36	0.031
<i>NQO2</i> (rs1143684)	PR negative⁷	PR positive⁷			
Phe47Phe	98 (70.0)	79 (57.2)	1.00	reference	
Phe47Leu	36 (25.7)	52 (37.7)	1.79	1.07–3.01	0.027
Leu47Leu	6 (4.3)	7 (5.1)	1.45	0.47–4.48	0.521
Leu allele ⁴	42	59	1.73	1.06–2.86	0.028
Phe allele ⁵	134	131	0.83	0.27–2.56	0.756
Additive model ⁶	140	138	1.51	0.99–2.28	0.053
<i>SOD3</i> (rs2536512)	ER negative⁷	ER positive⁷			
Ala58Ala	53 (51.5)	62 (34.8)	1.00	reference	
Ala58Thr	40 (38.8)	89 (50.0)	1.90	1.13–3.21	0.016
Thr58Thr	10 (9.7)	27 (15.2)	2.31	1.02–5.20	0.044
Thr allele ⁴	50	116	1.98	1.21–3.25	0.007
Ala allele ⁵	93	151	0.60	0.28–1.30	0.196
Additive model ⁶	103	178	1.64	1.13–2.38	0.009
<i>SOD3</i> (rs2536512)	ER/PR negative⁷	ER/PR positive⁷			
Ala58Ala	45 (52.3)	44 (35.8)	1.00	reference	
Ala58Thr	33 (38.4)	61 (49.6)	1.89	1.04–3.42	0.035
Thr58Thr	8 (9.3)	18 (14.6)	2.30	0.91–5.84	0.079
Thr allele ⁴	41	79	1.97	1.12–3.45	0.018
Ala allele ⁵	78	105	0.60	0.25–1.45	0.254
Additive model ⁶	86	123	1.64	1.07–2.50	0.023

¹Number of carriers of given genotypes (percentage). Patients with incomplete data were not analyzed. ²The Mantel-Haenszel common odds ratio (OR) estimate with 95% confidence interval (95% CI) and two-sided *p*-values. ³Including five patients with stage 0 DCIS. ⁴Carriers of heterozygous or homozygous genotype for nonancestral allele (dominant model). ⁵Carriers of heterozygous or homozygous genotype for ancestral allele (recessive model). Carriers of the homozygous genotype for the nonancestral allele served as reference group. ⁶Additive genetic model was assessed by logistic regression. ⁷PR: expression of progesterone receptors; ER: expression of estrogen receptors.

of them have studied their effects on prognosis, survival or therapy outcome of patients with breast cancer. The majority of these studies was limited to following up a single gene or analysis of SNPs and haplotypes in a number of selected candidate genes.^{15,19,30,31} Our study combined the assessment of functional SNPs and transcript levels of candidate genes (*NQO1*, *NQO2*, *SOD2* and *SOD3*) modifying levels of reactive oxygen species with an analysis of the association of these molecular factors with major prognostic factors and PFS. For assessment of transcript levels we developed highly sensitive methods based on real-time PCR with absolute quantification which is superior to relative or semiquantitative approaches. This approach has already been used in our previous studies on the role of *ABCB1* and *NQO1* in the prognosis of breast cancer patients.^{16,25}

Transcript levels of *NQO2* and *SOD2* in this study were significantly upregulated in tumors of the mammary gland in comparison with non-neoplastic tissues. However, analysis of clinicopathological data did not reveal any significant association of *NQO1*, *NQO2* or *SOD2* transcript levels with prognostic markers or PFS. Thus, transcript levels of these genes do not appear to modify prognosis of breast cancer patients.

In our previous study addressing “knock-out” SNP and transcript and protein levels, we have concluded that the role of *NQO1* in human mammary gland carcinogenesis does not seem to be directly associated with classical clinicopathological factors (Ref. 16, *n* = 105). This result was confirmed by the lack of association of clinical data with both *NQO1* transcript levels (*n* = 120) and the knock-out SNP rs1800566 (*n* = 321) in this study. *NQO1* was shown to be a strong

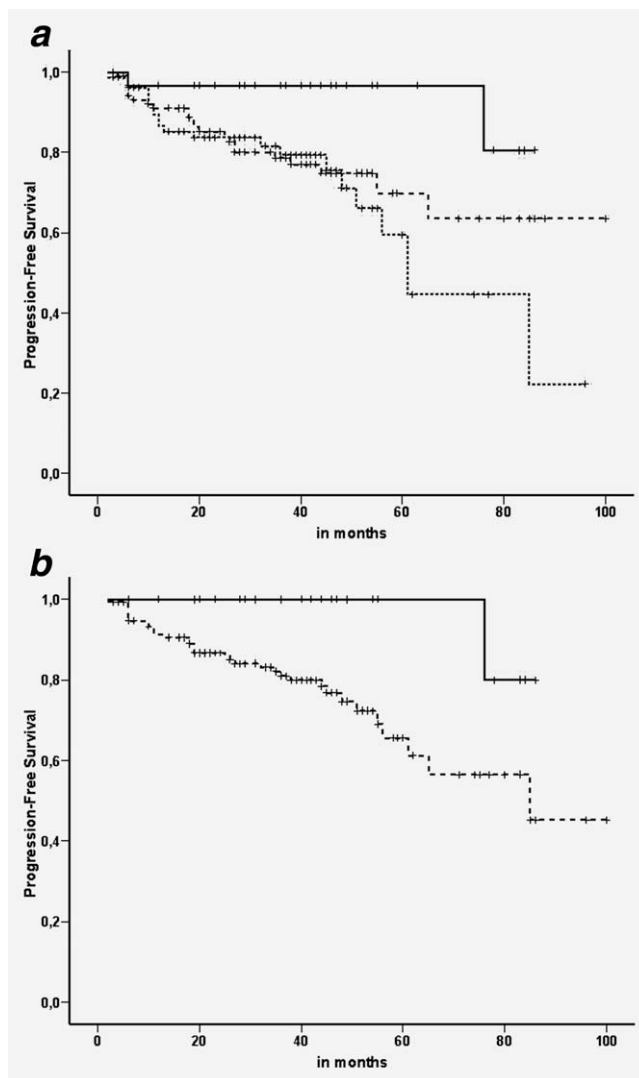


Figure 2. (a) Association between PFS of all studied patients with breast carcinoma and SNP rs699473 in *SOD3*. Kaplan–Meier survival curves for patients carrying CC (solid line, $n = 30$), CT (dashed line, $n = 106$) and TT (dotted line, $n = 80$) genotypes ($p = 0.038$, log-rank test). (b) Association between PFS of patients with breast carcinoma and SNP rs699473 in *SOD3* in group of patients treated by hormonal regimens. Kaplan–Meier survival curves for patients carrying CC (—, $n = 24$) and CT or TT (---, $n = 155$) genotypes ($p = 0.021$, log-rank test).

prognostic and predictive factor in breast cancer patients receiving anthracyclines, and interaction with TP53 status was reported.¹⁵ Our previous study did not reveal direct cosegregation between TP53 and NQO1 protein expression in breast tumors and non-neoplastic tissues.¹⁶ The present study failed to confirm the association between PFS and rs1800566 in patients treated by anthracyclines. However, it could be due to the considerably lower sample size in comparison with Fagerholm *et al.*¹⁵ NQO1 transcript level also did not modify the PFS in any of the stratified analyses.

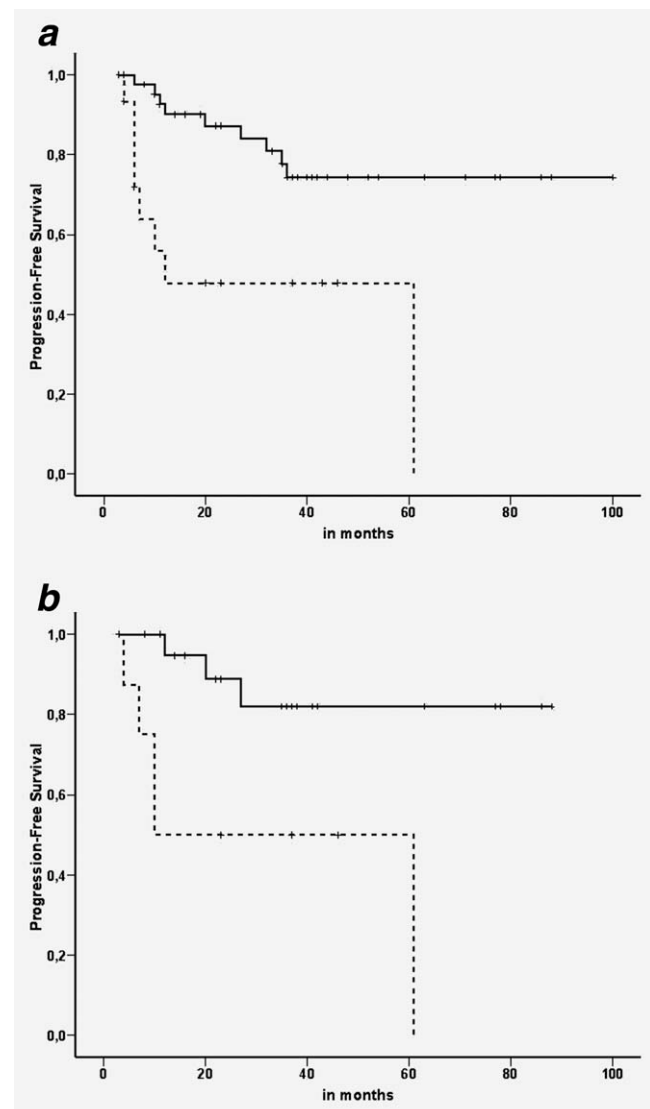


Figure 3. (a) Association between PFS of patients with breast carcinoma and SNP rs4880 in *SOD2* in group of patients with negative expression of estrogen and progesterone receptors. Kaplan–Meier survival curves for patients carrying Val allele (—, $n = 44$) and Ala/Ala genotype (---, $n = 15$) ($p = 0.001$, log-rank test). (b) Association between PFS of patients with breast carcinoma and SNP rs4880 in *SOD2* in the group of patients treated by cyclophosphamide-containing regimens. Kaplan–Meier survival curves for patients carrying Val allele (—, $n = 22$) and Ala/Ala genotype (---, $n = 8$) ($p = 0.004$, log-rank test). All patients in this group had negative expression of estrogen and progesterone receptors and did not receive hormonal therapy.

We hypothesized that NQO2 status may also contribute to the progression of breast cancer because stress-induced NQO1 and NQO2 transiently stabilize TP53, leading to protection against adverse effects of stressors.¹² Carriers of the low activity allele Leu in NQO2 rs1143684 SNP in this study were at moderately lower risk of developing more advanced disease (stages II–IV) or disease with poor prognosis (tumors

without expression of progesterone receptors) than carriers of the normal activity genotype Phe/Phe. The observed association was refined by subgroup analyses. Patients without expression of progesterone receptors had more frequent occurrence of stage 0 or I than stage II–IV disease in comparison with patients whose tumors expressed progesterone receptors. Carriers of the *NQO2* Leu allele in the group of patients without expression of progesterone receptors were at significantly lower risk of developing more advanced disease. The above findings suggested a possible link between *NQO2* and prognosis of breast cancer in the subgroup of patients without expression of progesterone receptors. Neither PFS analysis nor assessment of *NQO2* transcript levels helped to explain this phenomenon. Our numerous experiments with detection of *NQO2* protein expression by immunohistochemistry in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues failed due to the high level of unspecific staining (unpublished data). Currently there are no commercially available antibodies suitable for immunohistochemistry of human *NQO2* in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. Thus, we cannot add mechanistic evidence to support the observed association of *NQO2* rs1143684 SNP with prognosis of breast cancer patients. Bearing in mind the issue of possible false positive results due to multiple testing, our present observations should be treated with caution. Negative results on association of rs1143684 SNP in *NQO2* with breast cancer PFS comply with the recently published study.³²

SOD2 function can be modulated by estrogen and TP53, and thus it may be highly relevant for breast cancer progression and treatment.^{33,34} Patients with the high activity Ala allele in *SOD2* rs4880 SNP treated by cyclophosphamide had poorer breast cancer survival than patients with the low activity genotype Val/Val.^{19,20} In our study, *SOD2* rs4880 SNP did not significantly modify the PFS of patients treated by cyclophosphamide ($n = 89$). However, after exclusion of patients who were also treated by hormonal regimens (*i.e.*, tamoxifen or aromatase inhibitors), the effect of this SNP was revealed. Carriers of the high activity genotype Ala/Ala in *SOD2* rs4880 SNP treated by regimens containing cyclophosphamide but not hormonal regimens had significantly poorer PFS than carriers of the low activity Val alleles ($p = 0.004$). This result was further confirmed by analysis of patients divided by expression of estrogen and progesterone receptors. In the group of patients without expression of receptors (*i.e.*, candidates for chemotherapy) SNP rs4880 in *SOD2* significantly modified the PFS in the same way as in the cyclophosphamide-treated group. Our observation is in agreement with the above cited studies. Due to the small group size ($n = 30$), our observation should be confirmed by meta-analysis together with already published studies. Contrary to the study based on immunohistochemically detected levels of *SOD2* (MnSOD³⁵), the transcript levels of *SOD2* followed in our study did not associate with any of the analyzed prognostic factors. Due to various transcriptional and post-translational events, transcript levels do not necessarily repre-

sent protein level or activity. However, recently, Sgambato *et al.*³⁶ also reported the lack of association between *SOD2* protein levels evaluated by immunohistochemistry and breast cancer PFS and overall survival in a study similarly sized ($n = 134$) with ours. We did not find an association between *SOD2* transcript levels and PFS. Because of the relatively short mean and median follow-up time of patients, the observed associations between *SOD2* SNP and PFS could be modified by the progression-free surviving fraction of patients, particularly among the hormonally treated group. A larger controlled clinical trial is needed to ultimately answer the question of utility of *SOD2* as a marker of prognosis of breast cancer patients.

The importance of *SOD3* (formerly ECSOD) for prognosis of breast cancer patients has not been studied to date. Thus, our study brings completely novel results. A recent study using cell models of tumors of the mammary gland suggested that overexpression of *SOD3* may be a promising strategy for enhancing the efficacy of heparin/LMWH (low molecular weight heparin) by inhibiting heparanase. This finding may theoretically have implications for treatment of breast cancer patients.³⁷ We have observed the following trend in *SOD3* expression: tumor grade 3 < tumor grade 1 or 2 < non-neoplastic tissue. Downregulation of the *SOD3* expression in lung tumors was previously reported, and authors have suggested that it can have potential effects on extracellular regulation of multiple factors that regulate angiogenesis and invasion.^{38,39} *SOD3* also blunts oxidant-dependent VEGF expression and experiments with its overexpression in C57BL/6 mice carrying implanted melanoma B16-F1 tumor cells have suggested that tumor-related oxidative stress may facilitate tumor vascularization and thus promote tumor growth.⁴⁰ Direct injections of the *SOD3* expressing the AdECSOD vector had the greatest effect (of all *SODs* tested) in inhibiting *in vivo* pancreatic tumor growth and increasing the survival of xenograft nude mice.²² Our data thus support the previously envisaged role of *SOD3* in tumorigenesis. This effect seems to be generalized as lung tumors, melanoma and pancreatic and breast tumors have quite distinct etiologies and phenotypes. Patients with expression of estrogen (or both estrogen and progesterone) receptors in their tumors carried the nonancestral Thr allele in *SOD3* rs2536512 SNP with significantly greater frequency than those without expression. Estrogen was shown to modulate *SOD3* activity through mRNA stabilization in human circulating monocytes.⁴¹ However, the functional importance of this SNP and another studied *SOD3* rs699473 SNP is unknown and there are no published studies on the association of these SNPs with the prognosis of patients with any type of carcinoma. Moreover, our study did not find any association between *SOD3* transcript levels and PFS. A frequently studied SNP in *SOD3*, the rs1799895, is functional,²³ but surprisingly we did not find any carriers of the nonancestral allele in the studied patient group ($n = 321$). Most interestingly, the *SOD3* SNP rs699473 in intron 1 significantly modified the

PFS of all patients in our study, and its effect became more apparent in the group of patients treated by hormonal regimens. These findings together with the revealed association of *SOD3* transcript levels with grade suggest that *SOD3* may be important for the prognosis of breast cancer patients, although further studies are needed to characterize its potential role.

No significant association between the followed transcript levels and the studied SNPs in either tumor or non-neoplastic tissues was found. It seems obvious that although functional SNPs were mostly followed (in *NQO1*, *NQO2* and *SOD2*), either unknown haplotypes or methylation status influence the genotype–phenotype relationship more profoundly not only in tumors but also in tissues adjacent to the carcinoma (non-neoplastic tissues). It is the aim of our future

studies to address the importance of these factors in the prognosis of breast cancer patients.

Study power considerations suggested that subgroup analyses might have underestimated some potentially important effects. Correction for multiple testing was not applied and therefore some of the observed associations might be false. Future studies should reevaluate the results presented here in larger independent sample sets.

In conclusion, our study shows that oxidative stress-modifying enzymes present a promising area of investigation of prognostic markers of breast carcinoma. Associations identified by us, however, are quite complex. This fact is well demonstrated by the highly important discovery of the hitherto little studied *SOD3*, as compared to the lack of evidence for the role of the frequently followed *NQO1*.

References

- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008: Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. <http://globocan.iarc.fr>
- Costantini P, Jacotot E, Decaudin D, Kroemer G. Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1042–53.
- Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3: 276–85.
- Choi JY, Nowell SA, Blanco JG, Ambrosone CB. The role of genetic variability in drug metabolism pathways in breast cancer prognosis. *Pharmacogenomics* 2006;7:613–24.
- Sun W, Kalen AL, Smith BJ, Cullen JJ, Oberley LW. Enhancing the antitumor activity of adriamycin and ionizing radiation. *Cancer Res* 2009;69: 4294–300.
- Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978;201:875–80.
- Chen S, Wu KB, Knox R. Structure-function studies of DT-diaphorase (*NQO1*) and *NRH*: quinone oxidoreductase (*NQO2*). *Free Radic Biol Med* 2000;29: 276–84.
- Ahn KS, Gong X, Sethi G, Chaturvedi MM, Jaiswal AK, Aggarwal BB. Deficiency of *NRH*:quinone oxidoreductase 2 differentially regulates TNF signaling in keratinocytes: up-regulation of apoptosis correlates with down-regulation of cell survival kinases. *Cancer Res* 2007;67: 10004–11.
- Gaikwad NW, Yang L, Rogan EG, Cavalieri EL. Evidence for *NQO2*-mediated reduction of the carcinogenic estrogen ortho-quinones. *Free Radic Biol Med* 2009; 46:253–62.
- Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* 2005;11: 1306–13.
- Asher G, Lotem J, Cohen B, Sachs L, Shaul Y. Regulation of TP53 stability and TP53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:1188–93.
- Gong X, Kole L, Iskander K, Jaiswal AW. *NRH*:quinone oxidoreductase 2 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 protect tumor suppressor TP53 against 20S proteasomal degradation leading to stabilization and activation of TP53. *Cancer Res* 2007;67:5380–88.
- Traver RD, Siegel D, Beall HD, Phillips RM, Gibson NW, Franklin WA, Ross D. Characterization of a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase (*DT-diaphorase*). *Br J Cancer* 1997;75:69–75.
- Jamieson D, Wilson K, Pridgeon S, Margetts JP, Edmondson RJ, Leung HY, Knox R, Boddy AV. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and *nrh*:quinone oxidoreductase 2 activity and expression in bladder and ovarian cancer and lower *NRH*:quinone oxidoreductase 2 activity associated with an *NQO2* exon 3 single-nucleotide polymorphism. *Clin Cancer Res* 2007;13:1584–90.
- Fagerholm R, Hofstetter B, Tommiska J, Aaltonen K, Vrtel R, Syrjäkoski K, Kallioniemi A, Kilpivaara O, Mannermaa A, Kosma VM, Uusitupa M, Eskelinen M, *et al.* NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 *NQO1*2* genotype (P187S) is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer. *Nat Genet* 2008;40:844–53.
- Hubackova M, Vaclavikova R, Mrhalova M, Kubackova K, Kodet R, Gut I, Soucek P. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 Pro187Ser polymorphism and expression do not co-segregate with clinicopathological characteristics of human mammary tumors. *Pharmacogenet Genom* 2009;19:505–12.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem* 1969;244:6049–55.
- Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226:561–5.
- Glynn SA, Boersma BJ, Howe TM, Edvardsen H, Geisler SB, Goodman JE, Ridnour LA, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Naume B, Kristensen VN, Chanock SJ, *et al.* Mitochondrial target sequence polymorphism in manganese superoxide dismutase predicts inferior survival in breast cancer patients treated with cyclophosphamide. *Clin Cancer Res* 2009; 15:4165–73.
- Yao S, Barlow WE, Albain KS, Choi JY, Zhao H, Livingston RB, Davis W, Rae JM, Yeh IT, Hutchins LF, Ravdin PM, Martino S, *et al.* Manganese superoxide dismutase polymorphism, treatment-related toxicity and disease-free survival in SWOG 8897 clinical trial for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;124: 433–9.
- Qin Z, Reszka KJ, Fukai T, Weintraub NL. Extracellular superoxide dismutase (ecSOD) in vascular biology: an update on exogenous gene transfer and endogenous regulators of ecSOD. *Transl Res* 2008;151: 68–78.

22. Teoh ML, Sun W, Smith BJ, Oberley LW, Cullen JJ. Modulation of reactive oxygen species in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:7441–50.
23. Sandström J, Nilsson P, Karlsson K, Marklund SL. 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J Biol Chem* 1994;269:19163–6.
24. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. Tavassoli,FA, Devilee,P, eds. Lyon, France: IARC Press. 2003.
25. Vaclavikova R, Nordgard SH, Alnaes GIG, Hubackova M, Kubala E, Kodet R, Mrhalova M, Novotny J, Gut I, Kristensen VN, Soucek P. Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance gene 1 (ABCB1): effects on its expression and clinicopathological characteristics in breast cancer patients. *Pharmacogenet Genom* 2008;18:263–73.
26. Soucek P, Anzenbacher P, Skoumalova I, Dvorak M. Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cell* 2005;23:1417–22.
27. <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>; B36 assembly accessed 22 June 2010
28. Gems D, Partridge L. Stress-response hormesis and aging: that which does not kill us makes us stronger. *Cell Metab* 2008;7:200–3.
29. Tripathi DN, Jena GB. Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes. *Mutat Res* 2010;696:69–80.
30. Ambrosone CB, Ahn J, Singh KK, Rezaishiraz H, Furberg H, Sweeney C, Coles B, Trovato A. Polymorphisms in genes related to oxidative stress (MPO, MnSOD, CAT) and survival after treatment for breast cancer. *Cancer Res* 2005;65:1105–11.
31. Udler M, Maia AT, Cebrian A, Brown C, Greenberg D, Shah M, Caldas C, Dunning A, Easton D, Ponder B, Pharoah P. Common germline genetic variation in antioxidant defense genes and survival after diagnosis of breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:3015–23.
32. Choi JY, Barlow WE, Albain KS, Hong CC, Blanco JG, Livingston RB, Davis W, Rae JM, Yeh IT, Hutchins LF, Ravdin PM, Martino S, et al. Nitric oxide synthase variants and disease-free survival among treated and untreated breast cancer patients in a Southwest Oncology Group clinical trial. *Clin Cancer Res* 2009;15:5258–66.
33. Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, Ichimiya M, Sengupta S, Mechanic L, Okamura S, Hofseth LJ, Moake M, et al. p53-induced upregulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res* 2004;64:2350–6.
34. Razmara A, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V. Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Res* 2007;1176:71–1.
35. Tsanou E, Ioachim E, Briasoulis E, Damala K, Charchanti A, Karavasilis V, Pavlidis N, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of superoxide dismutase (MnSOD) anti-oxidant enzyme in invasive breast carcinoma. *Histol Histopathol* 2004;19:807–13.
36. Sgambato A, Camerini A, Collecchi P, Graziani C, Bevilacqua G, Capodanno A, Migaldi M, Masciullo V, Scambia G, Rossi G, Cittadini A, Amoroso D. Cyclin E correlates with manganese superoxide dismutase expression and predicts survival in early breast cancer patients receiving adjuvant epirubicin-based chemotherapy. *Cancer Sci* 2009;100:1026–33.
37. Teoh ML, Fitzgerald MP, Oberley LW, Domann FE. Overexpression of extracellular superoxide dismutase attenuates heparanase expression and inhibits breast carcinoma cell growth and invasion. *Cancer Res* 2009;69:6355–63.
38. Svensk AM, Soini Y, Pääkkö P, Hiravikoski P, Kinnula VL. Differential expression of superoxide dismutases in lung cancer. *Am J Clin Pathol* 2004;122:395–404.
39. Yoo DG, Song YJ, Cho EJ, Lee SK, Park JB, Yu JH, Lim SP, Kim JM, Jeon BH. Alteration of APE1/ref-1 expression in non-small cell lung cancer: the implications of impaired extracellular superoxide dismutase and catalase antioxidant systems. *Lung Cancer* 2008;60:277–84.
40. Wheeler MD, Smutney OM, Samulski RJ. Secretion of extracellular superoxide dismutase from muscle transduced with recombinant adenovirus inhibits the growth of B16 melanomas in mice. *Mol Cancer Res* 2003;1:871–81.
41. Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohé C, Laufs K, Böhm M, Nickenig G. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res* 2003;93:170–7.

