

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Alžběta Kloudová

Studium genové exprese faktorů signální dráhy oxysterolů u pacientek s karcinomem prsu

Gene expression study of oxysterol signal pathway in breast cancer patients

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Pavel Souček, CSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30. 4. 2015

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli, doc. RNDr. Pavlu Součkovi, CSc., za odborné vedení mé diplomové práce. Poděkování patří také Mgr. Veronice Brynychové za věnovaný čas, cenné rady a pomoc při zpracovávání této práce, Ing. Simoně Šůsové za odborné zasvěcení do laboratorních metod a Ing. Marii Ehrlichové za práci s buněčnými kulturami. Dík patří také celému kolektivu Oddělení toxikogenomiky, SZÚ za vytvoření přátelské atmosféry a podporu. Děkuji také Chirurgickému oddělení Nemocnice Atlas za poskytnutí vzorků a klinicko-patologických dat. V neposlední řadě děkuji za podporu také mé rodině a přátelům, bez nichž by tato práce nemohla vzniknout.

Tato práce byla financována z grantů GAČR č. 13-25222J a IGA NT/14055-3.

Abstrakt:

Hormonální terapie je běžnou součástí léčby karcinomu prsu u nádorů exprimujících estrogenové a progesteronové receptory. Tato terapie má za cíl zabránit proliferativním účinkům hormonů skrze příslušné receptory a inhibovat tak růst nádoru. Část nádorů je ovšem k této terapii rezistentní navzdory expresi hormonálních receptorů, přičemž důvody této rezistence nejsou v současné době zcela objasněny. Oxysteroly jsou hydroxylované deriváty cholesterolu, které by mohly ve vzniku této rezistence hrát roli. Jejich působení může ovlivňovat účinky hormonální terapie a zároveň některé signální dráhy vedoucí k nádorové progresi. Tato práce přináší výsledky analýzy exprese genů kódujících proteiny ovlivněné působením oxysterolů, proteiny metabolismu a transportu oxysterolů, transkripční faktory a proteiny signálních drah, které mohou souviset s účinky oxysterolů v buňce. Na základě porovnání expresního profilu mezi tumory lišícími se v expresi estrogenových receptorů a porovnání s klinicko-patologickými daty identifikuje kandidátní geny pro další studium. To by mohlo v konečném výsledku vést k vytvoření nových diagnostických markerů pro terapii karcinomu prsu.

Klíčová slova:

karcinom prsu, hormonální terapie, rezistence, estrogenový receptor, oxysteroly

Abstract:

Hormonal therapy is a common part of breast carcinoma treatment in patients whose tumors express estrogen and progesterone receptors. The aim of hormonal therapy is to prevent proliferative effect of hormones through their receptor proteins in order to inhibit tumor growth. However, certain number of tumors is resistant to hormonal therapy despite expression of hormonal receptors. Presently, the reasons of this resistance are not fully understood. Oxysterols are hydroxylated cholesterol derivatives, which may play some role in development of the resistance. They may interfere with hormonal therapy effect and influence some signal pathways leading to cancer progression. This study comes with results of gene expression of proteins influenced by oxysterol action, metabolic and transport proteins, transcription factors and members of signaling pathways that may be related to oxysterol effect. This thesis identifies some candidate genes for future analysis on the basis of comparison of gene expression between estrogen receptor positive and negative tumors and correlation with clinopathological data. The final goal should lead to discovery of new diagnostic markers for breast cancer therapy.

Key words:

breast cancer, hormonal therapy, resistance, estrogen receptor, oxysterols

Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod	10
2 Přehled literatury	11
2.1 Karcinom prsu	11
2.1.1 Klasifikace karcinomu prsu	12
2.1.2 Terapie karcinomu prsu	15
2.2 Estrogenové receptory a hormonální terapie	17
2.2.1 Struktura a funkce ER	17
2.2.2 Estrogenové receptory a karcinom prsu	18
2.2.3 Hormonální terapie	19
2.2.3.1 SERMs	20
2.2.3.2 SERDs	23
2.2.3.3 Inhibitory aromatázy	24
2.2.3.4 Ovariální supresory	26
2.2.4 Rezistence	26
2.3 Oxysteroly	27
2.3.1 Vznik oxysterolů	28
2.3.2 Metabolismus a transport oxysterolů	30
2.3.3 Funkce oxysterolů	32
2.3.3.1 Oxysteroly a faktory SREBP	32
2.3.3.2 Oxysteroly a HMG-CoA reductáza	34
2.3.3.3 Oxysteroly a receptory LXR	34
2.3.3.4 Oxysterol-vazebné proteiny	34
2.3.4 Signální kaskády spojené s oxysteroly	35
2.3.4.1 Oxysteroly a signální dráha Hedgehog	35
2.3.4.2 Oxysteroly a Wnt signalizace	36
2.3.4.3 Oxysteroly a apoptóza	36
2.3.4.4 Oxysteroly a mTOR	37
2.4 Cholesterol, oxysteroly a karcinogeneze	38
2.4.1 Význam oxysterolů v karcinogenezi	38
2.4.2 Metabolismus cholesterolu a hormonální terapie	39
2.4.3 27-hydroxycholesterol jako endogenní SERM	42
3 Cíle práce	45

4	Materiál a metody	46
4.1	Chemikálie a roztoky	46
4.2	Sběr materiálu, informovaný souhlas pacientek, klinicko-patologická data.....	47
4.3	Buněčné kultury	47
4.4	Drcení tkáně, izolace RNA	48
4.4.1	Měření koncentrace RNA	48
4.4.2	Kontrola kvality RNA.....	49
4.5	Syntéza cDNA.....	51
4.5.1	Kontrola kontaminace a kvality cDNA	52
4.6	Preamplifikace cDNA	54
4.6.1	Test preamplifikace.....	54
4.7	Studium genové exprese – qPCR.....	56
4.7.1	Seznam sledovaných genů	58
4.8	Statistické vyhodnocení	61
5	Výsledky	64
5.1	Srovnání exprese u nádorů ER+, ER- a zdravých tkání.....	64
5.1.1	ER+ vs. zdravá tkáň	65
5.1.2	ER- vs. zdravá tkáň.....	67
5.1.3	ER+ vs. ER-	69
5.2	Srovnání exprese vybraných genů u ER+ nádorů s klinicko-patologickými daty	71
5.2.1	Soubor pacientek - klinicko-patologická data	71
5.2.2	Porovnání exprese s klinickými daty	73
5.3	Expres ve tkáňových kulturách	76
6	Diskuze	77
6.1.1	Geny oxysterolové dráhy	77
6.1.2	Geny metabolismu oxysterolů	79
6.1.3	Geny transportu oxysterolů.....	81
6.1.4	Regulační geny	83
6.1.5	Geny signálních drah	84
7	Souhrn.....	87
8	Seznam použité literatury	89

Seznam zkratek

α -CE	cholestane-5 α ,6 α -epoxy-3 β -ol	cholestan-5 α ,6 α -epoxy-3 β -ol
β -CE	cholestane-5 β ,6 β -epoxy-3 β -ol	cholestan-5 β ,6 β -epoxy-3 β -ol
7 α / β -HC	7 α / β -hydroxycholesterol	7 α / β -hydroxycholesterol
7-KC	7-ketocholesterol	7-ketocholesterol
7 α / β -OOHC	7 α / β -hydroperoxycholesterol	7 α / β -hydroperoxycholesterol
11 β -HSD1	11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1	11 β -hydroxysteroid dehydrogenáza 1. typu
20-HC	20-hydroxycholesterol	20-hydroxycholesterol
24-HC	24-hydroxycholesterol	24-hydroxycholesterol
25-HC	25-hydroxycholesterol	25-hydroxycholesterol
27-HC	27-hydroxycholesterol	27-hydroxycholesterol
ABC	ATP binding cassette	transportní protein/pumpa ABC
ACAT	acetyl-coenzyme A cholesterol acetyltransferase	acetyl-koenzym A cholesterol acetyltransferáza
AEBS	anti-estrogen binding site	vazebné místo pro antie-strogeny
AF1/2	activation function (domain) 1/2	aktivační funkční (doména) 1/2
AI	aromatase inhibitors	inhibitory aromatázy
AKT	kinase, also known as PKB	kináza známá také jako PKB
BRCA1/2	breast cancer 1/2	proteiny spojované s dědičnou formou karcinomu prsu, tumor supresorové proteiny
CAF	cyclophosphamide, doxorubicin fluorouracil	cyklofosfamid, doxorubicin, fluorouracil
cAMP	cyclic adenosine monophosphate	cyklický adenosin monofosfát
cDNA	complementary DNA	komplementární DNA
CEF	cyclophosphamide, epirubicin, fluorouracil	cyklofosfamid, epirubicin, fluorouracil
COP II	coat protein II vesicles	plášťový protein transportních váček
CT	cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol	cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol
CYP	cytochrom P450	cytochrom P450
Cq	quantification cycle, also known as Ct (treshold cycle)	cyklus qPCR reakce, při kterém fluorescence vzroste nad prahovou hodnotu (treshold)
DBD	DNA binding domain	DNA vazebná doména
DCIS	ductal carcinoma <i>in situ</i>	duktální karcinom <i>in situ</i>
DES	diethylstilbestrole	diethylstilbestrol
dNTP	deoxynucleotide	deoxynukleotid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	kyselina ethylendiamintetraoctová
EMT	epithelial-mesenchymal transition	epitelo-mezenchymální tranzice
ER	estrogen receptor	estrogenový receptor
ERE	estrogen response element	sekvence DNA vázající ER
ERK	extracellular signal-regulated kinase	kináza regulovaná extracelulárními signály
ERKO	ER knock-out	myši s vyřazeným genem pro ER
ESR1/2	estrogen receptor 1/2	gen kódující ER 1/2
FDA	Food and Drug Administration	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FSH	follicle-stimulating hormone	folikuly stimulující hormon

gDNA	genome DNA	genomová DNA
GnRH	gonadotropin releasing hormone	gonadotropin uvolňující hormon
GSK3β	glycogen synthase kinase 3β	glykogen syntáza kináza 3β
H1 – 12	helix 1 – 12	helix 1 – 12
Hh / Shh	hedgehog/sonic hedgehog	signální molekula Shh buněčné dráhy ovlivňující především buněčný růst
HER1/2	human epidermal growth factor receptor 1/2	receptor 1/2 pro lidský epidermální růstový faktor
HDL	high density lipoprotein	lipoprotein s vysokou hustotou
HMG-CoAS	3-hydroxy-3methylglutaryl-CoA synthase	3-hydroxy-3methylglutaryl-CoA syntáza
HMG-CoAR	3-hydroxy-3methylglutaryl-CoA reductase	3-hydroxy-3methylglutaryl-CoA reductáza
HR	hormonal receptor	hormonální receptor
Ch25h	cholesterol-25-hydroxylase	cholesterol-25-hydroxyláza
IDCA	invasive ductal carcinoma	invazivní duktální karcinom
ILCA	invasive lobular carcinoma	invazivní lobulární karcinom
Insig	insulin-induced gene	insulinem indukovaný gen
IGFR	insulin-like growth factor receptor	receptor pro insulinu podobný růstový faktor
JNK	c-Jun N-terminal protein kinase	c-Jun N-terminální proteinkináza
LBD	ligand binding domain	ligand vazebná doména
LCAT	lecitin cholesterol acyltransferase	lecitin cholesterol acyltransferáza
LCIS	lobular carcinoma <i>in situ</i>	lobulární karcinom <i>in situ</i>
LDL	low density lipoprotein	lipoprotein s nízkou hustotou
LH	luteinizing hormone	luteinizační hormon
LHRH	luteinising-hormone releasing hormone	hormon uvolňující luteinizační hormon
LXR	liver X receptor	jaterní receptor X
MAPK	mitogen activated protein kinase	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MBTPS 1/2	membrane-bound transcription factor peptidase, site 1/2	membránově vázaná peptidáza 1/2 transkripčního faktoru
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
mTOR	mammalian target of rapamicin	významná proteinkináza, součást řady významných buněčných kaskád
NCOA	nuclear receptor coactivator	koaktivátor jaderných receptorů
NCOR	nuclear receptor corepressor	korepresor jaderných receptorů
NFW	nuclease-free water	voda bez přítomnosti nukleáz
NR	nuclear receptor	jaderný receptor
OS	ovarial supressors	ovariální supresory
OSBP	oxysterol-binding proteins	oxysterol-vazebný protein
OSBPL	OSBP-like protein	proteiny podobné OSBP
ORP	OSBP-related proteins	proteiny příbuzné s OSBP
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	protein účastnící se replikace DNA, souvisí tedy s buněčnou proliferací
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce

PI3K	phosphatidylinositol-4,5- -bisphosphate 3-kinase	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát 3-kináza
PKB	protein kinase B	protein kináza B
PKC	protein kinase C	protein kináza C
PR	progesterone receptor	progesteronový receptor
PTEN	phosphatase and tensin homolog	fosfatáza a homolog tensinu
rRNA	ribosomal RNA	ribozomální RNA
RXR	retinoid X receptor	retinoidní X receptor
S1/2P	site 1/2 protease, see also MBTPS	viz. MBTPS
SAG	smoothened antagonist	antagonista proteinu smoothened
SCAP	SREBP cleavage activating protein	protein aktivující štěpení SREBP
SERD	selective estrogen receptor downregulators	selectivní downregulátory estrogenových receptorů - způsobují vyšší degradaci ER
SERM	selective estrogen receptor modulators	selektivní modulátory estrogenových receptorů
SREBP	sterol regulatory element- -binding protein	transkripční faktor ovlivňující hladinu sterolů v buňce
SSD	sterol-sensing domain	doména citlivá na přítomnost sterolů
SULT	sulfotransferase	sulfotransferáza
TAC	docetaxel, doxorubicin, cyclophosphamide	docetaxel, doxorubicin, cyklofosfamid
TE	tris-EDTA (buffer)	tris-EDTA pufr
TBE	tris-borate-EDTA (buffer)	tris-borát-EDTA pufr
TTP	time to progression	doba do progresu onemocnění
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane	tris(hydroxymethyl)aminomethan
VAP-A	vesicle-associated membrane protein-associated protein A	membránový protein související s váčkovým transportem
VLDL	very low density lipoprotein	lipoprotein s velmi nízkou hustotou
qPCR	quantitative PCR	kvantitativní PCR
Wnt	Wingless/Int-1	signální molekula Wnt signalizační kaskády, nazvána podle pozorovaného fenotypu u <i>D. melanogaster</i>

Seznam zkratk všech studovaných genů se nachází v Tabulce 9, Kapitola 4.7.

1 Úvod

Karcinom prsu je nejčastějším nádorovým onemocněním postihujícím ženy, kterým ročně onemocní více než 1,5 milionu žen na celém světě. Díky včasnému záchytu onemocnění je sice mortalita výrazně nižší než incidence, přesto tomuto onemocnění podlehne asi půl milionu pacientek každý rok. Terapie prsu zahrnuje stejné přístupy jako řada jiných karcinomů – součástí je chirurgické odstranění nádoru a následná chemoterapie či radioterapie, jež má za úkol zbavit tělo zbývajících nádorových buněk; z modernějších přístupů je možno u některých pacientek indikovat léčbu monoklonální protilátkou Herceptin. Protože je ale karcinom prsu nádorem senzitivním na přítomnost hormonů, je u karcinomů, které exprimují estrogenový (ER) a/nebo progesteronový receptor (PR), součástí terapie také aplikace hormonálních terapeutik.

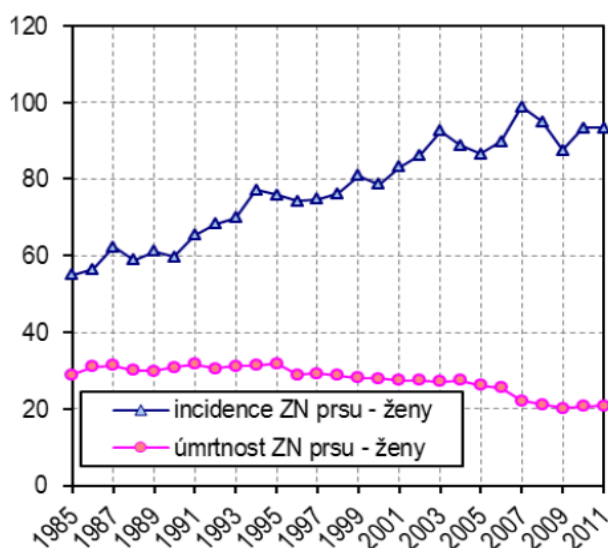
Limitujícím faktorem hormonální léčby je ovšem rezistence. Některé pacientky navzdory přítomným hormonálním receptorům na hormonální terapii nereagují, u jiných se tato rezistence vyvine v čase. Je známo několik možných důvodů vzniku této rezistence, přesný mechanismus ovšem v současné době není znám. Některé současné studie naznačují, že jednou z možných příčin vzniku rezistence by mohly být oxysteroly – deriváty cholesterolu. Oxysteroly mohou interferovat s účinky hormonální terapie, vázat se na stejná místa v buňce jako hormonální léky a ovlivňovat tak jejich výsledný účinek.

Tato diplomová práce je pilotní studií, která má za úkol především studium genové exprese faktorů, které jsou součástí dráhy působení oxysterolů, metabolismu a transportu oxysterolů a také některých členů signálních drah, které mohou být přítomností oxysterolů ovlivněny. Výsledkem práce bude nalezení genů, jejichž exprese je výrazně změněná u ER pozitivních nádorů karcinomu prsu oproti ER negativním a dále stanovení jejich prognostického významu asociací jejich transkripčních hladin s klinicko-patologickými daty pacientek. Cílem práce je identifikace případných kandidátních genů pro další analýzy, jež by mohly vést k vytvoření nových diagnostických markerů, které by napomohly cílenější terapii tohoto nádorového onemocnění.

2 Přehled literatury

2.1 Karcinom prsu

Karcinom prsu je nejčastějším nádorovým onemocněním u žen, celkově potom druhým nejčastěji se vyskytujícím karcinomem. Za rok 2012 celosvětově onemocnělo tímto typem nádoru více než 1,67 milionu žen (25 % z celkového počtu nádorů) a více než 522 000 žen tomuto onemocnění podlelo (GLOBOCAN 2012). V České republice se během roku 2011 objevilo 6620 nových případů (16,2 % celkového počtu nádorů) a 1725 žen v důsledku karcinomu prsu zemřelo (ÚZIS ČR). Díky zavedení celostátního screeningového programu dochází k diagnostice tohoto typu nádoru v časnějších stádiích nemoci, která jsou lépe léčitelná, což se odráží také na snižování úmrtnosti (viz Obr. 1). Ovšem i přesto je úmrtí v důsledku karcinomu prsu stále pátým nejčastějším ze všech nádorových onemocnění (ÚZIS ČR).



Obr. 1: Incidence a úmrtnost zhoubného nádoru prsu v ČR. Data pro roky 1985 – 2011. Díky zavedenému screeningu a odhalování nemoci v časnějších stádiích dochází ke snižování mortality. Na svislé ose jsou počty případů v tisících. Převzato z ÚZIS ČR.

Přibližně 5 - 10 % karcinomů prsu vzniká jako dědičná forma v důsledku mutace, nejčastěji v genech *BRCA1* nebo *BRCA2*, ostatní případy jsou sporadické (Carroll et al., 2008). Stejně jako u jiných typů nádorových onemocnění může na vznik onemocnění mít vliv nezdravý životní styl, jako například nadměrná konzumace alkoholu či kouření. Karcinom prsu patří mezi hormonálně závislé nádory. Z tohoto důvodu ovlivňují pravděpodobnost vzniku také další faktory, jakými jsou například časnější nástup menstruace či menopauza

v pozdějším věku – tedy celkově delší vystavení organismu hormonu estrogeneru. Nejčastější je výskyt karcinomu prsu u postmenopauzálních žen, naopak v mladém věku se vyskytuje spíše výjimečně. K významnému nárůstu diagnostikovaných karcinomů prsu dochází u žen po 40. roce života, přičemž s narůstajícím věkem dochází k dalšímu zvýšení (Eheman et al., 2009).

2.1.1 Klasifikace karcinomu prsu

Toto rozdělení pomáhá v klinické praxi pro navržení takové terapie, která bude pro danou pacientku nejvhodnější. Kritéria sloužící ke klasifikaci nádorů dále mohou sloužit jako prognostické či prediktivní faktory. Mezi kritéria hodnocená u nádorů prsu patří především typ nádoru, stupeň diferenciac (grade) a stádium (stage), a dále také exprese proteinů jako je estrogenový receptor, progesteronový receptor, receptor HER2/neu či marker proliferace Ki67.

Histopatologický typ nádoru klasifikujeme podle jeho původu (nejčastěji duktální, či lobulární) a dále na karcinomy *in situ* (DCIS a LCIS – duktální a lobulární karcinom *in situ*) a karcinomy invazivní (IDCA a ILCA – invazivní duktální/lobulární karcinom). Duktální karcinomy, ať už *in situ*, či invazivní formy vykazují významně vyšší incidenci, než karcinomy lobulární, nebo karcinomy smíšené - duktálně-lobulární (Eheman et al., 2009).