Příloha č. 3

Vaclavikova R, Nordgard SH, Alnaes GI, **Hubackova M**, Kubala E, Kodet R, Mrhalova M, Novotny J, Gut I, Kristensen VN, Soucek P. Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance gene 1 (ABCB1): effects on its expression and clinicopathological characteristics in breast cancer patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18(3):263-73. (IF₂₀₁₂ = 3,6)

Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance gene 1 (*ABCB1*): effects on its expression and clinicopathological characteristics in breast cancer patients

Radka Vaclavikova^a, Silje H. Nordgard^{e,f}, Grethe I.G. Alnaes^{e,f},
Miluse Hubackova^a, Eugen Kubala^b, Roman Kodet^c, Marcela Mrhalova^c,
Jan Novotny^d, Ivan Gut^a, Vessela N. Kristensen^{e,f} and Pavel Soucek^a

Objectives Resistance of tumor cells to multiple cytostatic agents is one of the major impediments of successful cancer chemotherapy. A large part of resistance of tumors to chemotherapy is caused by the ABC transporter P-glycoprotein encoded by the *ABCB1* gene. The main aim of this study was to assess the prognostic value of *ABCB1* genotype and phenotype in breast cancer.

Methods Six *ABCB1* single nucleotide polymorphisms (SNPs) were determined in 90 Czech breast cancer patients by a novel method that allows simultaneous assessment of multiple polymorphisms on a single electronic microarray. Expression levels of *ABCB1* were quantified in tumor and nontumor samples of breast cancer patients by real-time PCR. *T*-test, analysis of variance and Fisher's exact test were used to analyze the effect of *ABCB1* polymorphisms on *ABCB1* expression levels and for the analysis of associations between *ABCB1* expression, genotype and clinical and pathological characteristics.

Results *ABCB1* was expressed in 98.9% of the tumor and in 97.5% of the nontumor samples. *ABCB1* was downregulated in 79.5% of tumors compared with the nontumor samples. No significant correlation was observed between *ABCB1* mRNA expression levels and clinical and pathological characteristics. High frequencies of the variant alleles in *ABCB1* exon 12 (1236C>T, 38.3%)

and exon 26 (3435C>T, 54.0%) were observed. Individuals with variant alleles in exons 12 and 26 had significantly lower *ABCB1* expression levels in their tumors. SNPs in exons 12 and 26 also correlated with estrogen receptor status of patients.

Conclusion *ABCB1* SNPs may affect function of P-glycoprotein by influencing the expression level and modify breast cancer prognosis. *Pharmacogenetics and Genomics* 18:263–273 © 2008 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Pharmacogenetics and Genomics 2008, 18:263–273

Keywords: *ABCB1*, breast, cancer, expression, genotyping, marker, microarray

^aBiotransformation Group, National Institute of Public Health, ^bDepartment of Radiotherapy and Oncology, University Hospital Motol, ^cDepartment of Pathology and Molecular Medicine, 2nd Faculty of Medicine, ^dDepartment of Oncology, General Teaching Hospital and 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, ^eDepartment of Genetics, Institute for Cancer Research, Rikshospitalet-Radiumhospitalet Medical Center and ^fFaculty of Medicine, University of Oslo, Oslo, Norway

Correspondence to Dr Radka Vaclavikova, Group for Biotransformations, Center of Occupational Health, National Institute of Public Health, Srobarova 48, 100 42 Prague 10, Czech Republic
Tel: +420 2 6708 2709; fax: +420 2 6731 1236;
e-mail: rvaclavikova@szu.cz

Received 29 August 2007 Accepted 21 December 2007

Introduction

Chemotherapy failure owing to cellular multidrug resistance is a major problem of successful cancer therapy, including breast cancer. Multidrug resistance phenotype often correlates with high expression of P-glycoprotein (P-gp, OMIM no. 171050), the most common ATP-binding cassette membrane transporter protein (ABC transporter) [1,2]. The 170-kDa P-gp is encoded by *ABCB1* gene (*ABCB1*, GeneID: 5243) located on chromosome 7q21.1 in a 600 kb *NruI* fragment [3]. P-gp functions as a cellular efflux pump for many xenobiotics including drugs [2,4,5]. P-gp/*ABCB1* is expressed in normal tissues such as intestine, liver, kidney and brain [6]. It was also found to be expressed in normal breast

tissues [7,8] as well as in human breast carcinomas [9]. P-gp protein level significantly correlated with levels of mRNA transcripts [9,10].

Furthermore, there are indications that P-gp/*ABCB1* expression levels may correlate with pathological characteristics of the tumor [10] and with various clinical endpoints such as overall survival, disease-free survival and response to chemotherapy in breast cancer patients [11–13]. In contrast, other authors [14,15] found no impact of P-gp/*ABCB1* expression on breast cancer prognosis. Contradicting results have been summarized by Leonessa and Clarke [2], suggesting the need for further research in this field.

More than 28 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *ABCB1* were found (summarized in Ref. [4]) with significant interethnic differences in genotype frequencies [4,16]. SNP expression analyses have mainly focused on the synonymous 3435C>T SNP in exon 26 (rs1045642). Very recent findings report the impact of this silent *ABCB1* polymorphism on the P-gp protein activity and substrate specificity [17,18]. Carriers of the variant genotype of this SNP had significantly lower duodenal *ABCB1* expression levels and the highest digoxin plasma levels, that is, low uptake of digoxin, a P-gp substrate, administered orally in 21 volunteers [19]. No association of the variant genotype with *ABCB1* mRNA level in duodenum or placenta was, however, found in a recent study [20]. Statistically significant correlation of 1236C>T (rs1128503) SNP with clinical outcome has been reported in acute leukemia [21] and breast cancer patients [22]. On the contrary, no association of the 1236C>T SNP in *ABCB1* with clinical outcome of Polish adult acute lymphoblastic leukemia patients was observed [23]. No association was found between the variant allele in exon 21 (rs2032582) SNP and expression of *ABCB1* mRNA in the intestine [24], but this SNP resulted in higher expression of *ABCB1* in bone marrow [21]. Similarly, Obata *et al.* [25] observed no association of several studied SNPs with the *ABCB1* gene [promoter 1T/C, promoter 2(-41)A>G, exon 12 1236C>T, exon 26 3435C>T and exon 28 4036A>G] in response to chemotherapy and prognosis in advanced ovarian cancer.

To date, no report exists on the relationship between multiple *ABCB1* SNPs, expression level of the gene and prognosis of breast cancer. We evaluated (i) *ABCB1* expression by quantitative real-time PCR (QRT-PCR) and its variability in tumor and adjacent nontumor tissues in patients with breast cancer, and (ii) six SNPs in *ABCB1* and their potential associations with interindividual variation in *ABCB1* expression. In addition, both *ABCB1* SNPs and expression levels were correlated with clinical and pathological characteristics of patients to answer the question whether *ABCB1* genotypes or phenotypes have prognostic value in breast cancer.

Materials and methods

Materials

Histopaque (Ficoll), phenol, chloroform, RNase A, proteinase K, RedTaq polymerase, histidine and chemicals for preparation of buffers were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Deoxynucleotides (dATP, dCTP, dGTP and dTTP) for PCR and molecular weight standards for electrophoresis (Φ X174DNA/HaeIII digest, λ EcoRI/HindIII) were products of New England Biolabs, Inc. (Ipswich, Massachusetts, USA). Ultrapure agarose was supplied by Life Technologies (Paisley, UK.). Trizol reagent for isolation of

total RNA was purchased from Invitrogen (Carlsbad, California, USA) and RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit was purchased from MBI Fermentas (Vilnius, Lithuania). QRT-PCR was performed using commercially available sets of specific probe and primers for *ABCB1* (TaqMan Gene Expression Assays, kit no. Hs00184491_m1, Applied Biosystems, Foster City, California, USA) and for peptidylprolyl isomerase A (PPIA, TaqMan Human PPIA Endogenous Control, kit no. 4333763F, Applied Biosystems). TaqMan Universal PCR Master Mix (kit no. 4304437) was used for QRT-PCR. Equipment and components of the NanoChip assays were obtained from Nanogen Inc. (San Diego, California, USA). The oligonucleotide primers for the NanoChip assays were designed using the Primer3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), and synthesized by MWG Biotech AG (Ebersberg, Germany).

Patients

Blood samples and tissue samples of human carcinomas of the mammary gland were obtained from 90 incident breast cancer patients diagnosed in the Faculty Hospital Motol in Prague during the period 2001–2005. Paired adjacent tissue samples without morphological signs of carcinoma (nontumor) were available from 40 patients. Tissue samples were collected during surgery and snap-frozen in liquid nitrogen. Cryostat sections were stained by hematoxylin and eosin, and immediately reviewed by an experienced pathologist. Five-micrometer-thin cryostat sections were cut for isolation of total RNA. Content of tumor cells was verified histologically in the first and last sections. The sections cut in the layers between the aforementioned histological controls were used for total RNA isolations. To increase the content of tumor cells in samples, the surrounding nontumor tissue (stromal cells, adipose tissue) was removed before cryostat sectioning. Histological classification of carcinomas of the mammary gland as well as evaluation of non-neoplastic mammary lesions were performed according to standard diagnostic procedures. The following data on patients were retrieved from medical records: age, menopausal status, date of diagnosis of breast cancer, personal history, family history (number of relatives affected by breast cancer, ovarian cancer or other malignant diseases), clinical stage, tumor size, histological type and grade of tumor and expression of estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) (clinical and pathological characteristics of patients are listed in Table 1). All patients were asked to read and sign an informed consent in agreement with requirements of the Ethical Commission of the National Institute of Public Health in Prague.

Quantification of *ABCB1* expression

Total RNA was isolated from frozen tissue using Trizol reagent (Invitrogen), according to the procedure provided by the manufacturer. Quality of RNA was verified by

Table 1 Clinical and pathological characteristics of breast cancer patients

Characteristics	N ^a
Average age at diagnosis	
63.4 ± 11.8	90 (100)
≤ 40 years	3 (3.3)
40–49 years	7 (7.8)
50–59 years	27 (30.0)
>60 years	53 (58.9)
Menopausal status	
Premenopausal	12 (13.3)
Postmenopausal	78 (86.7)
Histological type	
Invasive-ductal carcinoma	69 (76.7)
Invasive-lobular carcinoma	9 (10.0)
Other type	12 (13.3)
Average tumor size	
22.9 ± 14.1 mm	–
≤ 20 mm	53 (58.9)
>20 mm	37 (41.1)
Histological grade	
1	11 (12.2)
2	46 (51.1)
3	20 (22.2)
Unknown	13 (14.5)
Clinical stage	
I	29 (32.2)
IIA	26 (28.9)
IIB	15 (16.7)
IIIA	5 (5.6)
IIIB	8 (8.9)
IV	2 (2.2)
Unknown	5 (5.6)
Estrogen receptor status	
Positive	52 (57.8)
Negative	34 (37.8)
Unknown	4 (4.4)
Progesterone receptor status	
Positive	46 (51.1)
Negative	40 (44.5)
Unknown	4 (4.4)
Nodal status	
Positive ^b	40 (44.4)
Negative	45 (50.0)
Not assessed	5 (5.5)

^aN, number of patients with percentage in parentheses.

^bPositive nodal status, at least one axillary node invaded by tumor cells.

horizontal agarose gel electrophoresis. RNA quantity was assessed by UV spectrophotometry on a Cary 300 spectrophotometer (Varian, Palo Alto, California, USA). cDNA was synthesized using 0.5 µg of total RNA and random hexamer primers with the help of RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas). Quality of cDNA in terms of DNA contamination was then confirmed by PCR amplification of *ubiquitin C (UBC, GeneID: 7316)* fragment discriminating between products from cDNA (190 bp) and from genomic DNA (1009 bp) as described previously [26]. Subsequently, QRT-PCR was performed in RotorGene 2000 (Corbett Research, Sydney, Australia). *PPIA* (GeneID: 5478) was used as a reference gene. Previously, *PPIA* was demonstrated as a suitable endogenous reference gene when comparing malignant and nonmalignant tissues [27]. cDNA was diluted 10 times for determination of *PPIA* expression levels and five times for determination of *ABCBI* expression levels. PCR reaction mixtures contained 10 µl of 20x TaqMan Universal PCR Master Mix, 1.0 µl of specific probe (final

concentration 250 nmol/l, 6-FAM (6-carboxyfluorescein)-labeled at the 5'-end and NFQ nonfluorescent quencher at the 3'-end of the probe), primers for *PPIA* or *ABCBI* (final concentration of 900 nmol/l each), 5 µl of diluted cDNA template and water to make a final volume of 20 µl. Cycling parameters were (i) initial hold at 50°C for 2 min, (ii) initial denaturation at 95°C for 10 min, (iii) followed by 55 cycles consisting of denaturation at 95°C for 15 s and (iv) annealing/extension at 58°C for 60 s. Fluorescence was acquired after each extension phase. Samples were analyzed in duplicates. The nontemplate control contained water instead of cDNA. Additionally, negative cDNA synthesis controls (RNA transcribed without reverse transcriptase) were used to reveal possible carry-over contamination. Each QRT-PCR run contained serially diluted concentrations of standard plasmid DNA (range for *ABCBI* gene, 10²–10⁶ copies/reaction; range for *PPIA* gene, 5.10²–5.10⁶ copies/reaction) from which a calibration curve was generated for quantification of target cDNA in examined samples.

Preparation of ABCBI standard for quantitative real-time PCR

For preparation of standards, a fragment spanning exons 18–28 of *ABCBI* (1500 bp) and a fragment spanning exons 3–5 (738 bp) of *PPIA* were subcloned into vector pDONR201 using Gateway Cloning Technology (Invitrogen). The entry clones were propagated in *Escherichia coli* DH5α Maximum Efficiency Cells (Invitrogen) and isolated by Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Concentrations of plasmids were determined spectrophotometrically.

Genotyping of ABCBI single nucleotide polymorphisms by NanoChip assays

Genomic DNA was prepared from fresh human peripheral blood lymphocytes of breast carcinoma patients by the phenol/chloroform extraction method. Six SNPs in *ABCBI* [(–1)G > A, rs2214102; 61A > G, Asn21Asp, rs9282564; 1199G > A, Ser400Asn, rs2229109; 1236C > T, Gly412Gly, rs1128503; (+44)C > T, rs2032588 and 3435C > T, Ile1145Ile, rs1045642] were detected on the NanoChip Molecular Biology Workstation (Nanogen Inc.). NanoChip Workstation uses electronic NanoChip electronic microarrays for genotyping. Nanogen's technology involves electronic addressing of biotinylated samples, hybridization of complementary DNA reporter probes and application of stringency to remove unbound and nonspecifically bound strands after hybridization (www.nanogen.com/technologies). The basic principles and mode of operation of electronic microarray as well as the NanoChip Molecular Biology Workstation, have been described in detail elsewhere [28–30]. Briefly, the assay using NanoChip Platform consisted of the following processes.

PCR amplification and desalting

First, PCR amplification of each region of *ABCB1* was performed. DNA (50 ng) was amplified in total volume of 25 μ l of PCR buffer (50 mmol/l KCl, 10 mmol/l Tris-HCl, pH 8.3), 0.2 mmol/l dNTP mix, 0.4 mmol/l forward and reverse *ABCB1* primers, 1.5 mmol/l MgCl₂ and 1 U of HotStar Taq polymerase (Qiagen). Sequences of primers were as follows; (-1)G > A: forward primer 5'-Biotin-CTTACTGCTCTCTGGCTTCG-3', reverse primer 5'-TTCAGAGCTGGAGGCTAGAA-3'; 61A > G: forward primer 5'-Biotin-CTTACTGCTCTCTGGCTTCG-3', reverse primer 5'-TTCAGAGCTGGAGGCTAGAA-3'; 1199G > A: forward primer 5'-Biotin-TCACTTATCCAGCTCTCCACA-3', reverse primer 5'-GGCAATTCACAGACACAGGA-3'; 1236C > T: forward primer 5'-TGTGTCTGTGAATTGCCTTG-3', reverse primer 5'-Biotin-GTCATCTCACCATCCCCTCT-3'; 12(+44)C > T: forward primer 5'-GGAAGAGCACAAACAGTCAG-3', reverse primer 5'-Biotin-CTGACTCACCACACAATGA-3'; 3435C > T: forward primer 5'-GGCATCGTGTCCCAGGA-3', reverse primer 5'-Biotin-ATGCTCCCAGGCTGTTTATTTG-3'. Cycling parameters of multiplex PCR (except exon 12 SNP) were (i) initial denaturation at 96°C for 15 min, (ii) followed by 35 cycles consisting of denaturation at 96°C for 45 s and (iii) annealing/extension at 58°C for 45 s (for 1236C > T and 3435C > T SNPs), 55°C for 45 s [for (-1)G > A, 61A > G and 12(+44)C > T SNPs] and 61°C for 1 min for 1199G > A SNP. Final extension was at 72°C for 10 min and final hold at 8°C. Amplicons were then desalted with the vacuum (MultiScreen PCR₉₆ filter plate) Multiscreen PCR 96-well Filtration System (Millipore, Billerica,

Massachusetts, USA). Samples were washed once with 100 μ l of water per well and then 70 μ l of water was added to each well to elute the PCR products. Thirty microliters of clean PCR product were transferred to a Nunc 96-well plate and 30 μ l of 100 mmol/l histidine was added.

Cartridge loading and scanning

Loading and reading processes and conditions are software-controlled and details of NanoChip assays are described elsewhere [30]. The whole process of *ABCB1* genotyping was performed by following the Nanogen Inc. manual with validation developed by the Department of Genetics (The Radium Hospital, Oslo, Norway). After loading and denaturation of the amplicons, the chip was reported and scanned on Nanogen Molecular Biology Workstation in the NanoChip Reader. A reporter-stabilizer mix for each SNP (Table 2) containing variant reporter probe labeled with Cy5, wild-type reporter probe labeled with Cy3 and stabilizer in high salt buffer was prepared. The discrimination temperatures used for each *ABCB1* SNP are shown in Table 2. NanoChip system evaluated the results by scanning the chip and subsequent analysis of red and green fluorescent ratios. After scanning, the cartridge was stripped for reporters/discriminators and stabilizers bound to the denatured PCR product. This was done by raising the chip temperature to 56°C before washing off with low salt buffer. SNPs in exon 12 (16 samples), exon 26 (46 samples) and intron 12 (nine samples) identified by NanoChip assay were confirmed by direct sequencing using an ABI 3100 DNA analyzer (Applied Biosystems).

Table 2 Sequences for NanoChip reporters and stabilizers

<i>ABCB1</i> oligonucleotide	Sequence	T _m (°C)	Discrimination temperature (°C)
Ex2-1			
Stabilizer	5'-CCGACCTGAAGAGAAACCGCAGCTCATTAG-3'	63.4	33.0
Wt discriminator (Cy3)	5'-CTGAGTCCGAACATTGAG-TT-CTTCAAGATCCATC-3'	37.7	
Vt discriminator (Cy5) ^a	5'-GCAGTATATCGCTTGACA-TT-CTTCAAGATCCAT-3'	36.5	
Ex2			
Stabilizer	5'-GTTYAGTTTAAAAAGTTCTTCTTCTTTGCTCCTCC-3'	58.0	36.0
Wt discriminator (Cy3)	5'-CTGAGTCCGAACATTGAG-TT-CTAGTTACCTTTTATT-3'	35.0	
Vt discriminator (Cy5)	5'-GCAGTATATCGCTTGACA-TT-CTAGTTACCTTTTAT-3'	36.0	
Ex11			
Stabilizer	5'-TGAAGTGAACATTTCTGAATCCAAATTTCC-3'	61.6	35.0
Wt reporter (Cy3)	5'-GATGGGTAAC-3'	30.0	
Vt reporter (Cy5)	5'-AGATGGGTAAT-3'	30.0	
Ex12			
Stabilizer	5'-CTGAACCTGAAGGTGCAGAGTGGGCAG-3'	64.6	37.0
Wt discriminator (Cy3)	5'-CTGAGTCCGAACATTGAG-TT-TCTTGAAGGGC-3'	36.0	
Vt discriminator (Cy5)	5'-GCAGTATATCGCTTGACA-TT-ATCTTGAAGGGT-3'	34.7	
Ex12+44			
Stabilizer	5'-ACATTGCACATCTTTCTGATGTTGCCCTTTC-3'	61.2	37.0-39.0
Wt discriminator (Cy3)	5'-CTGAGTCCGAACATTGAG-TT-TGATCAGCAGTC-3'	37.4	
Vt discriminator (Cy5)	5'-GCAGTATATCGCTTGACA-TT-TGATCAGCAGT-3'	36.0	
Ex26			
Stabilizer	5'-GTGAGGGCAGCAAAGGAGGCCAACATAC-3'	69.5	41.0
Wt discriminator (Cy3)	5'-CTGAGTCCGAACATTGAG-TT-TCACAGGAAGAGATC-3'	43.0	
Vt discriminator (Cy5)	5'-GCAGTATATCGCTTGACA-CC-TCACAGGAAGAGAT-3'	42.0	

Bold and underlined symbols mean differences in wild-type or variant discriminators.

Vt, variant, Wt, wild-type.

^aCy3-labeled or Cy5-labeled probes giving green and red signal, respectively.

Immunohistochemistry

Detection was performed with peroxidase/diaminobenzidine system. Fresh tumor tissues were fixed in 10% neutral buffered formalin up to 26 h. After fixation, tissues were processed in paraffin blocks with classical histological techniques. We utilized histological sections (3 μ m) from formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. Standardized immunohistochemical procedure was applied. Monoclonal primary antibodies against ER α (clone 1D5) and PR (clone PgR 636) were purchased from Dako (Glostrup, Denmark). Both primary antibodies were diluted at 1:50 ratio in Antibody diluent (Dako). The sections were further processed with heat-induced epitope retrieval in 10 mmol/l citrate buffer, pH 6.0 in water bath (40 min heating at 95–99°C, 20 min cooling at room temperature). Tissues with primary antibodies were incubated overnight at 4°C. Detection was performed with Universal Immuno-peroxidase Polymer (Histofine, Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan), according to manufacturer instruction. As a chromogen, 0.04% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride dihydrate, Fluka (Buchs, Switzerland) in 50 mmol/l Tris (Tris-hydroxymethyl amino methane)/0.015% H₂O₂ was used. A remnant of normal mammary gland in the vicinity of the tumor tissue served as an internal-positive control in each case investigated (internal negative-control – the normal stromal tissue surrounding the tumor cells).

Data analysis

ABCBI expression was analyzed using RotorGene v6 software (Corbett Research). Absolute quantification with external standard curve generated from five decimal dilutions of the pDONR/*ABCBI* plasmid was performed. The amount of *ABCBI* expression was calculated from the standard curve and quantitative normalization of cDNA amount in each sample was performed using the expression of *PPIA* as internal control (copies_{target}/copies_{control}). Each sample was assayed in duplicate and the mean value was used for calculation. Samples with more than 0.5C_t variation between duplicates were reanalyzed.

Raw red and green fluorescence signals from NanoChip assays were adjusted by subtracting background signal and were normalized to the heterozygous ratio reference. The resulting allelic ratios were used to score the genotype as follows: for the homozygous variants – variant to wild-type signal ratios (or *vice versa*) of at least 5:1 and for the heterozygous variants ratios of less than 2:1. Frequencies of particular *ABCBI* alleles were calculated as $q = (2a + b)/2n$, where a = number of homozygotes, b = number of heterozygotes and n = number of analyzed alleles.

Associations of clinical and pathological characteristics of patients with *ABCBI* SNPs were analyzed by Fisher's

exact test (categorical) and one-way analysis of variance (categorical vs. continuous data). Comparison of *ABCBI* expression levels in paired tumor and nontumor tissue samples was analyzed by two-sided t -test as well as by Kendall's W test. *ABCBI* expression levels in tumors were compared with *ABCBI* SNPs and clinical and pathological characteristics by two-sided t -test with independent-estimation. P value lower than 0.05 was considered to be statistically significant. Tested variables were as follows: age at diagnosis in years; menopausal status, premenopausal versus postmenopausal; tumor size in mm, tumor size ≤ 20 mm versus > 20 mm; histological type, invasive ductal carcinoma versus invasive lobular carcinoma; histological grade, G1 versus G2 versus G3; clinical stage, I versus II, III and IV combined (i.e. early vs. advanced disease); nodal status (positive vs. negative); metastasis (positive vs. negative) and expression of ERs and PRs (positive vs. negative). All P values are obtained from two-sided tests. All statistical analyses were performed using SPSS v12.0 program (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Results

Clinical and pathological characteristics of patients involved in the study are described in Table 1.

Frequencies of six *ABCBI* single nucleotide polymorphisms in breast cancer patients of Caucasian origin

The observed germline allele frequencies of the six examined SNPs are presented in Table 3. The highest frequencies were found for variant alleles in exons 12 (1236T, 38%) and 26 (3435T, 54%).

ABCBI gene expression and its association with *ABCBI* single nucleotide polymorphisms in breast cancer patients

ABCBI cDNA levels were determined by QRT-PCR using absolute quantification in 88 tumor tissue samples collected after surgery. *ABCBI* expression levels were also determined in the 40 available paired nontumor tissue samples. For the rest of the patients, the nontumor tissue was not available for analysis (inappropriate sample for nucleic acid isolation; microscopically found infiltration of sample with tumor cells; only tumor tissues were recovered during surgery). *ABCBI* was found to be expressed in 87 of the 88 (98.9%) breast tumor samples analyzed, and in 39 of the 40 (97.5%) examined adjacent nontumor tissue samples. Comparison of the expression in paired tissue samples revealed a significantly higher mean of *ABCBI* expression in nontumor than in tumor tissues ($P < 0.001$ by Kendall's W test, Table 4). The level of expression varied widely between individuals (Fig. 1) with variability being 1427-fold and 1120-fold in tumor and nontumor samples, respectively, as shown in Table 4. Of the investigated group, eight patients were found to have higher expression of *ABCBI* in their tumor

compared with their nontumor tissues. By comparing *ABCB1* mRNA levels in tumors of patients treated by neoadjuvant therapy (before surgery, $n = 18$) with the levels of untreated patients ($n = 65$), we found no significant difference (t -test, $P = 0.527$).

Association between *ABCB1* mRNA levels in tumors ($n = 87$) and frequencies of genotypes in each of the

Table 3 Distribution of *ABCB1* genotypes and allele frequencies in breast cancer patients

<i>ABCB1</i> genotype ^a	N ^b	Allele frequency
(-1)G>A, rs2214102		
G/G	77 (88.5)	G (93.1)
G/A	8 (9.2)	A (6.9)
A/A	2 (2.3)	
Total	87	
61A>G, Asn21Asp, rs9282564		
Asn/Asn	75 (84.3)	Asn (91.6)
Asn/Asp	13 (14.6)	Asp (8.4)
Asp/Asp	1 (1.1)	
Total	89	
1199G>A, Ser400Asn, rs2229109		
Ser/Ser	86 (95.6)	Ser (97.8)
Ser/Asn	4 (4.4)	Asn (2.2)
Asn/Asn	0 (0)	
Total	90	
1236C>T, Gly412Gly, rs1128503		
C/C	32 (35.6)	C (61.7)
C/T	47 (52.2)	T (38.3)
T/T	11 (12.2)	
Total	90	
12(+44)C>T, rs2032588		
C/C	79 (89.8)	C (93.8)
C/T	7 (8.0)	T (6.2)
T/T	2 (2.2)	
Total	88	
3435C>T, Ile1145Ile, rs1045642		
C/C	17 (19.5)	C (46.0)
T/C	46 (52.9)	T (54.0)
T/T	24 (27.6)	
Total	87	

^aProtein positions are displayed for nonsynonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) in exons. For other SNPs, genomic positions are relative to the ATG site and based on the cDNA sequence from GenBank accession number M14758 with an A as the reference nucleotide at position -43.

^bNumber of genotype carriers with percentage in parentheses.

examined SNP were analyzed throughout the studied group. Individuals were divided according to their genotypes into wild-type homozygous, heterozygous and variant groups and the difference in *ABCB1* expression levels between these groups was analyzed by t -test. Patients homozygous for the variant TT genotype at position 3435 in exon 26 of the *ABCB1* had significantly reduced *ABCB1* expression in their tumors when compared with carriers of the 3435CC genotype with 5.4-fold difference in *ABCB1* expression levels (two-sided, $P = 0.043$, Table 5). *ABCB1* expression levels were also significantly influenced by the presence of 1236C>T SNP in exon 12. Heterozygous individuals had significantly lower *ABCB1* mRNA expression levels than patients with wild-type genotype with three-fold difference in *ABCB1* expression levels (two-sided, $P = 0.029$, Table 5) but the difference in *ABCB1* mRNA levels between the patients carrying wild-type and variant genotypes was not significant. Other studied SNPs did not significantly influence *ABCB1* expression.

Relationship between clinical and pathological characteristics, *ABCB1* single nucleotide polymorphisms and expression

Association of *ABCB1* SNPs with clinical and pathological characteristics of breast carcinomas was analyzed by Fisher's exact test. A significant association of ER expression in tumor tissue with *ABCB1* SNPs in exons 12 and 26 was found (for sample of slides see Fig. 2). Breast cancer patients carrying the variant 1236TT genotype in exon 12 had significantly more often ER-negative tumors compared with patients with the wild-type genotype (two-sided, $P = 0.011$, Table 6). The same trend was observed in patients carrying heterozygous or variant genotype in exon 26, but the effect was borderline significant (two-sided, $P = 0.051$, Table 6). Among other studied SNPs, all patients with a variant (-1)AA genotype in intron 1 of *ABCB1* had invasive lobular carcinomas in contrast to prevalence of invasive ductal carcinoma in wild-type genotype carriers (two-sided, $P = 0.014$). Age, menopausal status, staging, tumor size, nodal status and histological type and grade of tumor did not significantly associate either with frequencies of

Table 4 *ABCB1* expression levels in paired tumor and nontumor breast tissue of breast cancer patients expressed (A) in ng of total RNA *ABCB1*/PP1A and (B) in *ABCB1* gene expression/ng

Sample	N ^a	Minimum	Maximum	Mean ^c	SD	Variability
(a) Expression of <i>ABCB1</i> (expressed in ng of total RNA <i>ABCB1</i> /PP1A)						
Tumor	39	0.03	42.82	7.37	11.0	1427-fold
Control ^b	39	0.44	492.74	39.43	105.8	1120-fold
(b) Expression of <i>ABCB1</i> (expressed in μ g of total RNA <i>ABCB1</i>)						
Tumor	39	200	1 447 240	220 983.59	294 549.77	7236-fold
Control ^b	39	3040	18 590 720	905 178.72	3 072 438.54	6115-fold

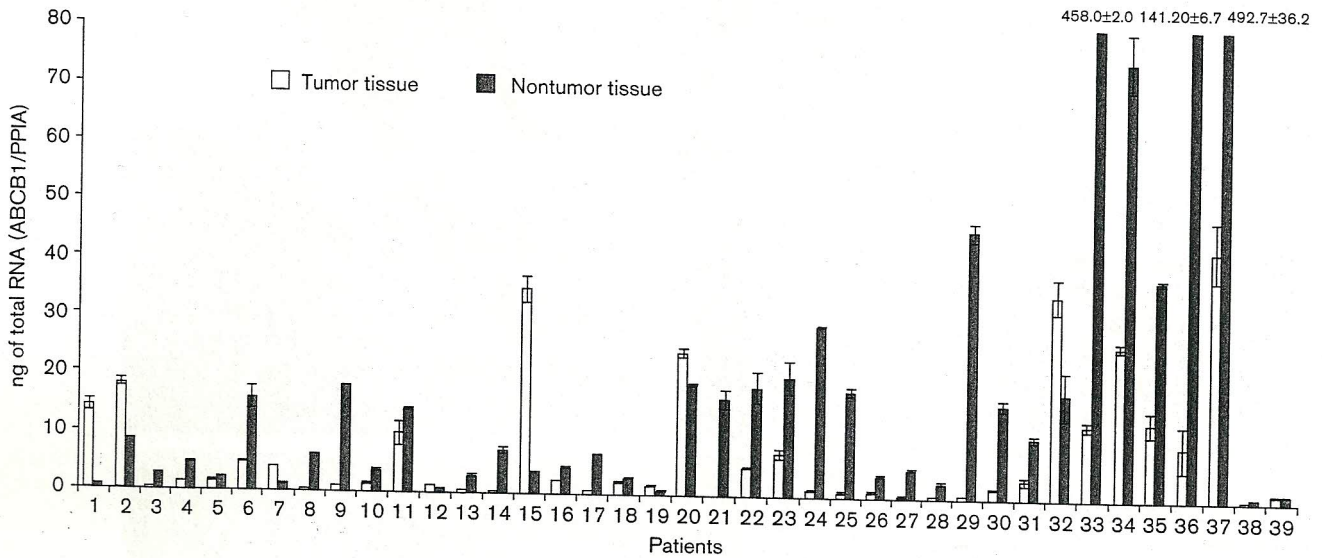
^aNumber of examined samples.

^bAdjacent breast tissue without presence of morphologically confirmed tumor cells.

^cVariability of tumor and nontumor breast tissue mean *ABCB1* expression was 5.4-fold.

Difference in *ABCB1* expression between tumor and nontumor samples was assessed by two-sided t -test ($P = 0.055$) and by Kendall's W test ($P < 0.001$) making no assumptions regarding the nature of the probability distribution.

Fig. 1



ABCB1 expression in tumor and corresponding nontumor breast tissue samples ($n=40$) analyzed by QRT-PCR. Reaction conditions are described in Materials and methods section. Data are expressed as means \pm SD from duplicate determinations. PP1A, peptidylprolyl isomerase A; QRT-PCR, quantitative real-time PCR.

Table 5 Influence of SNPs in exons 12 and 26 on ABCB1 expression in tumors of breast cancer patients

ABCB1 genotype	N ^a	ABCB1 expression (ng of total RNA ABCB1/PP1A)				P (2-sided)
		Mean \pm SD	95% Confidence interval for mean			
			Lower bound	Upper bound		
Exon 12 (1236C>T)						
CC	30	15.0 \pm 23.2	6.4	23.7		
CT	47	5.0 \pm 7.8	2.7	7.3	0.029 ^b	
TT	10	8.1 \pm 15.0	2.6	18.9	NS	
CT+TT	57	5.6 \pm 9.4	3.1	8.1	0.039 ^b	
Exon 26 (3435C>T)						
CC	15	12.9 \pm 18.3	2.8	23.1		
CT	46	11.2 \pm 18.6	5.6	16.7	NS	
TT	23	2.4 \pm 3.9	0.7	4.0	0.043 ^b	
CT+TT	69	8.2 \pm 15.9	4.4	12.0	NS	

^aNumber of examined samples.

^bTwo-sided t-test with independent estimation and equal variances not assumed according to Levene's test.

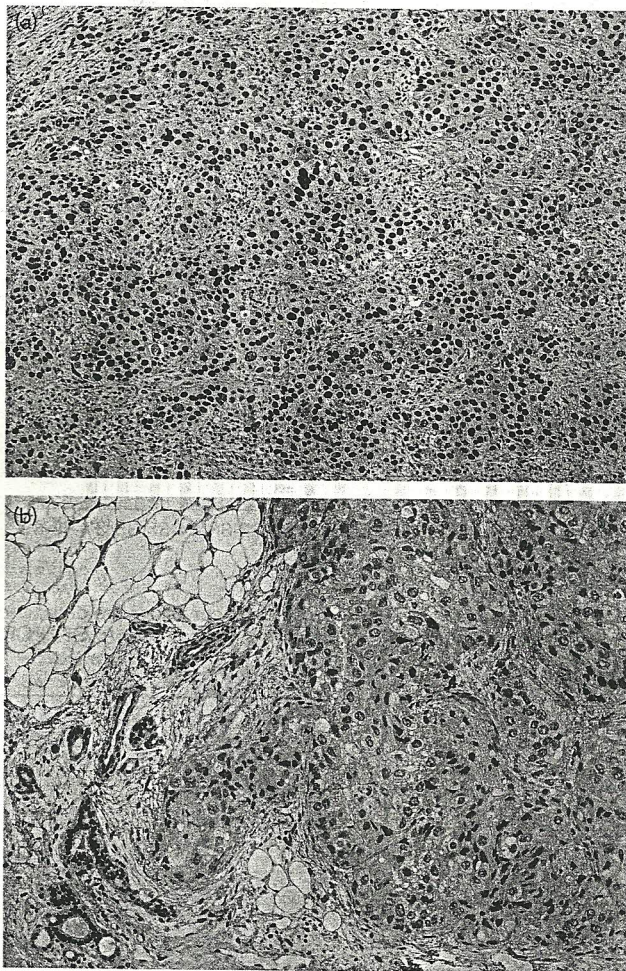
ABCB1 variant alleles or with distribution of genotypes. No correlation of ABCB1 mRNA levels with studied clinical and pathological characteristics was found by analysis of variance or t-test.

Discussion

This study provides a complex analysis of ABCB1 genetic variation and expression in the context of clinical and pathological characteristics of 90 Czech breast cancer patients of Caucasian origin. Such a detailed analysis of the association of genetic variation in ABCB1 with breast cancer, to our knowledge, does not exist at present. The observed allele frequencies of the six examined SNPs

(rs2214102, rs9282564, rs2229109, rs1128503, rs2032588 and rs1045642) are in agreement with published frequencies on American Caucasians of similar study size (Ref. [16], $n = 120$) and with a larger German study (Ref. [31], $n = 461$). Published frequency of 3435T in Slavic population (Russian) is almost identical with our results ($qT = 0.54$, $n = 290$, Ref. [32]) and highly similar to the results published on a Spanish population ($n = 408$, $qT = 0.48$, Ref. [33]). Surprisingly, our results differ from data reported on another Slavic population (Polish) (Ref. [34], $qT = 0.38$, $n = 122$). For comparison, the reported frequencies of these SNPs in the HapMap-CEU (CEPH Utah residents with ancestry from northern and western Europe) samples are 39.2% for the variant allele in

Fig. 2



Immunohistochemistry on histological section, estrogen receptor status staining significantly different among various *ABCB1* genotypes in exon 12. (a) Wild-type genotype CC in exon 12: the nuclei of carcinoma cells are positive, stromal cells are negative. Counterstained by hematoxylin. (b) TT genotype in exon 12: the nuclei of non-neoplastic mammary gland ducts and lobuli are positive (at left side), as internal control of the immunohistochemical reaction. Carcinoma cells are negative. Counterstained by hematoxylin.

Table 6 Significant associations between *ABCB1* SNPs and clinical and pathological characteristics of breast cancer patients

	ER negative	ER positive	<i>P</i> (2-sided) ^a
(a) <i>ABCB1</i> -exon 12 (1236C>T)			
CC	8	23	–
CT	18	26	0.222
TT	8	3	0.011
CT or TT	26	29	0.067
N	34	52	
(b) <i>ABCB1</i> -exon 26 (3435C>T)			
CC	3	14	–
CT	21	21	0.039
TT	10	14	0.173
CT or TT	31	35	0.051
N	34	49	

SNPs, single nucleotide polymorphisms.

^aFisher's exact test.

Bold symbols mean statistically significant results.

exon 12, and 54.3% for the variant allele in exon 26 of *ABCB1* (Entrez, SNP database). Similar to other genes [35], interethnic variations were observed for some of the studied *ABCB1* SNPs and this should be taken into account in future association study designs.

The major aim of this study was assessment of the effect of several *ABCB1* SNPs on the expression profile of *ABCB1* gene in breast cancer patients. We developed determination of *ABCB1* mRNA expression level on the basis of absolute quantification by QRT-PCR. This method, in contrast to semiquantitative approaches, including conventional immunohistochemistry, allows study of formerly 'negative' weakly expressing patients and precise stratification of patients with levels differing by three orders of magnitude. Biologic meaning of these differences may thus be well studied. *ABCB1* was unequivocally expressed in the majority of paired tumor and nontumor samples. Expectedly, large interindividual variation in *ABCB1* expression was found. We also observed downregulation of *ABCB1* expression in a majority of individual tumor samples when compared with their nontumor counterparts. Previously Ro *et al.* [7] reported a significantly higher level of P-gp in breast tumor when compared with adjacent nontumor tissue ($n = 40$). At mRNA level, *ABCB1* expression was found to be significantly induced by chemotherapy ($n = 40$, Ref. [8]), and induction of *ABCB1* mRNA expression was reported to be slightly higher in normal tissue compared with breast tumor tissue. These results suggested that *ABCB1* expression might significantly change during tumor progression and/or exposure to anticancer drugs. Thus, design of expression studies and interpretation of their results warrants extreme caution. We have not observed differences between tumors from patients treated by neoadjuvant chemotherapy and from patients untreated before surgery. In our study, eight of 39 individuals had higher *ABCB1* expression in their tumors than in nontumors. Patients with overexpressed *ABCB1* can be candidates for targeted therapy, including *ABCB1* inhibitors such as verapamil, cyclosporine A, quinidine, etc. [36]. Moreover, high expression of *ABCB1* in tumor tissue is considered to be an increased risk for the failure of anthracycline or taxane-based chemotherapy [11,13].

Our results suggest that SNPs in exons 12 (1236C > T) and 26 (3435C > T) influence *ABCB1* expression. Thus, these SNPs seem to be ideal candidates for mechanistic studies addressing functionality of *ABCB1* SNPs. In the literature, data are available mainly on analysis of 3435C > T influence on P-gp/*ABCB1* expression. The first report showed that the variant 3435TT genotype in exon 26 was associated with reduced *ABCB1* mRNA levels in duodenum and the resulting higher plasma concentration of digoxin [19]. Similarly, significantly higher levels of *ABCB1* mRNA in homozygous C

individuals compared with homozygous T individuals were observed in peripheral blood cells [37]. Furthermore, significantly higher mRNA expression levels of the ABCBI 3435C allele compared with the 3435T allele were reported in human liver samples and decrease of mRNA levels was associated with change in mRNA stability [38]. ABCBI expression levels were, however, increased in bone marrow of individuals with the 3435CT or 3435TT genotypes compared with 3435CC carriers [21]. Others again, have suggested that expression of ABCBI mRNA in heart [39], duodenum, intestine, placenta or lymphocytes [40] was independent of the 3435C > T SNP (summarized in Ref. [20]). The 1236C > T SNP was not found associated with ABCBI mRNA expression in the intestine [24] or bone marrow [21]. It is obvious that the present reports on functionality of ABCBI SNPs are ambiguous and detailed studies of haplotypes rather than isolated SNPs are needed. Kroetz et al. [16] described existence of 64 ABCBI haplotypes. Recently, Nordgard et al. [41] revealed a significantly different distribution of ABCBI haplotypes between breast cancer cases and controls in a Caucasian population of Norwegian origin, although significant difference in allele distribution of individual SNPs was not observed. Considerable ABCBI haplotype diversity has been observed across different populations [42]. In Caucasians, haplotype frequencies derived from genotype data on 10 SNPs revealed four major haplotypes occurring at a frequency above 4%. Among the major haplotypes, the subhaplotype consisting of T alleles in the exons 12, 21 and 26 SNP was represented with high frequency (33.8%) [42]. Practical implications may also be suggested by analysis of tissues in which effect of ABCBI expression product is expected. Despite the fact that some authors reported the influence of ABCBI expression on chemotherapy outcome [11,13], association between ABCBI SNPs and phenotype in breast tumors has not been reported so far. Our results suggest a functional importance of ABCBI 1236C > T and 3435C > T SNPs. If confirmed by larger studies, our results may significantly reduce the costs of estimation of P-gp levels performed at present by immunohistochemistry or QRT-PCR and suggest proper treatment regimens for breast cancer patients.

Of the studied clinical and pathological characteristics of our patients, ER status was associated with potentially functional ABCBI SNPs in exon 12 and exon 26. Patients carrying variant alleles, which conferred lower ABCBI expression had significantly more frequent ER-negative status in comparison with wild-type carriers. ER (and PR) negative status is a well-established factor suggesting worse prognosis in breast cancer and presents the major information for making decisions on chemo or hormonal regimens for its treatment. No reports suggesting associations of individual ABCBI SNPs with ER status are available in the literature. Turgut et al. [43] reported

that the 3435C > T SNP was not associated with difference between clinical and pathological parameters in breast cancer patients ($n = 57$); however, no information on ABCBI gene expression as well as ER/PR status was reported. Recently, Nordgard et al. [41] reported a correlation between several ABCBI haplotypes and ER and PR status ($P < 0.05$). A larger study addressing the question of chemotherapy outcomes and ABCBI protein (P-gp) levels as well may answer the question whether the observed association is relevant for prognosis of breast cancer patients. It should also be pointed out that correlation between ER or PR status and ABCBI expression was not significant. Presence of haplotypes not addressed by this study could further influence ABCBI phenotype and mask possible association. No clear conclusion on association between ABCBI expression and ER or PR status was reported so far. Seymour et al. [44] suggested a significant positive association between P-gp levels and ER-positive patients compared with ER-negative patients. Charpin et al. [9], however, reported the opposite. Other studies found no correlation between P-gp expression and ER or PR status [7,45]. Recently, another study [46] found a negative correlation between P-gp expression studied by immunohistochemistry and tumor grade in Slovak breast cancer patients ($n = 87$). The authors suggested that the negative correlation between histological grade of malignancy of tumor and expression of P-gp indicates possible influence of progressive tumor cell dedifferentiation. On the other hand, a higher P-gp immunoreactivity score was associated with higher histological grade ($n = 104$, see Ref. [12]; $n = 177$, see Ref. [14]) and axillary lymph node involvement ($n = 104$, see Ref. [12]) of breast carcinomas. Association of ABCBI expression with invasion into axillary nodes was found by semiquantitative reverse transcription PCR ($n = 46$, see Ref. [10]) as well. Yet, other studies did not confirm this observation [15,45]. Our study found no associations of ABCBI expression with menopausal status, type, stage, size, grade and node involvement of breast carcinomas.

ABCBI SNP in intron 1 seemed to cosegregate with invasive lobular type of breast carcinoma but owing to low frequency of this SNP (only two samples were homozygotes for the variant allele), it is not possible to draw a reasonable conclusion from this observation.

In conclusion, expression of ABCBI was lower in majority of the tumor compared with the nontumor samples. The observed association of ABCBI SNPs with ER status of patients warrants further research on the basis of extended haplotype analysis. SNPs in exons 12 and 26 influenced ABCBI expression and seem to be good candidates for cancer association studies. Analysis of association of ABCBI SNPs and expression with patient's response to chemotherapy and survival is conducted by

Table 7 Distribution of *ABCB1* SNP 2677G>T/A and allele frequencies in breast cancer patients

<i>ABCB1</i> SNP 2677G>T/A, rs2032582	N(%)	Allele frequency
G/G	19 (21.1)	G (53.5)
G/T	50 (55.5)	T (40.0)
T/T	9 (10.0)	A (6.7)
G/A	8 (8.9)	
A/A	0 (0)	
T/A	4 (4.4)	
Total	90	

our laboratories in a longer perspective to evaluate predictive value and potential use of *ABCB1* for breast cancer chemotherapy.

Acknowledgements

No conflict of interest declared. This project was supported by grant of Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health, no. 9426-3, grant from the Czech Science Foundation, no. 305/07/P347, NIPH Young Scientist Research Program and the National Program FUGE nos. 151924/150 and 15204/150, funded by The Research Council in Norway.

Appendix 1: *ABCB1* 2677G>T/A (Ala893Ser, Ala893Thr) single nucleotide polymorphism genotyping

Methods

The 2677G>T/A SNP in *ABCB1* was estimated using real-time PCR with specific TaqMan MGB probes. Oligonucleotide primers and probes design for real-time PCR as well as the reaction conditions of PCR were performed according to Saito *et al.* (2003) with a slight modification. Reaction volume of 10 µl included 5 µl of TaqMan 2x Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) probes labeled with VIC (wild G allele) and FAM (T or A allele, final concentration of each probe was set to 200 nmol/l, each probe from Applied Biosystems) forward and reverse primers (final concentration of each was 900 nmol/l) and genomic DNA (50–100 ng). Cycling parameters were initial hold at 50°C for 2 min and initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 55 cycles consisting of denaturation at 95°C for 15 s and annealing/extension at 60°C for 60 s.