Grade vyjadřuje stupeň diferenciac nádorových buněk. Hodnotí se pomocí tzv. Nottinghamské klasifikace podle tří kritérií – formování tubulů, jaderného pleomorfismu a počtu mitóz (Elston and Ellis, 1991). Každé z těchto kritérií je ohodnoceno body (1 – 3), přičemž jejich součet nám udává výsledný stupeň diferenciac. Zjednodušeně je možno říci, že čím více se nádorové buňky podobají těm zdravým, tím jsou diferencovanější a tím nižší bude také grade příslušného nádoru. Pokud je více než 75 % tumoru tvořeno tubulárními strukturami, hodnotíme 1 bodem. Pokud se jedná o 10 – 75 %, hodnotíme 2 body a 3 body znamenají méně než 10 % tumoru tvořeného tubuly. Změny ve tvaru jader hodnotíme následovně – 1 bod pro malá nebo jen trochu zvětšená jádra s uniformním chromatinem, 2 body pro větší buňky s vezikulárními jádry a viditelnými jadérky a 3 body pro velká a bizarní jádra. Mitotické figury jsou počítány minimálně v deseti polích, přičemž konkrétní bodové ohodnocení se liší dle velikosti jednotlivých polí v mm² v závislosti na typu mikroskopu a jeho zvětšení (Elston and Ellis, 1991). Výsledný grading nádoru je následně hodnocen podle Tabulky 1. Mezi stupněm diferenciac nádoru a prognózou pacienta je významná korelace. Pacientky s nižším grade vykazují jak delší bezpříznakové, tak i celkové přežívání (Elston and Ellis, 1991).

3 - 5 bodů	G1	dobře diferencované buňky
6 - 7 bodů	G2	částečně diferencované buňky
7 - 9 bodů	G3	špatně diferencované buňky

Tabulka 1: Vyhodnocení stupně diferenciace nádoru podle Nottinghamské klasifikace. Po sečtení bodů z dílčích kritérií získáme grade (G) nádoru. Upraveno podle Elston and Ellis (1991).

Stage neboli stádium nádoru je v současnosti hodnoceno pomocí tzv. TNM klasifikace, ve které je hodnocena jednak velikost nádoru (T – tumor size), přítomnost metastáz v mízních uzlinách (N – nodal status) a existence vzdálených metastáz jinde v těle pacientky (M – metastasis). Aktuální kritéria TNM klasifikace jsou uvedena v Tabulce 2.

T	TX	primární nádor nelze hodnotit
	T0	bez známek primárního nádoru
	Tis	karcinom <i>in situ</i>
	T1	nádor do 2 cm v největším rozměru
	T2	nádor větší než 2, ale menší než 5 cm v největším rozměru
	T3	nádor větší než 5 cm v největším rozměru
	T4	nádor jakékoli velikosti s přímým šířením do stěny hrudní a/nebo do kůže
N	NX	regionální mízní uzliny nelze hodnotit
	N0	regionální mízní uzliny bez metastáz
	N1	metastázy v pohyblivé stejnostranné axilární mízní uzlině
	N2	klinicky fixované metastázy ve stejnostranné uzlině nebo metastázy zřejmé v stejnostranné vnitřní mamární uzlině bez přítomnosti metastáz v axilárních uzlinách
	N3	metastázy v mízní uzlině pod nebo nad klíční kostí, nebo současný výskyt metastáz v axilární a vnitřní mamární uzlině
M	MX	vzdálené metastázy nelze hodnotit
	M0	bez vzdálených metastáz
	M1	vzdálené metastázy

Tabulka 2: Kritéria TNM klasifikace. Upraveno podle Sobin et al. (2011).

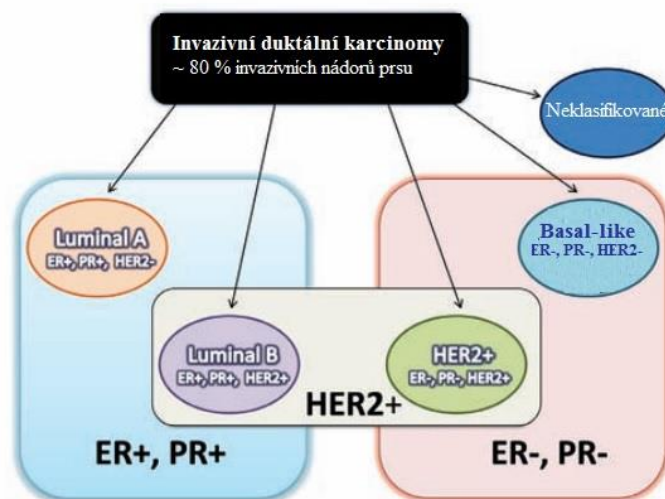
Následné vyhodnocení konkrétního stage (stádia) vyplývá z konkrétní kombinace velikosti nádoru, zasažení mízních uzlin a přítomnosti vzdálených metastáz (viz Tabulka 3).

Stage	T	N	M
S0	Tis	N0	M0
SIA	T1	N0	M0
SIB	T0, T1	N1mi	M0
SIIA	T0, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
SIIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
SIIIA	T0, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
SIIBB	T4	N0, N1, N2	M0
SIIC	jakékoli T	N3	M0
SIV	jakékoli T	jakékoli N	M1

Tabulka 3: Rozdělení stádií karcinomu, tzv. stageing. N1mi – mikrometastázy (0,2 – 2 mm v největším rozměru).

Upraveno podle Sobin et al. (2011).

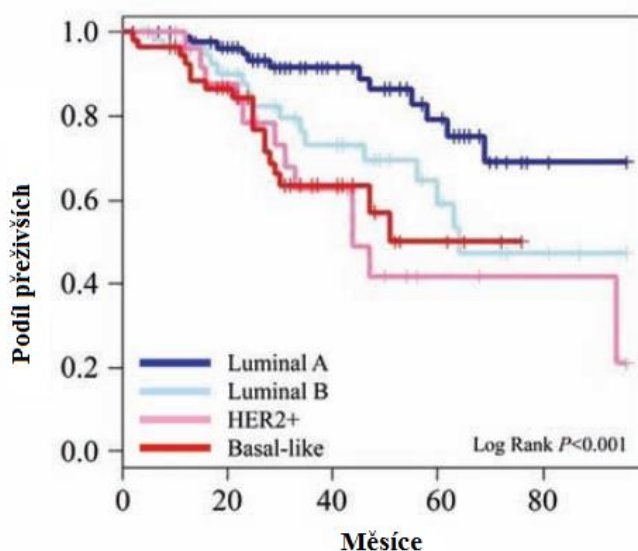
Dalším hodnoceným kritériem, které napomáhá s výběrem terapie a je zároveň prognostickým a prediktivním faktorem, je exprese některých receptorových proteinů a proteinu Ki67. Mezi hodnocené receptorové proteiny patří estrogenový receptor α (ER), progesteronový receptor (PR) a receptor 2 pro lidský epidermální růstový faktor (ERBB2, či také HER2/neu). Podle přítomnosti těchto receptorů v nádorových buňkách jsou tumory rozděleny na pozitivní (ER+, PR+, HER2+), či negativní (ER-, PR-, HER2-). Rozdělení nádorů podle exprese příslušných receptorů lépe popisuje tzv. molekulární klasifikace karcinomů prsu, která je znázorněna na Obr. 2.



Obr. 2: Rozdělení invazivních duktálních karcinomů na molekulární subtypy. Novější molekulární klasifikace dělí karcinomy podle exprese příslušných receptorů. Nejčastějšími subtypy jsou luminal A, luminal B, HER2+ a basal-like, ostatní jsou zahrnuty ve skupině neklasifikovaných, do které spadají typy jako normal breast-like, či luminální typ C.

Upraveno podle Sandhu et al. (2010).

Tumory exprimující receptory ER a PR jsou označovány jako lumenální typ (luminal A, luminal B). Pokud je současně exprimován také receptor HER2, jedná se o lumenální typ B, v opačném případě jde o lumenální typ A. Nádory bez ER a PR, v nichž je přítomný pouze HER2 receptor, se označují jako HER2+. Nádory bez exprese všech tří receptorů jsou nazývány triple-negative nebo také basal-like, jsou obecně agresivnější a mají nejhorší prognózu (Dent et al., 2007), a to zejména v počátečních měsících vývoje onemocnění, jak je znázorněno na Obr. 3.



Obr. 3: Kaplan-Meierův graf přežití podle molekulárního subtypu invazivních duktálních karcinomů. Z grafu je patrné, že nejvyšší šanci na přežití mají pacientky s lumenálním typem A, tedy ER+, PR+, HER2-. Nejhorší přežití v počátečních měsících onemocnění vykazují pacientky s basal-like typem karcinomu, v pozdějších stádiích jsou to potom pacientky s HER2+ typem. Upraveno podle Sandhu et al. (2010).

Popisu funkce a významu receptorových proteinů, zejména ER, je v této diplomové práci věnována samostatná kapitola. Protein Ki67 je jaderný protein, který úzce souvisí s proliferací a je detekován právě v proliferujících buňkách. Jeho exprese je u invazivních karcinomů prsu spjata s přítomností metastáz v lymfatických uzlinách (Yin et al., 2014). Bývá také nazýván jako marker proliferace.

2.1.2 Terapie karcinomu prsu

V léčbě karcinomu prsu je uplatňován multimodální přístup, jsou zde využity všechny typy terapií běžně používané v boji s nádorovými chorobami. Součástí konzervativní léčby je chirurgické odstranění nádoru. Toto odstranění může být různého rozsahu – odstraněna může být pouze nádorová masa (lumpektomie), část prsu (kvadrantektomie, parciální mastektomie), či kompletně celá prsní tkáň (úplná mastektomie). Spolu s nádorem bývá odstraněna také

jedna či několik podpažních mízních uzlin v blízkosti nádoru. Vyšetření nejbližší (sentinelové) uzliny je standardní praxí u žen s invazivní formou karcinomu prsu. Zjištění přítomnosti či nepřítomnosti metastáz v uzlinách je součástí určení stupně (stagingu) nádoru – TNM klasifikace.

Po operačním zákroku následuje léčba pomocí radioterapie a/nebo chemoterapie. Léčba karcinomu prsu chemoterapeutiky zahrnuje obvykle kombinaci několika druhů cytostatik, tzv. polychemoterapie. Její součástí bývá některý z anthracyklinů (doxorubicin, epirubicin). Takovou kombinací chemoterapeutik je například cyklofosfamid, doxorubicin a fluorouracil (CAF), či cyklofosfamid, epirubicin a fluorouracil (CEF). Ke zlepšení výsledků chemoterapie přispělo také užití jiného typu cytostatik – taxanů (paclitaxel, docetaxel) (Henderson et al., 2003). Příkladem polychemoterapie zahrnující taxany je léčebný režim TAC (docetaxel, doxorubicin, cyklofosfamid). Chemoterapie bývá užívána jako léčba adjuvantní (po chirurgickém zákroku, k likvidaci reziduálních nádorových buněk), neoadjuvantní (před samotným zákrokem, ke zmenšení nádoru, který bude následně operabilní) i paliativní (ke zmírnění projevů nemoci u pacientů v generalizovaném stádiu).

Součástí adjuvantní terapie dále může být využití cílené léčby monoklonálními protilátkami. Takovouto protilátkou je Herceptin (trastuzumab), který je namířen specificky proti receptoru 2 pro epidermální růstový faktor - HER2/neu. Navázáním protilátky na doménu IV HER2 receptoru (Cho et al., 2003) dochází k narušení jeho signalizace ve směru buněčné proliferace. Tuto protilátku není možno využít u pacientek, jejichž nádorové buňky exprimují nízké nebo žádné hladiny proteinu HER2/neu. Indikace Herceptinu současně s chemoterapií u pacientek s metastatickým karcinomem prsu zajistí mj. delší přežívání pacientek a snížení rizika úmrtí o 20 % (Slamon et al., 2001)

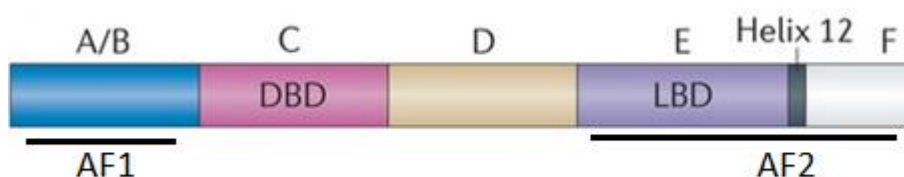
Terapie karcinomu prsu zahrnuje v neposlední řadě také léčbu hormonální. Její indikace závisí na tom, zda nádor exprimuje hormonální receptory – estrogenový (ER) a progesteronový (PR). Hormonální terapie zahrnuje několik možností léčby, kterými jsou například inhibitory aromatázy (anastrozol, letrozol), či selektivní modulátory estrogenových receptorů - tzv. SERMs (tamoxifen, raloxifen).

2.2 Estrogenové receptory a hormonální terapie

V současné době jsou známy dva typy estrogenových receptorů – ER α a ER β . Oba proteiny jsou kódovány unikátními geny – protein ER α je kódován genem *ESR1* lokalizovaným na chromozomu 6, protein ER β potom genem *ESR2* na chromozomu 14. Zatímco estrogenový receptor α patří mezi diagnostické faktory běžně sledované v klinické praxi, estrogenový receptor β je stále předmětem řady studií a jeho význam v karcinomu prsu dosud není zcela zřejmý (podrobněji popsáno v bakalářské práci: Kloudová, 2013). Tato práce se proto bude dále zabývat receptorem α (dále jen ER).

2.2.1 Struktura a funkce ER

ER je součástí rodiny jaderných receptorů, jejichž ligandem je steroidní hormon, který může procházet přes cytoplazmatickou membránu. ER má typickou konzervativní strukturu (viz Obr. 4). N-koncová část proteinu představuje aktivační funkční doménu 1 (AF1), ta je následována DNA vazebnou doménou (DBD) a doménou spojovací. Na C-koncové části proteinu je potom aktivační funkční doména 2 (AF2), jejíž součástí je ligand vazebná doména (LBD).



Obr. 4: Struktura ER. Protein ER můžeme rozdělit na strukturní domény (A – F) a funkční domény. AF1 doména odpovídá doménám A a B. Doména C slouží jako DNA vazebná doména, doména D je spojovací, domény E a F odpovídají doméně AF2, jejíž součástí je ligand vazebná doména. Upraveno podle Kojetín and Burris (2014).

Aktivace transkripce prostřednictvím ER může být zprostředkována navázáním ligandu do LBD proteinu. Tuto aktivaci zprostředkovává doména AF2, jejíž součástí je právě LBD. Ligand vazebná doména proteinu ER stejně jako ostatních jaderných receptorů obsahuje 12 alfa-helixů (H1 – H12), které jsou klíčové pro změnu konformace receptoru. V přítomnosti ligandu dochází k uvolnění heat-shock proteinů z ER, k navázání ligandu na LBD a dimerizaci ER. Helixy společně vytváří hydrofobní dutinu receptoru, do které se molekula estrogenu váže (Brzozowski et al., 1997). Pro vazbu dalších koaktivátorů jsou významné aminokyselinové zbytky zejména na H3, H5 a H12, které vytvoří hydrofobní vazebné místo, s nímž mohou koaktivátory interagovat prostřednictvím LxxLL motivu (Mak et al., 1999). Tento tzv. NR box (nuclear receptor box) motiv je tvořen třemi leuciny - L

a dvěma libovolnými aminokyselinami – x (Heery et al., 1997). Po vazbě koaktivátorů (NCOA – nuclear receptor coactivator), případně korepresorů (NCOR – nuclear receptor corepressor) dochází k interakci ER s DNA, tvorbě preiniciačního komplexu a zahájení transkripce příslušného genu. Interakce s DNA může být jak přímá, tak zprostředkovaná dalšími adaptorovými proteiny.

Protein ER může být dále aktivován také bez přítomnosti ligandu – tzv. ligand-nezávislou aktivací, kterou zprostředkovává aktivační funkční doména 1 (AF1). Tato aktivace vyžaduje fosforylaci proteinu ER na serinovém zbytku v pozici 118 (Kato et al., 1995) a 167 (Joel et al., 1998), kterou zajišťuje signální dráha Ras – MAPK. Tento způsob aktivace ER může přispívat k růstu nádorových buněk, které jsou na hladině estrogenu nezávislé (Coutts and Murphy, 1998).

V neposlední řadě se ER mohou účastnit buněčných dějů také skrze tzv. rychlou cytoplazmatickou signalizaci, při které proteiny ER ovlivňují řadu klíčových signálních drah buňky. V tomto případě se nejedná o působení ER skrze zahájení genové exprese, neboť k buněčné odpovědi na estrogen dochází v rámci několika sekund. Již v 60. a 70. letech minulého století bylo prokázáno, že působení estrogenu dokáže zvýšit hladinu cAMP již během 15 sekund (Szego and Davis, 1967), či ovlivnit hladinu vápníku v buňkách během 150 sekund (Pietras and Szego, 1975). Rychlou cytoplazmatickou odpověď mají na svědomí ER, které jsou lokalizované na buněčné membráně. K membránové lokalizaci a negenomické signalizaci ER je zapotřebí palmitoylace cysteinového zbytku ER v pozici 447 (Acconcia et al., 2005). Tento fakt potvrdil také Pedram et al. (2007), který prokázal, že ER lokalizovaný v jádře není palmitoylovaný. Zároveň také zjistil, že kromě Cys-447 jsou pro membránovou lokalizaci ER významné i další přilehlé aminokyseliny.

2.2.2 Estrogenové receptory a karcinom prsu

Působení hormonu estrogenu skrze ER hraje řadu významných fyziologických rolí v průběhu vývoje i života jedince. Estrogen je důležitý nejen pro správný pohlavní vývoj a funkci reprodukčního traktu, ale hraje roli také v systému kardiovaskulárním, skeletálním, centrálním nervovém či imunitním, a to jak u mužů, tak u žen. Mezi tkáně s expresí ER α patří především játra, děloha, prsní žláza, hypofýza, hypotalamus, čípek děložní a pochva (Couse et al., 1997). Pro studium funkce estrogenových receptorů jsou využívány myši bez exprese ER (ERKO – estrogen receptor knock-out). Tímto způsobem byl objasněn význam ER – dospělé ERKO myši mají hypoplastickou dělohu, jsou neplodné (Couse and Korach, 2001)

a v pubertálním období u nich nedochází k vývoji mléčné žlázy (Bocchinfuso and Korach, 1997).

Kromě vývoje a zajištění správné funkce řady tkání hraje exprese ER také velmi významnou roli u karcinomu prsu. První souvislost mezi působením estrogeneru a nádorem prsu byla pozorována již koncem 19. století, kdy chirurgické odstranění vaječníků pacientky vedlo k regresi jejího nádoru (Beatson, 1896). Imunohistochemická detekce ER v nádorech patří v současné době k běžné praxi. Na základě této detekce jsou pacientky rozděleny na tzv. ER pozitivní a ER negativní. Více než 70 % karcinomů prsu je ER pozitivních a mají obecně lepší prognózu. ER pozitivním pacientkám je indikována hormonální terapie, která je u ER negativních pacientek naopak neúčinná.

Hormonální terapie spočívá v léčbě pacientky takovou látkou, která působí proti aktivitě ER. Estrogenové receptory jsou díky ovlivnění řady signálních kaskád zapojeny do vývoje a progresu karcinomu prsu. Aktivace proteinu ER vede ke zvýšení proliferační aktivity buněk. Toto zjištění do dnešní doby potvrdila řada studií. Důkazem takového zvýšení prostřednictvím ER je kupříkladu snížená exprese proteinů p53 a p21 či zvýšení exprese proteinů jako PCNA (proliferating cell nuclear antigen) nebo Ki67 (Liao et al., 2014). Dalším buněčným dějem, který je ovlivněn aktivitou ER, je buněčná migrace. Signalizace skrze ER může ovlivňovat tzv. epitelo-mezenchymální tranzici (EMT). Tento děj je nezbytný pro nádorovou invazivitu, pokud buňka projde EMT, může následně migrovat krevním řečištěm a tvořit základ pro tvorbu vzdálených metastáz. Studie na buněčných liniích karcinomu prsu ukazují, že ER signalizace hraje v EMT a následné buněčné invazivitě svou roli (Planas-Silva and Waltz, 2007; Sanchez et al., 2010; Sun et al., 2014).

2.2.3 Hormonální terapie

Všechna léčiva podaná v rámci hormonální terapie mají stejný cíl – zablokovat působení estrogeneru prostřednictvím ER a tím inhibovat nádorový růst a invazivitu. Mohou být využita jako terapie neoadjuvantní, adjuvantní i paliativní. Hormonální terapeutika můžeme rozdělit do několika skupin – inhibitory aromatázy, selektivní modulátory estrogenových receptorů (SERMs), selektivní downregulátory estrogenových receptorů (SERDs) či ovariální supresory (OS).

2.2.3.1 SERMs

Nejčastěji skloňovanými terapeutiky v souvislosti s hormonální léčbou karcinomu prsu jsou tzv. selektivní modulátory estrogenových receptorů (SERMs, selective estrogen receptor modulators). Jsou to látky nesteroidní povahy, které jsou schopny vázat se na ER a ovlivňovat jejich aktivitu. Estrogenové receptory jsou tímto mezi steroidními receptory unikátní – jejich promiskuitu ve vazbě různých substrátů umožňuje fakt, že dutina pro vazbu ligandu ve LBD je téměř dvakrát větší, než je molekulový objem samotného estrogenu (Brzozowski et al., 1997).