Results

Frequency of *ABCB1* SNP 2677G>T/A in breast cancer patients of Czech origin observed in our laboratory is presented in Table 7. The higher frequency was found for variant allele T in exon 21 (2677T, 40%) than for variant allele A (2677A, 6.7%).

References

- Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993; **62**:385–427.
- Leone F, Clarke R. ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2003; **10**:43–73.
- Callen DF, Baker E, Simmers RN, Seshadri R, Roninson IB. Localization of the human multiple drug resistance gene, *ABCB1*, to 7q21.1. *Hum Genet* 1987; **77**:142–144.
- Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K. Pharmacogenetics of drug transporters and its impact on the pharmacotherapy. *Curr Top Med Chem* 2004; **4**:1385–1398.
- Ling V. Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; **40**:S3–S8.
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**:7735–7738.
- Ro J, Sahin A, Ro JY, Fritsche H, Hortobagyi G, Blick M. Immunohistochemical analysis of P-glycoprotein expression correlated with chemotherapy resistance in locally advanced breast cancer. *Hum Pathol* 1990; **21**:787–791.
- Arnal M, Franco N, Fargeot P, Riedinger JM, Brunet-Lecomte P, Lizard-Nacol S. Enhancement of *ABCB1* gene expression in normal tissue adjacent to advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2000; **61**:13–20.
- Charpin C, Vielh P, Duffaud F, Devictor B, Andrac L, Lavaut MN, *et al.* Quantitative immunocytochemical assays of P-glycoprotein in breast carcinomas: correlation to messenger RNA expression and to immunohistochemical prognostic indicators. *J Natl Cancer Inst* 1994; **86**:1539–1545.
- Schneider J, Gonzalez-Roces S, Pollan M, Lucas R, Tejerina A, Martin M, *et al.* Expression of LRP and *ABCB1* in locally advanced breast cancer predicts axillary node invasion at the time of rescue mastectomy after induction chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2001; **3**:183–191.
- Burger H, Foekens JA, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, Wiemer EA, *et al.* RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. *Clin Cancer Res* 2003; **9**:827–836.
- Surowiak P, Materna V, Matkowski R, Szczuraszek K, Kornafel J, Wojnar A, *et al.* Relationship between the expression of cyclooxygenase 2 and *ABCB1*/P-glycoprotein in invasive breast cancers and their prognostic significance. *Breast Cancer Res* 2005; **7**:R862–R870.
- Chintamani, Singh JP, Mittal MK, Saxena S, Bansal A, Bhatia A, *et al.* Role of P-glycoprotein expression in predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer – a prospective clinical study. *World J Surg Oncol* 2005; **3**:61.
- Larkin A, O'Driscoll L, Kennedy S, Purcell R, Moran E, Crown J, *et al.* Investigation of MRP-1 protein and MDR-1 P-glycoprotein expression in invasive breast cancer: a prognostic study. *Int J Cancer* 2004; **112**:286–294.
- Moureau-Zabotto L, Ricci S, Lefranc JP, Coulet F, Genestie C, Antoine M, *et al.* Prognostic impact of multidrug resistance gene expression on the management of breast cancer in the context of adjuvant therapy based on a series of 171 patients. *Br J Cancer* 2006; **94**:473–480.
- Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, *et al.* Sequence diversity and haplotype structure in the human *ABCB1* (*ABCB1*, Multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics* 2003; **13**:481–494.
- Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM. A 'silent' polymorphism in the *MDR1* gene changes substrate specificity. *Science* 2007; **315**:525–528.
- Komar AA. Silent SNPs: impact on gene function and phenotype. *Pharmacogenomics* 2007; **8**:1075–1080.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John E, *et al.* Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**:3473–3478.
- Kerb R. Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. *Cancer Lett* 2006; **234**:4–33.
- Illmer T, Schuler US, Thiede C, Schwarz UI, Kim RB, Gotthard S, *et al.* *ABCB1* gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Res* 2002; **62**:4955–4962.
- Kafka A, Sauer G, Jaeger C, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R, *et al.* Polymorphism C3435T of the *MDR1* gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Int J Oncol* 2003; **22**:1117–1121.
- Jamrozik K, Balcerzak E, Cebula B, Kowalczyk M, Panczyk M, Janus A, *et al.* Multi-drug transporter *ABCB1* gene polymorphism and prognosis in adult acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacol Rep* 2005; **57**:882–888.
- Goto M, Masuda S, Saito H, Uemoto S, Kiuchi T, Tanaka K, *et al.* C3435T polymorphism in the *ABCB1* gene affects the enterocyte expression level of

- CYP3A4 rather than Pgp in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics* 2002; **12**:451-457.
- 25 Obata H, Yahata T, Quan J, Sekine M, Tanaka K. Association between single nucleotide polymorphisms of drug resistance-associated genes and response to chemotherapy in advanced ovarian cancer. *Anticancer Res* 2006; **26**:2227-2232.
 - 26 Soucek P, Anzenbacher P, Skoumalova I, Dvorak M. Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells* 2005; **23**:1417-1422.
 - 27 Jung M, Ramankulov A, Roigas J, Johannsen M, Ringsdorf M, Kristiansen G, Jung K. In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. *BMC Mol Biol* 2007; **8**:47.
 - 28 Weidenhammer EM, Kahl BF, Wang L, Wang L, Duhon M, Jackson JA, et al. Multiplexed, targeted gene expression profiling and genetic analysis on electronic microarrays. *Clin Chem* 2002; **48**:1873-1882.
 - 29 Huang Y, Shirajian J, Schroder A, Yao Z, Summers T, Hodko D, et al. Multiple sample amplification and genotyping integrated on a single electronic microarray. *Electrophoresis* 2004; **25**:3106-3116.
 - 30 Erali M, Schmidt B, Lyon E, Witwer C. Evaluation of electronic microarrays for genotyping factor V, factor II, and MTHFR. *Clin Chem* 2003; **49**: 732-739.
 - 31 Cascorbi I, Gerloff T, John A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter *ABCB1* gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2001; **69**:169-174. Erratum in: *Clin Pharmacol Ther* 2004; **75**:124.
 - 32 Gaikovitch EA, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Brockmoller J, Frotschl R, Kopke K, et al. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; **59**:303-312.
 - 33 Bernal ML, Sinues B, Fanlo A, Mayayo E. Frequency distribution of C3435T mutation in exon 26 of the *ABCB1* gene in a Spanish population. *Ther Drug Monit* 2003; **25**:107-111.
 - 34 Jamrozik K, Balcerczak E, Mlynarski W, Mirowski M, Robak T. Distribution of allelic variants of functional C3435T polymorphism of drug transporter *ABCB1* gene in a sample of Polish population. *Pol J Pharmacol* 2002; **54**:495-500.
 - 35 Sarmanova J, Tynkova L, Susova S, Gut I, Soucek P. Genetic polymorphisms of biotransformation enzymes: allele frequencies in the population of the Czech Republic. *Pharmacogenetics* 2000; **10**:781-788. Erratum in: *Pharmacogenetics* 2003; **13**:243.
 - 36 Nobili S, Landini I, Gigliani B, Mini E. Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. *Curr Drug Targets* 2006; **7**:861-879.
 - 37 Owen A, Chandler B, Bray PG, Ward SA, Hart CA, Back DJ, et al. Functional correlation of P-glycoprotein expression and genotype with expression of the human immunodeficiency virus type 1 coreceptor CXCR4. *J Virol* 2004; **78**:12022-12029.
 - 38 Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadee W. Multidrug resistance polypeptide 1 (*ABCB1*, *ABCB1*) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics* 2005; **15**:693-704.
 - 39 Meissner K, Jedlitschky G, Meyer zu Schwabedissen H, Dazert P, Eckel L, Vogelgesang S, et al. Modulation of multidrug resistance P-glycoprotein 1 (*ABCB1*) expression in human heart by hereditary polymorphisms. *Pharmacogenetics* 2004; **14**:381-385.
 - 40 Oselin K, Nowakowski-Gashaw I, Mrozikiewicz PM, Wolbergs D, Pahkla R, Roots I. Quantitative determination of *ABCB1* mRNA expression in peripheral blood lymphocytes: a possible role of genetic polymorphisms in the *ABCB1* gene. *Eur J Clin Invest* 2003; **33**:261-267.
 - 41 Nordgard SH, Ritchie MD, Jensrud SD, Motsinger AA, Alnaes GI, Lemmon G, et al. *ABCB1* and GST polymorphisms associated with TP53 status in breast cancer. *Pharmacogenet Genomics* 2007; **17**:127-136.
 - 42 Tang K, Wong LP, Lee EJ, Chong SS, Lee CG. Genomic evidence for recent positive selection at the human *ABCB1* gene locus. *Hum Mol Genet* 2004; **13**:783-797.
 - 43 Turgut S, Yaren A, Kursunluoglu R, Turgut G. MDR1 C3435T polymorphism in patients with breast cancer. *Arch Med Res* 2007; **38**:539-544.
 - 44 Seymour L, Bezwoda WR, Dansey RD. P-glycoprotein immunostaining correlates with ER and with high Ki67 expression but fails to predict anthracycline resistance in patients with advanced Breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1995; **36**:61-69.
 - 45 Lacave R, Coulet F, Ricci S, Touboul E, Flahault A, Rateau JG, et al. Comparative evaluation by semiquantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of *ABCB1*, MRP and GSTP gene expression in breast carcinomas. *Br J Cancer* 1998; **77**:694-702.
 - 46 Rybarova S, Hodorova I, Hajdukova M, Schmidtova K, Mojzis J, Kajo K, et al. Expression of MDR proteins in breast cancer and its correlation with some clinical and pathological parameters. *Neoplasma* 2006; **53**:128-135.

Příloha č. 4

Vaclavikova R, **Hubackova M**, Stribrna-Sarmanova J, Kodet R, Mrhalova M, Novotny J, Gut I, Soucek P. RNA expression of cytochrome P450 in breast cancer patients. *Anticancer Res.* 2007;27(6C):4443-50. (IF₂₀₁₂ = 1,7)

RNA Expression of Cytochrome P450 in Breast Cancer Patients

RADKA VACLAVIKOVA¹, MILUSE HUBACKOVA^{1,4}, JANA STRIBRNA-SARMANOVA¹, ROMAN KODET², MARCELA MRHALOVA², JAN NOVOTNY³, IVAN GUT¹ and PAVEL SOUCEK¹

¹Group for Biotransformations, Center of Occupational Diseases,
National Institute of Public Health, 100 42 Prague, Czech Republic;

²Department of Pathology and Molecular Medicine, 2nd Faculty of Medicine,
Charles University, 150 06 Prague, Czech Republic;

³Department of Oncology, General Teaching Hospital and 1st Faculty of Medicine,
Charles University, 121 08 Prague;

⁴Third Faculty of Medicine, Charles University, 100 00 Prague, Czech Republic

Abstract. *Background:* The expression pattern of cytochrome P450 genes (CYPs) affected by tumorigenesis may have an important role in the progression of cancer and in the metabolism of anticancer drugs. The aim of the study was to determine the expression patterns of four cytochrome P450 genes (CYP1B1, 2C9, 2E1 and 3A4) in breast cancer patients. *Patients and Methods:* mRNA expression was quantified by real-time PCR. Analyses of 40 sets of human breast tumors, adjacent non-tumor tissues and of 18 peripheral blood lymphocyte samples were performed. Expression levels were tested for correlation with clinical and pathological data of patients. *Results:* Expression levels of CYP2C9 and CYP3A4 were negligible. CYP1B1 expression was on average 50-fold higher than that of CYP2E1 with overexpression detected in one third of the tumors. Correlation of CYP1B1 expression in lymphocytes with that in non-tumor tissues was found. Significantly higher CYP2E1 expression was associated with an invasive lobular type of tumor, locally advanced disease as well as with non-tumor tissue of progesterone receptor-negative patients. *Conclusion:* CYP2E1 expression has a potential role as a breast cancer prognosis marker. The observed high CYP1B1 expression in tumor cells may evoke changes in their response to drugs which are substrates of P450 1B1 and influence metabolism or activation of environmental carcinogens.

Correspondence to: Radka Vaclavikova, Ph.D., Group for Biotransformations, Center of Occupational Diseases, National Institute of Public Health, Srobarova 48, 100 42 Praha 10, Czech Republic. Tel: +420267082709, Fax: +420267311236, e-mail: rvaclavikova@szu.cz, web: www.szu.cz

Key Words: Breast cancer, cytochrome P450, real-time PCR, tumor, gene, prognosis.

Breast cancer is the most common malignant tumor in the female population in the Western world responsible for 15% of cancer-related deaths (1). The expression of tumor-specific proteins in mammary glands may play a critical role in the development of breast cancer as well as in the success of chemotherapy treatment. To date, very few critical markers have been validated for the prediction of drug efficiency in breast cancer.

Cytochrome P450 (protein name P450, EC 1.14.14.1; gene name CYP) enzymes catalyze a large number of reactions modifying biological activities of environmentally related xenobiotics, including drugs and endobiotics, e.g. fatty acids, steroids, prostaglandins and bile acids (2). Another aspect of importance of P450s is their ability to metabolize a variety of anticancer drugs. The expression of major P450s is polymorphic and results in the generation of multiple population-specific phenotypes with different drug metabolizing capabilities. Thus, it is important to determine the expression patterns in different populations.

Human cytochrome P450 1B1 is an extrahepatic enzyme involved in the production of reactive estrogen metabolites, e.g. 4-hydroxyestradiol (3), and in the activation of environmental procarcinogens (4). P450 1B1 is highly expressed in estrogen-sensitive tissues such as the mammary gland, uterus and ovary (4, 5, 6). Immunohistochemistry revealed a localization of P450 1B1 in breast cancer microsomes (7). P450 1B1 activates prodrugs, such as resveratrol, and inactivates others, such as tamoxifen and docetaxel (8-11).

P450 2C9 is highly abundant in the human liver and was also found in the kidney, adrenals, pancreatic islets, pituitary gland, prostate ducts, and gastrointestinal tract (12). P450 2C9 contributes to biotransformation of pharmacologically important drugs and metabolizes endogenous fatty acids, prostanoids, and steroid hormones (13). P450 2C9 expression in human mammary gland may

lead to activation of anticancer prodrug ifosfamide (14).

P450 2E1 is predominantly expressed in human liver, but it has also been found in esophagus, kidney, lung (15), and brain (16). *CYP2E1* is expressed at an early stage of human fetal development (17), indicating its importance for cellular proliferation and differentiation. P450 2E1 is responsible for the metabolic activation of low molecular weight procarcinogens, e.g. chlorinated hydrocarbons and nitrosamines (18). Etoposide and dacarbazine are inactivated by P450 2E1 (8).

P450 3A4 metabolizes a majority of prescription drugs (19). P450 3A4 converts endogenous estrone and estradiol to 16-hydroxy metabolites (20). *CYP3A4* is expressed in the liver, gut, colon, prostate and mammary gland (6, 21). P450 3A4 in tumors may inactivate drugs, e.g. etoposide, gefitinib, paclitaxel, tamoxifen, topotecan, vincristine, and vinblastine, or activate them, e.g. cyclophosphamide, doxorubicin, ifosfamide, imatinib and thiotepa (2, 8, 9, 11, 22).

In this study, we determined the mRNA expression of *CYP1B1*, *CYP2C9*, *CYP2E1* and *CYP3A4* in samples of human carcinomas of the mammary gland and paired surrounding tissue without morphological signs of presence of tumor cells. Peripheral blood lymphocytes were tested as potential surrogates. A highly sensitive method with absolute quantification and internal normalization was used for the first time. The potential of *CYP* expression patterns as markers of prognosis was also examined.

Patients and Methods

Materials. Histopaque (Ficoll) and chemicals for preparation of buffers were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Deoxynucleotides (dATP, dCTP, dGTP and dTTP) for polymerase chain reaction (PCR) and molecular weight standards for electrophoresis (Φ X174DNA/HaeIII digest, λ EcoRI/HindIII) were products of New England Biolabs, Inc. (Ipswich, MA, USA). Ultrapure agarose was supplied by Life Technologies (Paisley, UK). Quantitative real-time PCR (QRT-PCR) of *CYP1B1*, *CYP2C9*, *CYP3A4* and *cyclophilin A (CYCA)* was performed using commercially available TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) including sets of specific probe and primers for *CYP1B1* (kit no. Hs00164383_m1), *CYP2C9* (kit no. Hs00426397_m1), *CYP3A4* (kit no. Hs00430021_m1) and *CYCA* (kit no. 4310857). TaqMan Universal PCR Master Mix (kit no. 4304437) was used for these assays as well. QRT-PCR for *CYP2E1* was performed using ThermoStart Polymerase kit (AB Gene, Surrey, UK) and fluorescent probe with primers was purchased from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). Sequences of primers and probe for QRT-PCR of *CYP2E1* have been described elsewhere (23).

Samples. Samples of human mammary carcinomas and paired adjacent normal tissue without morphological signs of carcinoma were obtained from 40 breast cancer patients diagnosed at the Motol Faculty Hospital in Prague during the period 2003-2005. Peripheral lymphocytes were isolated by centrifugation with Histopaque from 18 of these patients. Tissue samples were

Table I. *Clinical and histological characteristics of patients involved in the study.*

Characteristic	N(%)
Average age at diagnosis (years), mean \pm SD	
62.3 \pm 11.5	40 (100)
\leq 40	1 (2.5)
40-49	3 (7.5)
50-59	15 (37.5)
>60	21 (52.5)
Menopausal status	
Pre/Post	6 (15)/34 (85)
Histological type	
Invasive ductal carcinoma	30 (75)
Invasive lobular carcinoma	7(17.5)
Other type	3 (7.5)
Average tumor size, mean \pm SD	
23.9 \pm 11.6 mm	
\leq 20 mm	20 (50)
>20 mm	20 (50)
Histological grade [†]	
1	5 (12.5)
2	20 (50)
3	9 (22.5)
Not assessed	6 (15)
Clinical stage ^{††}	
I	12 (30)
II	24 (60)
III	3 (7.5)
IV	1 (2.5)
Estrogen receptor	
Positive/Negative	26 (65)/14 (35)
Progesterone receptor	
Positive/Negative	18 (45)/22 (55)

N=number of patients. [†]According to histological type of tumor and tumor necrosis. ^{††}According to TNM classification.

collected during surgery and snap-frozen in liquid nitrogen. In each sample containing carcinoma more than 50% of vital tumor tissue was present. The histological classification of the carcinomas, as well as the evaluation of non-tumor breast lesions, was made according to standard diagnostic procedures. Non-tumor samples were without morphologically detected tumor cells. Characteristics of patients are shown in Table I. Patients were asked to read and sign an Informed Consent in agreement with requirements of the Ethical Commission of the National Institute of Public Health in Prague.

Isolation of total RNA and cDNA synthesis. Total RNA was isolated from tissue slices and from peripheral blood lymphocytes using Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the procedure supplied by the manufacturer. The quality of RNA was verified by horizontal agarose gel electrophoresis. RNA quantity was assessed by UV spectrophotometry on a Cary 300 spectrophotometer (Varian, Palo Alto, CA, USA). cDNA was synthesized using 0.5 μ g of total RNA using random hexamer primers with the help of RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis

Table II. Programs for the QRT-PCR of human CYPs and CYCA performed on RotorGene 2000.

Gene	PCR program					
	Initial hold	Initial denaturation	Number of cycles	Denaturation	Annealing	Extension
<i>CYP1B1</i>	2 min 50°C	15 min 95°C	55	10 s 95°C	60 s 60°C	15 s 72°C
<i>CYP2C9</i>	2 min 50°C	10 min 95°C	50	15 s 95°C	60 s 60°C	none
<i>CYP2E1</i>	none	15 min 95°C	45	15 s 95°C	50 s 60°C	none
<i>CYP3A4</i>	2 min 50°C	10 min 95°C	50	15 s 95°C	60 s 60°C	15 s 72°C
<i>CYCA</i>	none	15 min 95°C	55	15 s 95°C	45 s 62°C	none

Kit from MBI Fermentas (Vilnius, Lithuania). The quality of cDNA in terms of DNA contamination was then confirmed by PCR amplification of *ubiquitin C* fragment discriminating between product from cDNA (190 bp) and from genomic DNA (1009 bp) as described elsewhere (24).

Quantitative real-time PCR assays. The resulting cDNA was used for QRT-PCR performed in a RotorGene 2000 (Corbett Research, Sydney, Australia) under conditions shown in Table II. *CYCA* was used as a reference gene. The PCR reaction mixtures contained cDNA diluted 10-fold for determination of expression levels of *CYP1B1* and *CYCA* and 5-fold for determination of *CYP2E1*, *CYP2C9* and *CYP3A4*. The non-template control consisted of a reaction tube in which water was used in place of cDNA. Negative cDNA controls were also employed to reveal possible carry-over contamination.

Preparation of standards for quantitative real-time PCR. Bacterial plasmids containing full-length coding sequences of *CYP1B1*, *CYP2C9*, *CYP2E1* and *CYP3A4* were used for construction of calibration curves. The use of these standards has been described elsewhere (24). Plasmid containing subcloned fragments of exons 1 and 2 of *CYCA* in *pCR2.TOPO* plasmid was kindly provided by D. Lison (Center of Occupational Medicine, Catholic University, Louvain, Brusel, Belgium). Plasmids were propagated in *Escherichia coli* DH5 α Maximum Efficiency Cells (Invitrogen) and isolated by Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The concentration of plasmids was determined spectrophotometrically.

Data analysis. All data were analyzed using RotorGene v6 software (Corbett Research) and evaluated by absolute quantification with external standard curves. Standard curves were generated from five decimal dilutions of the corresponding plasmid clone; the number of copies ranged from 10² to 10⁶ copies/reaction. The amount of target gene expression was calculated from the standard curve and quantitative normalization of the amount of cDNA in each sample was performed using the expression of *CYCA* as internal control ($\text{copies}_{\text{target}}/\text{copies}_{\text{control}}$). Each sample was assayed in duplicate and the mean value was used for the calculation.

Analyses of associations among clinical and histological variables and mRNA expression in tumor and non-tumor adjacent pairs were also performed. Determined variables were as follows: age at diagnosis; menopausal status, pre- vs. post-; tumor size in mm; tumor size ≤ 20 mm vs. > 20 mm; histological type, invasive ductal vs. lobular; histological grade, G1 vs. G2 vs. G3; clinical stage, I vs.

II, III and IV combined (*i.e.* regional vs. advanced disease); expression of estrogen and progesterone receptors, positive vs. negative. One-way ANOVA tests and two-tailed Pearson's bivariate correlation analysis were used for evaluation of the significance of these associations. For statistical analyses, SPSS v12.0 program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used.

Results

Characteristics of patients and tumors. Available clinical and histological data on all patients are summarized in Table I. Tissue samples were collected from Caucasian females who ranged from 39 to 83 years of age at diagnosis with more than half of the patients being older than 60 years; the average age at diagnosis of breast cancer patients was 62 years (median 62.5). Almost all patients (85%) had post-menopausal status at diagnosis. The average size of their tumors was 23.9 mm (median 20.5) and 75% of cases were invasive ductal carcinomas, with 65% of tumors being estrogen receptor-positive. Progesterone receptor expression was positive in 45% of tumors.

Expression of *CYP1B1*, *CYP2C9*, *CYP2E1*, and *CYP3A4* in human mammary gland. *CYP2C9* and *CYP3A4* were present at very low levels in all kinds of samples (see Table III for *CYCA* normalized levels). *CYP2C9* expression was below the limit of quantification (50 copies per μg of RNA) in 1 sample of tumor and 9 samples of non-tumor tissue. *CYP3A4* was present at slightly higher levels than *CYP2C9* (Table III). *CYP3A4* expression was below the limit of quantification (50 copies per μg of RNA) in 14 samples of 40 tumor samples and 5 samples of 40 non-tumor tissue.

CYP2E1 was unequivocally expressed in all samples of mammary tumor and paired non-tumor tissue from the same patients (Table III). *CYP1B1* expression was the highest in all samples, with mean values exceeding those of *CYP2E1* expression by almost 50-fold (Table III). One non-tumor sample showed no *CYP1B1* expression (Figure 1b).

Table III. *CYP* expression levels in human mammary tissue and peripheral blood lymphocytes.