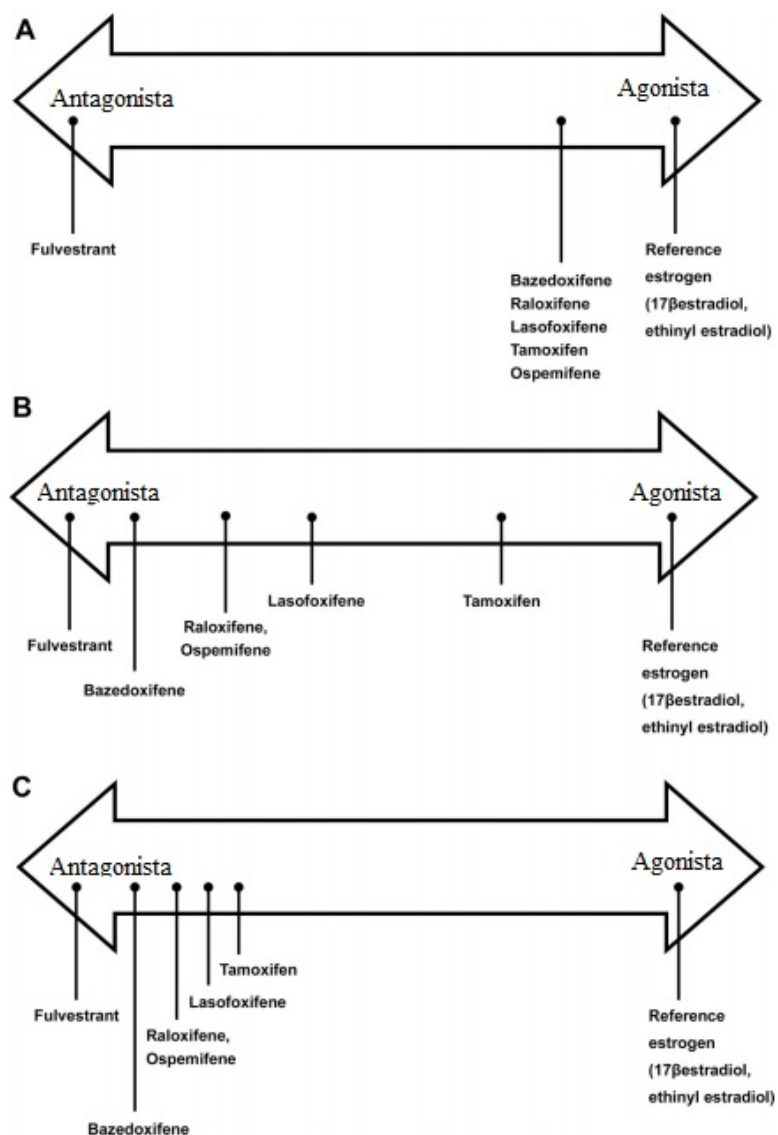
Různé SERMs přitom mohou mít na estrogenové receptory odlišný účinek. Vazba různých ligandů na ER může indukovat rozdílné konformace ER (McDonnell et al., 1995) a tím i vazbu rozdílných koaktivátorů či korepresorů. Ligandy mohou působit jak agonisticky, tak antagonisticky – ve směru, či proti směru působení receptorového proteinu v buňkách. V situaci, kdy se k ER proteinu váže estradiol či agonisticky působící diethylstilbestrol (DES), helix 12 v LBD je lokalizován přes ligand-vazebnou dutinu proteinu, AF2 doména může vázat koaktivátory a může být zahájena transkripce (Brzozowski et al., 1997; Shiau et al., 1998). Pokud se ale ER váže s antagonistickými selektivními modulátory ER, jako je raloxifen (Brzozowski et al., 1997) či 4-hydroxytamoxifen (Shiau et al., 1998), H12 je umístěn v hydrofobním žlábků tvořeném helixy H3 a H5, přičemž tak zakrývá interakční místo pro vazbu koaktivátorů a brání jejich navázání.

Mezi SERMs užívané v terapii nádorů prsu patří tamoxifen a raloxifen. Existuje ale i řada dalších selektivních modulátorů, které jsou klinicky využívány kupříkladu v souvislosti s terapií osteoporózy. Mezi takové SERMs patří bazedoxifen, lasofoxifen, droloxifen, idoxifen, ormeloxifen, ospemifen či arzoxifen.

V léčbě karcinomu prsu je nejznámějším SERM tamoxifen. Předpoklady jeho využití v terapii karcinomu prsu se začaly objevovat v 70. letech minulého století, v roce 1977 byl potom schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv - FDA (Food and Drug Administration) pro léčbu karcinomu prsu (FDA). Tamoxifen se v boji s karcinomem prsu užívá až do současnosti, a to u pacientek s ER pozitivními nádory prsu a jako prevence u žen s vysokým rizikem vzniku tohoto nádoru. Využívá se jak u žen před menopauzou, tak i u postmenopauzálních pacientek. Studie zahrnující 13 388 žen se zvýšeným rizikem karcinomu prsu prokázala, že tamoxifen (20 mg/den) snižuje riziko výskytu invazivního karcinomu prsu o 49 % oproti placebo (Fisher et al., 1998). Meta-analýza z roku 2011

ukazuje, že 5 let adjuvantní léčby tamoxifenem snižuje riziko návratu nemoci v průběhu 10 let o polovinu, o třetinu je potom sníženo riziko úmrtí v důsledku karcinomu prsu během 15 let (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative et al., 2011). Jeho efekt na prevenci návratu karcinomu prsu u pacientek spočívá nejen v blokování buněčné proliferace prostřednictvím ER aktivace, ale také v blokování EMT a buněčné motility (Planas-Silva and Waltz, 2007).

Účinek selektivních modulátorů ER je ovšem tkáňově specifický, přičemž v jednom typu tkáně se SERM může chovat zcela antagonisticky, v jiné tkáni potom jako částečný agonista, jak je znázorněno na Obr. 5. Léčba tamoxifenem tedy pomáhá pacientkám v terapii karcinomu prsu, ovšem v endometriální tkáni se tamoxifen chová více agonisticky, a může tak způsobovat endometriální hyperplázii a zvyšovat riziko vzniku karcinomu endometria (Fisher et al., 1994). Riziko vzniku invazivního karcinomu endometria je přitom 2,5 krát vyšší oproti pacientkám s placebem (Fisher et al., 1998), v jiné studii byl ovšem ve skupině léčené tamoxifenem dokonce 7 krát zvýšený výskyt karcinomu endometria oproti skupině beroucí placebo (Fisher et al., 1994). Review zahrnující 106 studií zabývajících se patologiemi endometria ve vztahu k užívání tamoxifenu dokládá, že v těchto studiích jsou endometriální hyperplasie, endometriální polypy a karcinom endometria častěji diagnostikovány u postmenopauzálních pacientek léčených tamoxifenem než u pacientek, které tento lék nedostávaly (Cohen, 2004). Pozitivní účinky tamoxifenu v léčbě karcinomu prsu ovšem tyto nežádoucí účinky převažují, a tak se tamoxifen stále užívá i v současnosti.



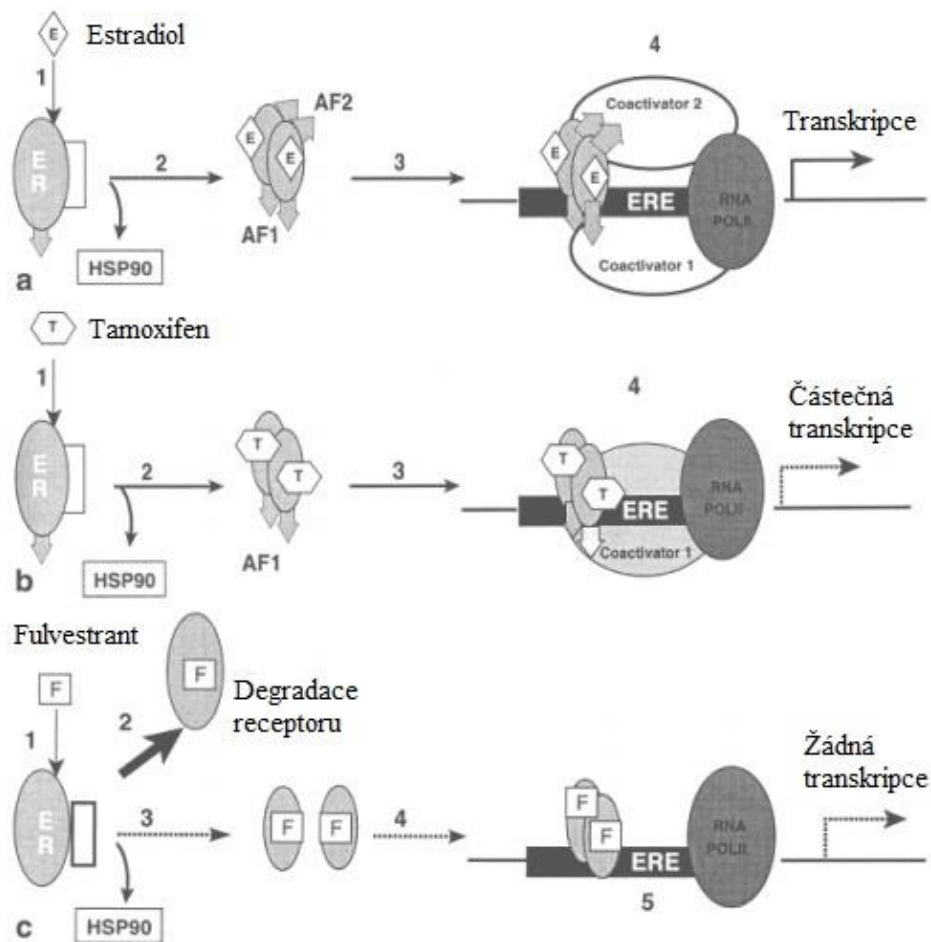
Obr. 5: Účinky selektivních modulátorů ER ve vybraných tkáních. Na obrázku je znázorněna aktivita estradiolu i SERMs v kostech (A), endometriu (B) a prsu (C). Různé SERMs mohou mít v každé z těchto tkání odlišné účinky. Tedy kupříkladu tamoxifen, který působí v prsní tkáni spíše antagonisticky, má v tkáni endometria více agonistickou funkci a může tak přispívat se vzniku karcinomu endometria. Upraveno podle Komm and Mirkin (2014).

Druhým SERM, který se užívá ke snížení rizika invazivního karcinomu prsu, ale také pro prevenci a léčbu osteoporózy u postmenopauzálních žen, je raloxifen. Studie zahrnující 7 705 postmenopauzálních žen prokázala, že v průběhu tříleté terapie raloxifenem dochází ke snížení rizika invazivního karcinomu prsu o 76 %. Podání raloxifenu pacientkám nezvyšovalo riziko vzniku endometriálního karcinomu, ovšem zvyšovalo riziko žilního tromboembolismu (Cummings et al., 1999).

2.2.3.2 SERDs

Skupina látek známá jako selektivní downregulátory estrogenových receptorů (SERDs) bývá někdy v literatuře spojována dohromady se selektivními modulátory ER, i když mají některé vlastnosti odlišné. Typickým zástupcem SERDs spojovaným s terapií karcinomu prsu je fulvestrant. Jedná se o látku steroidní povahy, která je na rozdíl od SERMs tzv. „čistým“ antiestrogenem (Wakeling and Bowler, 1992), tedy nepůsobí ani z části agonisticky na protein ER. Jak je možno vidět na Obr. 5, jeho agonistické a antagonistické působení se v různých typech tkání neliší, působí vždy antagonisticky. Fulvestrant je analogem molekuly estradiolu, který se váže k proteinu ER s vyšší afinitou než tamoxifen a také účinněji inhibuje buněčný růst (Wakeling and Bowler, 1992). Po vazbě SERDs a proteinu ER dochází k zablokování aktivity receptoru, ke snížení vazby ER na DNA, a to patrně blokováním dimerizace ER (Fawell et al., 1990), k narušení transportu ER z cytoplazmy do jádra (Dauvois et al., 1993) a ve výsledku ke zvýšené degradaci receptorového proteinu (Howell et al., 2000). Z tohoto efektu také vyplývá název této skupiny látek.

Fulvestrant je předepisován postmenopauzálním pacientkám s ER pozitivními tumory, které jsou již v pokročilém stádiu, nebo dokonce metastatické. Inhibuje růst buněk, a to jak prsní, tak endometriální tkáně (Howell et al., 2000). Studie na buněčných liniích a myších modelech ukazují, že fulvestrant dokáže efektivněji inhibovat aktivitu ER než tamoxifen (Osborne et al., 1995). Jeho výhodou oproti tamoxifenu je, že nemá ani částečnou agonistickou funkci, nespouští tedy vůbec genovou transkripci, jak popisuje Obr. 6. Tato částečná aktivita může být v případě léčby pomocí SERD příčinou selhání hormonální terapie u některých pacientek (DeFriend et al., 1994). Léčba fulvestrantem je možná také u některých nádorů, které si vyvinuly rezistenci na tamoxifen nebo inhibitory aromatázy (Howell et al., 1995; Perey et al., 2007).

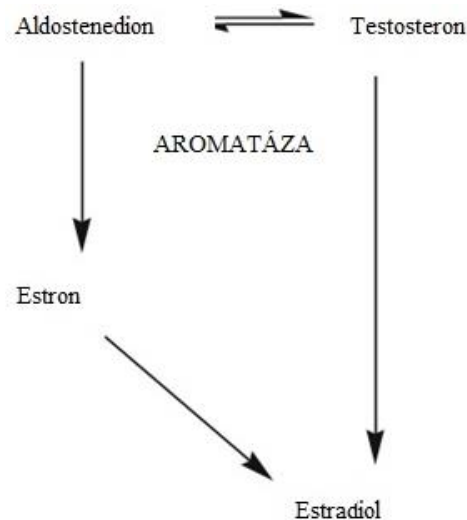


Obr. 6: Mechanismus působení estradiolu, tamoxifenu a fulvestrantu. V případě vazby estradiolu (E) na ER (obrázek a) dochází k oddělení chaperonových proteinů, dimerizaci receptoru, aktivaci domén AF1 i AF2 a vazbě koaktivátorů.

Proteinový dimer následně nasedá na příslušné místo na DNA – ERE (estrogen response element) a dochází k aktivaci transkripce. V případě vazby tamoxifenu (T) na ER (obrázek b) dochází ke sterickému bránění vazby některých koaktivátorů nutných pro úplnou funkci proteinu a doména AF2 není aktivována. Proteiny ER ovšem dimerizují a díky aktivitě domény AF1 dochází k částečné aktivaci genové transkripce. Odtud vyplývá částečná agonistická role tamoxifenu. V případě vazby fulvestrantu (F) na ER (obrázek c) nedochází k dimerizaci receptorů, ani k aktivaci transkripce, receptorové proteiny jsou naopak degradovány. Upraveno podle Howell et al. (2000).

2.2.3.3 Inhibitory aromatázy

Další z možností hormonální terapie jsou inhibitory aromatázy (AIs – aromatase inhibitors). Aromatáza je enzym z rodiny cytochrom P450, který zprostředkovává aromatizaci - konverzi androgenů na aromatické estrogény. Tento enzym se vyskytuje především v placentě a ovariích, ale také v játrech, svalech, tukové nebo prsní tkáni. V případě karcinomu prsu je v jeho bezprostředním okolí hladina aromatázy zvýšená (Bulun et al., 1993).



Obr. 7. Mechanismus působení aromatázy. Enzym aromatáza provádí tzv. aromatizaci androgenních hormonů za vzniku estrogenů. Je schopna konvertovat testosteron na estradiol, či androstenedion na estron, z něhož může rovněž vzniknout estradiol. Převzato z Dutta and Pant (2008).

K potlačení aktivity tohoto enzymu se využívá dvou typů inhibitorů – ty jsou buď steroidního, nebo nesteroidního charakteru a liší se mechanismem svého účinku. Steroidní AI jsou analogy nativního substrátu, se kterým soutěží o vazebné místo enzymu. Tento způsob inhibice je ireverzibilní. Inhibitory nesteroidní povahy váží železo v hemu cytochromu P450, čímž enzym inhibují reverzibilně. V současné době jsou v klinické praxi užívány inhibitory již tzv. třetí generace. Příkladem steroidního AI třetí generace je exemestan, u nesteroidních inhibitorů jsou to potom anastrozol a letrozol. Inhibitory třetí generace jsou specifitější a také účinnější než předchozí inhibitory, inhibice aromatizace je vyšší než 97 % (Geisler et al., 2002; Geisler et al., 1998).

Oproti tamoxifenu nemají inhibitory aromatázy ani částečně agonistickou funkci, nehrozí u nich tedy riziko spojené s tímto fenoménem. Studie porovnávající účinky anastrozolu a tamoxifenu ukázala, že anastrozol je podle řady kritérií stejně účinným terapeutikem jako tamoxifen. U pacientek léčených anastrozolem se navíc méně často vyskytuje tromboembolie či vaginální krvácení. Také tzv. doba do progresse onemocnění (TTP, time to progression) je u pacientek s anastrozolem prodloužená oproti ženám léčeným tamoxifinem (Nabholtz et al., 2000).

Léčba pomocí inhibitorů aromatázy je v klinické praxi indikovaná pouze ženám po menopauze. Terapie AI u premenopauzálních žen způsobí aktivaci hypotalamu a hypofýzy jako odpověď na sníženou hladinu estrogenu. Tato aktivace vede ke zvýšení hladiny

gonadotropinu, který stimuluje vaječníky k tvorbě hormonů, a k signifikantnímu zvýšení hmotnosti vaječníků, jak bylo prokázáno na krysím modelu (Sinha et al., 1998).

2.2.3.4 Ovariální supresory

U premenopauzálních žen je dále možno využít také tzv. ovariální supresory. U žen před menopauzou jsou hlavní tkáně produkující estrogen vaječníky. Tato tvorba je pod kontrolou hypofýzy, která produkuje folikuly stimulující hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH), díky kterým následně dochází k tvorbě androgenů a také enzymu aromatázy. Tvorba těchto hormonů je pod kontrolou gonadotropin uvolňujícího hormonu - GnRH, gonadotropin releasing hormone neboli LHRH, luteinising-hormone releasing hormone (podrobněji popsáno v knize: King and Millar (1991)), a právě na tento hormon je cílena léčba. Pacientkám jsou podávány analogy GnRH, které, jak ukazuje publikace zahrnující 16 studií, pokud jsou podány samostatně, nijak výrazně nesnižují riziko návratu onemocnění, ovšem v kombinaci s tamoxifenem a/nebo chemoterapií snižují jak riziko návratu nemoci, tak riziko úmrtí (LHRH-agonists in Early Breast Cancer Overview group, 2007).

2.2.4 Rezistence

Hormonální terapie je hojně využívanou léčebnou metodou u pacientek s ER pozitivním karcinomem prsu, její hlavní limitací ovšem zůstává rezistence. Nádor může být k dané terapii rezistentní již od počátku, nebo může dojít k získání této rezistence časem v reakci a adaptaci nádorových buněk na léčbu. Příčin vzniku této rezistence přitom může být celá řada. Nádorové buňky se mohou stát na ER signalizaci zcela nezávislé a zcela přestat tento protein exprimovat. Studium vzorků před léčbou tamoxifenem a po ní ukázalo ztrátu exprese ER u 17 % rezistentních tumorů (Gutierrez et al., 2005). Tabulka 4 ukazuje ženy s expresí ER a PR, respektive bez ní, a jejich odpověď na hormonální terapii karcinomu prsu.

Mezi hlavní příčiny vzniku rezistence patří mutace genu *ESR1*, které kóduje protein ER. Při studiu xenograftů odvozených od rezistentních nádorů prsu byly detekovány mutace v ligand-vazebné doméně ER (Li et al., 2013), které mohou způsobovat na ligandu nezávislou aktivaci receptorového proteinu. Gen *ESR1* může být dále amplifikován, přičemž zvýšená exprese produktu může být také spojena s rezistencí, přežíváním buněk a na estrogenu nezávislým růstem, jak bylo prokázáno v *in vitro* studii buněčných linií karcinomu prsu (Tolhurst et al., 2011). Dalším faktorem, který může mít podíl na rezistenci, je existence izoform proteinu ER, které mohou vznikat využitím odlišných promotorů či alternativním

sestřihem. Příkladem takovéto izoformy je protein ER α -36, jehož zvýšená exprese je spojena s horší odpovědí pacientek na léčbu tamoxifenem (Shi et al., 2009).

Status	Odpověď	
	Počty	%
ER+	303/571	53
ER+ PR-	80/248	32
ER+ PR+	223/323	69
ER-	32/239	13
PR+	233/354	66
ER- PR-	22/208	11
ER- PR+	10/31	32
PR-	102/456	22

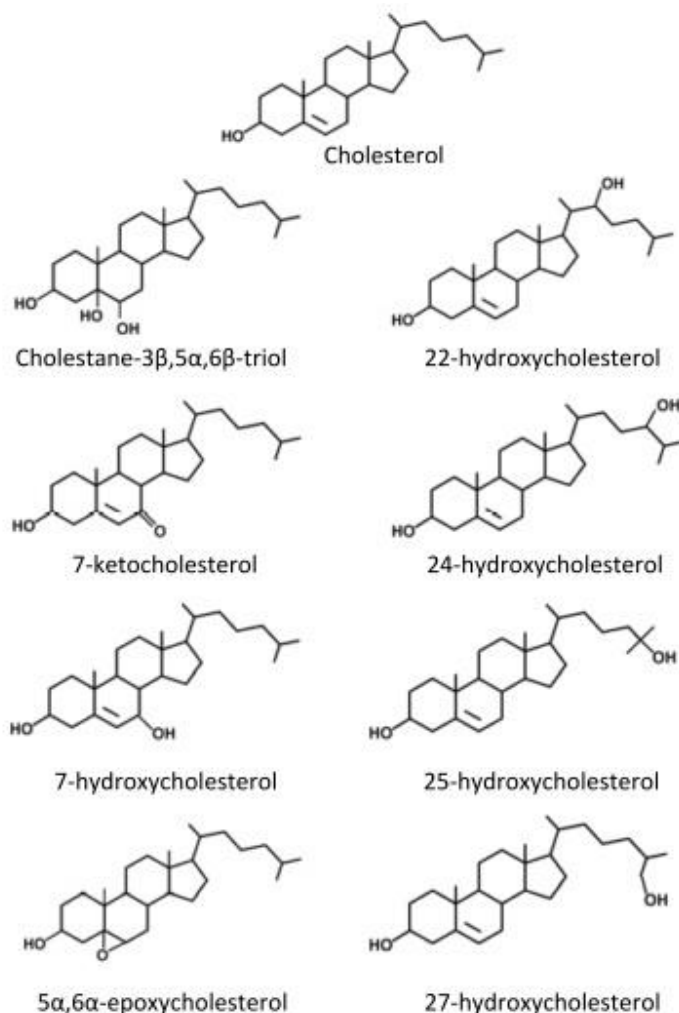
Tabulka 4: Odpověď pacientek na hormonální terapii podle ER a PR pozitivitu. Převzato z Horwitz (1988) podle Pearce and Jordan (2004).

Kromě změn v samotném proteinu ER dochází také ke změnám řady faktorů signálních drah, díky kterým nádor následně neodpovídá na hormonální terapii. Takovým faktorem jsou kupříkladu signální molekuly HER1 a HER2, kdy exprese HER1 a zvýšená exprese HER2 souvisí s horší odpovědí na tamoxifen (Arpino et al., 2004). U několika rezistentních nádorů, které byly původně HER2 negativní, došlo dokonce v průběhu karcinogeneze k amplifikaci molekuly HER2 (Gutierrez et al., 2005). S rezistencí jsou ale spojovány i signální dráhy jako je Ras - MAPK dráha (McGlynn et al., 2009) či řada dalších (Campbell et al., 2001; Ramaswamy et al., 2012). V poslední době se ukazuje, že by v této rezistenci mohl hrát svou roli i metabolismus cholesterolu.

2.3 Oxysteroly

Oxysteroly jsou 27-uhlíkaté oxidované deriváty cholesterolu, případně rostlinných sterolů - fytosterolů. Molekula sterolů je složena ze steroidního jádra a uhlovodíkového řetězce. Obsahuje hydroxylovou skupinu na uhlíku C3 a dvojnou vazbu mezi C5 a C6, která umožňuje oxidaci sterolů. V současné době je známa celá řada oxysterolů, jež se nacházejí v lidských tkáních, mezi nejvýznamnější patří 7 α -hydroxycholesterol (7 α -HC), 7 β -hydroxycholesterol (7 β -HC), 24-hydroxycholesterol (24-HC), 25-hydroxycholesterol (25-HC), 27-hydroxycholesterol (27-HC, ve starší literatuře označován jako 26-hydroxycholesterol) či 7-ketcholesterol (7-KC), které jsou spolu s dalšími zástupci znázorněny na Obr. 8.

Hladina oxysterolů v lidských tkáních je nízká, zauímají pouze malé procento všech sterolů v těle. Tato hladina však může být v těle zvýšena v souvislosti s některými chorobami, jako je ateroskleróza (Iuliano et al., 2003), kde byla u pacientů zjištěna až 45 krát zvýšená hladina oxysterolů v porovnání se zdravými jedinci.



Obr. 8: Přehled významných oxidovaných produktů cholesterolu. Převzato z Jusakul et al. (2011).

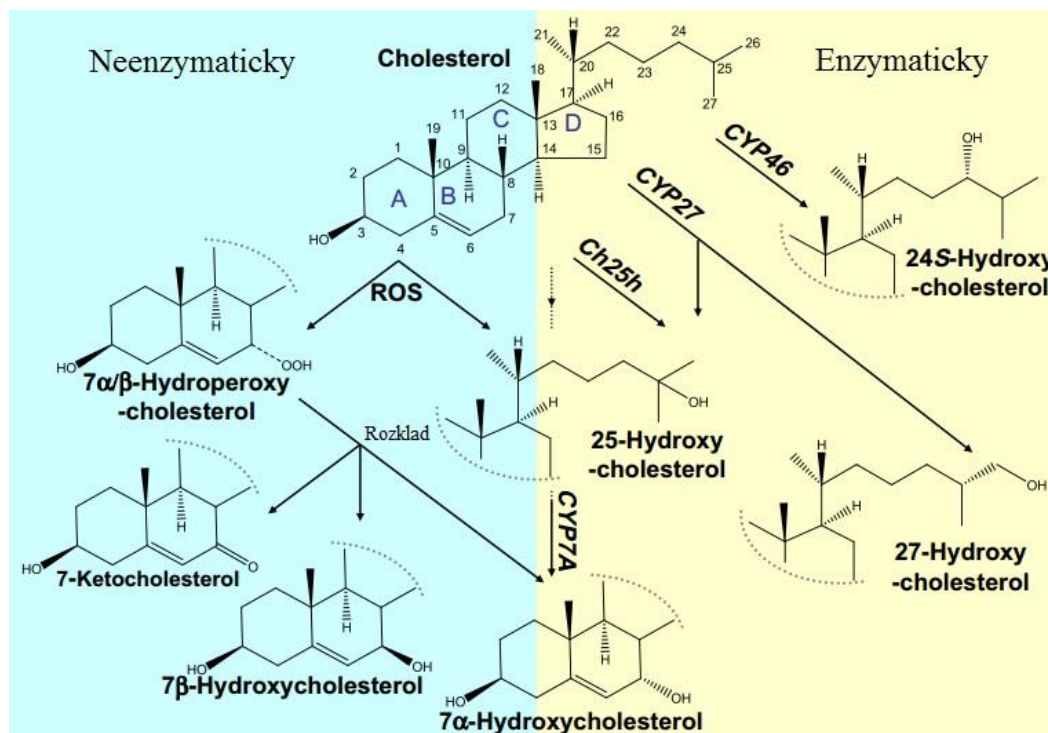
2.3.1 Vznik oxysterolů

Přítomnost oxysterolů v lidském těle může mít několik příčin – oxysteroly jsou přijímány jako součást potravy, či vznikají přímo v lidském těle, a to jednak enzymatickou a jednak neenzymatickou cestou. Cholesterol můžeme najít v řadě živočišných produktů, jako je mléko, vejce, játra, červené maso či řada dalších. Vlivem oxidace dochází v těchto potravinách ke vzniku oxysterolů (podrobněji popsáno v Guardiola et al. (2002)), které následně přijímáme spolu s potravou. Množství oxysterolů v potravinách může ovlivnit řada faktorů, jako je například tepelná úprava. Se zvyšující se teplotou stoupá také množství volných radikálů, zvyšuje se oxidace lipidů a následkem toho stoupá také koncentrace

oxidovaných derivátů sterolů (Soupas et al., 2004). Také skladování potravin může množství oxysterolů ovlivnit. Vliv hraje zejména přístup kyslíku, vystavení světlu či teplota skladování. Kupříkladu skladování masných výrobků v ochranné atmosféře je z hlediska oxidace efektivnější než ve vakuu (Zanardi et al., 2002). Vliv na oxidaci má také složení lipidové matrix, v jaké se steroly nacházejí. Stupeň saturace okolních lipidů ovlivňuje oxidaci sterolů, ovšem v závislosti na teplotě. Při vyšších teplotách ($> 140\text{ }^{\circ}\text{C}$) jsou steroly stabilnější v prostředí nenasycených lipidů, zatímco při nižších teplotách je tomu naopak (Soupas et al., 2004). Jak se zdá, některé oxysteroly se mohou dostávat do těla ještě jiným způsobem, a to skrze kůži prostřednictvím kosmetických přípravků obsahujících fytosteroly a jejich následnou neenzymatickou oxidací způsobenou UV zářením (Tonello and Poli, 2006).

Další možností je vznik oxysterolů přímo v lidském těle, a to buď prostřednictvím enzymů, či neenzymaticky. Enzymaticky vznikají zpravidla deriváty oxidované na postranním řetězci, neenzymaticky potom deriváty oxidované na sterolovém jádře. Výjimkou jsou 25-HC a 7 α -HC, které mohou vznikat oběma způsoby, jak je znázorněno na Obr. 9. K neenzymatické oxidaci dochází prostřednictvím volných kyslíkových radikálů, které atakují sterolové jádro (nejčastěji v pozici C7) za vzniku 7 α/β -hydroperoxycholesterolů (7-OOHC), které jsou hlavními vznikajícími oxysteroly v časně fázi neenzymatické oxidace (Brown et al., 1997). Z nich mohou dále vznikat další oxysteroly, jako 7 α/β -HC a 7-KC, díky čemuž dochází ke snižování hladiny 7-OOHC (Brown et al., 1997).

Enzymatickou oxidaci cholesterolu, zpravidla na postranním uhlíkatém řetězci, zajišťují některé proteiny z rodiny cytochrom P450. 24-HC vzniká činností cholesterol 24-hydroxylázy (CYP46A1) lokalizované v endoplazmatickém retikulu (Lund et al., 1999). Hlavní produkce tohoto oxysterolu probíhá v mozku (Lutjohann et al., 1996), proto bývá nazýván také cerebrosterol. 27-HC vzniká působením sterol 27-hydroxylázy (CYP27A1). Tento enzym katalyzuje několik kroků v syntéze žlučových kyselin, je tedy přítomný zejména v jaterních buňkách, přesněji v mitochondriích (Cali and Russell, 1991) a dále také v makrofázích (Bjorkhem et al., 1994). Vznik 25-HC má na svědomí cholesterol 25-hydroxyláza (Ch25h), enzym obsahující nehemové železo. Tento enzym je exprimován v řadě tkání, ovšem ve velmi nízkém množství (Lund et al., 1998), jak bylo prokázáno na myším modelu.



Obr. 9: Vznik oxysterolů prostřednictvím enzymů a neenzymatickým způsobem. Oxidované deriváty cholesterolu mohou vznikat jednak neenzymaticky, a to působením reaktivních kyslíkových radikálů (ROS, reactive oxygen species). Enzymaticky potom vznikají zejména prostřednictvím proteinů z rodiny cytochrom P450, či proteinu Ch25h. Neenzymaticky vznikají deriváty oxidované na sterolovém jádře, neenzymaticky potom deriváty odvozené oxidací postranního řetězce. Výjimkami jsou oxysteroly, které mohou vznikat oběma způsoby - 7 α -HC a 25-HC. Upraveno podle Brown and Jessup (2009).

2.3.2 Metabolismus a transport oxysterolů

Oxysteroly se do těla dostávají jako součást stravy (Linseisen and Wolfram, 1998; Staprans et al., 2003), jsou vstřebávány v tenkém střevě. Steroly mohou být v buňkách dále zpracovány, nebo exkretovány zpět do lumen střeva prostřednictvím ABC transportérů – ABCG5 a ABCG8 (Berge et al., 2000). V těle oxysteroly vznikají jako intermediáty metabolických drah syntézy steroidních hormonů a žlučových kyselin. Jakožto oxidované deriváty jsou zároveň snáze transportovatelnou formou sterolů. Buňky mohou oxysteroly dále metabolizovat, a to několika různými způsoby.

Většina oxysterolů v těle se vyskytuje v esterifikované formě (Brown et al., 1997; Linseisen and Wolfram, 1998; Staprans et al., 2003). Esterifikaci provádějí enzymy ACAT (acyl-CoA cholesterol acyl transferáza) uvnitř buněk a LCAT (lecitin cholesterol acyl transferáza) v krevním oběhu. Tyto enzymy katalyzují metabolické reakce jak cholesterolu, tak také jeho oxidovaných derivátů. Enzym ACAT má dvě vazebná místa pro steroly – aktivační a substrátové. Substrátové místo je specifitější z hlediska struktury sterolové

molekuly – oxysteroly aktivují enzym jen málo, ovšem po vazbě cholesterolu do aktivačního místa se stává substrátové místo ACAT promiskuitním (Zhang et al., 2003), váže oxysteroly a katalyzuje jejich esterifikaci. Esterifikované oxysteroly se následně v enterocytech stávají součástí lipoproteinových částic a mohou být takto transportovány po těle. Jejich přítomnost byla zjištěna v chylomikronech a částicích HDL, LDL i VLDL (Staprans et al., 2003). Nejhojněji se v těchto částicích vyskytují $7\alpha/\beta$ -HC a 7-KC (Brown et al., 1997; Linseisen and Wolfram, 1998).

K dalším enzymatickým úpravám oxysterolů dochází zejména v játrech. Oxysteroly mohou být dále oxidovány, především v metabolické dráze syntézy žlučových kyselin. K hlavním intermediátům syntézy žlučových kyselin patří 7α -HC a 27-HC (Anderson et al., 1972), které jsou dále oxidovány činností 7α -hydroxylázy, respektive 27-hydroxylázy. Zatímco cholesterol je oxidován cholesterol 7α -hydroxylázou CYP7A, 25- a 27-hydroxycholesterol mají na tuto oxidaci příbuzný, ovšem ne stejný enzym – oxysterol 7α -hydroxylázu CYP7B (Martin et al., 1997; Schwarz et al., 1997) a 24-hydroxycholesterol je oxidován enzymem CYP39A1 (Li-Hawkins et al., 2000). Také 7-KC může být dále oxidován na 27-hydroxyl-7-ketocholesterol, a to prostřednictvím sterol 27-hydroxylázy (CYP27) (Lyons and Brown, 2001). Kromě oxidace mohou oxysteroly také podléhat redukci. Kupříkladu 7-KC může být redukován na 7β -HC. Tuto reakci katalyzuje enzym 11β -hydroxysteroid dehydrogenáza 1. typu (Schweizer et al., 2004) - 11β -HSD1, jinak také CYP11B1.

Dalšími enzymy schopnými metabolizovat oxysteroly jsou sulfotransferázy (SULTs), respektive rodina SULT2, která katalyzuje připojení sulfátu na 3β -hydroxylovou skupinu. Tuto reakci jsou schopny katalyzovat jak na cholesterolu, tak na oxysterolech. Oxysteroly oxidované na sterolovém jádře (Fuda et al., 2007) i postranním řetězci (Chen et al., 2007) jsou takto metabolizovány enzymem SULT2B1. Buněčná linie MCF-7 s vysokou expresí SULT2B1 je odolnější vůči toxickým účinkům 7-KC, z čehož vyplývá, že tato metabolická dráha je jedním ze způsobů, jak se buňky brání jeho škodlivým účinkům (Fuda et al., 2007).

Buňky se mohou přítomných oxysterolů dále zbavovat jejich transportem zprostředkovaným proteiny z rodiny ABC (ATP Binding Cassette) přenašečů. Tyto přenašeče tak zajišťují ochranu buněk před nežádoucími účinky oxysterolů. Mezi významné přenašeče transportující oxysteroly patří proteiny ABCA1 a ABCG1. Kupříkladu exprese těchto dvou transportérů v placentě chrání plod před akumulací oxidovaných sterolů (Aye et al., 2010).

Prostřednictvím ABCA1 dochází k transportu 25-HC, a to s vysokou afinitou (Tam et al., 2006), mezi oxysteroly transportované ABCG1 patří 7 β -HC a 7-KC (Engel et al., 2007; Terasaka et al., 2007).

2.3.3 Funkce oxysterolů

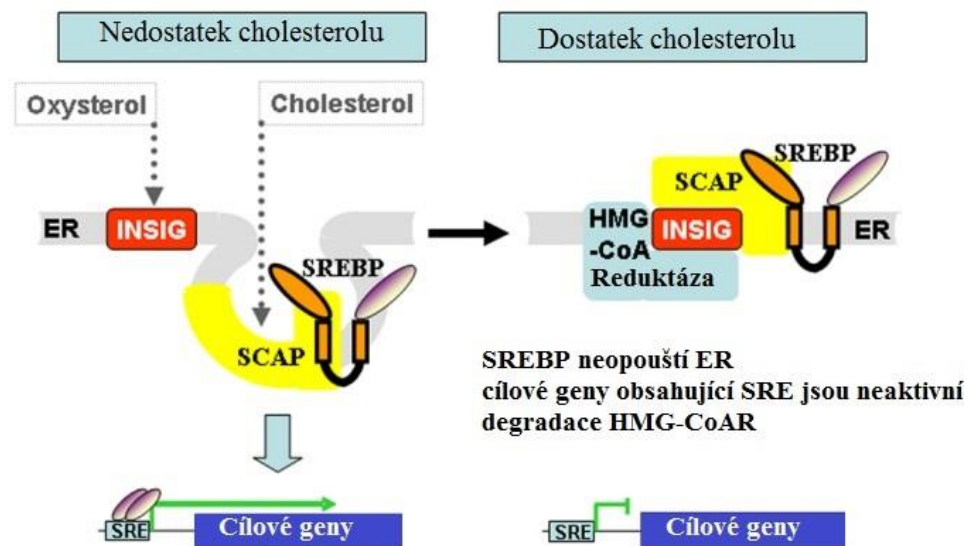
Přítomnost oxysterolů může ovlivňovat řadu buněčných funkcí a vlastností. Mezi hlavní role oxysterolů patří regulace metabolismu a transportu lipidů, a to jak prostřednictvím regulace genové exprese (transkripční faktory SREBP, receptory LXR), tak prostřednictvím proteinových interakcí (LXR, proteiny rodiny OSBP). Oxysteroly mohou také měnit vlastnosti buněčných membrán, jako je fluidita či propustnost pro některé látky. Ovlivnění membrán nebude v této práci dále rozebíráno, vlivu na metabolismus a transport je věnována následující kapitola.

2.3.3.1 Oxysteroly a faktory SREBP

Jednou z buněčných funkcí oxidovaných sterolů je regulace lipidového metabolismu. Již v roce 1978 přišla skupina vědců s myšlenkou, dnes známou jako oxysterolová hypotéza, že zpětnovazebná regulace syntézy cholesterolu neprobíhá prostřednictvím cholesterolu samotného, ale prostřednictvím jeho oxidovaných derivátů (Kandutsch et al., 1978). Z pokusů na řadě buněčných linií vyplynulo, že oxidované deriváty jsou v inhibici syntézy sterolů na rozdíl od cholesterolu samotného efektivní, inhibice prostřednictvím oxysterolů byla řádově vyšší než inhibice čistým cholesterolem. V následujících letech ovšem přišla řada experimentů, díky nimž byla původní oxysterolová hypotéza v mnohém vyvrácena či modifikována. V dnešní době je známo, že v regulaci této biosyntetické dráhy hraje významnou roli jak cholesterol, tak i oxysteroly.

Regulaci hladiny cholesterolu, ale i mastných kyselin zajišťují transkripční faktory SREBP - sterol regulatory element binding protein (Wang et al., 1993). Princip této regulace je znázorněn na Obr. 10. Prekurzory těchto transkripčních faktorů jsou lokalizovány v endoplazmatickém retikulu jako membránově vázané proteiny, které jsou v komplexu s proteinem SCAP (SREBP-cleavage activating protein). V případě nedostatku cholesterolu dochází k transportu SREBP-SCAP komplexu do Golgiho aparátu prostřednictvím COP II váčků. Zde dochází k proteolytickému štěpení SREBP a uvolnění transkripčního faktoru (Wang et al., 1994). Toto proteolytické štěpení mají na svědomí dvě proteázy – MBTPS1 – membrane-bound transcription factor peptidase, site 1, či také S1P - Site 1 protease (Sakai et al., 1998) a MBTPS2 – membrane-bound transcription factor peptidase, site 2, neboli S2P -

Site 2 protease (Rawson et al., 1997). Uvolněný transkripční faktor následně putuje do buněčného jádra, váže se do SRE (sterol regulatory element) oblastí v promotorech příslušných genů (Wang et al., 1993) a spouští transkripci cílových genů kódujících například LDL receptor, či klíčové enzymy syntézy cholesterolu - 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA syntáza (HMG-CoAS), či HMGCoA reduktáza (HMG-CoAR). V situaci, kdy má buňka cholesterolu dostatek, SCAP, který je citlivý na hladinu cholesterolu, interaguje prostřednictvím své SSD domény (sterol-sensing domain) s proteinem Insig - insulin-induced gene (Yang et al., 2002). V takovém případě dochází k zadržení komplexu SREBP-SCAP, transkripční faktor není uvolněn do jádra a nedochází k expresi cílových genů. Za nedostatku cholesterolu dochází k ubiquitinaci a degradaci proteinu Insig (Gong et al., 2006) a k uvolnění komplexu SCAP-SREBP.



Obr 10: Regulace genové exprese prostřednictvím SREBP. V případě nedostatku cholesterolu dochází k transportu SCAP-SREBP komplexu z endoplazmatického retikula (ER) do Golgiho aparátu, kde dochází k proteolytickému štěpení SREBP, který následně v jádře aktivuje genovou expresi. V případě dostatek cholesterolu dochází k interakci mezi SCAP a proteinem Insig, díky čemuž zůstává SCAP-SREBP komplex v ER. Upraveno podle Gill et al. (2008).

Jak již bylo řečeno, cholesterol ovlivňuje aktivaci SREBP a příslušnou transkripci prostřednictvím cholesterol senzitivního proteinu SCAP. Protein SREBP může být ale regulován také oxysteroly, například 25-HC (Lund et al., 1998). Mechanismus působení oxysterolů je ovšem odlišný, regulace prostřednictvím 25-HC nefunguje skrze vazbu proteinu SCAP, místo toho dochází k vazbě Insig (Radhakrishnan et al., 2007). Vazba Insig způsobí konformační změnu tohoto proteinu a jeho interakci s proteinem SCAP, která opět znemožní transport SCAP-SREBP komplexu do Golgiho aparátu a uvolnění transkripčního faktoru.

2.3.3.2 Oxysteroly a HMG-CoA reduktáza

Dalším mechanismem regulace syntézy cholesterolu je ovlivnění enzymu HMG-CoA reduktázy, který katalyzuje jeden z klíčových kroků syntézy cholesterolu. HMG-CoA reduktáza se může vázat k proteinu Insig pomocí SSD domény stejně jako protein SCAP. Její vazba na Insig přitom zvyšuje degradaci v proteazomu (Sever et al., 2003). Ovlivnění metabolismu skrze HMG-CoA reduktázu mohou mít na svědomí také oxysteroly. Ubiquitinaci reduktázy mohou zprostředkovat kupříkladu 25-HC, 24-HC, 27-HC, 19-HC, 24(S),25-epoxycholesterol, nebo 5-cholesten-3 β ,16 β ,27-triol (Song and DeBose-Boyd, 2004).