Gene	Sample	Expression of <i>CYP/CYCA</i> (per µg of total RNA)			Individual variability ^b
		Minimum value	Maximum value	Mean±S.E.	
<i>CYP1B1</i>	Lymphocytes	5.0	483.2	89.2±32.0	97
	Tumor	0.2	300.5	47.6±11.5	1252
	Non-tumor	4.1	292.7	55.1±11.2	72
<i>CYP2C9</i>	Lymphocytes	BLQ	1.2x10 ⁻³	0.2x10 ⁻³ ±0.1x10 ⁻³	.a
	Tumor	BLQ	279.3x10 ⁻³	19.3x10 ⁻³ ±7.1x10 ⁻³	.a
	Non-tumor	BLQ	404.7x10 ⁻³	50.9x10 ⁻³ ±13.9x10 ⁻³	.a
<i>CYP2E1</i>	Lymphocytes	0.1	77.1	4.6±4.3	857
	Tumor	0.1	3.5	1.0±0.1	25
	Non-tumor	0.1	3.2	0.9±0.1	53
<i>CYP3A4</i>	Lymphocytes	BLQ	0.5x10 ⁻³	0.4 x10 ⁻³ ±0.3x10 ⁻⁴	.a
	Tumor	BLQ	217.6x10 ⁻³	24.1x10 ⁻³ ±8.1x10 ⁻³	.a
	Non-tumor	BLQ	910.8x10 ⁻³	136.3x10 ⁻³ ±36.1x10 ⁻³	.a

^aNo variability is shown because the lowest value was below limit of quantification (BLQ). ^bFold difference.

The expression levels of examined *CYPs* in paired mammary tumor and non-tumor tissue from the same individuals were also compared. *CYP2C9* and *CYP3A4* expressions were usually higher in the morphologically confirmed non-tumor tissue than in the tumor in 22/30 and 32/40 of cases, respectively. We found only one patient with a 3-fold and one with negligible (1.08-fold) *CYP3A4* overexpression in the tumor compared to non-tumor tissue. In the rest of the patients, *i.e.* 32 of 34, the level of *CYP3A4* was lower in their tumor tissue.

The *CYP2E1* expression was higher in non-tumor than in tumor tissue of 23 out of 40 patients and lower in 17 samples (Figure 1a). In four of forty patients, *CYP2E1* was overexpressed more than 3-fold in their tumors (3.3-, 3.4-, 4.0-, and 7.6-fold) compared to non-tumor tissue. *CYP1B1* expression levels were higher in non-tumor than in tumor tissue of 27 out of 40 patients (Figure 1b). More than a 3-fold overexpression of *CYP1B1* was detected in tumors of three patients (3.3-, 7.2-, and 22.9-fold).

We compared the *CYP2E1* and *CYP1B1* expression in peripheral blood lymphocytes with that of the mammary gland. We observed higher *CYP2E1* expression in lymphocytes than in mammary gland tissue (almost 5-fold on average, Table III). *CYP2E1* expression in lymphocytes did not correlate with that in either tumor or non-tumor mammary tissue (results not shown). Similarly to mammary gland tissue, the expression of *CYP1B1* mRNA in peripheral blood lymphocytes of all patients was significantly higher than the expression of *CYP2E1* (almost 20-fold higher on average, Table III). *CYP1B1* expression in lymphocytes was up to 2-fold higher on average than that in mammary gland tissue (Table III). Interestingly, *CYP1B1* expression positively correlated with that in non-tumor samples ($R^2=0.67$). The correlation of *CYP1B1* expression in lymphocytes with that in tumors was weaker ($R^2=0.42$).

Association of expression of CYPs with clinical and histological characteristics of patients. Expression levels of *CYP1B1* and *CYP2E1*, as the highest among the studied *CYPs*, were compared to clinical and histological characteristics of patients. *CYP1B1* expression did not correlate with any of characteristics inspected (data not shown). *CYP2E1* expression was significantly higher in invasive lobular types of tumors in comparison with invasive ductal ones ($p=0.028$; Table IV). *CYP2E1* expression was higher in non-tumor tissue of progesterone receptor-negative patients than in receptor-positive patients ($p=0.026$; Table IV). *CYP2E1* expression in tumors of patients with clinical stage I was higher than the expression in those with more advanced stages (II, III, and IV; $p=0.070$; Table IV). Age and menopausal status did not modify any of inspected associations.

Discussion

Our data suggest that of the four *CYPs* studied, *CYP2C9* and *CYP3A4* were present at very low levels. The low, but detectable expression of *CYP2C9* in tumors and non-tumor samples of mammary gland found by our study is in accordance with previous studies (13, 19). Similarly, *CYP3A4* mRNA was detected in 8 out of 11 examined normal mammary tissue samples and in 2 out of 13 tumors by PCR determined with Southern blotting (25). By far largest study reported recently found positive immunohistochemical P450 3A4/5 staining in 25% (97 out of 393) of inspected mammary tumors (6). However, it remains unclear whether there is any correlation between mRNA and protein levels in mammary tumors because mRNA expression levels were not analyzed. From another point of view, it is also worth to mentioning the issue of the specificity of antibodies used for immunohistochemistry. The human P450 family includes

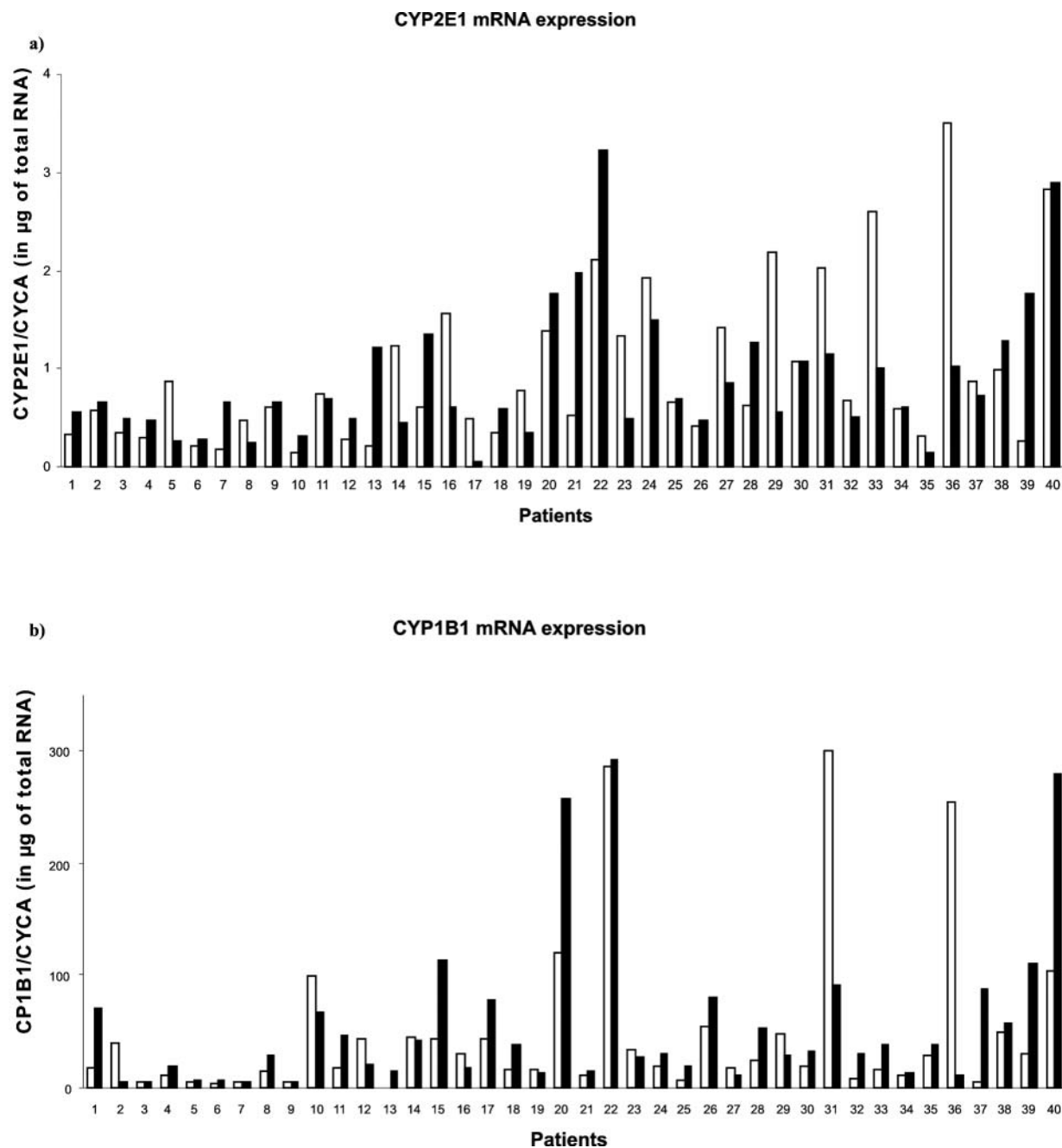


Figure 1. Levels of mRNA expression of (a) *CYP2E1* and (b) *CYP1B1* in tumor and adjacent non-tumor mammary tissue. *CYP1B1* and *CYP2E1* levels were normalized to the level of the control gene *CYCA* and expressed per μg of total RNA. Values represent means with standard deviation of the mean of expression levels in 40 samples of non-tumors (■) and tumors (□) determined in duplicates.

about 60 CYP genes (<http://drnelson.utmem.edu/hum.html>) with some members sharing more than 90% homology in their primary protein sequences. In fact, the study of Haas *et al.* (6) used polyclonal antibodies, raised in rabbits, which did not distinguish between P450 3A4 and the highly homologous 3A5.

There were quite contradictory findings on *CYP2E1* expression in mammary gland tissue in the literature. *CYP2E1* was not detected in tumor or non-tumor tissue (20) while two previous studies showed its expression in both tumor (26) and in normal tissue from reduction mammoplasties (27). The presence of P450 2E1 protein in mammary gland tissue was

Table IV. Associations of CYP2E1 expression with clinical and histological characteristics of patients.

Tissue	Characteristics	N	CYP2E1 expression Mean±S.E ^a	95% Confidence interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Tumor F=5.29; p=0.028	Ductal invasive	30	0.85±0.12	0.60	1.10
	Lobular invasive	7	1.61±0.45	0.51	2.71
Non-tumor F=5.33, p=0.026	Progesterone receptor positive	18	0.62±0.08	0.45	0.79
	Progesterone receptor negative	22	1.10±0.17	0.73	1.46
Tumor F=3.47, p=0.070	Stage I	12	1.32±0.32	0.60	2.03
	Stages II-IV	28	0.81±0.11	0.58	1.04

N=number of patients, ^aCYP2E1/CYCA (per µg of total RNA), mean and standard error of the mean is presented.

also found by immunohistochemistry (28) and in 45%, i.e. 175 out of 393 tumors (6). In our study, CYP2E1 was unequivocally expressed in all samples of mammary tumor and paired non-tumor tissue from the same patients.

CYP1B1 expression was the highest CYP on average with mean values exceeding those of CYP2E1 expression almost 50-fold. Principally, data on high CYP1B1 expression in mammary gland tissue well support the fact that P450 1B1 is extrahepatic enzyme. Our data are also consistent with previous studies in which CYP1B1 expression in both tumor and non-tumor adjacent breast tissue was observed (20, 25, 26). In an earlier study, Murray *et al.* (7) detected immunostaining for P450 1B1 in (12/12) breast invasive ductal carcinomas in contrast to normal tissue (0/12). It is quite interesting that a recent immunohistochemical study found positive P450 1B1 staining in only 16.5% (65 of 393) of inspected mammary tumors (6) while our study detected transcripts in all inspected tumors. In our opinion, this result suggests that detection of CYP1B1 transcripts may be more sensitive than detection of protein by immunohistochemistry and thus better reflect tissue characteristics.

The expression levels of the examined CYPs in paired mammary tumor and non-tumor tissue from the same individuals were compared in order to reveal signatures of individual tumors which may then be used for targeted therapy design.

CYP2C9 and CYP3A4 levels were usually higher in the morphologically confirmed non-tumor tissue than in the tumor. Differences in CYP2C9 expression between mammary tumor and non-tumor tissue were not previously found (20). Our data on CYP3A4 support results of others who found higher levels in morphologically normal adjacent tissue than in tumors (20, 29). Similarly, Miyoshi *et al.* (30) found significantly higher CYP3A4 levels in normal mammary tissue (n=44) than those in tumors (n=70). However, the fact that normal tissue was obtained from different patients than were the tumors might have biased

the results. In contrast, Kapucuoglu *et al.* (31) concluded that P450 3A4 protein levels assessed by immunohistochemistry were higher in tumors than in normal mammary tissue (n=25).

Our data, together with findings of others, suggest that CYP2C9 and CYP3A4 expression is mostly down-regulated during carcinogenesis. The level of P450 3A4 was reported to be associated with a low response rate to docetaxel treatment (32). In our group of patients, the extremely low expression of CYP3A4 in all tumors suggests that its predictive value for any estimation of response to anticancer drugs metabolically inactivated by P450 3A4 is negligible unless significant mRNA stabilization occurs. The same applies to CYP2C9.

In four out of forty patients, CYP2E1 was overexpressed more than 3-fold in their tumors. These patients could potentially benefit from P450 2E1-activated prodrugs. On the other hand, it is also worth pointing out that metabolism of a number of P450 2E1 substrates as well as a P450 2E1 futile cycle in the absence of substrate is known to lead to an increased production of reactive oxygen species and deregulation of apoptotic pathways (33).

CYP1B1 expression levels were higher in non-tumor than in tumor tissue of the majority of patients. Our data comply with a recent study that found significantly higher CYP1B1 mRNA levels in adjacent non-tumor tissue than in tumors (20). In our study, more than 3-fold overexpression of CYP1B1 (3.3-, 7.2-, and 22.9-fold) was detected in tumors of three patients. These patients could potentially benefit from P450 1B1-based therapeutic interventions. In fact, P450 1B1-directed immunotherapeutics, P450 1B1-activated prodrugs and P450 1B1 inhibitors are currently being developed to exploit the presence and activity of this enzyme in tumor cells (34). In a Phase I clinical trial, all patients where anti-P450 1B1 increased had significantly improved response to their next therapy possibly associated with clinical benefit (35).

This study is the first to compare the expression of *CYPs* in mammary glands with that in lymphocytes from the same patients as potential surrogate marker. Expressions of *CYP2C9* and *CYP3A4* in lymphocytes from a subset of 18 examined patients were negligible. Previously detected *CYP1B1* and *CYP2E1* expression in human lymphocytes was confirmed (5, 23). We observed on average almost a 5-fold higher *CYP2E1* expression in lymphocytes than in mammary gland tissue. Due to lack of correlation, *CYP2E1* expression in lymphocytes cannot be used as surrogate marker. On the contrary, correlation of *CYP1B1* expression in non-tumor samples with that in lymphocytes found by our study suggests that lymphocytes may serve as marker of the *CYP1B1* level in the human mammary gland. The correlation of *CYP1B1* expression in lymphocytes with that in tumors was weaker. However, our study was performed on quite a small number of lymphocyte samples and thus a confirmation study on a larger number of paired samples is necessary.

Expression levels of *CYP1B1* and *CYP2E1* were compared with clinical and histological characteristics of patients in order to identify possible associations between expression levels and prognostic markers of breast cancer. *CYP1B1* expression did not correlate with any of characteristics inspected. *CYP2E1* expression seemed to co-segregate with locally advanced disease, because in tumors of patients with clinical stage I it was higher than that in patients with stages II, III and IV. The fact that *CYP2E1* expression was down-regulated in hepatocellular carcinomas and its decreased expression was associated with poor prognosis suggests that the relevance of this finding may be more general (36). Interestingly, *CYP2E1* expression was higher in the non-tumor tissue of our progesterone receptor-negative patients. Higher P450 1B1 levels were observed in estrogen receptor-negative tumors than in positive ones ($p=0.006$; 6). Significantly higher *CYP2E1* expression observed in our study in the invasive lobular types of tumors in comparison with invasive ductal ones suggests that *CYP2E1* expression may be an indicator of different types of breast carcinogenesis. Higher *CYP2E1* expression may be caused by unknown events leading to deregulation of receptors or other *trans*-acting factors interacting with *CYP2E1* expression in lobular carcinomas. Association of *CYP2E1* expression with breast cancer type has not been reported to date. Recently, no significant differences between 274 ductal and 73 lobular cases in P450 1A1/2, 1B1, 2E1 and 3A4/5 protein levels were found by immunohistochemistry (6). There is a lack of information on any correlation between CYP mRNA and P450 protein expression levels in the literature. Thus, in our opinion, mRNA and protein levels should be considered as independent markers of prognosis until mechanistic studies clarify these discrepancies. Indeed it seems that gene expression profiling will soon become a highly valuable tool in the molecular pathology of breast cancer (37).

In conclusion, *CYP2C9* and *CYP3A4* expression was negligible in most of the examined samples. *CYP2E1* was expressed at a significant level in mammary tumors and non-tumor adjacent tissues and associated with some of the clinical and pathological data on patients. The observed high *CYP1B1* expression in tumor cells may evoke changes in their response to drugs which are substrates of P450 1B1 as well as perhaps influencing estrogen metabolism or activation of environmental carcinogens. The potential implications of *CYP1B1* expression in prodrug activation and vaccination strategies to combat tumor cells are envisaged. Detailed association studies of *CYP1B1* and *CYP2E1* expression with response to various chemotherapy regimens in the long-term perspective are currently being carried out in our laboratory.

Acknowledgements

Work for this project was supported by a grant of the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health, grants no.: IA-8248-3 and NR 9426, and grant COST OC B20.001 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

References

- 1 Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C and Thun MJ: Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 56: 106-130, 2006.
- 2 Rendic S: Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev* 34: 83-448, 2002.
- 3 Guengerich FP, CHun YJ, Kim D, Gillam EM and Shimada T: Cytochrome P450 1B1: a target for inhibition in anticarcinogenesis strategies. *Mutat Res* 523-524: 173-182, 2003.
- 4 Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H, Amin S, Hecht SS, Guengerich FP and Sutter TR: Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res* 56: 2979-2984, 1996.
- 5 Hakkola J, Pasanen M, Pelkonen O, Hukkanen J, Evisalmi S, Anttila S, Rane A, Mantyla M, Purkunen R, Saarikoski S, Tooming M and Raunio H: Expression of *CYP1B1* in human adult and fetal tissues and differential inducibility of *CYP1B1* and *CYP1A1* by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cells. *Carcinogenesis* 18: 391-397, 1997.
- 6 Haas S, Pierl C, Harth V, Pesch B, Rabstein S, Bruning T, Ko Y, Hamann U, Justenhoven C, Brauch H and Fischer HP: Expression of xenobiotic and steroid hormone metabolizing enzymes in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 119: 1785-1791, 2006.
- 7 Murray GI, Taylor MC, McFadyen MCE, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD and Melvin WT: Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res* 57: 3026-3031, 1997.
- 8 McFadyen MC, Melvin WT and Murray GI: Cytochrome P450 enzymes: novel options for cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* 3: 363-371, 2004.
- 9 Mathijssen RH and Van Schaik RH: Genotyping and phenotyping cytochrome P450: perspectives for cancer treatment. *Eur J Cancer* 42: 141-148, 2006.

- 10 Sissung TM, Price DK, Spareboom A and Figg WD: Pharmacogenetics and regulation of human cytochrome P450 1B1, implications in hormone-mediated tumour metabolism and a novel target for therapeutic intervention. *Mol Cancer Res* 4: 135-150, 2006.
- 11 Crewe HK, Notley LM, Wunsch RM, Lennard MS and Gillam EM: Metabolism of tamoxifen by recombinant human cytochrome P450 enzymes: formation of the 4-hydroxy, 4'-hydroxy and N-desmethyl metabolites and isomerization of *trans*-4-hydroxytamoxifen. *Drug Metab Dispos* 30: 869-874, 2002.
- 12 Enayetallah AE, French RA, Thibodeau MS and Grant F: Distribution of soluble epoxide hydrolase and of cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 in human tissues. *J Histochem Cytochem* 52: 447-454, 2004.
- 13 Kirchheiner J and Brockmoller J: Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 77: 1-16, 2005.
- 14 Knupfer H, Schmidt R, Stanitz D, Brauckhoff M, Schonfelder M and Preiss R: CYP2C and IL-6 expression in breast cancer. *Breast* 13: 28-34, 2004.
- 15 Lieber CS: Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role. *Physiol Rev* 77: 517-544, 1997.
- 16 Upadhyaya SC, Tirumalai PS, Boyd MR, Mori T and Ravindranath V: Cytochrome P4502E (CYP2E) in brain: Constitutive expression, induction by ethanol and localization by fluorescence in situ hybridization. *Arch Biochem Biophys* 373: 23-34, 2000.
- 17 Johnsrud EK, Koukouritaki SB, Divakaran K, Brunengraber LL, Hines RN and McCarver DG: Human hepatic CYP2E expression during development. *J Pharmacol Exp Ther* 307: 402-407, 2003.
- 18 Guengerich FP, Kim DH and Iwasaki M: Role of human cytochrome P450 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem Res Toxicol* 4: 168-179, 1991.
- 19 Anzenbacher P and Anzenbacherova E: Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* 58: 737-747, 2001.
- 20 Modugno F, Knoll C, Kanbour-Shakir A and Romkes M: A potential role for the estrogen-metabolizing cytochrome P450 enzymes in human breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 82: 191-197, 2003.
- 21 Keshava C, McCanlies EC and Weston A: CYP3A4 polymorphisms-potential risk factors for breast and prostate cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 160: 825-841, 2004.
- 22 Kawashiro T, Yamashita K, Zhao XJ, Koyama E, Tani M, Chiba K and Ishizaki T: A study on the metabolism of etoposide and possible interactions with antitumour or supporting agents by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 1294-1300, 1998.
- 23 Haufroid V, Toubreau F, Clippe A, Buyschaert M, Gala JL and Lison D: Real-time quantification of cytochrome P4502E1 mRNA in human peripheral blood lymphocytes by reverse transcription-PCR, Method and practical application. *Clin Chem* 47: 1126-1129, 2001.
- 24 Soucek P, Anzenbacher P, Skoumalova I and Dvorak M: Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells* 23: 1417-1422, 2005.
- 25 Huang Z, Fasco MJ, Figge HL, Keyomarsi K and Kaminsky LS: Expression of cytochromes P450 in human breast tissue and tumours. *Drug Metab Dispos* 24: 899-905, 1996.
- 26 Iscan M, Klaavuniemi T, Coban T, Kapucuoglu N, Pelkonen O and Raunio H: The expression of cytochrome P450 enzymes in human breast tumours and normal breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 70: 47-54, 2001.
- 27 Hellmold H, Rylander T, Magnusson M, Reihner E, Warner M and Gustafsson JA: Characterization of cytochrome P450 enzymes in human breast tissue from reduction mammoplasties. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 886-895, 1998.
- 28 Kapucuoglu N, Coban T, Raunio H, Pelkonen O, Edwards RJ, Boobis AR and Iscan M: Immunohistochemical demonstration of the expression of CYP2E1 in human breast tumour and non-tumour tissues. *Cancer Lett* 196: 153-159, 2003.
- 29 El-Rayes BF, Ali S, Heilbrun LK, Lababidi S, Bouwman D, Visscher D and Philip PA: Cytochrome P450 and glutathione transferase expression in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 9: 1705-1709, 2003.
- 30 Miyoshi Y, Ando A, Takamura Y, Taguchi T, Tamaki Y and Noguchi S: Prediction of response to docetaxel by CYP3A4 mRNA expression in breast cancer tissues. *Int J Cancer* 97: 129-132, 2002.
- 31 Kapucuoglu N, Coban T, Raunio H, Pelkonen O, Edwards RJ, Boobis AR and Iscan M: Expression of CYP3A4 in human breast tumour and non-tumour tissues. *Cancer Lett* 202: 17-23, 2003.
- 32 Miyoshi Y, Taguchi T, Kim SJ, Tamaki Y and Noguchi S: Prediction of response to docetaxel by immunohistochemical analysis of CYP3A4 expression in human breast cancers. *Breast Cancer* 12: 11-15, 2005.
- 33 Gonzalez FJ: Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress, studies with CYP2E1. *Mutat Res* 569: 101-110, 2005.
- 34 McFadyen MC and Murray GI: Cytochrome P450 1B1: a novel anticancer therapeutic target. *Future Oncol* 1: 259-263, 2005.
- 35 Gribben JG, Ryan DP, Boyajian R, Urban RG, Hedley ML, Beach K, Nealon P, Matulonis U, Campos S, Gilligan TD, Richardson PG, Marshall B, Neuberg D and Nadler LM: Unexpected association between induction of immunity to the universal tumour antigen CYP1B1 and response to next therapy. *Clin Cancer Res* 11: 4430-4436, 2005.
- 36 Ho JC, Cheung ST, Leung KL, Ng IO and Fan ST: Decreased expression of cytochrome P450 2E1 is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 111: 494-500, 2004.
- 37 Lonning PE, Sorlie T and Borresen-Dale AL: Genomics in breast cancer-therapeutic implications. *Nat Clin Pract Oncol* 2: 26-33, 2005.