2.3.3.3 Oxysteroly a receptory LXR

Dalším buněčným cílem, jehož aktivita je ovlivněna působením oxysterolů, jsou proteiny z rodiny jaderných receptorů - jaterní receptory X (LXR, liver X receptor) – LXR α a LXR β . LXR α je exprimován především v játrech, ale také ve střevních buňkách nebo ledvinách (Willy et al., 1995), zatímco LXR β je všudypřítomný (Song et al., 1994). Receptory LXR tvoří funkční heterodimery s retinoidními receptory X (retinoid X receptor) – RXR (Willy et al., 1995), které slouží jako senzory sterolů v buňce a následně v odpovědi na jejich hladinu ovlivňují absorpci cholesterolu ve střevě, transport sterolů či syntézu žlučových kyselin. Mezi cílové geny ovlivněné působením LXR patří transportéry ABCG5, ABCG8 (Repa et al., 2002), ABCA1 (Costet et al., 2000) nebo ABCG1 (Venkateswaran et al., 2000). Chen et al. (2007) na modelu několika savčích buněčných linií prokázal, že zvýšená exprese enzymu SULT2B1, který katabolizuje oxysteroly, způsobuje inaktivaci signalizace prostřednictvím LXR. Tento fakt potvrdila také studie *in vivo* na myších deficientních v syntéze 24-HC, 25-HC i 27-HC, které neodpovídaly na příjem cholesterolu aktivací LXR, ovšem při aplikaci nesteroidního agonisty LXR receptoru k této aktivaci došlo (Chen et al., 2007).

Regulace ABCA1 prostřednictvím LXR probíhá kromě transkripční úrovně také na úrovni protein-proteinové interakce. LXR β /RXR dimer tvoří komplex s proteinem ABCA1, který je v tomto stavu inaktivní. V případě, že dojde k akumulaci cholesterolu, dochází k vazbě oxysterolů na LXR β a disociaci z proteinu ABCA1 (Hozoji et al., 2008). Tím dochází k aktivaci tohoto ABC transportéru, který může pumpovat cholesterol z buňky ven.

2.3.3.4 Oxysterol-vazebné proteiny

Oxysterol vazebné proteiny – OSBP (oxysterol-binding proteins) jsou nejméně dvanáctičlennou rodinou proteinů (Jaworski et al., 2001), které v odpovědi na hladinu

cholesterolu/oxysterolů hrají roli v lipidovém metabolismu buněk, buněčné signalizaci nebo váčkovém transportu. Prvním členem této rodiny je protein OSBP či také OSBP1, ostatní nesou také další pojmenování – ORP (OSBP-related proteins) či OSBPL (OSBP-like proteins), tedy kupříkladu OSBP2 = ORP4 (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Protein OSBP je významný v metabolismu lipidů kupříkladu pro regulaci transportu ceramidu a syntézu sfingomyelinu (Perry and Ridgway, 2006). Jeho další rolí je negativní regulace proteinu ABCA1 a tedy transportu sterolů. OSBP dokáže snižovat hladinu transportéru ABCA1, a to jak na úrovni exprese, tak destabilizací samotného proteinového produktu. Nepřítomnost OSBP v buňkách vyvolává třikrát vyšší stabilitu proteinu (Bowden and Ridgway, 2008). Dalším regulátorem exprese proteinu ABCA1 je také protein ORP8 (Yan et al., 2008). OSBP se také podílí na váčkovém transportu, jeho interakce s proteinem VAP-A (vesicle-associated membrane protein-associated protein A) hraje roli v transportu proteinů a lipidů z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu (Wyles et al., 2002).

Oxysterol-vazebné proteiny interagují také s cytoskeletárními vlákny. Kupříkladu u zkrácené varianty proteinu ORP4 vzniklé alternativním sestřihem byla prokázána interakce s vimentinem (Wang et al., 2002). Přítomnost proteinu ORP4 je významná pro proliferaci a přežívání buněk, umlčením jeho exprese dochází k zastavení buněčného růstu a apoptóze (Charman et al., 2014). V neposlední řadě mohou tyto proteiny hrát roli také v buněčné signalizaci. Kupříkladu OSBP může díky regulaci fosforylace kinázy ERK (MAP kinázy) modulovat její aktivitu (Wang et al., 2005). Významu oxysterolů v signalizaci, včetně MAP kinázové, se bude podrobněji věnovat následující kapitola.

2.3.4 Signální kaskády spojené s oxysteroly

Oxysteroly svou přítomností ovlivňují řadu signálních buněčných drah. Aktivace těchto drah přítom může v nádorových buňkách vést ke zvýšené proliferaci buněk a růstu nádoru. Mezi kaskády ovlivněné oxysteroly patří kupříkladu signální dráha Hedgehog, MAP kinázová signální dráha, či Wnt signalizace. Jak jsou tyto dráhy ovlivněny oxidovanými deriváty cholesterolu, bude podrobněji probráno v této kapitole.

2.3.4.1 Oxysteroly a signální dráha Hedgehog

Mezi signalizace ovlivněné působením oxysterolů patří také dráha nazývaná Hedgehog (Hh) nebo Sonic hedgehog (Shh). Tato dráha hraje významnou roli v regulaci buněčného růstu a dělení, a to zejména v embryonální, ale i postembryonální fázi vývoje

organismu. V této kaskádě se signální molekula Hedgehog váže k transmembránovému proteinu Patched (PTCH), díky čemuž Patched přestane inhibovat protein Smoothened (SMO). Uvolnění Smoothened vede k aktivaci transkripčních faktorů Gli, které následně zprostředkovávají expresi příslušných genů v jádře. Hh signalizace může být dále negativně regulována represorem transkripce Sufu, který snižuje aktivaci transkripčními faktory Gli. Oxysteroly do této dráhy vstupují jako alosterické aktivátory proteinu Smoothened, kdy kupříkladu vazba 20(S)-HC spouští tuto kaskádu (Nachtergaele et al., 2012). Jejich vazba k extracelulární části proteinu je nezbytná pro správnou aktivaci Hh kaskády (Nedelcu et al., 2013). Aktivaci Hh dráhy pomocí oxysterolů poprvé popsali Corcoran and Scott (2006) na buňkách meduloblastomu. Oxysteroly v tomto modelu aktivovaly buněčnou proliferaci skrze Hh kaskádu stejně efektivně jako agonista proteinu Smoothened, SAG (Smoothened agonist). Tato aktivace však byla zprostředkována deriváty oxidovanými na postranním řetězci (25-HC), ale ne steroly s hydroxylovou skupinou na steroidním jádře, jako je 7 β -HC (Corcoran and Scott, 2006).

2.3.4.2 Oxysteroly a Wnt signalizace

Také další ze signalizací významných hlavně ve vývoji může být ovlivněna oxysteroly. Signalizace začíná vazbou Wnt signální molekuly na transmembránový receptor Frizzled, díky čemuž následně dochází k aktivaci proteinu Dishevelled. Tato aktivace má za následek inhibici proteinu GSK3 β (glykogen syntáza kináza 3 β), který by jinak fosforyloval β -katenin a ten by byl následně degradován. Defosforylovaný β -katenin přitom putuje do jádra, kde v komplexu s dalšími transkripčními faktory aktivuje expresi příslušných genů. Jak se zdá, oxysteroly mohou aktivovat Wnt-dependentní geny a tak vyvolávat diferenciaci buněk v kostní dřeni. Tato aktivace přitom patrně probíhá mechanismem nezávislým na β -kateninu (Amantea et al., 2008). Jiná práce ovšem ukazuje, že oxysteroly mohou v případě karcinomu tlustého střeva Wnt dráhu inhibovat, a to aktivací receptorů LXR. Ty následně tvoří s β -kateninem dimery, což má za následek sníženou aktivaci β -kateninu (Uno et al., 2009), a tedy inhibici Wnt signalizace a proliferace buněk.

2.3.4.3 Oxysteroly a apoptóza

Další významnou rolí oxysterolů je jejich význam v zánětlivých reakcích a indukcii apoptózy, s čímž souvisí jejich cytotoxický efekt. Oxysteroly mohou indukovat apoptózu, a to jak tzv. vnější drahou, skrze receptory smrti (Lee et al., 2005a; Lee and Chau, 2001), tak i vnitřní, mitochondriální drahou (Biasi et al., 2009; Kang et al., 2005). Oxysteroly mohou v souvislosti s indukcí apoptózy ovlivňovat buněčné signalizace, jako je MAP kinázová

dráha, a signalizace prostřednictvím kinázy PKB/AKT, ale i další signální dráhy, například zahrnující proteinkinázu C (PKC).

MAP kinázová signalizace je jednou z klíčových drah, reguluje řadu buněčných dějů, mezi nimi buněčnou proliferaci, ale i apoptózu. Zahrnuje několikastupňovou kaskádu aktivačních reakcí signálních proteinů – Ras – Raf (MAPKKK) – MEK (MAPKK) – ERK (MAPK), kdy poslední aktivovaná kináza fosforyluje, a tím aktivuje příslušné transkripční faktory. Mezi terminální kinázy této kaskády patří kromě ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2), také například kinázy JNK (c-Jun N-terminal protein kinase). Pro řadu oxysterolů byla prokázána souvislost s aktivací MAPK kaskády. Kupříkladu přidání 7 β -HC k buňkám hladkého svalstva způsobilo již po pěti minutách aktivaci ERK1 a ERK2, ale ne JNK kinázy (Ares et al., 2000). Aktivace ERK1/2 je přitom spojována jak s inhibicí buněčné smrti (Xia et al., 1995), tak s její aktivací (Van den Brink et al., 1999). Aplikace 25-HC a 27-HC byla v aktivaci apoptózy v případě buněk hladkého svalstva ještě účinnější, než 7 β -HC (Ares et al., 2000).

Signalizační kaskáda zahrnující fosfatidylinositol 3-kinázu PI3K a AKT či také proteinkinázu B (PKB) hraje význam v přežívání buněk (Khwaja et al., 1997). Aktivace AKT a její antiapoptotický efekt je významný pro řadu nádorů. Dráha může být aktivována například inaktivací tumor supresorového proteinu PTEN – phosphatase and tensin homolog, který je negativním regulátorem kinázy AKT. Jak se zdá, tak oxysteroly, přesněji 25-HC a 7-KC jsou schopny podpořit buněčnou smrt skrze indukci degradace AKT kinázy (Rusinol et al., 2004). Podobně může účinkovat také 7 β -HC (Lordan et al., 2008), u něhož bylo prokázáno snížení aktivované AKT kinázy v buňkách.

2.3.4.4 Oxysteroly a mTOR

Oxysteroly mohou dále ovlivňovat i PI3K/mTOR dráhu. Na příkladu kultury jaterních buněk bylo prokázáno, že 7-KC dokáže skrze aktivaci mTOR dráhy zvyšovat transport látek z buňky pomocí P-glykoproteinu, označovaného také jako MDR1 (ABCB1) (Wang et al., 2013b). MDR1 přitom může z buněk pumpovat léčivé látky, jako například chemoterapeutikum doxorubicin. Touto aktivací může tedy oxysterol 7-KC přispívat ke vzniku lékové rezistence buňky.

2.4 Cholesterol, oxysteroly a karcinogeneze

Riziko vzniku karcinomu prsu je zvyšováno velkou řadou faktorů, ať už genetických, či environmentálních. Mezi takové faktory je řazena i obezita, která u postmenopauzálních žen může významně zvyšovat riziko vzniku ER pozitivního karcinomu prsu (Vrieling et al., 2010). Příčin této souvislosti může být celá řada, patří mezi ně zvýšená hladina inzulínu a faktorů IGF (insulin-like growth factor), produkce estrogenů tukovou tkání, ale také zvýšená hladina cholesterolu, která je s obezitou často spjata. Tzv. hypercholesterolemie je spojena s výskytem karcinomu prostaty, střeva či prsu, na druhou stranu je však zvýšená hladina cholesterolu spojena také s nižším výskytem karcinomu jater či žaludku (Kitahara et al., 2011). Nejen zvýšená hladina cholesterolu v těle, ale také ve stravě se ukázala jako faktor zvyšující riziko řady karcinomů včetně prsu, ovšem především u postmenopauzálních žen (Hu et al., 2012). Je tedy jasné, že účinky cholesterolu jsou spojeny s rizikem karcinomu prsu, ovšem zdá se, že toto riziko nesouvisí pouze s cholesterolem samotným, ale především s jeho metabolity – oxidovanými deriváty. Tato kapitola shrnuje význam oxysterolů v karcinogenezi a hlavně jejich interferenci s hormonální terapií.

2.4.1 Význam oxysterolů v karcinogenezi

Jak se zdá, některé účinky oxysterolů mohou zvyšovat riziko vzniku nádorů či přispívat k jejich progresi. První souvislost mezi oxidovanými produkty cholesterolu a karcinogenezí byla objevena již v roce 1946, kdy u myši dostávajících progesteron se sezamovým olejem docházelo častěji k vývoji rakoviny než u myši dostávajících čistý progesteron. Jako karcinogenní zde byly označeny oxidované deriváty cholesterolu (Bischoff and Rupp, 1946). Oxysteroly mohou přispívat ke vzniku mutací DNA, jak bylo poprvé objeveno pomocí Amesova testu (Smith et al., 1979). Kupříkladu 7-KC způsobuje v buněčné kultuře ARPE-19 zvýšenou produkci reaktivních kyslíkových a dusíkových radikálů a zvyšuje poškození mitochondriální DNA v porovnání s kontrolními buňkami (Gramajo et al., 2010). Dalšími steroly s oxidativními účinky jsou také 7 β -hydroxycholesterol, či cholesterol-5 β ,6 β -epoxid (Lemaire-Ewing et al., 2005). Oxysteroly mohou dále k rozvoji nádorů přispívat také svými prozánětlivými účinky. Dokáží kupříkladu zvyšovat sekreci a hladinu mRNA interleukinu IL-8 (Lemaire-Ewing et al., 2005), či stabilizovat mRNA pro cyklooxygenázu-2, čímž mohou přispívat např. k progresi cholangiokarcinomu (Yoon et al., 2004). Karcinogenezi mohou oxysteroly podporovat také aktivací signálních drah, které byly podrobněji probrány v předcházející kapitole. Kupříkladu signální dráha Hedgehog patří ke kaskádám, jež jsou aktivovány v řadě karcinomů.

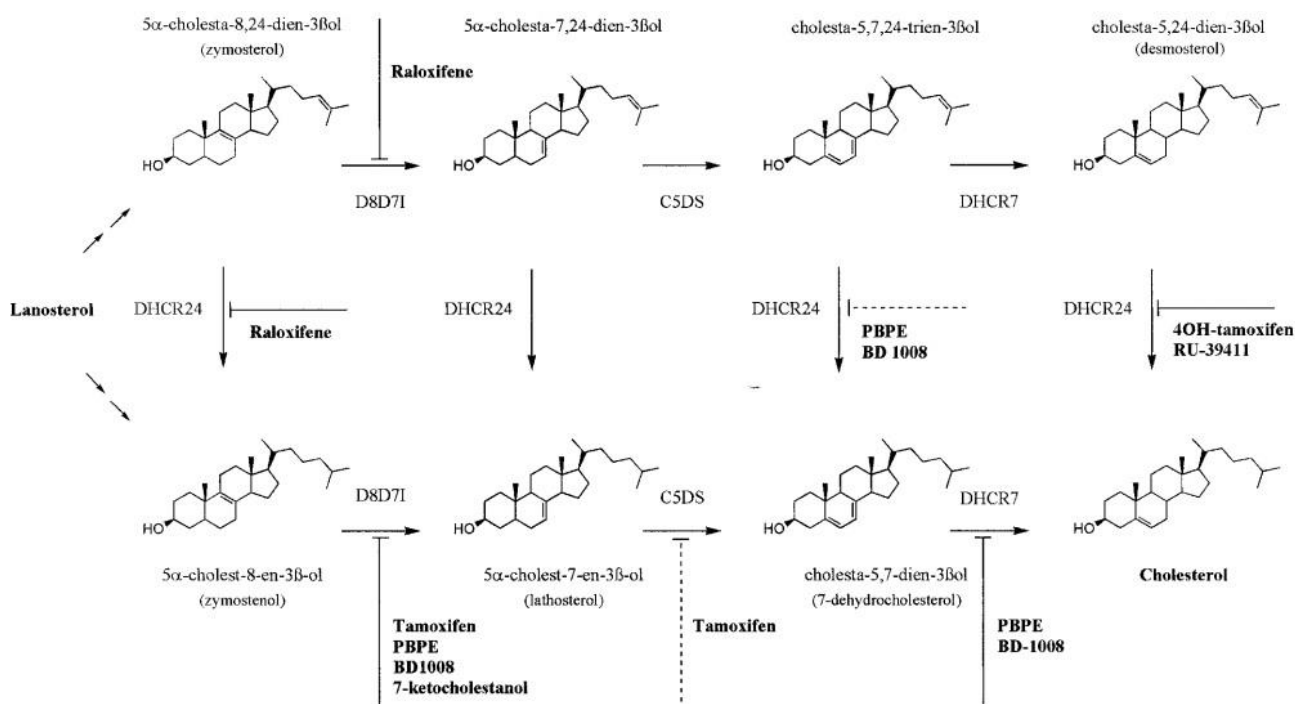
Na druhou stranu se však zdá, že oxysteroly působí na nádorové buňky toxicky a mají spíše proapoptotické účinky. Buněčné smrti a cytotoxicitě vyvolávané oxysteroly snáze podléhají vysoce proliferující buňky (Kupferberg et al., 1991), zatímco pro nedělící se buňky jsou účinky oxysterolů mírné. Buňky, u nichž je dělení pozastaveno pomocí inhibice syntézy proteinů a RNA molekul, se stávají na toxicitu oxysterolů méně citlivé (Hwang, 1992). Aplikace směsi několika oxysterolů (7α -HC, $5\alpha,6\alpha$ -epoxycholesterol a $5\beta,6\beta$ -epoxycholesterol) na buněčnou linii karcinomu střeva CaCo-2 způsobuje buněčnou smrt těchto buněk, ovšem pouze těch diferencovaných (Biasi et al., 2009). Podobně účinkuje kupříkladu 7β -HC na buněčnou linii karcinomu plic, kdy vyvolává snížení membránového potenciálu mitochondrií, vznik reaktivních kyslíkových radikálů a apoptózu prostřednictvím aktivace kaspáz 3 a 9 (Kang et al., 2005).

Tyto rozdíly ve studiích, které naznačují jak pronádorový, tak také cytotoxický vliv, mohou být způsobeny jak odlišným vlivem oxysterolů na různé buněčné linie, tak dávkou aplikovanou na buňky. Při nižších koncentracích mohou oxysteroly způsobovat takové poškození DNA, které vede k vyšší mutagenitě, avšak vyšší dávky poškodí DNA natolik, že se v buňce nastartují proapoptotické procesy a buňka umírá.

2.4.2 Metabolismus cholesterolu a hormonální terapie

O účincích hormonálních léčiv na estrogenový receptor a blokování jeho mitogenní aktivity je známo již mnohé, ovšem hormonální terapeutika, jako je tamoxifen, mají v buňce také jiná cílová místa, kam se mohou vázat a uplatňovat své protinádorové účinky nezávislé na ER. Mezi tyto účinky patří snížení hladiny LDL cholesterolu a naopak zvýšení intermediátů jeho syntézy, jak bylo pozorováno u pacientek s karcinomem prsu léčených tamoxifenem, či toremifenem (Gylling et al., 1995). Mezi taková cílová místa hormonálních léků patří tzv. mikrozomální anti-estrogen vazebná místa (AEBS, anti-estrogen binding sites). Existence AEBS byla popsána před více než třiceti lety (Sutherland et al., 1980), kdy bylo zjištěno, že tamoxifen a jiné anti-estrogeny se mohou s vysokou afinitou vázat na tato místa. V dnešní době je již známo, že tato místa jsou heterooligomerním komplexem, jehož součástí je dvojice enzymů – 3β -hydroxysterol- Δ^7 -reduktáza – DHCR7 a 3β -hydroxysterol- $\Delta^8\Delta^7$ -izomeráza – D8D7I, neboli EBP (Kedjouar et al., 2004). Tento objev byl učiněn mimo jiné na základě pozorování, že vazba ligandů k AEBS zapříčiňuje v nádorových buňkách MCF-7, MDA-MB-231 a SAOS-2 zvýšenou koncentraci intermediátů dráhy syntézy cholesterolu, jako je 5α -cholest-8-en- 3β -ol (zymostenol), cholesta-5,7-dien- 3β -ol (7-dehydrocholesterol), 5α -cholesta-8,20-dien- 3β -ol (zymosterol), 5α -cholest-7-en- 3β -ol (desmosterol) nebo

cholesta-5,7,24-trien-3 β -ol (7-dehydrodesmosterol). Schéma syntézy cholesterolu a enzymy katabolizující jednotlivé kroky jsou znázorněny na Obr. 11. Různé ligandy přitom mohou ovlivňovat rozdílné kroky syntézy a způsobovat tak nárůst koncentrace řady intermediátů. Ovlivněna je aktivita především enzymů DHCR7 a D8D7I, méně potom aktivita 3 β -hydroxysterol- Δ 14-reduktázy - DHCR24 a 3 β -hydroxysterol-C5-desaturázy - C5DS (Kedjouar et al., 2004).



Obr.11: Schéma post-lanosterolové syntézy cholesterolu ovlivněné anti-estrogeny. Anti-estrogeny mohou prostřednictvím vazby na AEBS inhibovat některé kroky syntézy cholesterolu. Různé anti-estrogeny přitom mohou ovlivňovat jeden, nebo několik kroků syntézy v důsledku inaktivace enzymů DHCR7, D8D7I, DHCR24, nebo C5DS.