Received May 29, 2007
Revised September 11, 2007
Accepted October 10, 2007

Příloha č. 5

Hubáčková M, Václavíková R, Kubala E, Kodet R, Mrhalová M, Novotný J, Vrána D, Gut I, Souček P. Úloha exprese genů chinonoxidoreduktázy 1 a 2 v rozvoji karcinomu prsu. *Klin Onkol.* 2007;20(5):335-39. (bez IF)

ÚLOHA EXPRESE GENŮ CHINONOXIDOREDUKTÁZY 1 A 2 V ROZVOJI KARCINOMU PRSU

ROLE OF GENE EXPRESSION OF QUINONE OXIDOREDUCTASE 1 AND 2 IN PROGRESSION OF BREAST CANCER

HUBÁČKOVÁ M.^{1,2}, VÁCLAVÍKOVÁ R.¹, KUBALA E.³, KODET R.⁴, MRHALOVÁ M.⁴, NOVOTNÝ J.⁵,
VRÁNA D.⁶, GUT I.¹ A SOUČEK P.¹

¹ STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, PRAHA

² 3.LF UK, PRAHA

³ RADIOTERAPEUTICKO-ONKOLOGICKÉ ODDĚLENÍ, FN MOTOL, PRAHA

⁴ ÚSTAV PATOLOGIE A MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNY 2.LF UK A FN MOTOL, PRAHA

⁵ ONKOLOGICKÁ KLINIKA VFN A 1.LF UK, PRAHA

⁶ KRAJSKÁ NEMOCNICE T.BATI A.S., ZLÍN A 1.LF UK, PRAHA

Souhrn

Východisko: Karcinom prsu je velmi závažné onemocnění, při kterém je včasná diagnóza nemoci kritickým předpokladem úspěšné léčby. V současné době vrcholí snaha hledat spolehlivé prognostické faktory, které by umožnily co nejlépe odhadnout vývoj nemoci. Vhodnými prognostickými markery se jeví také skupina biotransformačních enzymů chinonoxidoreduktáz (NQO1 a NQO2), u kterých již bylo prokázáno spojení s rizikem vzniku karcinomu prsu. **Metody a výsledky:** Pomocí metody real-time PCR byla detekována exprese NQO1 a NQO2 ve všech sledovaných vzorcích pacientek s karcinomem prsu (42 párových vzorků nádorové tkáně, okolní tkáně bez histologicky prokázané infiltrace nádorovými buňkami a 19 vzorků lymfocytů periferní krve). Expres u obou genů vykazovala velkou individuální variabilitu a byla rovněž charakterizována deregulací v nádorové tkáni. Statisticky byly zhodnoceny vztahy mezi expresí obou genů a klinickými a histopatologickými charakteristikami onemocnění. Významně vyšší exprese NQO1 byla nalezena v nenádorové tkáni pacientek po menopauze ($P = 0,036$), u pacientek s pN0 (tj. bez metastatického postižení axilárních lymfatických uzlin, $P = 0,044$) a u pacientek s prokázanou expresí receptorů pro estrogen ($P = 0,020$) a progesteron ($P = 0,040$). Celkově vysoká exprese NQO1 v nenádorové tkáni korelovala s příznivými prognostickými faktory. Tento trend bude ještě třeba ověřit analýzou přežívání v delším časovém horizontu. Pacientky s invazivním ductálním karcinomem mléčné žlázy měly významně nižší expresi NQO2 v nádorové tkáni ve srovnání s lobulárním typem nádoru mléčné žlázy ($P = 0,011$). **Závěr:** Expres NQO1 i NQO2 koreluje s významnými prognostickými faktory u nemocných s karcinomy prsu a jejich studiu je třeba se dále věnovat na větším souboru.

Klíčová slova: karcinom prsu, NQO1, NQO2, exprese, real-time PCR.

Summary

Background: Breast cancer is a highly serious disease in which early diagnosis presents a critical step to successful therapy. At present time, identification of reliable prognostic markers that enable more precise estimation of disease progression is a major scientific target. The group of biotransformation enzymes quinone oxidoreductases (NQO1 and NQO2) seems to be among such targets, as their association with breast cancer risk has been already published. **Methods and Results:** Expression of NQO1 and NQO2 was detected by real-time PCR in 42 paired tumor and surrounding (without morphologically verified presence of tumor cells) tissue samples and in 19 samples of lymphocytes of breast cancer patients. Large inter-individual variability in expression of both genes was found along with deregulation in tumor tissue. Statistical comparisons of expression levels of both genes with clinical and histopathology findings were performed. Postmenopausal patients had significantly higher NQO1 expression in their non-tumor samples when compared to premenopausal ones ($P = 0,036$). Higher NQO1 expression in non-tumor samples was found in patients without axillary lymph node metastasis ($P = 0,044$) and in patients with immunohistochemically detected expression of the estrogen receptor ($P = 0,020$) and progesterone receptor ($P = 0,040$). Generally, high NQO1 expression in non-tumor tissue correlated with factors of good prognosis. This trend should be further verified by survival analysis from a long-term perspective. Lower NQO2 expression was observed in tumor tissues of patients with invasive duct carcinomas of the mammary gland ($P = 0,011$). **Conclusion:** Expressions of NQO1 and NQO2 correlate with well-established prognostic factors in breast carcinoma patients and should be studied further on larger number of patients.

Key words: Breast cancer, quinone reductase 1, quinone reductase 2, gene expression, PCR.

Úvod

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem žen a patří mezi tzv. hormonálně regulované nádory, ovlivněné expresí zejména estrogenů (1). Estrogeny i xenoestrogeny přítomné v zevním prostředí navíc indukují zvýšenou expresi některých růstových faktorů jež ovlivňují proliferativní aktivitu buněk (1). Tyto procesy se uplatňují u většiny tzv. sporadických forem karcinomu prsu, tj. u 75 – 85 % nemocných. U 10 – 15 % vzniká karcinom prsu na základě dědičných genetických změn (tzv. hereditární formy karcinomu prsu), které jsou podmíněny především mutacemi genů BRCA1 nebo BRCA2. Kromě těchto majoritních predispozičních genů (angl. high penetrance) je nyní studována úloha i tzv. genů s nízkou penetrancí (angl. low penetrance), mezi které patří i biotransformační geny.

Chinonoxidoreduktázy jsou flavoproteiny účastníci se druhé fáze biotransformace. V lidském genomu se vyskytují dva geny kódující enzymy NAD(P)H:chinonoxidoreduktázu 1 (NQO1, chromosom 16q22.1, číslo OMIM 125860) a NRH:chinonoxidoreduktázu 2 (NQO2, chromosom 6p25, číslo OMIM 160998). Tyto enzymy katalyzují dvouelektronové redukce chinonů a chinoidních sloučenin na relativně stabilní hydrochinony. Ty mohou být dále konjugovány a vylučovány. Navíc látky s chinoidními strukturami patří mezi nejpoužívanější cytostatika (antracykliny).

NQO1 je cytosolický enzym využívající jako donor elektronů kofaktory NADH nebo NAD(P)H. NQO1 se vyskytuje jako homodimer, v každém aktivním centru má jednu prosthetickou skupinu FAD (flavin adenin dinukleotid) (2). NQO1 hraje důležitou roli v ochraně buněk proti toxicitě chinonů tím, že snižuje jejich mutagenitu a karcinogenitu. Vysoká hladina NQO1 byla popsána u řady nádorů a byly nalezeny i rozdíly v hladinách exprese mezi nádorovou i nenádorovou tkání (3). V naší předchozí studii jsme zjistili, že polymorfismus NQO1, způsobující téměř absolutní redukcí enzymové aktivity, je rizikovým faktorem vzniku karcinomu prsu (4). Tyto výsledky jsme potvrdili nezávislou studií rakouské populace nemocných s karcinomy mléčné žlázy (5).

Enzym NQO2 se podobně jako NQO1 vyskytuje v cytosolu a jako kofaktor využívá ribosid dihydronikotinamid (NRH) spíše než NAD(P)H. NQO2 katalyzuje nejen dvouelektronovou redukci chinonů, ale také čtyřelektronovou redukci, při které jako elektronový akceptor *in vitro* využívá methyl červeně (methyl red). U NQO2 bylo nalezeno specifické místo pro vazbu kovů (angl. metal binding site), které u NQO1 není přítomno (6). Enzym NQO2, stejně jako NQO1, chrání buňky proti některým chemickým karcinogenům (7). NQO2 metabolicky aktivuje protinádorové léky, např. CB1954, čímž zvyšuje jejich cytotoxicitu a stimuluje buněčnou smrt (8). V nedávné době bylo také prokázáno, že exprese lidského NQO2 je indukována antioxidanty (9).

Tato pilotní studie se zaměřila především na kvantitativní stanovení exprese NQO1 a NQO2 v souboru pacientek s karcinomem prsu. Poprvé bylo provedeno, metodou absolutní kvantifikace, zřetelné rozdíly v expresi jednotlivých genů mezi prsní nádorovou a nenádorovou tkání. Jako možný marker hladin expresí NQO1 a NQO2 jsme sledovali expresi těchto genů u lymfocytů periferní krve. Hlavním cílem bylo prozkoumání významu exprese NQO1 a NQO2 pro prognózu vývoje onemocnění u pacientek s karcino-

mem prsu, jež bylo provedeno korelací hladin expresí s klinickými nálezy a histopatologickými charakteristikami karcinomů.

Pacientky a metody

Do studie bylo zahrnuto 42 nemocných s histologicky potvrzenou diagnózou karcinomu prsu z období let 1998 – 2005. Sledované klinické a histopatologické charakteristiky pacientek jsou uvedeny v **tabulce č. 1**. Všechny pacientky podepsaly formulář informovaného souhlasu ve shodě s Helsinskou deklarací a studie byla schválena etickou komisí Státního zdravotního ústavu v Praze. U 19 sledovaných nemocných byla v průběhu operace odebrána periferní krev a ihned použita k separaci lymfocytů a izolaci RNA s využitím TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Tabulka 1: Klinické a histopatologické charakteristiky sledovaných pacientek.

Charakteristika	N §
Průměrný věk v době diagnózy (66,6 ± 12,4)	42 (100)
Menopauzální stav	
premenopauzální	6 (14,3)
postmenopauzální	36 (85,7)
Histologický typ nádoru	
invasivní duktální karcinom	32 (76,2)
invasivní lobulární karcinom	7 (16,7)
jiný typ †	2 (4,8)
neurčeno	1 (2,3)
Průměrná velikost nádoru (23,8 ± 10,3 mm)	
≤ 20 mm	21 (50,0)
21 – 49 mm	19 (45,2)
≥ 50 mm	2 (4,8)
Histologický grade	
1	7 (16,7)
2	19 (45,2)
3	9 (21,4)
neurčeno	7 (16,7)
Klinické stadium	
I	12 (28,6)
II	20 (47,6)
III	5 (11,9)
IV	1 (2,4)
neurčeno	4 (9,5)
Receptor pro estrogen	
pozitivní	27 (64,3)
negativní	15 (35,7)
Receptor pro progesteron	
pozitivní	19 (45,2)
negativní	23 (54,8)
Postižení uzlin*	
pozitivní	15 (35,7)
negativní	23 (54,8)
neurčeno	4 (9,5)

§ N = počet pacientek (procentuelní zastoupení je uvedené v závorce)

† mucinozní a malobuněčný karcinom

* kritérium „pozitivita“ – alespoň jedna uzlina s metastatickým postižením

V průběhu operačního výkonu byl nemocným odebrán vzorek tkáně z makroskopicky suspektního ložiska nádoru (pro účely peroperační biopsie) a k nádoru přiléhající okolní tkáň. Vzorky tkání byly histologicky zpracovány a vyšetřeny podle standardních diagnostických procedur. Expres receptořů pro estrogen a pro progesteron byla stanovena imunohistochemicky na histologickém řezu z formolem fixované a do parafinu zalité tkáň. Tkáň s histologicky prokázaným karcinomem byly zařazeny jako reprezenta-

Tabulka 2: Porovnání exprese *NQO1* a *NQO2* v nádoru, nenádorové tkáni a lymfocytech periferní krve pacientek s karcinomem prsu. (A) Hladina exprese pro *NQO1* a (B) hladina exprese pro *NQO2*.

A)							
Expresie <i>NQO1</i> (vyjádřena jako poměr počtu kopií na μg RNA <i>NQO1/PP1A</i>)							
Typ vzorku	N §	Minimum	Maximum	Průměr	S.E.	Medián	Variabilita
nádor	42	0,0248	3,0821	0,5266	0,0961	0,2804	122-krát
nenádorová tkáň*	42	0,0143	3,7983	0,7815	0,1474	0,3618	265-krát
lymfocyty	19	0,0015	0,2335	0,0409	0,0153	0,0112	156-krát
B)							
Expresie <i>NQO2</i> (vyjádřena jako poměr počtu kopií na μg RNA <i>NQO2/PP1A</i>)							
Typ vzorku	N §	Minimum	Maximum	Průměr	S.E.	Medián	Variabilita
nádor	42	0,0023	1,8085	0,1681	0,0530	0,0735	786-krát
nenádorová tkáň*	42	0,0059	1,1459	0,2097	0,0433	0,0910	194-krát
lymfocyty	19	0,0112	0,2278	0,0838	0,0148	0,0731	20-krát

§ počet sledovaných vzorků

* tkáň z okolí nádoru bez morfologicky prokázanych známek přítomnosti nádorových buněk

tivní pro izolace nukleových kyselin. Ve vzorcích okolní nenádorové tkáně použitých pro izolace nukleových kyselin nebyla morfologicky prokázána přítomnost nádorových buněk. 5 μm tenké kryostatové řezy nádorových a nenádorových tkání byly uchovávány v tekutém dusíku a následně použity pro izolaci celkové RNA s využitím TRIzol reagent. Kvalita výsledného preparátu celkové RNA bylo ověřeno agarózovou elektroforézou a koncentrace určena spektrofotometricky pomocí přístroje Cary 300 (Varian, Palo Alto, CA). Pro syntézu cDNA bylo použito 0,5 μg celkové RNA a kit na syntézu cDNA (MBI Fermentas, Vilnius, Litva). Případná kontaminace genomovou DNA byla posouzena PCR amplifikační fragmentu kontrolního genu ubichitinu C za vzniku produktu z cDNA (190 bp) a z genomové DNA (1009 bp) popsanou metodou (10).

Vyšetření exprese metodou real-time PCR bylo provedeno na systému RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia) za použití TaqMan Gene Expression Assays pro sledované geny (Applied Biosystems, Foster City, CA). Současně se vzorky byly v průběhu real-time PCR měřeny i standardy obsahující cílovou sekvenci genů *NQO1* nebo *NQO2* naklonovanou do plasmidu *pDONR201* pomocí GATEWAY Cloning Kit podle instrukcí výrobce (Invitrogen, Carlsbad, CA). Jako kontrolní gen byl využit cyklofilin A (*PP1A*, chromosom 7p13, číslo OMIM 123840), který byl stanoven za stejných podmínek PCR amplifikace jako *NQO* geny.

Vyhodnocení real-time PCR reakcí bylo prováděno softwarem Rotor-Gene 6000 série verze 1.7. Expresie *NQO1* a *NQO2* byla analyzována metodou absolutní kvantifikace s využitím externí křivky příslušných standardů plasmidů o koncentracích: 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 a 10^6 kopií/vzorek. Počet kopií *NQO1* a *NQO2* v každém vzorku byl vztažen na μg celkové RNA. Podobně byl vyhodnocen i počet kopií kontrolního genu *PP1A*. Nakonec byla provedena normalizace počtu kopií *NQO1* nebo *NQO2* na počet kopií *PP1A*. Hladiny exprese *NQO1* a *NQO2* byly korelovány s klinickým průběhem onemocnění a s histopatologickými nálezy pomocí neparametrického Mann-Whitney U testu. Za statisticky významnou byla považována hodnota $P < 0,05$. Sta-

tistická analýza byla provedena programem Statistica 7 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA).

Výsledky

U všech sledovaných vzorků byla hladina exprese *NQO1* a *NQO2* spolehlivě detekovatelná. V nádorové i nenádorové tkáni byly nalezeny vyšší průměrné hladiny *NQO1* než *NQO2*. Expresie obou genů se vyznačovala velkou individuální variabilitou mezi jednotlivými pacientkami. Při porovnání rozdílů exprese obou sledovaných genů byly nalezeny významně vyšší průměrné exprese v nenádorové tkáni oproti nádorové tkáni (viz. **tabulka č.2**). Při hodnocení hladin ve vzorcích jednotlivých pacientek byly nalezeny vyšší hodnoty exprese *NQO1* a *NQO2* v nenádorové oproti nádorové tkáni u 20 (47,6%) resp. 26 (61,9%) z celkového počtu 42 vzorků. Na druhé straně však u některých pacientek byly nalezeny více než 3x vyšší hladiny exprese *NQO1* (u 12 pacientek ze 42, tj. 28,6%) i *NQO2* (u 6 pacientek ze 42, tj. 14,3%) v nádorové oproti nenádorové tkáni.

Klinické a patologické charakteristiky souboru pacientek jsou shrnuty v **tabulce č.1**. Věkový průměr sledovaného souboru pacientek s karcinomem prsu byl 67 let a 85,7% pacientek se nacházelo v období po menopauze. Lokálně rozvinuté nádory (klinické stádium I, IIA či IIB) mělo 76,2% pacientek. Z histologického hlediska se jednalo především o invazivní ductální karcinomy prsu (76,2%) s průměrnou velikostí všech typů nádorů $23,8 \pm 10,3$ mm. Expresie receptorů pro estrogen byla nalezena u 64,3 % a exprese receptorů pro progesteron u 45,2% pacientek.

Při hodnocení vztahů hladin *NQO1* a *NQO2* ke sledovaným klinickým a histopatologickým faktorům byla nalezena řada významných korelací, které jsou shrnuty v **tabulce č.3**. Pacientky po menopauze měly významně vyšší hladinu exprese *NQO1* v nádorové tkáni ve srovnání s pacientkami před menopauzou ($P = 0,033$; viz. **tabulka č.3A**). Obdobně tomu bylo v jejich nenádorové tkáni ($P = 0,036$, viz. **tabulka č.3B**). Vyšší exprese *NQO1* v nenádorové tkáni jsme zjistili u nemocných bez metastatického postižení lymfatických uzlin, tj. pN0 (negativní node status, $P = 0,044$) a s pozitivitou jak receptorů pro estrogen ($P = 0,020$) tak

Tabulka 3: Významné vztahy mezi expresí genů *NQO1* a *NQO2* v nádorové a nenádorové tkáni a klinickými a histopatologickými charakteristikami karcinomů vyšetřených nemocných

A. <i>NQO1</i> nádorová tkáň	N §	Průměr ± S.E.	P (2-sided)
Postmenopauzální stav	36	0,59 ± 0,11	
Premenopauzální stav	6	0,16 ± 0,09	0,033
B. <i>NQO1</i> nenádorová tkáň	N	Průměr ± S.E.	P (2-sided)
Postmenopauzální stav	36	0,88 ± 0,17	
Premenopauzální stav	6	0,21 ± 0,01	0,036
Uzliny bez metastáz (N0)	23	1,14 ± 0,24	
Uzliny s metastázami (N1-N3)	15	0,38 ± 0,11	0,044
Pozitivní ER *	27	0,91 ± 0,18	
Negativní ER	15	0,56 ± 0,25	0,020
Pozitivní PR *	19	1,07 ± 0,25	
Negativní PR	23	0,55 ± 0,17	0,040
C. <i>NQO2</i> nádorová tkáň	N	Průměr ± S.E.	P (2-sided)
Invazivní duktální karcinom	32	0,46 ± 0,08	
Invazivní lobulární karcinom	7	0,55 ± 0,22	0,011
D. <i>NQO2</i> nenádorová tkáň	N	Průměr ± S.E.	P (2-sided)
Klinické stádium T1	18	0,15 ± 0,06	
Klinické stádium T2-T4	20	0,30 ± 0,07	0,048

§ počet sledovaných vzorků

* ER – receptor pro estrogen, PR – receptor pro progesteron

pro progesteron ($P = 0,040$). Pacientky s invazivním duktálním karcinomem měly významně nižší expresi *NQO2* v nádorové tkáni než pacientky s lobulárním typem nádoru ($P = 0,011$, viz. **tabulka č.3C**). Expres *NQO2* v nenádorové tkáni byla ve vztahu k velikosti nádoru na hranici významnosti. Pacientky s vyšší expresí *NQO2* měly častěji nádory větší než 20 mm ($P = 0,048$, viz. **tabulka č.3D**). Další významné vztahy hladin exprese studovaných genů ke klinickým a histopatologickým faktorům nebyly nalezeny. Expres *NQO1* ani *NQO2* v lymfocytech nekorelovala s příslušnou expresí těchto genů v nádorové či nenádorové tkáni.

Diskuze

V našich předchozích studiích, které se zaměřily na sledování polymorfismu *NQO1*, se nám podařilo prokázat vztah genotypu *NQO1* k riziku vzniku karcinomu prsu u české populace (4) a v mezinárodní studii jej potvrdit na rakouské populaci (5). Proto jsme se v této pilotní studii snažili tento rizikový potenciál hlouběji prozkoumat a případně nalézt další možné informace o úloze *NQO1* a příbuzného *NQO2* na úrovni genové exprese. Tato pilotní studie za použití metody real-time PCR jednoznačně prokázala expresi genů *NQO1* a *NQO2* v nádorech, v okolní přiléhající nenádorové tkáni i v periferních lymfocytech pacientek s karcinomem prsu. Vysoká expres *NQO1* již byla nalezena v řadě lidských nádorových i nenádorových tkání (karcinom prsu, plic, tračnicku, jater atd.) (11,12,13,14,15). Pomocí Northern blotu byla hladina genové exprese *NQO2* zjištěna v srdci, mozku, plicích, játrech, ledvinách a v kosterních svalech (16). Imunohistochemickými studiemi bylo zjištěno, že *NQO1* v lidských tkání je hlavně lokalizován v endoteliálních a epiteliálních tkání v mnoha různých orgánech včetně

očí (17). Naše studie je unikátní v tom, že nabízí významně přesnější stanovení genové exprese metodou absolutní kvantifikace pomocí real-time PCR jež dosud nebylo publikováno.

V průměru byly nalezeny vyšší exprese genů *NQO1* a *NQO2* v nenádorové oproti nádorové tkáni, tzn. v nádorové tkáni během rozvoje onemocnění došlo ke snížení exprese sledovaných genů (downregulace). U některých pacientek však byly nalezeny více než 3x vyšší hladiny exprese *NQO1* i *NQO2* v nádorové oproti nenádorové tkáni (upregulace). Tento fakt naznačuje možné využití kvantitativního stanovení exprese *NQO1* a *NQO2* v budoucnu při individualizované chemoterapii cytostatiky založenými na aktivaci enzymy kódovanými *NQO1* nebo *NQO2*. V odborné literatuře již na toto téma probíhá diskuze (7,18,19).

Ve snaze zjistit zda by bylo možné, pro odhad hladin exprese ve sledované tkáni, použít lymfocyty periferní krve byly u 19 pacientek korelovány hladiny exprese *NQO1* a *NQO2* v lymfocytech s hladinami ve zkoumaných tkáních. Expres *NQO1* ani *NQO2* v periferních lymfocytech však s expresí v nádorové či nenádorové tkáni významně nekorelovala. Pravděpodobně tedy nebude možné použít pro vyšetření exprese *NQO1* a *NQO2* lymfocyty (což by umožňovalo nejen primární stanovení hladin exprese těchto genů, které je vhodnější přímo z nádorové tkáně, ale hlavně by umožnilo průběžné sledování dynamiky exprese v průběhu léčby a po jejím ukončení).