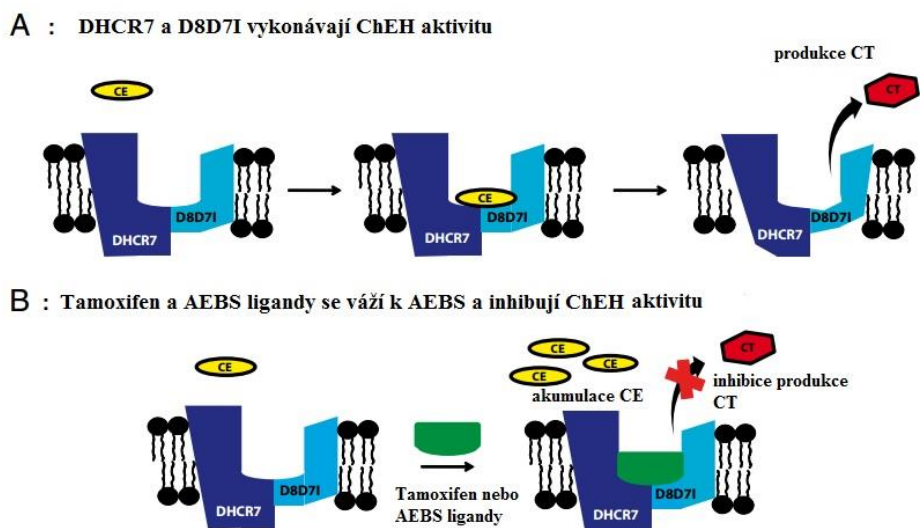
Převzato z (Kedjouar et al., 2004).

Akumulace těchto intermediátů může následně v buňkách ovlivňovat kontrolu růstu, iniciovat zastavení buněk v G0 – G1 fázi (Payre et al., 2008), vyvolávat apoptózu či autofagii (De Medina et al., 2009), mimo jiné zvyšováním hladiny reaktivních kyslíkových radikálů a autooxidací intracelulárních sterolů. Tento fakt značí další protinádorový mechanismus účinku tamoxifenu a jiných hormonálních terapeutik. V souladu s tím je také to, že *DHCR7* patří mezi geny, jejichž zvýšená hladina exprese na úrovni mRNA souvisí s kratší dobou bezpříznakového přežívání a celkového přežívání pacientek léčených tamoxifenem (Pitroda et al., 2009), a může tak predikovat sníženou odpověď pacientek na tuto léčbu.

AEBS nemají afinitu k estrogenu, ale váže se na ně řada hormonálních terapeutik, jako je tamoxifen, či raloxifen, nebo AEBS selektivní ligandy jako PBPE – *N,N*-pyrrolidino-[(4-

benzyl)-fenoxy]-ethylamin, který je derivátem tamoxifenu. AEBS mohou kromě toho dále vázat také oxysteroly, konkrétněji tzv. ring B oxysteroly oxidované na druhém kruhu sterolového jádra, mezi něž patří 7-ketocholesterol, 7-ketocholestanol a 6-ketocholestanol (Hwang and Matin, 1989).

Komplex AEBS může vykonávat také další enzymatickou aktivitu, kromě výše popsaných. Tou je aktivita cholesterol epoxid hydrolázy– ChEH (De Medina et al., 2010), jejíž substráty jsou cholestan-5 α ,6 α -epoxy-3 β -ol (α -CE) a cholestan-5 β ,6 β -epoxy-3 β -ol (β -CE), které hydrolyzuje na cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT). To, že AEBS vykonává ChEH aktivitu, nebo k ní výrazně přispívá, bylo postulováno na základě řady faktů, jako je společná buněčná lokalizace obou aktivit, inhibice stejnými látkami, pokles ChEH aktivity při utlumení exprese jednoho z AEBS enzymů a snížení ChEH aktivity o 92 % při vyřazení obou enzymů (De Medina et al., 2010). ChEH je mimo jiné také inhibována oxysteroly jako 7-ketocholesterol, 7-ketocholestanol a 6-ketocholestanol (Sevanian and McLeod, 1986). Inhibice ChEH tedy způsobuje v buňkách zvýšenou koncentraci α/β -CE a zamezuje tvorbě CT, jak je znázorněno na Obr. 12. Protože CT má v buňkách mutagenní účinky (Cheng et al., 2005), inhibice jeho tvorby prostřednictvím vazby tamoxifenu na AEBS a utlumení ChEH aktivity by mohla být jedním z dalších protinádorových účinků tamoxifenu.



Obr 12: Schéma působení tamoxifenu a AEBS ligandů na ChEH aktivitu. Za fyziologických podmínek komplex AEBS vykonává aktivitu ChEH, tedy konverzi α - a β -CE na CT. Po vazbě tamoxifenu, nebo dalších ligandů vázajících se na AEBS dochází k utlumení této aktivity a akumulaci α/β -CE. Upraveno podle De Medina et al. (2010).

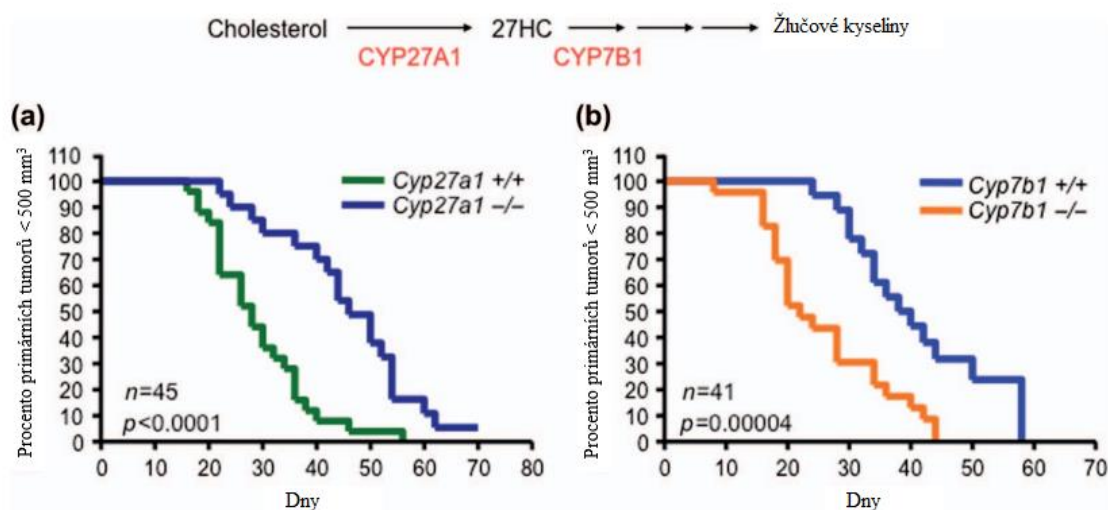
V neposlední řadě se zdá, že tamoxifen může inhibovat enzym ACAT a tak zamezit esterifikaci cholesterolu (De Medina et al., 2004). Tato skutečnost opět potvrzuje a ukazuje

jeho protinádorové působení, neboť esterifikace cholesterolu je spojována s vyšší buněčnou proliferací a nádorovou invazivitou (Paillasse et al., 2009). Tomuto nasvědčuje také fakt, že *ACAT* patří mezi geny, jejichž zvýšená exprese je u pacientek s karcinomem prsu léčených tamoxifenem spojena s vyšším rizikem návratu onemocnění a smrti (Pitroda et al., 2009). Vyšší hladina mRNA pro *ACAT1* je produkována v agresivnější, ER negativní buněčné linii MDA-MB-231 oproti ER pozitivním MCF-7 buňkám, přičemž inhibitor enzymu ACAT účinně snižuje buněčnou proliferaci ER negativní linie (Antalis et al., 2010).

2.4.3 27-hydroxycholesterol jako endogenní SERM

Velký význam pro studium oxysterolů v souvislosti s karcinomem prsu mělo zjištění, že tyto oxidované deriváty mohou ovlivňovat funkci estrogenových receptorů. V roce 2007 Umetani et al. (2007) zjistil, že 27-hydroxycholesterol může modulovat funkci estrogenových receptorů, je tedy kompetitivním antagonistou, a to jak ER α , tak ER β izoformy. Do této doby byla známá řada syntetických selektivních modulátorů estrogenových receptorů, a 27-HC je prvním objeveným endogenním SERM. Studie popisující tuto skutečnost byla provedena na embryonálních ledvinových buňkách HEK293, u nichž bylo prokázáno, že 27-HC může inhibovat působení ER jak na úrovni transkripční, tak na úrovni negenomické, neboli rychlé cytoplazmatické, kdy ovlivňuje produkci NO a vazodilataci (Umetani et al., 2007).

27-hydroxycholesterol ovšem nepůsobí jako tzv. čistý, ale jako parciální antagonist, s ohledem na konkrétní buněčný typ může naopak účinkovat ve směru působení ER. V kultuře buněk ER pozitivního karcinomu prsu působí 27-HC podobně, ne však stejně jako estrogen. Po vazbě 27-HC zaujme protein ER zcela unikátní konformaci, rozdílnou od vazby estrogenu, či jiných SERM. Tato vazba má kupříkladu v ER pozitivních buněčných kulturách MCF-7 a T47D za následek vazbu příslušných koaktivátorů a zahájení transkripce genů ve směru buněčného růstu a proliferace (DuSell et al., 2008). Působením 27-HC dochází k expresi genů kódujících např. transkripční faktor E2F či cyklin D1 a dochází ke zvýšení počtu buněk nacházejících se v S fázi buněčného cyklu. Tyto účinky byly ověřeny také *in vivo* na myším modelu. Jak je vidět na Obr. 13, myši s vyřazeným (tzv. knock-outovaným) genem pro CYP7B1 – enzym, který dále metabolizuje 27-HC a tak snižuje jeho hladinu v těle, vykazovaly rychlejší růst nádorů mléčné žlázy (Nelson et al., 2013).



Obr. 13: Růst nádorů podle přítomnosti CYP27A1, respektive CYP7B1. Zatímco myši s ponechaným genem pro CYP27A1 (*Cyp27a1* +/+) vykazují rychlejší růst nádorů v důsledku přítomnosti 27-HC, nádory u myši s knock-outovaným genem pro tento enzym rostou pomaleji. Naopak je tomu u knock-outu genu kódujícího CYP7B1, který za fyziologických podmínek konvertuje 27-hydroxycholesterol na další metabolity. Vyřazení tohoto genu způsobuje progresivnější růst nádoru ve srovnání s myši s expresí tohoto proteinu. Upraveno podle (McDonnell et al., 2014).

Působení 27-hydroxycholesterolu na ER tak může ovlivňovat odpověď pacientek na hormonální terapii, souviset s progresí karcinomu prsu či s rizikem návratu onemocnění. 27-hydroxycholesterol patří k nejhojněji se vyskytujícím oxidovaným derivátům cholesterolu v těle, jeho hladina v těle se navíc zvyšuje s věkem jedince a pozitivně koreluje s hladinou cholesterolu (Burkard et al., 2007). Z tohoto pohledu tedy působení 27-HC více ohrožuje postmenopauzální a obézní ženy. Vlivu 27-HC na prognózu pacientek navíc odpovídá i korelace mezi bezpříznakovým přežíváním pacientek a expresí enzymu CYP7B1 odbourávajícího 27-HC. ER pozitivní pacientky s vyšší expresí CYP7B1 vykazovaly delší bezpříznakové přežívání, zatímco u pacientek s ER negativními tumory taková souvislost nebyla prokázána (DuSell et al., 2008; Nelson et al., 2013). Obdobně byla srovnána exprese enzymu CYP27A1 syntetizujícího 27-HC, která byla vyšší v tumorech s vyšším grade (Nelson et al., 2013). V souladu s touto teorií je také fakt, že enzym syntetizující 27-HC, CYP27A1 se mimo jiné vyskytuje v makrofázích, patrně tedy včetně těch, které infiltrují nádorové mikroprostředí. Zvýšené množství makrofágů v nádoru je přitom spojováno s horší prognózou pacientek (Steele et al., 1984). Přítomnost endogenního SERM by mohla také být možným vysvětlením rezistence pacientek k léčbě inhibitory aromatázy, kdy sice dochází k inhibici syntézy estrogenu jako ligandu ER, který ale není jediným možným endogenním ligandem.

Jak se zdá, 27-HC může progresi karcinomu prsu ovlivňovat nejen prostřednictvím proteinu ER, ale také prostřednictvím receptoru LXR. Ten není vyžadován pro samotný růst nádoru, ale pro vznik plicních metastáz. 27-HC zprostředkovává skrze LXR expresi řady genů potřebných pro epitelo-mezenchymální tranzici (Nelson et al., 2013)

Z výše uvedených informací vyplývá, že oxysteroly, či obecněji – metabolismus cholesterolu by mohl významně zasahovat do buněčného růstu a dělení či nádorové invazivity. Jeho vliv může zasahovat i do rezistence k hormonální terapii, kdy upregulace řady genů, jako např. *ACAT*, či *DHCR7* může interagovat s účinky hormonálních terapeutik jako je tamoxifen. Další studium exprese genů souvisejících s metabolismem cholesterolu a oxysterolů, oxysterolových regulačních drah či signální drah ovlivňovaných oxysteroly by mohlo přinést významné výsledky a zvýšit naše porozumění významu cholesterolového metabolismu v nádorové progresi a léčbě.

3 Cíle práce

I. Studium exprese faktorů metabolických a signálních drah oxysterolů u pacientek s ER pozitivními (ER+) a ER negativními (ER-) karcinomy prsu

- Izolace RNA ze vzorků, syntéza cDNA a na základě posouzení kvality výběr vzorků vhodných pro studii
- Měření hladiny genové exprese faktorů metabolických a signálních drah oxysterolů
- Srovnání expresních profilů u ER+ a ER- tumorů a kontrolní zdravé tkáně, výběr kandidátních genů pro další studium

II. Srovnání s klinicko-patologickými údaji a odpovědí pacientek na terapii

- Studium vybraných genů na souboru vzorků ER+ karcinomů prsu
- Statistické vyhodnocení – porovnání genové exprese s dostupnými klinicko-patologickými daty pacientek

III. Stanovení exprese v buněčných kulturách

- Měření genové exprese kandidátních genů u ER+ a ER- buněčných kultur

IV. Identifikace případných diagnosticky významných genů

- Zhodnocení výsledků, porovnání genových expresí s dostupnou literaturou
- Identifikace genů vhodných pro další analýzu

4 Materiál a metody

4.1 Chemikálie a roztoky

Chemikálie	Dodavatel
6x Loading Dye Solution	Fermentas, Vilnius, Litva
10x Taq buffer without Mg ²⁺	Top-Bio, Praha, ČR
25 mM MgCl ₂	Top-Bio, Praha, ČR
Agarosa (for routine use)	Sigma Aldrich, Steinheim, Německo
Antibiotics (10 000 U/ml Pen + 10 mg/ml Strep)	PANBiotech GmbH, Aidenbach, Německo
Boric acid	Ridel-de Haën, Hannover, Německo
EDTA	Ridel-de Haën, Hannover, Německo
Ethanol absolutní p.a.	Penta, Praha, ČR
Ethydium bromid	Sigma Aldrich, Steinheim, Německo
Fetal bovine serum	PANBiotech GmbH, Aidenbach, Německo
HEPES Buffer (1 M)	PANBiotech GmbH, Aidenbach, Německo
Chloroform p.a.	Lach-ner, Neratovice, ČR
Isopropanol p.a.	Lach-ner, Neratovice, ČR
L-Glutamine (200 nM)	PANBiotech GmbH, Aidenbach, Německo
Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated)	Ambion®, Foster City, USA
PCR dNTP mix	Top-Bio, Praha, ČR
Primery genu pro ubiquitin	Invitrogen™, Gaithersburg, USA
Quant-iT™ RiboGreen RNA reagent and Kit	Invitrogen™, Gaithersburg, USA
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
RNaseZap® RNase Decontamination Solution	Ambion®, Foster City, USA
RPMI 1640 (10x)	PANBiotech GmbH, Aidenbach, Německo
Sodium bicarbonate (NaHCO ₃ , 7,5%)	PANBiotech GmbH, Aidenbach, Německo
Sodium pyruvate (100 mM)	PANBiotech GmbH, Aidenbach, Německo
Sterile water for cell culture	PANBiotech GmbH, Aidenbach, Německo
Taq Purple polymerase	Top-Bio, Praha, ČR
TaqMan® Gene Expression Assay*	Applied Biosystems, Austin, USA
TaqMan® Gene Expression master Mix	Applied Biosystems, Austin, USA
TaqMan® PreAmp Master Mix	Applied Biosystems, Austin, USA
TaqMay® Pre-Developed Assay Reagents PPIA (20x)	Applied Biosystems, Austin, USA
TRI Reagent®	Sigma Aldrich, Steinheim, Německo
Tris-EDTA buffer solution	Sigma Aldrich, Steinheim, Německo
Trizma® Base (Tris Base)	Sigma Aldrich, Steinheim, Německo
Trypsin (0,25% / 0,02/EDTA)	PANBiotech GmbH, Aidenbach, Německo
ΦX174 DNA-HaeIII Digest marker	New England Biolabs, Ipswich, USA

Tabulka 5: Použité chemikálie.

* seznam všech použitých TaqMan® Gene Expression Assays je v kapitole 4.7.1

Roztoky	
TBE pufr	45mM Tris, 44mM borát, 1mM EDTA

Tabulka 6: Použité roztoky – koncentrace.

4.2 Sběr materiálu, informovaný souhlas patientek, klinicko-patologická data

Ve studii byly využity vzorky tkání celkem 79 patientek s karcinomem prsu diagnostikovaných na Chirurgickém oddělení Nemocnice Atlas (Zlín) během roku 2012. V průběhu chirurgického odstranění nádoru byly odebrány vzorky nádorové tkáně patientek a vzorky okolní, nenádorové tkáně. Obsah nádorových buněk ve vzorcích byl stanoven patologem histologicky pomocí barvení hematoxylinem a eosinem. Zmražené vzorky tkání byly následně transportovány na Oddělení toxikogenomiky, SZÚ, a uloženy v -80 °C.

Spolu s tkáněmi patientek byla získána také klinicko-patologická data patientek (TNM stage, typ a grade nádoru, exprese ER, PR, HER2 a Ki67) k následnému statistickému vyhodnocení. Od všech patientek zařazených do studie byl získán informovaný souhlas se zařazením vzorku do studie.

Do studie byly dále zařazeny dvě buněčné linie nádoru prsu – hormonální receptory exprimující linie MCF-7 a triple-negativní linie MDA-MB-231 (American Type Culture Collection, Manassas, USA).

4.3 Buněčné kultury

Práci s buněčnými liniemi prováděla Ing. Marie Ehrlichová z Oddělení toxikogenomiky, SZÚ, práce probíhala v laminárním boxu se sterilními materiály. Buněčné linie byly pěstovány na základním médiu RPMI 1640 obohaceném o L-glutamin (300 mg/ml), pyruvát sodný (110 mg/ml), 15 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'2-ethan sulfonová kyselina), penicilin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/ml) a 10 % FBS (fetal bovine serum) při 5% CO₂ a 37 °C. Buňky byly pravidelně pasážovány pomocí roztoku 0,25% trypsinu a 0,02% EDTA. Buňky byly po napěstování uvolněny pomocí trypsinu, přeneseny do centrifugační zkumavky a centrifugovány (1000 RPM/157 g, 5 min, při laboratorní teplotě) na centrifuze Hermle Z323K (Maschinenfabrik Berthold Hermle, Gosheim, Německo, radius rotoru 140 mm). Buňky byly opatrně resuspendovány pomocí 1x PBS pufru, znovu centrifugovány a homogenizovány vortexováním v TRI Reagent. Následná izolace RNA a příprava cDNA z buněčných linií probíhala stejně jako u tkáňových vzorků.

4.4 Drcení tkáně, izolace RNA

Drcení tkáně a izolace RNA byly prováděny v laminárním boxu se sterilními nástroji a plastovými zkumavkami, sterilizace kovových nástrojů (pinzety, kopíčka) a porcelánu (misky s tloučkem) probíhala v laboratorní sušárně 2 hod při 180 °C, sterilizace plastových zkumavek potom 5 hod při 120 °C. K pipetování byly využity špičky s filtrem, aby bylo zabráněno kontaminaci izolované RNA a její degradaci RNázami. Všechny použité plast byly zároveň certifikovány na nepřítomnost RNáz a DNáz.

Přibližně 2 x 2 mm zmražené tkáně bylo mechanicky podrceno v porcelánové misce s tloučkem pod tekutým dusíkem. Takto homogenizovaný vzorek tkáně byl přenesen do mikrozkušavky s 1 ml TRI Reagent - směsi guanidin thiokyanátu a fenolu, která se užívá k izolaci celkové RNA, DNA a proteinů. Přítomnost guanidin thiokyanátu zabraňuje degradaci RNA v průběhu izolace, neboť jeho působením dochází k denaturaci proteinů včetně RNáz. Zkušavky se vzorky byly důkladně zvortexovány a následně k nim bylo přidáno 200 µl chloroformu. Po zvortexování byly zkušavky inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 3 min a následně centrifugovány (15 min, 12 000 RPM/13 684 g, 4 °C) na centrifuze Hettich MIKRO200R (Hettich, Tuttlingen, Německo, radius rotoru 85 mm). Ve zkušavce došlo k vytvoření tří fází – horní vodné fáze, mezifáze a spodní organické fáze. Díky nastolení kyselých podmínek dochází k rozpuštění RNA ve vodné fázi, zatímco DNA zůstává spolu s proteiny v organické fázi a mezifázi. Vrchní vodná fáze s RNA byla přenesena do čisté mikrozkušavky, do které byl přidán stejný objem ledového izopropanolu, který vysráží přítomnou RNA. Vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 10 min a následně centrifugovány (15 min, 12 000 RPM/13 684 g, 4 °C). Po vylití supernatantu byla peleta obsahující RNA opláchnuta v 500 µl 70% ethanolu. Mikrozkušavka byla centrifugována (5 min, 12 000 RPM/13 684 g, 4 °C), ethanol byl odstraněn pipetou a zbytek byl odpařen v termobloku při 60 °C, 5 – 10 min. K vysušené peletě byla přidána voda bez nukleáz (nuclease-free water, dále jen NFW) (20 – 40 µl dle velikosti pelety), zkušavka byla inkubována v termobloku (15 min, 60 °C) a vortexována. Rozpuštěná RNA byla přepipetována do čistých mikrozkušavek po 20 µl alikvotech a zamražena na -80 °C.