Pro posouzení významu exprese *NQO1* a *NQO2* pro prognózu vývoje karcinomu prsu jsme porovnali výsledky sledování exprese *NQO1* a *NQO2* s klinickými a histopatologickými charakteristikami nádorů jednotlivých nemocných. Studie zabývající se podobnou tematikou nebyly dosud publikovány. Naše studie našla některé velmi zajímavé vztahy. Významně vyšší expres *NQO1* zjištěné v tkáních pacientek s primární diagnózou onemocnění po menopauze naznačuje možné ovlivnění kolísáním hormonálních hladin u premenopauzálních žen. Tento předpoklad vychází z toho, že k regulaci exprese *NQO1* může docházet nejen pomocí Ah receptoru či fenolických antioxidantů a metabolitů polycyklických aromátů, ale i pomocí antiestrogenů a estrogenových receptorů (20). Nález významně nižší exprese *NQO2* v nádorové tkáni pacientek s invazivním duktálním karcinomem oproti pacientkám s invazivním lobulárním karcinomem by bylo vhodné korelovat na úrovni proteinu s imunohistochemicky zjištěnou expresí *NQO1* a *NQO2* proteinů u jednotlivých typů karcinomů. V případě potvrzení vztahu exprese na úrovni mRNA a proteinů a ověření významu tohoto stanovení na větším souboru nemocných by bylo možné gen *NQO2* začlenit do panelu markerů molekulárně-patologického profilu karcinomů prsu. K nejzajímavějším vztahům patří nález významně zvýšené exprese *NQO1* u pacientek s lepší prognózou onemocnění (postmenopauzální stav, pN0, ER+ a PR+). Tento výsledek by mohl mít význam pro zpřesnění zařazení jednotlivých nemocných do léčebných skupin. Pro ověření a lepší využití poznatků je třeba rozšířit studii na větší skupinu pacientek, porovnat vývoj onemocnění u jednotlivých pacientek s odstupem času po léčbě (korelace s přežitím, kompletní remisí, recidivami atd.) a rovněž prozkoumat vztah mezi genovou expresí a hladinami proteinu sledovaného například imunohistochemicky. Další zajímavé infor-

mace ohledně prognostického a prediktivního významu expresí obou genů může přinést analýza přežívání ve vztahu k typu použité chemoterapie, kterou plánujeme v dlouhodobější perspektivě.

Závěr

Pilotní studie sledující expresi genů 2.fáze biotransformace *NQO1* a *NQO2* prokázala na souboru pacientek s karcinomem prsu významné exprese jak v nádorové tak i v nenádorové tkáni a v lymfocytech periferní krve. Na základě dosažených výsledků je možno usuzovat, že vysoká exprese *NQO1* v nenádorové tkáni by mohla charakterizovat pacientky s lepší prognózou vývoje nemoci.

Naproti tomu nízká exprese *NQO2* by mohla naznačovat větší pravděpodobnost vývoje agresivnějšího průběhu onemocnění. Celkově se tedy exprese *NQO1* i *NQO2* jeví jako potenciální prognostický faktor vývoje karcinomu prsu. Pro možné využití výsledků v klinické praxi navrhujeme ověřit získané informace sledováním hladin *NQO1* a *NQO2* i příslušných proteinových produktů u většího souboru pacientek a s časovým odstupem od diagnózy onemocnění.

Poděkování: Projekt byl podpořen grantem IGA 9426-3, Grantem Univerzity Karlovy GAUK č. 94507 a výzkumným programem na podporu mladých vědců SZÚ Praha.

Literatura

- Klener P, Abrahámová J: Nádory prsu. In: Klener, P.: Klinická onkologie, Praha, Galén; 2002. s.495.
- Hosoda S, Nakamura W, Hayashi K: Properties and reaction mechanism of DT-diaphorase from rat liver. *J Biol Chem* 1974;249: 6416-23.
- Ross D: NAD(P)H:quinone oxidoreductases. In: Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine, New York, John Wiley&Sons, Inc.; 2002.
- Šarmanova J, Šušová S, Gut I et al: Breast cancer: Role of polymorphisms in biotransformation enzymes. *Eur J Hum Genet* 2004;12:848-854.
- Menzel HJ, Sarmanova J, Soucek P et al: Association of *NQO1* polymorphism with spontaneous breast cancer in two independent populations. *Br J Cancer* 2004;90:1989-1994.
- Foster CE, Bianchetti MA, Talalay P et al: Crystal structure of human quinone reductase type 2, a metalloflavoprotein. *Biochemistry* 1999;38:9881-9886.
- Iskander K, Paquet M, Brayton C, Jaiswal AK: Deficiency of NRH:oxidoreductase 2 increases susceptibility to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and benzo(a)pyrene-induced skin carcinogenesis. *Cancer Res* 2004;64:5925-5928.
- Knox RJ, Jenkins TC, Hobbs SM et al: Bioactivation of 5-(anzirin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB 1954) by human NAD(P)H quinone oxidoreductase 2: a novel co-substrate-mediated antitumor prodrug therapy. *Cancer Res* 2000;60:4179-4186.
- Wang W, Jaiswal AK: Nuclear factor Nrf2 and antioxidant response element regulate NRH:quinone oxidoreductase 2 (*NQO2*) gene expression and antioxidant induction. *Free Radic Biol Med* 2006;40:1119-1130.
- Soucek P, Anzenbacher P, Skoumalova I, Dvorak M: Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells* 2005;23:1417-1422.
- Schlager JJ, Powis G: Cytosolic NAD(P)H:quinone-acceptor oxidoreductase in human normal and tumor tissue: effects of cigarette smoking and alcohol. *Int J Cancer* 1990;45:403-409.
- Malkinson AM, Siegel D, Forrest GL et al: Elevated DT-diaphorase activity and messenger RNA content in human non-small cell lung carcinoma: relationship to the response of lung tumor xenografts to mitomycin C1. *Cancer Res* 1992;52:4752-4757.
- Mekhail-Ishak K, Hudson N, Tsao MS, Batist G: Implications for therapy of drug metabolizing enzymes in human colon cancer. *Cancer Res* 1989;49:4866-4869.
- Smitskamp-Wilms E, Giaccone G, Pinedo HM et al: DT-diaphorase activity in normal and neoplastic human tissues; an indicator for sensitivity to bioreductive agents. *Br J Cancer* 1995;72:917-921.
- Mikami K, Naito M, Ishiguro T et al: Immunological quantitation of DT-diaphorase in carcinoma cell lines and clinical colon cancers: advanced tumors express greater levels of DT-diaphorase. *Jpn J Cancer Res* 1998;89:910-915.
- Jaiswal AK: Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase2 gene structure, activity, and tissue-specific expression. *J Biol Chem* 1994;269:14502-14508.
- Siegel D, Ross D: Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (*NQO1*) in human tissues. *Free Radic Biol Med* 2000;29:246-253.
- Celli CM, Tran N, Knox R, Jaiswal AK: NRH:quinone oxidoreductase 2 (*NQO2*) catalyzes metabolic activation of quinones and anti-tumor drugs. *Biochem Pharmacol* 2006;72(3):366-376.
- Jamieson D, Wilson K, Pridgeon S et al: NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and NRH:quinone oxidoreductase 2 activity and expression in bladder and ovarian cancer and lower NRH:quinone oxidoreductase 2 activity associated with an *NQO2* exon 3 single-nucleotide polymorphism. *Clin Cancer Res* 2007;13(5):1584-1590.
- Montano MM, Katzenellenbogen B: The quinone reductase gene: A unique estrogen receptor-regulated gene that is activated by anti-estrogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2581-2586.

Korespondenční adresa:

Ing. Míluše Hubáčková,
Oddělení Biotransformací, CPL, Státní zdravotní ústav,
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10,
Tel: +4202 6708 2681, E-mail:hubackova@szu.cz

Došlo / Submitted: 8. 6. 2007
Přijato / Accepted: 29. 6. 2007

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy. The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů. The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Příloha č. 6

Václavíková R, **Hubáčková M**, Kubala E, Kodet R, Mrhalová M, Novotný J, Gut I, Souček P. Expresse genu mnohočetné lékové rezistence 1 (mdr1) a její význam v rozvoji a terapii karcinomu prsu. *Klin Onkol.* 2007;20(3):253-59. (bez IF)

EXPRESSE GENU MNOHOČETNÉ LÉKOVÉ REZISTENCE 1 (MDR1) A JEJÍ VÝZNAM V ROZVOJI A TERAPII KARCINOMU PRSU

EXPRESSION OF MULTIDRUG RESISTANCE GENE 1 (MDR1) AND ITS ASSOCIATION WITH DEVELOPMENT AND CLINICAL OUTCOME OF BREAST CARCINOMA

VÁCLAVÍKOVÁ R.¹, HUBÁČKOVÁ M.^{1,5}, KUBALA E.², KODET R.³, MRHALOVÁ M.³, NOVOTNÝ J.⁴, GUT L.¹ a SOUČEK P.¹

¹ STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, PRAHA

² RADIOTERAPEUTICKO-ONKOLOGICKÉ ODDĚLENÍ, FAKULTNÍ NEMOCNICE MOTOL, PRAHA

³ ÚSTAV PATOLOGIE A MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNY 2.LF UK A FAKULTNÍ NEMOCNICE MOTOL, PRAHA

⁴ ONKOLOGICKÁ KLINIKA VFN A 1.LF UK, PRAHA

⁵ 3.LF UK

Souhrn

Východiska: Mnohočetná léková rezistence je významnou překážkou úspěšné léčby nádorových onemocnění. Jedním z nejvýznamnějších proteinů přispívajících k rozvoji rezistence je P-glykoprotein kódovaný genem mnohočetné lékové rezistence (*MDR1*, nově *ABCB1*). Vysoká exprese *MDR1* v primárních nádorech karcinomu prsu může být spojena se špatnou prognózou vývoje onemocnění a být negativním prediktivním faktorem výsledku chemoterapie. **Metody:** Metodou real-time PCR byly detekovány transkripty *MDR1* v nádorové tkáni souboru 88 pacientek s karcinomem prsu a současně v párových vzorcích nenádorové tkáně u 40 pacientek. Dále byly statisticky zhodnoceny rozdíly v expresi mezi skupinami pacientek rozdělenými podle klinicko-patologických charakteristik analýzou variance ANOVA. Pro analýzy vztahu genových expresí k celkovému a bezpříznakovému přežívání pacientek byl použit Kaplan-Meierův test. **Výsledky:** Exprese *MDR1* byla detekována u 87/88 (98,9 %) vzorků nádorové a 39/40 (97,5%) vzorků kontrolní tkáně 87 (98,9 %) pacientek. Exprese byla charakterizovaná velkou interindividuální variabilitou. K deregulaci exprese *MDR1* docházelo především v nádorové tkáni (89,7%). Korelace exprese *MDR1* s klinicko-patologickými údaji pacientek nebyla nalezena. Riziko relapsu u pacientek s vysokou expresí *MDR1* bylo významně vyšší v případech, že byly léčeny substráty P-glykoproteinu antracykliny nebo taxany ($P = 0,031$). **Závěr:** Exprese *MDR1* se jeví jako potenciální prediktivní faktor úspěšnosti chemoterapie karcinomu prsu režimy na bázi taxanů či antracyklinů.

Klíčová slova: karcinom prsu, *MDR1*, exprese, real-time PCR, léčba, predikce.

Summary

Background: Multiple drug resistance presents a major problem for successful cancer chemotherapy. One of the most important proteins contributing to the development of resistance is the P-glycoprotein encoded by multidrug resistance gene 1 (*MDR1*, newly *ABCB1*). A high expression of *MDR1* might correlate with shorter overall survival and worse chemotherapy outcome. **Methods:** mRNA levels of *MDR1* were analyzed in 88 breast tumor samples and in adjacent non-tumor tissue samples ($n = 40$) by real-time PCR. Statistical comparisons between the levels of *MDR1* expression and clinical-pathological data were performed using ANOVA test. Kaplan-Meier's statistics test was used for the estimation of significance of differences in overall and disease-free survivals. **Results:** *MDR1* was expressed in 87/88 (98,9 %) of tumors samples and in 39/40 (97,5%) of non-tumor breast samples. Striking inter-individual variability in expression of *MDR1* was found with down-regulation in almost 89,7% of all tumors. No correlation of *MDR1* expression with clinical-pathological characteristics was found. Patients with high *MDR1* expression treated with P-gp substrates anthracycline or taxane containing regimens had significantly shorter disease-free survival than those treated by other regimens ($P = 0,031$). **Conclusion:** *MDR1* expression seems appears to be a potential predictive factor of chemotherapy outcome in breast cancer patients treated with anthracycline or taxane containing regimens.

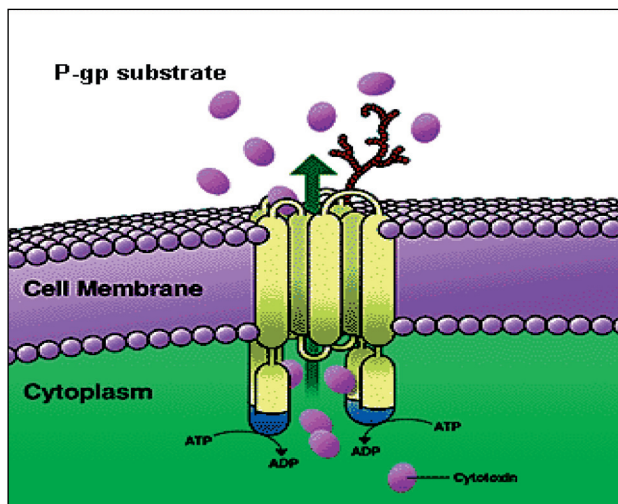
Key words: Breast neoplasms, *MDR1*, protein, gene expression, PCR, treatment, prognosis.

Úvod

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorovým onemocněním žen. Přes značné pokroky v terapii zůstává významnou překážkou úspěšné léčby nádorových onemocnění rozvoj mnohočetné lékové rezistence (MDR z angl. multidrug resistance). Rezistence přitom nevzniká jen na

jedno léčivo, ale zpravidla na celou skupinu léčiv, které se liší strukturou i mechanismem účinku a díky tomu se tento fenomén nazývá mnohočetná léková rezistence (1). Jedním ze základních mechanismů vzniku MDR je transportní funkce některých transmembránových transportních proteinů ze skupiny tzv. ABC-transportérů (ATP binding cassette pro-

teins). V současné době je známo 49 lidských ABC-transportérů, které jsou rozděleny na základě sekvenční homologie do sedmi podrodin; ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF a ABCG (2). Jedním z nejvýznamnějších ABC-transportérů přispívajících k rozvoji MDR je P-glykoprotein (P-gp). Jedná se o transmembránový glykoprotein o velikosti 170kDa tvořený 1280 aminokyselinami (**obrázek č. 1**). Tato ATP-řízená effluxní pumpa využívá pro svou transportní funkci energii z hydrolyzy ATP (3). P-gp je kódován genem *MDR1* (alias *ABCB1*, *PGY1*, *P-GP*, *GP170*). *MDR1* je běžně exprimován v játrech, ledvinách, střevech, mozku, děloze, varlatech a placentě (4). Z toho vyplývá i jeho fyziologická funkce, kterou je především řízení absorpce, distribuce a exkrece celé řady xenobiotik včetně řady klinicky významných léčiv. Brání také průniku xenobiotik do mozku či reprodukčních orgánů (5). Substráty P-gp je přitom řada protinádorových léčiv jako vinka-alkaloidy, antiracykliny, epipodophylotoxiny, taxany, kolchicin a actinomycin D (4,6). Doxorubicin a taxany jsou přitom jedny z neúspěšnějších léků pokročilého karcinomu prsu. Jejich terapeutické použití je limitováno rozvojem MDR a především zvýšenou expresí P-gp, která s resistencí vůči taxanům a doxorubicinu *in vitro* koreluje (7). Expresí P-gp/*MDR1* byla nalezena jak v tkáni z okolí nádoru bez morfoloogicky prokázané přítomnosti nádorových buněk (8), tak v nádorové tkáni pacientek s karcinomem prsu (9,10). Expresí proteinu přitom často korelovala s expresí na úrovni genu (9,11).



Obrázek 1

V současné době existuje několik studií ukazujících jasnou souvislost mezi expresí P-gp/*MDR1* a klinicko-patologickými údaji pacientek (např. metastázy do axilárních lymfatických uzlin, 11,12). Vztahy k úspěšnosti chemoterapie karcinomem prsu (OS, DFS, odpověď) na úrovni proteinu (13,14,15,16) či mRNA byly rovněž publikovány (10,17). Naproti tomu existuje několik studií, jež vliv exprese P-gp/*MDR1* na rozvoj a průběh terapie karcinomem prsu neprokázaly (12,18,19,20). Z velké variability zveřejněných výsledků vyplývá potřeba individuálního stanovení míry exprese *MDR1* a jejího vlivu na rozvoj a úspěšnost terapie karcinomem prsu u konkrétních pacientek, zejména s ohledem na použitý terapeutický režim.

Předkládaná pilotní studie se zaměřila na (i) kvantitativní stanovení exprese *MDR1* v souboru pacientek s karcinomem prsu jako potenciálního prediktivního faktoru průběhu a úspěšnosti léčby, (ii) stanovení rozdílu v expresi *MDR1* mezi nádorovou tkání a tkání bez přítomnosti nádorových buněk (iii) stanovení korelace exprese *MDR1* s klinicko-patologickými prognostickými faktory. Hlavním cílem bylo, na základě nalezených souvislostí, zhodnotit význam exprese *MDR1* pro potenciální optimalizaci chemoterapie jednotlivých pacientek s karcinomem prsu.

Tabulka 1: Klinicko-patologické charakteristiky sledovaných pacientek

Charakteristika		N §
Průměrný věk v době diagnózy	63,7 ± 11,8	88 (100)
	≤ 40 let	3 (3,4)
	40 - 49 let	6 (6,8)
	50 - 59 let	26 (29,5)
	> 60 let	53 (60,3)
Stav menopauzy	premenopauzální	11 (12,5)
	postmenopauzální	77 (87,5)
Histologický typ nádoru	invasivní duktální karcinom	68 (77,3)
	invasivní lobulární karcinom	9 (10,2)
	jiný typ + a	11 (12,5)
Průměrná velikost nádoru	23,1 ± 13,9 mm	
	≤ 20 mm	50 (56,8)
Histologický grade	> 20 mm	38 (43,2)
	1	11 (12,5)
	2	45 (51,1)
	3	19 (21,6)
	X ^{ab}	13 (14,8)
Klinické stadium	I	29 (33,0)
	IIA	26 (29,5)
	IIB	15 (17,0)
	IIIA	5 (5,7)
	IIIB	8 (9,1)
	IV	2 (2,3)
neurčeno	3 (3,4)	
Receptor pro estrogen	pozitivní	51 (58,0)
	negativní	33 (37,5)
	neurčeno	4 (4,5)
Receptor pro progesteron	pozitivní	45 (51,1)
	negativní	39 (44,3)
	neurčeno	4 (4,5)
Postižení uzlin	pozitivní	40 (45,5)
	negativní	45 (51,1)
	neurčeno	3 (3,4)

§ N = počet pacientek a procentuální zastoupení uvedené v závorce, ^{ab} ve třech případech jednalo se o jiný typ nádoru než duktální či lobulární karcinom tzn.: mucinozní, 2x komedonový, 1x, medulární, 1x želatinosní, 1x tubulopapilární karcinom 3x, 1x atypický trabekulární, 1x malobuněčný karcinom a 1x duktální karcinom in situ, X^{ab} údaje o stanovení gradegradingu nebyly k dispozici

Pacientky a metody

Pacientky

Do studie bylo zahrnuto 88 nemocných s histologicky potvrzenou diagnózou karcinomem prsu z období let 1998 - 2005. U všech pacientek zařazených do studie byly sledovány následující údaje: věk v době diagnózy, osobní a rodinná

anamnéza (zahrnující informace o výskytu karcinomu prsu, vaječníků či dalších maligních onemocnění v blízkém příbuzenstvu), stav menopauzy a dále klinicko- patologická data jako stadium, histologický typ a grade nádoru, velikost nádoru, exprese receptorů pro estrogen (ER) a progesteron (PR). Klinicko-patologické charakteristiky sledovaného souboru pacientek jsou uvedeny v **tabulce č. 1**.

V celém souboru byl rovněž sledován způsob radioterapie a chemoterapie (neoadjuvantní, adjuvantní i paliativní), výsledek (kompletní odpověď, CR z angl. complete response vs. relaps), celkové přežívání (OS z angl. overall survival) a bezpříznakové přežívání (DFS z angl. disease-free survival). Tyto údaje shrnuje **tabulka č. 2**.

Všechny pacientky podepsaly formulář informovaného souhlasu ve shodě s Helsinskou deklarací a studie byla schválena etickou komisí Státního zdravotního ústavu v Praze.

Tabulka 2: Terapeutický profil a výsledek chemoterapie sledovaných pacientek

Charakteristika		N [§]
Terapie:		
Neznámá (pacientka není zařazena v databázi)		5 (5,7)
Chemoterapie		
bez chemoterapie		5 (5,7)
adjuvantní		59 (67,0)
neoadjuvantní		10 (11,4)
adjuvantní i neoadjuvantní		8 (9,1)
paliativní		8 (9,1)
Odpověď na terapii		
kompletní odpověď		62 (70,5)
relaps		21 (23,8)
neznámá odpověď		5 (5,7)
Přežití:		
Celkové (měsíce)	medián (rozsah: 4 - 112)	51,5
Bezpříznakové (měsíce)	medián (rozsah: 0 - 112)	45
Počet úmrtí		12 (13,6)

§ N = počet pacientek a procentuelní zastoupení uvedené v závorce

Zpracování vzorků

Všem 88 pacientkám byl v průběhu operace odebrán vzorek nádoru a současně u 40 pacientek také vzorek bez jakýchkoliv morfologických známek karcinomu z přiléhající okolní tkáně. Vzorky žezů tkání byly ihned uloženy a uchovávány v tekutém dusíku. Všechny bioptické vzorky tkáně byly histologicky klasifikovány dle standardních diagnostických procedur. Patology bylo provedeno histologické zhodnocení tkáně, přičemž každý vzorek s obsahem nádorových buněk byl zařazen jako reprezentativní pro izolace nukleových kyselin. (Ve vzorcích okolní nenádorové tkáně nebyla morfologicky prokázána přítomnost nádorových buněk. 5 µm tenké kryostatové řezy nádorových a nenádorových tkání byly použity pro izolaci celkové RNA s využitím TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Kvalita výsledného preparátu bylo ověřena agarózovou elektroforézou a koncentrace mRNA byla určena spektrofotometricky pomocí přístroje Cary 300 (Varian, Palo Alto, CA). Pro syntézu cDNA bylo použito 0,5 µg celkové RNA a kit RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania). Případná kontaminace genomovou DNA byla posouzena PCR

amplifikaací fragmentu kontrolního genu ubichitinu C za vzniku produktu z cDNA (190 bp) a z genomové DNA (1009 bp) popsanou metodou (21).

Kvantifikace pomocí real-time PCR

Vyšetření metodou real-time PCR bylo provedeno na systému RotorGene 2000 (Corbett Research, Sydney, Australia). Reakční směs pro PCR sledovaného genu *MDR1* obsahovala 10 µl 20x TaqMan Universal PCR Master Mix, 1,0 µl specifické sondy (konečná koncentrace 250 nM, značení 6-FAM na 5' -konci a lapač NFQ na 3' -konci) a primerů pro *MDR1* (900 nM pro oba primery), 5 µl 5x ředěné cDNA a do konečného objemu 20 µl byla doplněna ultračistou vodou. Podmínky PCR reakce byly následující: počáteční aktivace HotStar Taq polymerázy 2 min při 50°C, úvodní denaturace 10 min při 95°C následovaná 55 cykly sestávajícími se z denaturace 15 s při 95° a annealingu/extenze 60 s při 58°C. Fluorescence byla měřena na konci každého cyklu. Všechny vzorky byly analyzovány v duplikátech. Negativní kontrolní reakce obsahovala vodu místo vyšetřované cDNA. Pro vyloučení možné kontaminace z předchozích kroků přípravy RNA a cDNA byla rovněž použita negativní kontrola vyšetřované cDNA připravená současně se vzorkovou cDNA bez přidání reverzní transkriptázy. Současně se vzorky byly v průběhu real-time PCR měřeny i standardy obsahující cílovou sekvenci *MDR1* naklonovanou do plasmidu *pDONR201* (rozsah; 10² - 10⁶ kopií DNA/reakci). Množství vyšetřované cDNA bylo stanoveno metodou absolutní kvantifikace s využitím kalibrační křivky sestavené z použitých standardů. Jako kontrolní gen byl využit cyklofilin A (*CYCA*), který byl stanoven za stejných podmínek PCR amplifikace jako *MDR1* a při použití komerčně dostupné sady TaqMan Human PPIA Endogenous Control (Applied Biosystems, Foster City, CA) obsahující sadu specifických primerů pro *CYCA* a fluorescenčně značené sondy (kit č. 4333763F).

Příprava *MDR1* standardů pro real-time PCR

Pro přípravu standardů *MDR1* byla použita cílová sekvence genu překrývající oblast exonů 18-28 (1500 bp) připravená pomocí specifických primerů, forward: TGGAGAGATCCTCACCAAGC a reverse: ACTGGGCGCTTTGTTCCAG. Pro *CYCA* byla zvolena oblast exonů 3 - 5 (738 bp) připravená ze specifických primerů, forward: AGGGTTCCTGCTTTCACAGA a reverse: CCGAGT-TGGCTACATTT. PCR produkty těchto fragmentů byly naklonovány do vektoru *pDONR201* užitím GatewayTM Cloning Technology (Invitrogen, Carlsbad, CA). Vstupní plasmidy byly poté namnoženy v *Escherichia coli* DH5α Maximum Efficiency Cells (Invitrogen, Carlsbad, CA) a izolovány pomocí Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Koncentrace izolovaných plasmidů byla určena spektrofotometricky.