4.4.1 Měření koncentrace RNA

Pro kvantifikaci vyizolované RNA bylo využito měření koncentrace pomocí Quant-it™ RiboGreen RNA reagent and Kit. Quant-it™ RiboGreen RNA reagent je fluorescenční barva, která specificky váže nukleové kyseliny a je využívána pro měření koncentrace RNA

molekul v roztoku. Pomocí měření intenzity fluorescence dokážeme změřit koncentraci RNA až 1 ng/ml, metoda je tedy asi 1000x citlivější, než měření koncentrace nukleových kyselin pomocí absorbance.

Příprava roztoků a vzorků pro měření probíhala v laminárním boxu a se sterilními materiály. Před vlastním měřením bylo nejprve připraveno potřebné množství roztoků. Roztoky byly naředěny minimálně 3 hod, maximálně však 24 hod předem. TE (tris - EDTA) pufr byl připraven naředěním komerčně dodaného 20x koncentrovaného TE pufru v NFW. Fluorescenční barva RiboGreen byla naředěna 200x v již naředěném TE pufru.

1 μ l každého vzorku byl naředěn 200x pomocí NFW. Dále byl naředěn také RNA standard, který je součástí kitu (Ribosomal RNA standard, 16S and 23S rRNA from *E.coli*). 8 μ l standardu bylo přidáno k 392 μ l NFW. TE pufr a RNA standard byly pipetovány do 96-jamkové destičky pro vytvoření ředící řady dle Tabulky 7:

Pozice na destičce	1x TE pufr (μ l)	RNA standard (μ l)	RiboGreen pracovní roztok (μ l)	RNA koncentrace (ng/ml)
A1	0	100	100	1000
A2	50	50	100	500
A3	90	10	100	100
A4	98	2	100	20
A5	100	0	100	0

Tabulka 7: Ředící řada pro měření koncentrace RNA.

Do dalších jamek bylo napipetováno vždy 10 μ l ředěného vzorku RNA a 90 μ l TE pufru. Jak vzorky, tak ředící řada s RNA standardy byly na destičku pipetovány vždy v duplikátech pro kontrolu přesnosti měření. Jamky se vzorky i standardem byly převrstveny 100 μ l připraveného roztoku barvy RiboGreen. Destička byla následně 10 min inkubována na třepačce ve tmě, aby nedošlo k vysvícení fluorescenční značky.

Intenzita fluorescence byla následně změřena na přístroji Infinite M200 (Tecan, Grodig, Rakousko), excitační vlnová délka byla nastavena na 480 nm, emisní na 520 nm. Po odečtení pozadí byla z ředící řady sestavena regresní přímka s regresní rovnicí, ze které byly vypočteny příslušné koncentrace měřených vzorků.

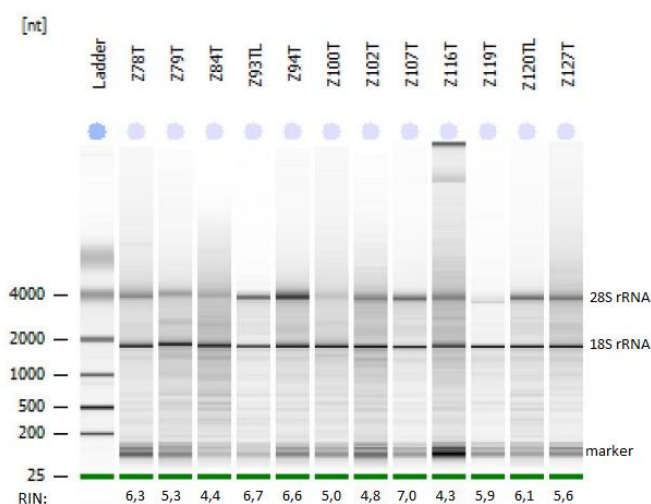
4.4.2 Kontrola kvality RNA

Hodnocení kvality vyizolované RNA bylo provedeno pomocí měření tzv. RIN čísla (RNA Integrity Number). Díky působení všudypřítomných RNáz může dojít k fragmentaci izolované RNA, přičemž příliš velká fragmentace by mohla ovlivnit výsledky studie.

Při měření RIN dochází k elektroforetické separaci RNA molekul podle jejich molekulové hmotnosti a následnému vyhodnocení podle poměru 28S rRNA a 18S rRNA. K výpočtu RIN čísla dochází pomocí algoritmu stanoveného Schroederem et al. (2006).

K měření RIN byl využit Agilent RNA 6000 Nano Kit. Koncentrace RNA vzorků byla upravena na 25 – 500 ng/μl pomocí NFW a v laminárním boxu byly připraveny alikvoty po 2 μl, včetně standardu (žebříček různě velkých fragmentů RNA (RNA ladder)). Vzorky i standard byly zdenaturovány v termobloku (2 min při 70 °C) a ihned ochlazeny ve vychlazeném stojánku.

Obsah kitu byl vytemperován na laboratorní teplotu. Gel (Agilent RNA 6000 Nano gel matrix) před použitím přečištěn centrifugací přes kolonku s filtrem (10 min, 4000 RPM/1520 g, při laboratorní teplotě). Zkumavka s barvou (RNA 6000 Nano dye concentrate) byla zvortexována a centrifugována na minicentrifuze a potřebné množství barvy bylo přidáno k přefiltrovanému gelu (1 μl barvy na 65 μl gelu). Výsledný mix byl centrifugován (10 min, 14 000 RPM/18 626 g, při laboratorní teplotě). Na čip (RNA Nano chip) bylo podle návodu nanášeno 27 μl směsi gelu a barvy. Do jamek pro všechny vzorky (1 – 12) a pro standard bylo napipetováno 5 μl markeru (RNA 6000 Nano marker) pro vnitřní kalibraci a dále 1 μl vzorku, popř. standardu. Čip byl vortexován po dobu 60 s a ihned analyzován na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Elektrody přístroje byly před každým měřením vyčištěny pomocí RNase-ZAP® a NFW. Vzorky s RIN < 3 byly z dalších analýz vyřazeny.



Obr.14 Výsledek měření RIN. V levém sloupci se nachází žebříček RNA (ladder), v dalších jsou měřené vzorky. S ubývajícím proužkem pro 28S rRNA se snižuje také hodnota RIN. 28S rRNA je u těchto vzorků již v různé míře degradovaná.

4.5 Syntéza cDNA

Syntéza cDNA je proces, který využívá schopnosti RNA dependentní DNA polymerázy (reverzní transkriptázy) nasynetizovat podle řetězce RNA molekuly komplementární vlákno molekuly DNA – cDNA (z angl. complementary DNA). Syntéza byla prováděna opět v laminárním boxu a ve sterilních mikrozkušavkách, s využitím RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kitu. Pro syntézu cDNA byl použit takový objem izolované RNA, který odpovídá 0,5 µg RNA, aby množství vstupního materiálu pro následné analýzy bylo stejné u všech studovaných vzorků.

Do 0,2ml mikrozkušavek bylo napipetováno odpovídající množství roztoku RNA, 1 µl náhodných primerů (Random Hexamer primer) a doplněno NFW do celkového objemu 14 µl. Do poslední zkumavky bylo napipetováno pouze 13 µl NFW a 1 µl primerů jako kontrola případné kontaminace (K). Obsah zkumavek byl promíchán a centrifugován na minicentrifuze. Zkumavky byly inkubovány 5 min při 70 °C v termobloku, aby došlo k rozvolnění sekundárních struktur RNA. Vzorky byly ochlazeny v chlazeném stojánku a centrifugovány. Do každé zkumavky bylo následně přidáno 7 µl mixu obsahujícího:

4 µl reakčního pufru (5x Reaction Buffer)

2 µl inhibitoru RNáz (RiboLock RNase Inhibitor, 20 U/µl)

1 µl dNTP mixu (10 mM dNTP Mix)

Vzorky byly centrifugovány, inkubovány 5 min při laboratorní teplotě, opět ochlazeny v chlazeném stojánku a centrifugovány. Z každého vzorku včetně kontrolního byly odebrány 2 µl do čisté mikrozkušavky jako negativní kontrola vzorků, ve kterých neprobíhala reverzní transkripce. Ke všem vzorkům (kromě negativních kontrol) byl následně přidán 1 µl reverzní transkriptázy (RevertAid M-MuLV, 200 U/µl). Vzorky byly následně inkubovány 10 min při laboratorní teplotě, 60 min v termobloku při 42 °C – tato teplota je optimální pro činnost reverzní transkriptázy, v této fázi tedy dochází k samotné syntéze cDNA vlákna podle RNA předlohy. Poté byly vzorky inkubovány 10 min při 70 °C, aby došlo k inaktivaci enzymu a terminaci reakce. Vzorky cDNA byly ochlazeny, centrifugovány a dále uchovávány při -20 °C.

4.5.1 Kontrola kontaminace a kvality cDNA

Pro zjištění případné kontaminace vzorku genomovou DNA (gDNA) byla provedena PCR reakce s využitím primerů pro gen kódující ubiquitin C. Tyto primery jsou navrženy tak, aby v genomové DNA zahrnovaly sekvenci intronu (Soucek et al., 2005). Pokud tedy dojde k amplifikaci pouze cDNA, vznikají pouze fragmenty o délce 190 bp. V případě kontaminace vzorku gDNA se amplifikují i delší fragmenty (s intronovou sekvencí) o délce 1009 bp. Přítomnost namnožených fragmentů byla detekována elektroforeticky v agarózovém gelu.

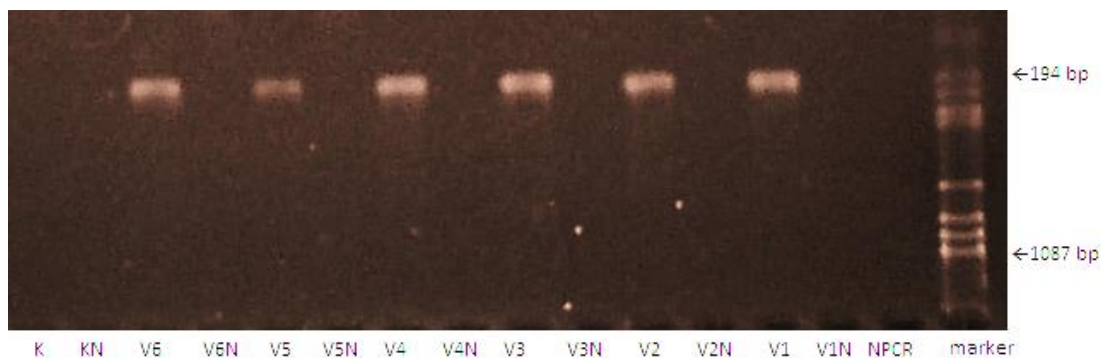
Všechny vzorky i negativní kontroly byly pipetovány do 96-jamkového plata, přičemž do každé jamky bylo přidáno 0,5 µl vzorku cDNA a 9,5 µl PCR mixu, který obsahoval: 6,9 µl NFW, 1 µl 10x PCR pufru, 0,4 µl MgCl₂, 0,2 µl dNTP mixu, 2 x 0,25 µl primerů (reverse i forward) a 0,5 µl Taq Purple polymerázy.

Takto připravené vzorky byly umístěny do PCR cyklieru GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, Austin, USA) s nastaveným programem:

5 min	94 °C
38x 30 s	94 °C
30 s	64 °C
30 s	72 °C
5 min	72 °C

dále 10 °C chlazení vzorků do vyndání z cyklieru

Do připraveného 3% agarózového gelu bylo napipetováno vždy 10 µl PCR produktu a 8 µl markeru Φ174 DNA – Hae III Digest (roztok 6x koncentrovaného markeru, 6x Loading Dye Solution a NFW). Vzhledem k tomu, že roztok s Taq Purple polymerázu obsahoval barvivo, nebylo potřeba před nanesením na gel ke vzorkům přidávat žádnou nanášecí barvu (loading dye). Po cca 45 min elektroforetického transferu při 120 V a cca 100 mA byl gel 15 min barven v ethidium bromidu, následně opláchnut v dH₂O. Proužky DNA ampliconů a markeru byly zobrazeny pomocí UV světla a vyfoceny fotoaparátem. Vzorky bez přítomnosti 190 bp pruhu nebo naopak s 1009 bp pruhem byly ze studie vyřazeny.



Obr. 15: Elektroforetický gel. Spolu se vzorky byl na gel napipetován také DNA marker Φ 174 pro porovnání velikosti fragmentů. Na gel byla dále napipetována i negativní kontrola PCR (NPCR), kontrola syntézy cDNA (K), sledované vzorky (V) a negativní kontroly (VN a KN). V případě kontaminace genomovou DNA bychom na gelu detekovali také proužek o velikosti 1009 bp.

Kontrola kvality všech vzorků byla provedena pomocí qPCR reakce s využitím TaqMan[®] primerů a proby pro gen *PPIA* (kódující peptidylprolyl izomerázu A, známou také jako cyklofilin A). Stejně jako ubiquitin, je tento gen exprimován ve stejné míře ve všech buňkách, patří mezi tzv. housekeepingové geny a je proto vhodným nástrojem pro tuto analýzu.

Do 0,1ml zkumavek bylo napipetováno vždy 2,5 μ l 5x ředěného vzorku cDNA (v NFW), 2 μ l NFW, 0,5 μ l primerů pro *PPIA* (TaqMan Primer and Probe Mix) a 5 μ l PCR mixu (TaqMan Gene Expression master Mix). qPCR reakce byla provedena na přístroji RotorGene 6000 (Corbett Life Science, Sydney, Austrálie) za podmínek:

2 min		58 °C
10 min		95 °C
50x	15 s	95 °C
	60 s	58 °C

Každý vzorek byl analyzován vždy v duplikátu, výsledné hodnoty C_q pro daný vzorek, které se nelišily o více než 0,5, cyklu byly následně zprůměrovány. V případě vyššího rozdílu mezi duplikáty byla reakce opakována. Kromě analyzovaných vzorků byly hodnoty C_q změřeny také pro kontrolu obsahující místo vzorku jen NFW a také pro kalibrátor, u něhož je exprese genu *PPIA* známá a můžeme podle něj usoudit, zda reakce proběhla správně. Vzorky s C_q vyšším než 25 byly považovány za degradované a nebyly využity pro další analýzu.

4.6 Preamplifikace cDNA

Vzhledem k vysokému počtu genů vybraných pro prvotní analýzu (kapitola 4.7.1) byl před samotným měřením genové exprese vložen krok preamplifikace cDNA. Díky tomuto kroku získáme z počátečního limitovaného množství cDNA při 14 cyklech PCR reakce až 16 000x více amplikonů pro studovaný gen. Jako primery pro preamplifikační PCR reakci slouží směs TaqMan® Gene Expression Assays pro všechny geny, jejichž exprese bude následně měřena v qPCR reakci. Díky tomu dochází k amplifikaci pouze specifických úseků cDNA, které odpovídají studovaným genům. K preamplifikaci cDNA byl využit TaqMan® PreAmp Master Mix Kit.

Byl připraven mix TaqMan® Gene Expression Assays pro všechny studované geny, vždy 10 µl každé Expression Assay. Do 0,2ml mikrozkušavek bylo napipetováno 2,5 µl vzorku neamplifikované cDNA, 3,75 µl NFW, 12,5 µl TaqMan® PreAmp Master Mixu a 6,25 µl mixu všech Expression Assays. Zkušavky byly promíchány, centrifugovány na minicentrifuze a umístěny do PCR cyklu. PCR reakce probíhala za podmínek:

10 min		95 °C
14x	15 s	95 °C
	4 min	60 °C
dále 10 °C chlazení vzorků do ukončení experimentu		

Preamplifikované vzorky byly ochlazeny a následně uloženy při -20 °C.

4.6.1 Test preamplifikace

Pro zjištění účinnosti preamplifikační PCR reakce byl proveden test této preamplifikace – porovnání exprese referenčních genů u neamplifikované a preamplifikované cDNA jednoho vzorku. Preamplifikovaná cDNA byla 20x naředěna v NFW, neamplifikovaná cDNA byla naředěna 5x. Do 0,1ml mikrozkušavek bylo napipetováno vždy 2,5 µl ředěné cDNA, 2 µl NFW, 5 µl TaqMan® Gene Expression Master Mixu a 0,5 µl příslušné TaqMan® Gene Expression Assay. Vzorky byly měřeny vždy v duplikátech pro odhalení případné chyby v pipetování. Genová exprese byla měřena pomocí qPCR na přístroji RotorGene 6000 za podmínek:

2 min		50 °C
10 min		95 °C
40x	15 s	95 °C
	60 s	60 °C

Stanovení účinnosti preamplifikační reakce bylo provedeno pomocí výpočtu $\Delta\Delta Cq$:

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq (\text{preamplifikovaná cDNA}) - \Delta Cq (\text{neamplifikovaná cDNA}),$$

kdy:

$$\Delta Cq = Cq (\text{cílový gen}) - Cq (\text{referenční gen})$$

Ke změření genové exprese byl vybrán vzorek Z5T ze souboru studovaných vzorků. Exprese byla změřena pro tři referenční geny – *EIF2B1*, *UBB* a *ELF1*, a dále pro dva náhodně vybrané geny ze studie – *TP53* a *SMO*. Preamplifikační reakce byla považována za účinnou, pokud se hodnoty ΔCq pro preamplifikovanou a neamplifikovanou cDNA ($\Delta\Delta Cq$) lišily o méně než 1,5 cyklu. Toto kritérium bylo splněno u všech testovaných genů (viz Tabulka 8), proto byla preamplifikační reakce považována za úspěšnou.

Vzorek Z5T	Gen	Cq	Průměr Cq	Směrodatná odchylka	ΔCq	$\Delta\Delta Cq$
PreAmp	<i>EIF2B1</i>	17,78	17,83	0,05	1,40	0,00
		17,87				
NeAmp		26,39	26,29	0,10	1,40	
		26,19				
PreAmp	<i>UBB</i>	13,96	13,90	0,06	-3,93	-0,22
		13,84				
NeAmp		22,64	22,59	0,06	-3,71	
		22,53				
PreAmp	<i>ELF1</i>	16,35	16,43	0,08	-1,40	0,00
		16,50				
NeAmp		24,86	24,89	0,03	-1,40	
		24,92				
PreAmp	<i>TP53</i>	16,65	16,69	0,04	-1,14	0,28
		16,72				
NeAmp		24,76	24,87	0,11	-1,43	
		24,97				
PreAmp	<i>SMO</i>	20,51	20,54	0,03	2,72	0,20
		20,57				
NeAmp		28,93	28,81	0,13	2,52	
		28,68				

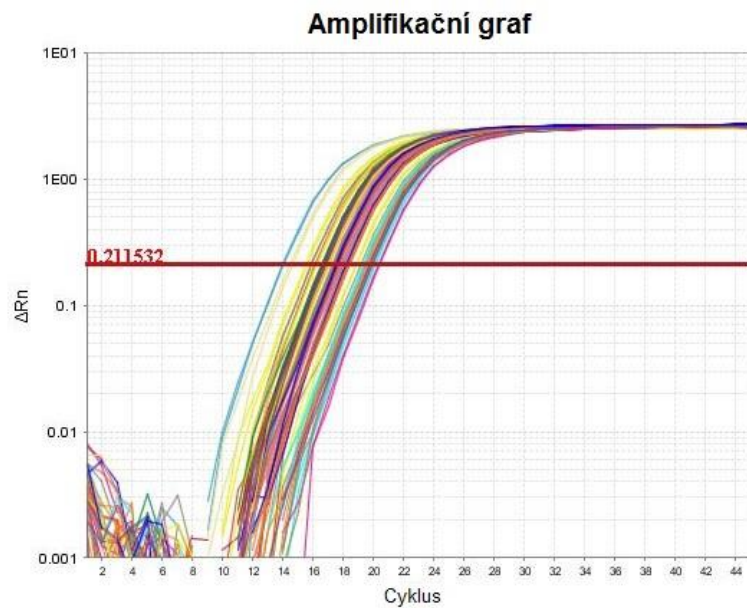
Tabulka 8: Hodnoty Cq a výpočet $\Delta\Delta Cq$. Tabulka ukazuje naměřené hodnoty Cq pěti genů analyzovaných pomocí qPCR reakce, a následný výpočet hodnot $\Delta\Delta Cq$. Ani pro jeden gen nepřesáhla tato hodnota $\pm 1,5$ cyklu. Preamplifikační reakce byla tedy úspěšná.

4.7 Studium genové exprese – qPCR

Ke studiu exprese genů bylo využito kvantitativní PCR v reálném čase – qPCR (quantitative PCR). Při qPCR se využívá fluorescenčně značených sond různých typů. Pro účely této studie bylo využito TaqMan[®] sond značených fluorescenční barvou FAM[®]. Sonden jsou fragmenty DNA komplementární k sekvenci sledovaného genu. Každá sonda obsahuje fluorescenční značku (tzv. reportér - R) a zhášec (Q – quencher). Ve stavu, kdy sonda obsahuje jak reportér, tak zhášec, nedetekujeme fluorescenční signál. V okamžiku, kdy dochází k amplifikaci cDNA v úseku komplementarity, dochází ke štěpení sondy 5' → 3' exonukleázovou aktivitou Taq polymerázy. V tuto chvíli dochází k oddělení reportéru a zhášeče, a tím také k emisi fluorescence. Výstupní hodnotou měření je tzv. C_q (quantification cycle) hodnota, která udává cyklus PCR reakce, ve kterém došlo ke zvýšení fluorescenčního signálu nad prahovou hodnotu (threshold). Nižší hodnota C_q značí vyšší množství vstupního materiálu – více ampliconů daného genu.