Analýza dat

Vyhodnocení real-time PCR reakcí bylo prováděno softwarem Rotor- Gene verze 6.0 (Corbett-Research). Exprese *MDR1* byla analyzována metodou absolutní kvantifikace s využitím externí křivky standardů *pDONR/MDR1* plasmidu o koncentracích: 100, 10³, 10⁴, 10⁵ a 10⁶ kopií/vzorek. Množství vznikajícího počtu kopií *MDR1* v každém vzorku bylo vztaženo na µg celkové RNA. Podobně bylo vyhodnoceno i množství počtu

kopii kontrolního genu *CYCA*. Nakonec byla provedena normalizace počtu kopií *MDR1* na počet kopií *CYCA* ($\text{kopie}_{MDR1} / \text{kopie}_{CYCA}$).

Míra exprese byla hodnocena vzhledem k věku při diagnóze a velikosti nádoru v mm Pearsonovým a Spearmanovým korelačním testem (celkem 4 testy). Vztah exprese k menopauze (pre vs. post), typu (duktální vs. lobulární), grade (grade 1 vs. 2 vs. 3), stádiu (0, I, II vs. III a IV), TNM klasifikaci podle International Union Against Cancer (UICC), exprese receptoru pro estrogen a pro progesteron (pozitivní vs. negativní) a léčebné odpovědi (kompletní odpověď vs. relaps) byl hodnocen testem variance ANOVA (10 testů). Pro analýzy vztahů exprese *MDR1* k celkovému a bezpříznakovému přežívání pacientek rozdělených podle druhu chemoterapie (antracykliny a/nebo taxany vs. ostatní a hormonální léčba vs. ostatní) byly pacientky rozděleny na dvě skupiny se stejným počtem osob (vysoká exprese *MDR1* vs. nízká exprese *MDR1*). K těmto analýzám byl použit Kaplan-Meier test (5 testů). Hodnota $P < 0,05$ byla považována za signifikantní. Statistická analýza byla provedena programem SPSS v12,0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Výsledky

Expres *MDR1* detekovaná metodou real-time PCR

Vzorky nádorů byly odebrány během chirurgického výkonu celkem od 88 pacientek. Současně bylo získáno 40 vzorků přiléhající nenádorové tkáně. Dostatečné množství celkové RNA bylo izolováno ze všech uvedených vzorků. Transkripty *MDR1* byly zjištěny v 87 (98,9 %) vzorcích nádorové tkáně a ve 39 (97,5 %) vzorcích nenádorové tkáně. U jedné pacientky nebyla exprese *MDR1* detekována v nádorové ani v nenádorové tkáni, zřejmě díky degradaci RNA. Expres *MDR1* se vyznačovala velkou interindividuální variabilitou mezi jednotlivými pacientkami. Při porovnání rozdílů exprese v obou typech tkání byla nalezena významně vyšší průměrná exprese *MDR1* v nenádorové tkáni oproti nádorové (35 z 39 vzorků, tj. 89,7 %, $P < 0,001$ viz. **tabulka č. 3 a obrázek č. 2**). Pro pacientky s vyšší expresí *MDR1* v nádorové tkáni, může mít tento fakt klinický dopad na terapii, jak je dále diskutováno.

Korelace exprese *MDR1* s dokumentovanými klinicko-patologickými daty pacientek

Sledovaný soubor pacientek byl charakterizován na základě řady nejčastěji sledovaných klinicko-patologických údajů (viz. **tabulka č. 1**). Více než polovina pacientek byla v době diagnózy starší 60 let (60,3%) a po menopauze (87,5 %). Většina pacientek byla v lokálně rozvinutých stádiích I, IIA či IIB (79,5 %). Z parametrů týkajících se přímo nádorů lze shrnout, že se většinou jednalo o invazivní duktální karcinom prsu (77,3 %) s průměrnou velikostí $23,1 \pm 13,9$ mm. Srovnání míry exprese *MDR1*

v nádorové tkáni pacientek (poměru mezi expresí *MDR1* a *CYCA* na mg RNA) se sledovanými klinicko-patologickými faktory ukázalo nevýznamnou korelaci s klinickým stádiem. Pacientky ve stádiu I měly vyšší expresi *MDR1* ($0,0139 \pm 0,0036$) než pacientky v pokročilejších stádiích II - IV ($0,0071 \pm 0,0019$, ANOVA, $F = 3,71$ a $P = 0,058$). Podobně, pacientky s nádory menšími než 20 mm (T1) měly vyšší expresi *MDR1* ($0,0131 \pm 0,0033$) než pacientky s nádory většími než 20 mm (T2-T4; $0,0074 \pm 0,0023$) (ANOVA, $F = 2,19$ a $P = 0,143$). Expres *MDR1* nebyla ve významném vztahu se žádným z dále sledovaných údajů (stav menopausy, typ a stupeň nádoru, počet postižených uzlin, exprese hormonálních receptorů, léčebná odpověď).

Korelace exprese *MDR1* s dokumentovaným terapeutickým profilem a úspěšností terapie karcinomu prsu

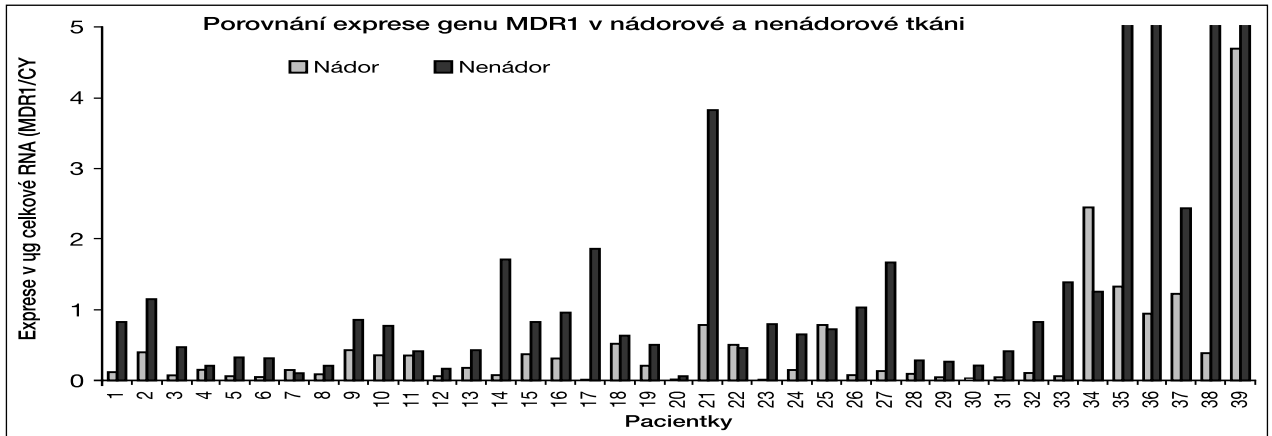
Použité režimy terapie a srovnání léčebných odpovědí jsou uvedeny v **tabulce č. 2**. Pacientky s nejvyšší expresí *MDR1* se nelišily v klinicko-patologických charakteristikách od ostatních nemocných. Z celého souboru 88 pacientek nebyla k dispozici chemoterapeutická data ani přežívání u 5 pacientek, které po operaci nepokračovaly v léčbě ve spolupracujících klinických zařízeních. Tyto pacientky byly vyřazeny ze statistických analýz vztahů exprese *MDR1* s typem a výsledkem terapie. Pacientky zahrnuté ve studii byly rozděleny na dvě skupiny podle použití antracyklinů či taxanů v jejich chemoterapeutické léčbě (antracykliny a/nebo taxany vs. ostatní režimy). V dalším kole analýz byly ještě pacientky rozděleny na skupiny léčené pouze hormonálně (tamoxifen a/nebo inhibitory aromatáz vs. ostatní režimy). Neoadjuvantní chemoterapie použitá u 11 pacientek zahrnovala u 8 pacientek použití antracyklinů (kombinace 5-fluorouracil/adriamycin/cyklofosfamid = FAC, 5-fluorouracil/epirubicin/cyklofosfamid = FEC, adriamycin/cyklofosfamid = AC) nebo taxanů (paclitaxel, docetaxel, epirubicin/docetaxel = ED). V adjuvantní systémové léčbě byly použity režimy na základě antracyklinů (kombinace FAC, FEC, AC) či taxanů (paclitaxel, docetaxel) u 17 pacientek, 10 pacientkám byla aplikována kombinace cyklofosfamid/metotrexát/5-fluorouracil = CMF a 32 pacientek podstoupilo hormonální terapii antiestrogeny (tamoxifen) či inhibitory aromatázy (anastrozol, letrozol či jiné). Medián celkového přežití (OS) činil 51,5 měsíce a bezpříznakového přežívání (DFS) pak 45 měsíců. Ze souboru pacientek zařazeného ve studii došlo u 21 (23,8 %) pacientek k relapsu onemocnění po použité chemoterapii a 12 nemocných (13,6 %) pacientek zemřelo. Nakonec bylo z analýz vyřazeno 6 pacientek, u kterých byl karcinom prsu sekundárním nádorem. Důvodem byla obava z možnosti ovlivnění výsledků předchozí chemoterapie primárního karcinomu. Ke konečnému statistickému zhodnocení bylo tedy do souboru zařazeno 82 pacientek.

Tabulka 3: Porovnání exprese *MDR1* v nádoru a nenádorové tkáni karcinomu prsu

Typ vzorku	N [§]	Expres <i>MDR1</i> (vyjádřená jako poměr počtu kopií na mg RNA <i>MDR1</i> / <i>CYCA</i>)					
		Minimum	Maximum	Průměr	SE	Medián	Variabilita
nádor	39	0,0127	4,6878	0,4558	0,1350	0,1446	369-krát
nenádorová tkáň*	39	0,0566	30,8345	2,4982	0,9525	0,7711	546-krát

[§] počet sledovaných vzorků; Pearsonův test $r = 0,804$, $P < 0,001$ pro nádor vs. nenádorovou tkáň.

* tkáň z okolí nádoru bez morfologicky detekovaných nádorových buněk



Obrázek č. 2

Pro hodnocení významu exprese *MDR1* byly pacientky rozděleny na dvě stejně velké skupiny (41 pacientek s vysokou vs. 41 pacientek s nízkou expresí). Pacientky s vysokou expresí *MDR1* léčené antracykliny nebo taxany a to v jakémkoliv podání (neoadjuvantním, adjuvantním, paliativním či kombinovaném) přežily kratší dobu než pacientky léčené jinými režimy, ovšem výsledek nebyl signifikantní (Kaplan-Meier test pro OS, $P = 0,090$). U pacientek s nízkou expresí *MDR1* se přežívání nelišilo ($P = 0,746$). Riziko relapsu u pacientek s vysokou expresí *MDR1* bylo významně vyšší v případě, že byly léčeny antracykliny nebo taxany (Kaplan-Meier test pro DFS, $P = 0,031$). Podobně jako v případě OS se u pacientek s nízkou expresí *MDR1* přežívání významně nelišilo ($P = 0,244$). Tento trend byl nepřímo potvrzen i výsledkem analýz u pacientek léčených pouze hormonálně (tamoxifen či inhibitory aromatáz). Pacientky s vysokou expresí *MDR1* přežily významně déle bez relapsu pokud byly léčeny pouze hormonálně než pacientky léčené jinými režimy (chemoterapie taxany, antracykliny, CMF apod.) (Kaplan-Meier test pro DFS, $P = 0,037$). U pacientek s nízkou expresí se DFS po rozdělení podle terapie významně nelišil ($P = 0,759$). Pro sledování vlivu exprese *MDR1* na úspěšnost chemoterapie byly pacientky rozděleny na základě toho, zda byl používán v terapii substrát P-gp či nikoliv, protože právě u těchto látek je předpoklad ovlivnění účinnosti cytotatik mírou exprese *MDR1*.

Výsledky byly ovšem hodnoceny i bez ohledu na míru exprese *MDR1*, jak uvádí další odstavec.

Při posuzování úspěšnosti chemoterapie bez ohledu na expresi *MDR1* bylo bezpříznakové přežívání pacientek léčených antracykliny či taxany oproti pacientkám léčeným ostatními režimy kratší, ale jen na hranici významnosti (Kaplan-Meier test pro DFS, $P = 0,052$). Celkové přežívání všech takto léčených pacientek se tedy významně nelišilo (Kaplan-Meier test pro OS, $P = 0,273$). Obdobně bez posuzování ohledu na expresi *MDR1* léčba pouze hormonálními preparáty ve srovnání s jinými režimy neměla na DFS ani OS všech pacientek významný vliv.

Stejně tak se DFS OS ani OS DFS významně nelišily prostým porovnáním pacientek ve skupinách pacientek s vysokou vs. nízkou expresí *MDR1*.

Diskuse

Naše výsledky prokazují expresi genu *MDR1* v nádorech i okolní přiléhající nenádorové tkáni metodou real-time PCR. Expres v nádorové i nenádorové tkáni již byla u pacientek s karcinomem prsu dokumentována (8,9,10,11). Imunohistochemicky byla pozitivita exprese P-gp pozorována průměrně ve 46% nádorů (rozmezí 35,6 - 56,2) v celkem 28 studiích zahrnujících více než 20 subjektů. Genová expres pak byla detekována zhruba v 63% případech (12 studií) v rozsahu 0 až 100% jak shrnuje *Leonessa and Clarke* (20). Podíl detekce exprese *MDR1* vzrostl díky vysoké citlivosti metody real-time PCR používané v poslední době. Tato práce měla za cíl porovnat rozdíly exprese *MDR1* mezi nádorovou a nenádorovou tkání u pacientek s karcinomem prsu. Výsledky lze shrnout konstatováním, že u většiny pacientek dochází k deregulaci exprese v nádorové oproti nenádorové tkáni. U některých pacientek však naopak expres *MDR1* v nádorové tkáni silně převažuje. V nenádorové tkáni přitom byla nalezena indukce exprese *MDR1* po provedení chemoterapie ($n = 40$, cit. 22). Expres *MDR1* se tedy jeví jako obecný fenomén vyskytující se v nenádorové i nádorové tkáni, jehož klinický dopad není stále jasný a jeví se jako velmi aktuální pro podrobné studium ve vztahu k různým léčebným režimům.

Pro posouzení významu exprese *MDR1* v nádorech karcinomu prsu pro prognózu vývoje onemocnění jsme porovnávali výsledky sledování exprese *MDR1* v nádorech s klinicko-patologickými údaji pacientek. Na rozdíl od některých zahraničních studií se souvislost exprese *MDR1* s klinicko-patologickými údaji nepodařilo potvrdit. Dříve byly nalezeny korelace míry exprese P-gp detekovaného imunohistochemicky s vyšším gradingem (G3) karcinomu prsu (cit. 12, $n = 177$; cit. 14, $n = 104$). *Schneider et al.* (11) našel významnou souvislost mezi expresí *MDR1* a metastatické postižení axilárních lymfatických uzlin u pacientek s karcinomem prsu ($n = 46$). V souboru 22 pacientek s detekovanou expresí *MDR1* bylo 81,8% (18/22) případů se zasažením uzlin na rozdíl od skupiny pacientek, kde *MDR1* detekován nebyl. Korelaci mezi zasažením uzlin a vyšší expresí P-gp našel nedávno *Surowiak et al.* (14, $n = 104$). Korelace dalších klinicko-patologických charakteristik s expresí P-gp/*MDR1* dosud nebyly publikovány. V nedávné studii *Moureau-Zabotto*

et al. (19) nebyla u 164 pacientek nalezena korelace exprese *MDR1* s žádným z klinicko-patologických údajů. Podobným výsledkem skončila i naše studie. Pouze pacientky ve stádiu I měly nevýznamně vyšší expresi *MDR1* ve srovnání s pacientkami v pokročilejších stádiích ($P = 0,058$).

Pro posouzení významu míry exprese *MDR1* pro predikci úspěšnosti chemoterapie je rozhodujícím faktorem výběr cytostatika. V případě použití cytostatik, které jsou substráty P-gp, např.: antracykliny či taxany (7) existuje předpoklad, že terapie může vést ke vzniku MDR. Díky případně zvýšené expresi *MDR1* mohou být taková léčiva za účasti transportní funkce P-gp předčasně vylučována z nádorových buněk, což může způsobit pokles účinku léčby. Pro analýzy byly tedy pacientky rozděleny na dvě skupiny (ošetřené substráty P-gp, tj. antracykliny a/nebo taxany vs. ošetřené ostatními režimy). Riziko relapsu u pacientek s vysokou expresí *MDR1* bylo významně vyšší ($P = 0,031$) a celkové přežívání nevýznamně kratší ($P = 0,090$) v případě, že byly léčeny antracykliny nebo taxany. U pacientek s nízkou expresí *MDR1* se přežívání podle terapie významně nelišilo. Jsme si vědomi toho, že rozdělení pacientek pouze na základě léčby plně nerespektuje význam prognostických faktorů, jež jsou pro stanovení léčby zásadní (např.: stavu hormonálních receptorů či velikosti nádoru a postižení uzlin). Pro hodnocení vlivu exprese *MDR1* byly tak statistické analýzy rozdělením na dvě skupiny podle terapie silně zjednodušeny. U skupiny pacientek léčených antracykliny nebo taxany se jedná o selekci nemocných pacientek s obecně horší prognózou. Důvodem pro toto zjednodušení byl fakt, že zařazením prognostických kritérií do analýz by se sledovaný soubor rozpadl na obtížně hodnotitelné (příliš malé) skupiny přesto, že jde o studii dostupných nemocných ze dvou velkých pražských nemocnic po dobu 7 let. Proto je třeba zdůraznit, že prognostické faktory mohly výsledky analýz značně zkreslit (bias). Pro návrh větší cílenou studie, která bude průběžně pokračovat, nám však zjednodušené hodnocení poskytuje potřebné vodítko. V zahraniční literatu-

ře jsme našli studie obdobného typu, z nichž řada podporuje námi dosažené výsledky.

Vysoká exprese *MDR1* korelovala s horší odpovědí na chemoterapii primárních karcinomů prsu antracykliny v režimech FAC/FEC ($n = 59$, cit. 17). Pozitivita exprese P-gp proteinu rovněž korelovala s nízkou odpovědí na neoadjuvantní chemoterapii režimem FAC u pacientek s karcinomy prsu ($n = 50$, cit. 15). Oproti tomu ve skupině pacientek podstupujících adjuvantní chemoterapii kombinací CMF nebyl prokázán vliv exprese P-gp (12) či jeho genu *MDR1* (17). Také v některých dalších studiích zabývajících se vlivem exprese *MDR1* na úspěšnost chemoterapie nebyly nalezeny korelace (18,19). Jednalo se však o studie, ve kterých byl hodnocen vliv míry exprese *MDR1* na OS či DFS eventuelně PFS (progress-free-survival) bez ohledu na režim chemoterapie. Naše studie tyto závěry potvrzuje, protože bezpříznakové ani celkové přežívání pacientek, bez ohledu na terapii, se mezi skupinou s vysokou a nízkou expresí *MDR1* nelišilo ($P = 0,560$ pro DFS resp. $P = 0,883$ pro OS).

Závěr

Pilotní studie sledující expresi *MDR1* v souboru pacientek české populace s karcinomem prsu získaném ze dvou z pražských nemocnic prokázala, že kvantitativní real-time PCR pro *MDR1* může být úspěšně využita k detekci exprese *MDR1* v nádorové i v nenádorové tkáni. V nádorové tkáni u většiny pacientek byla nalezena down-regulace exprese *MDR1*. Na základě dosažených výsledků lze vyvodit, že exprese *MDR1* pravděpodobně neovlivňuje prognózu karcinomu prsu. Na druhou stranu se exprese *MDR1* jeví jako potenciální prediktivní faktor úspěšnosti chemoterapie v případě jeho vysoké hladiny exprese v nádorové tkáni a využití chemoterapie na základě substrátů P-gp. Sledování exprese *MDR1* u většího a přesněji definovaného souboru pacientek by mohlo vést k návrhu studie vedoucí k ověření uvedených výsledků a jejich využití v klinické praxi.

Poděkování: Projekt byl podpořen granty IGA 1A/8248-3, GAČR 305/07/P347 a výzkumným programem na podporu mladých vědců SZÚ Praha.

Literatura

- Gottesman MM and Pastan I: Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem*, 1993, 62: 385-427.
- <http://nutrigene.4t.com/translink.htm>
- Zhang JT: The multi-structural feature of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein: implications for its mechanism of action (hypothesis). *Mol Membr Biol*, 2001, 18(2):145-152.
- Kuwano M, Uchiumi T, Hayakawa H et al.: The basic and clinical implications of ABC transporters, Y-box-binding protein-1 (YB-1) and angiogenesis-related factors in human malignancies. *Cancer Sci*, 2003, 94(1): 9-14.
- Schinkel AH: P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999, 36: 179-194.
- Ling V: Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1997, 40 Suppl: S3-8.
- Mechetner E, Kyshtoobayeva A, Zonis S et al.: Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(2): 389-398.
- Scala S, Saeki T, Lynch A et al.: Coexpression of TGF alpha, epidermal growth factor receptor, and P-glycoprotein in normal and benign diseased breast tissues. *Diagn Mol Pathol*, 1995, 4(2): 136-142.
- Charpin C, Vielh P, Duffaud F et al.: Quantitative immunocytochemical assays of P-glycoprotein in breast carcinomas: correlation to messenger RNA expression and to immunohistochemical prognostic indicators. *J Natl Cancer Inst*, 1994, 86(20): 1539-1545.
- Correnti M, Cavazza ME, Guedez N et al.: Expression of the multidrug-resistance (MDR) gene in breast cancer. *J Chemother*, 1995, 7(5): 449-451.

11. Schneider J, Gonzalez-Roces S, Pollan M et al.: Expression of LRP and *MDR1* in locally advanced breast cancer predicts axillary node invasion at the time of rescue mastectomy after induction chemotherapy. *Breast Cancer Res*, 2001, 3(3): 183-191. Epub 2001 Feb 1.
12. Larkin A, O'Driscoll L, Kennedy S et al.: Investigation of MRP-1 protein and MDR-1 P-glycoprotein expression in invasive breast cancer: a prognostic study. *Int J Cancer*, 2004, 112(2): 286-294.
13. Koh EH, Chung HC, Lee KB et al.: The value of immunohistochemical detection of P-glycoprotein in breast cancer before and after induction chemotherapy. *Yonsei Med J*, 1992, 33(2): 137-142.
14. Surowiak P, Materna V, Matkowski R et al.: Relationship between the expression of cyclooxygenase 2 and *MDR1/P-glycoprotein* in invasive breast cancers and their prognostic significance. *Breast Cancer Res*, 2005, 7(5): R862-870. Epub 2005 Aug 25.
15. Chintamani, Singh JP, Mittal MK et al.: Role of p-glycoprotein expression in predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer- a prospective clinical study. *World J Surg Oncol*, 2005, 3: 61.
16. Chung HC, Rha SY, Kim JH et al.: P-glycoprotein: the intermediate end point of drug response to induction chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1997, 42(1): 65-72.
17. Burger H, Foekens JA, Look MP et al.: RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(2): 827-836.
18. Seymour L, Bezwoda WR, Dansey RD: P-glycoprotein immunostaining correlates with ER and with high Ki67 expression but fails to predict anthracycline resistance in patients with advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1995, 36(1): 61-69.
19. Moureau-Zabotto L, Ricci S, Lefranc JP et al.: Prognostic impact of multidrug resistance gene expression on the management of breast cancer in the context of adjuvant therapy based on a series of 171 patients. *Br J Cancer*, 2006, 94(4): 473-480.
20. Leonessa F and Clarke R: ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 2003, 10(1): 43-73.
21. Soucek P, Anzenbacher P, Skoumalova I, Dvorak M: Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells*, 2005, 23:1417-1422.
22. Arnal M, Franco N, Fargeot P et al.: Enhancement of *mdr1* gene expression in normal tissue adjacent to advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2000, 61(1): 13-20.
23. Gardiner T: Increased demand for glycoconjugates during stress. http://www.glycoscience.com/glycoscience/document_viewer.wm?FILENAME=D004 (2000).

Korespondenční adresa:

Mgr. Radka Václavíková PhD.,
Oddělení Biotransformací, CPL, Státní zdravotní ústav,
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10
E-mail: rvaclavikova@szu.cz

Došlo: 24. 1. 2007

Přijato: 6. 2. 2007