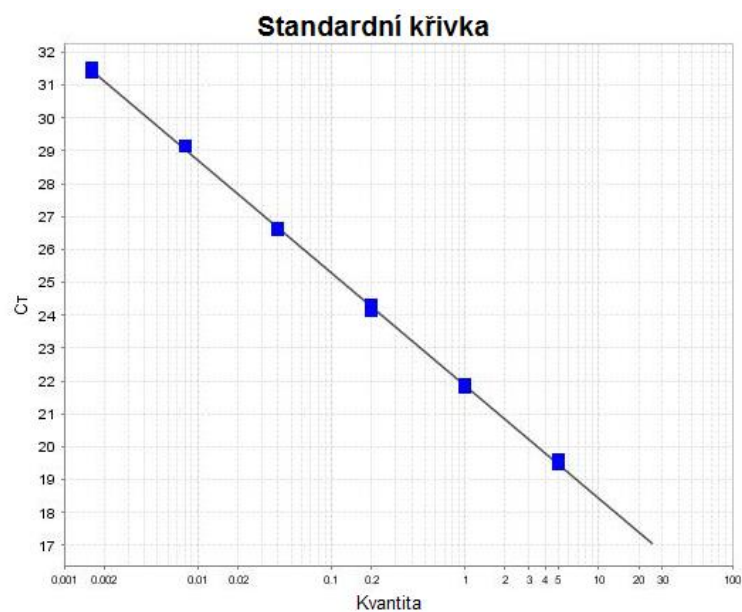
Vzorky preamplifikované cDNA byly naředěny 32x do TE pufru. V případě měření neamplifikované cDNA se vzorky ředily 8x. Vzorky byly pipetovány do 384-jamkové destičky – vždy v duplikátech (v případě odchylky C_q hodnoty o více než 0,5 cyklu mezi duplikáty bylo měření opakováno). Do každé jamky byly napipetovány vždy 2 μl měřeného vzorku a 3 μl připraveného mixu. Mix obsahoval v přepočtu na jednu jamku 2,5 μl TaqMan[®] Gene Expression Master Mix, 0,25 μl TaqMan[®] Gene Expression Assay pro příslušný gen a 0,25 μl NFW. Destička byla následně centrifugována (2 min, 1200 RPM/167 g, při laboratorní teplotě) na centrifuze Hermle Z360K (Maschinenfabrik Berthold Hermle, Gosheim, Německo, radius rotoru 104 mm). Genová exprese byla měřena na přístroji ViiA7 (Applied Biosystems, Austin, USA) za podmínek:

2 min	50 °C
10 min	95 °C
45x 15 s	95 °C
60 s	60 °C



Obr. 16: Výstup z měření genové exprese pomocí qPCR na Vii7 přístroji - normalizovaný graf. Výsledek měření pro jeden gen. Threshold je nastaven automaticky, právě v jeho místě dochází k odečtení hodnoty C_q - jedná se o místo, kde hladina fluorescence vzroste nad určitou prahovou hodnotu.

Současně se všemi vzorky byla napipetována ředící řada (minimálně o pěti bodech) vzorku využitého jako kalibrátor. Z C_q hodnot pro tuto ředící řadu byla softwarem vypočtena kalibrační křivka a účinnost (efficiency) PCR reakce. Hodnoty C_q pro duplikáty byly zprůměrovány a následně využity pro statistické vyhodnocení.



Obr. 17: Sestavení standardní křivky. Na základě změřené exprese pro ředící řadu software sestaví standardní křivku, z níž je následně vypočtena účinnost PCR reakce.

4.7.1 Seznam sledovaných genů

Do první části studie bylo vybráno na základě literatury celkem 96 genů, jejichž proteinové produkty se uplatňují v metabolismu, regulaci a transportu oxysterolů (Tabulka 9). K těmto genům byly připojeny 3 klinicky významné markery - *TP53*, *ERBB2* (HER2) a *MKI67* (Ki67) a tři geny pro normalizaci dat (*EIF2B1*, *ELF1*, *UBB*).

Gen	Číslo sondy	Anglický název genu	Délka amplikonu	Referenční sekvence *	Umístění v genu (exony)
Oxysterolová dráha					
<i>ACAT1</i>	Hs00608002_m1	acetyl-CoA cholesterol acetyltransferase 1	94	NM_000019.3	6 - 7
<i>ACAT2</i>	Hs00255067_m1	acetyl-CoA cholesterol acetyltransferase 2	67	NM_005891.2	2 - 3
<i>ATF6</i>	Hs00232586_m1	activating transcription factor 6	95	NM_007348.3	6 - 7
<i>HMGCR</i>	Hs00168352_m1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	67	NM_000859.2	6 - 7
<i>HMGCS1</i>	Hs00940429_m1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble)	77	NM_001098272.2	10 - 11
<i>HMGCS2</i>	Hs00985427_m1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2	91	NM_001166107.1	8 - 9
<i>INSIG1</i>	Hs04186616_m1	insulin induced gene 1	90	NM_198336.2	5 - 6
<i>INSIG2</i>	Hs01013988_m1	insulin induced gene 2	141	NM_016133.2	5 - 6
<i>MBTPS1</i>	Hs00186886_m1	membrane-bound transcription factor peptidase, site 1	71	NM_003791.2	21 - 22
<i>MBTPS2</i>	Hs01056129_m1	membrane-bound transcription factor peptidase, site 2	66	NM_015884.3	5 - 6
<i>OSBP1</i>	Hs00387304_m1	oxysterol binding protein 1	74	NM_002556.2	3 - 4
<i>OSBP2</i>	Hs01066294_m1	oxysterol binding protein 2	68	NM_030758.3	12 - 13
<i>OXCT1</i>	Hs01036203_m1	3-oxoacid CoA transferase 1	72	NM_000436.3	16 - 17
<i>OXCT2</i>	Hs00254439_s1	3-oxoacid CoA transferase 12	85	NM_022120.1	1 - 1
<i>SCAP</i>	Hs00378725_m1	SREBP chaperone	60	NM_012235.2	10 - 11
<i>SOAT1</i>	Hs00162077_m1	sterol O-acyltransferase 1	96	NM_001252511.1	10 - 11
<i>SREBF1</i>	Hs01088691_m1	sterol regulatory element binding transcription factor 1	90	NM_001005291.2	6 - 7
<i>SREBF2</i>	Hs01081784_m1	sterol regulatory element binding transcription factor 2	91	NM_004599.3	3 - 4
Metabolismus					
<i>AKR1C1</i>	Hs04230636_sH	aldo-keto reductase family 1, member C1	84	NM_001353.5	9 - 9
<i>AKR1C3</i>	Hs00366267_m1	aldo-keto reductase family 1, member C3	112	NM_001253908.1	8 - 9
<i>CYP11A1</i>	Hs00167984_m1	cytochrom P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1	77	NM_000781.2	2 - 3
<i>CYP24A1</i>	Hs00167999_m1	cytochrom P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1	123	NM_000782.4	7 - 8
<i>CYP27A1</i>	Hs00168003_m1	cytochrom P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1	101	NM_000784.3	2 - 3
<i>CYP39A1</i>	Hs00213201_m1	cytochrom P450, family 39, subfamily A, polypeptide 1	109	NM_001278738.1	11 - 12

<i>CYP51A1</i>	Hs01567880_g1	cytochrom P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1	59	NM_000786.3	5 - 6
<i>CYP7B1</i>	Hs00191385_m1	cytochrom P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1	68	NM_004811.1	1 - 2
<i>CYP8B1</i>	Hs00244754_s1	cytochrom P450, family 8, subfamily B, polypeptide 1	57	NM_004391.2	1 - 1
<i>DHCR24</i>	Hs01092436_m1	24-dehydrocholesterol reductase	73	NM_014762.3	4 - 5
<i>DHCR7</i>	Hs01023087_m1	7-dehydrocholesterol reductase	74	NM_001163817.1	3 - 4
<i>EBP</i>	Hs00198130_m1	emopamil binding protein (sterol isomerase)	90	NM_006579.2	2 - 3
<i>HSD11B1</i>	Hs01547870_m1	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1	67	NM_001206741.1	3 - 4
<i>CH25H</i>	Hs04187516_s1	cholesterol 25-hydroxylase	74	NM_003956.3	1 - 1
<i>SULT1B1</i>	Hs00234899_m1	sulfotransferase family, cytosolic, 1B, member 1	106	NM_014465.3	4 - 5
<i>UGT1A1</i>	Hs02511055_s1	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1	134	NM_000463.2	1 - 1
<i>UGT1A7</i>	Hs02517015_s1	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A7	137	NM_019077.2	1 - 1
<i>UGT1A9</i>	Hs02516855_sH	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A9	113	NM_021027.2	1 - 1
<i>UGT2B4</i>	Hs02383831_s1	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B4	161	NM_021139.2	6 - 6
Transport					
<i>ABCA1</i>	Hs00194045_m1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	125	NM_005502.3	30 - 31
<i>ABCA10</i>	Hs00365268_m1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 10	127	NM_080282.3	3 - 4
<i>ABCA12</i>	Hs00292421_m1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 12	77	NM_015657.3	1 - 2
<i>ABCA2</i>	Hs00242232_m1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2	58	NM_001606.4	10 - 11
<i>ABCA3</i>	Hs00184543_m1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 3	77	NM_001089.2	19 - 20
<i>ABCA7</i>	Hs00185303_m1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 7	80	NM_019112.3	40 - 41
<i>ABCA9</i>	Hs00329320_m1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 9	145	NM_080283.3	2 - 3
<i>ABCB1</i>	Hs00184491_m1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	110	NM_000927.4	23 - 24
<i>ABCB4</i>	Hs00240956_m1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	73	NM_000443.3	2 - 3
<i>ABCC1</i>	Hs00219905_m1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	74	NM_004996.3	24 - 25
<i>ABCG1</i>	Hs00245154_m1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	58	NM_004915.3	5 - 6
<i>ABCG2</i>	Hs00184979_m1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	92	NM_001257386.3	5 - 6
<i>ABCG4</i>	Hs00223446_m1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 4	93	NM_001142505.1	9 - 10
<i>ABCG5</i>	Hs00223686_m1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 5	60	NM_022436.2	10 - 11
<i>SLCO1A2</i>	Hs00366488_m1	solute carrier organic anion transporter family, member 1A2	72	NM_021094.3	11 - 12
<i>SLCO2B1</i>	Hs01030343_m1	solute carrier organic anion transporter family, member 2B1	62	NM_001145211.2	11 - 12
<i>SLCO3A1</i>	Hs00203184_m1	solute carrier organic anion transporter family, member 3A1	89	NM_001145044.1	2 - 3

<i>SLCO4A1</i>	Hs00983988_m1	solute carrier organic anion transporter family, member 4A1	76	NM_016354.3	10 - 11
Regulace					
<i>AHR</i>	Hs00169233_m1	aryl hydrocarbon receptor	105	NM_001621.4	6 - 7
<i>ARNT</i>	Hs01121908_m1	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	65	NM_001668.3	19 - 20
<i>CEBPA</i>	Hs00269972_s1	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	77	NM_004364.3	1 - 1
<i>ESR1</i>	Hs00174860_m1	estrogen receptor alpha	62	NM_000125.3	3 - 4
<i>ESR2</i>	Hs01100357_m1	estrogen receptor beta	93	NM_001040275.1	6 - 7
<i>NCOA1</i>	Hs00186661_m1	nuclear receptor coactivator 1	59	NM_003743.4	16 - 17
<i>NCOA2</i>	Hs00197990_m1	nuclear receptor coactivator 2	99	NM_006540.2	14 - 15
<i>NCOA3</i>	Hs01105248_m1	nuclear receptor coactivator 3	73	NM_001174087.1	13 - 14
<i>NCOA6</i>	Hs01052843_m1	nuclear receptor coactivator 6	63	NM_0012425339.1	13 - 14
<i>NCOR1</i>	Hs01094540_m1	nuclear receptor corepressor 1	137	NM_001190438.1	7 - 8
<i>NCOR2</i>	Hs00196955_m1	nuclear receptor corepressor 2	75	NM_NM_001077261.3	17 - 18
<i>NR1H2 = LXRB</i>	Hs00173195_m1	liver X receptor beta	77	NM_001256647.1	7 - 8
<i>NR1H3 = LXRA</i>	Hs00172885_m1	liver X receptor alpha	78	NM_001130101.2	6 - 7
<i>NR1H4 = FXR</i>	Hs00231968_m1	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4/farnesoid X receptor	85	NM_001206977.1	9 - 10
<i>NR1H1 = VDR</i>	Hs01045840_m1	vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor	88	NM_000376.2	9 - 10
<i>NR1H2 = PXR</i>	Hs01114267_m1	pregnane x receptor	103	NM_003889.3	8 - 9
<i>PPARGC1A</i>	Hs01016719_m1	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	74	NM_013261.3	10 - 11
<i>RXRA</i>	Hs01067636_m1	retinoid X receptor, alpha	98	NM_002957.4	3 - 4
<i>RXRB</i>	Hs00232774_m1	retinoid X receptor, beta	69	NM_001270401.1	4 - 5
<i>RXRG</i>	Hs00199455_m1	retinoid X receptor, gamma	88	NM_001256570.1	4 - 5
Signální dráhy					
<i>AKT1</i>	Hs00178289_m1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	66	NM_001014431.1	4 - 5
<i>BRAF</i>	Hs00269944_m1	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B	77	NM_004333.4	1 - 2
<i>GLI1</i>	Hs01110766_m1	GLI family zinc finger 1	83	NM_001160045.1	8 - 9
<i>GLI2</i>	Hs01119974_m1	GLI family zinc finger 2	61	NM_005270.4	6 - 7
<i>GLI3</i>	Hs00609233_m1	GLI family zinc finger 3	64	NM_000168.5	7 - 8
<i>GNAI1</i>	Hs01053355_m1	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 1	86	NM_001256414.1	6 - 7
<i>GSK3A</i>	Hs00997942_m1	glycogen synthase kinase 3 alpha	64	NM_019884.2	4 - 5
<i>GSK3B</i>	Hs00275656_m1	glykogen syntáza kináza 3 beta	73	NM_001146156.1	7 - 8
<i>KRAS</i>	Hs00270666_m1	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	130	NM_004985.3	4 - 5
<i>LRP2</i>	Hs00189742_m1	low density lipoprotein receptor-related protein 2	72	NM_004525.2	34 - 35
<i>MAP2K1</i>	Hs00983247_g1	mitogen-activated protein kinase kinase 1	68	NM_002755.3	10 - 11

MAP2K2	Hs04194606_gH	mitogen-activated protein kinase kinase 2	74	NM_030662.3	7 - 7
MAPK1	Hs01046830_m1	mitogen-activated protein kinase 1	74	NM_002745.4	6 - 7
MAPK3	Hs00946872_m1	mitogen-activated protein kinase 3	74	NM_001040056.2	6 - 7
MTOR	Hs00234508_m1	mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)	103	NM_004958.3	20 - 21
PRKAR2B	Hs00176966_m1	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta	93	NM_002736.2	4 - 5
PTEN	Hs02621230_s1	phosphatase and tensin homolog	135	NM_000314.4	9 - 9
PTCH1	Hs00181117_m1	patched 1	72	NM_000264.3	19 - 20
RAF1	Hs00234119_m1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	90	NM_002880.3	7 - 8
SMO	Hs01090242_m1	Smoothened, frizzled family receptor	54	NM_005631.4	8 - 9
SUFU	Hs00960524_m1	suppressor of fused homolog	85	NM_001178133.1	9 - 10
Diagnóza					
ERBB2	Hs01001580_m1	v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2	60	NM_002005862.1	17 - 18
MKI67	Hs01032443_m1	marker of proliferation Ki-67	66	NM_001145966.1	7 - 8
TP53	Hs01034249_m1	tumor protein p53	108	NM_000546.5	10 - 11
Referenční geny					
EIF2B1	Hs00426752_m1	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1 alpha, 26kDa	75	NM_001414.3	4 - 5
ELF1	Hs00152844_m1	E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)	76	NM_001145353.1	1 - 2
UBB	Hs00430290_m1	ubiquitin B	120	NM_018955.3	1 - 2

Tabulka 9: Seznam všech sond (TaqMan® Gene Expression Assays) využitých ve studii. Popis funkce příslušných produktů je popsán výše. Poslední tři geny (*EIF2B1*, *ELF1* a *UBB*) jsou geny referenční, hodnoty Cq těchto genů jsou využity pro normalizaci dat před statistickým vyhodnocením.

* Pokud je k danému genu více referenčních sekvencí, je v tabulce uvedena pouze jedna.

4.8 Statistické vyhodnocení

Před samotnou statistickou analýzou byla data normalizována k referenčním genům. Normalizace výsledků slouží k eliminaci případných chyb, které mohly nastat v průběhu zpracování vzorků. Díky normalizaci zůstává hlavním aspektem variabilita biologická, kterou detekovat chceme.

Současně se všemi studovanými geny byla u všech vzorků změřena také genová exprese třech referenčních genů – *EIF2B1*, *ELF1* a *UBB*. Tyto geny patří mezi tzv. housekeepingové. Jejich produkty zajišťují základní buněčné pochody, jako je transkripce, translace či degradace proteinů. Stabilita exprese těchto genů na souboru vzorků nádorových a nenádorových tkání pacientek s karcinmem prsu byla otestována v předchozí práci Oddělení toxikogenomiky (Brynychova et al., 2013). Hodnoty Cq všech tří referenčních genů pro daný vzorek byly zprůměrovány a normalizace Cq hodnoty vzorku byla následně vypočtena podle vzorce:

$$Cq \text{ (normalizované)} = Cq \text{ (vzorek)} / Cq \text{ (referenční geny)}$$

K analýze rozdílů v genové expresi mezi ER pozitivními tumory, ER negativními tumory a nenádorovými kontrolami byl využit software REST 2009 (Qiagen, Hilden, Německo). Výstupem softwaru je mimo jiné i změna genové exprese (fold change) vypočtená metodou $\Delta\Delta Cq$ s korekcí na účinnost reakce (Pfaffl, 2001) podle vzorce:

$$R = (E_{\text{cílový gen}})^{\Delta Cq_{\text{cílový gen (tumor - kontrola)}}} / (E_{\text{referenční gen}})^{\Delta Cq_{\text{referenční gen (tumor - kontrola)}}},$$

kde R je poměr expresí (expression ratio) a E je účinnost PCR reakce (efficiency). Stejná metoda byla použita pro vyjádření rozdílů v genové expresi mezi buněčnými liniemi.

Pro zjištění rozdělení dat byl využit Kolmogorov-Smirnovův test. Protože všechna data nesplňovala podmínku normálního rozdělení, byly pro statistickou analýzu využity neparametrické testy. Ke zhodnocení vztahu genových expresí k faktoriálním veličinám-klinicko-patologickým datům pacientek byl využit Kruskal-Wallisův test. Mezi klinicko-patologickými údaji, které byly srovnávány s genovou expresí, je familiární výskyt jakéhokoli karcinomu, popř. výskyt karcinomu prsu a/nebo ovaria. Karcinomy byly z hlediska histopatologického typu rozděleny na invazivní duktální karcinomy (IDCA) a ostatní, které zahrnovaly invazivní lobulární karcinom či smíšený karcinom. Srovnávány byly také nádorový grade a stage (hodnocený pomocí TNM klasifikace), které jsou podrobněji popsány v kapitole 2.1.1 a exprese receptorových proteinů (PR a HER2). Grade (G) a stage (S) byly vzhledem k nízkému počtu pacientek srovnávány jako G1 vs. G2 nebo G3, respektive S1 vs. S2-S4.

Pro testování korelace kontinuálních veličin (exprese jednotlivých genů, věk pacientky, exprese ER, PR a Ki67) posloužil Spearmanův test. Za statisticky významné byly považovány výsledky na hladině významnosti $p < 0,05$. K analýze byl využit software SPSS v15.0 (SPSS Inc., IL, USA).

Výsledky statistických analýz byly podrobeny tzv. FDR (false discovery rate) korekci podle Benjamini and Hochberg (1995). Tato statistická metoda se užívá v případě mnohočetného testování hypotéz, při kterém je třeba pravidla pravděpodobnosti uplatnit nejen na vstupní data, ale i na samotné statistické testování. FDR korekce má za úkol upravit hladinu pravděpodobnosti mnohočetného testování, jinými slovy snížit pravděpodobnost výskytu chyby I. typu, kdy je nulová hypotéza chybně zamítnuta a výsledek statistické analýzy považován za signifikantní. Vstupními daty pro FDR korekci jsou p-hodnoty

mnohočetného testování a požadovaná hladina významnosti pro korekci, obvykle stanovena jako $q^* = 0,05$.

Pro potřeby výpočtu jsou všechny p-hodnoty, P_1, P_2, \dots, P_m , kde m je celkový počet nulových hypotéz mnohočetného testování, seřazeny v tabulce vzestupně podle velikosti. Pro všechny hodnoty P , které nesplňují rovnici

$$P_i \leq \frac{i}{m} \cdot q^*,$$

kde i je pořadí hypotézy v tabulce, bude hypotéza zamítnuta (Benjamini and Hochberg, 1995). Pro FDR korekci byl použit předpřipravený soubor s výpočtem v programu Microsoft Excel (Weinkauff, 2012).

5 Výsledky

5.1 Srovnání exprese u nádorů ER+, ER- a zdravých tkání

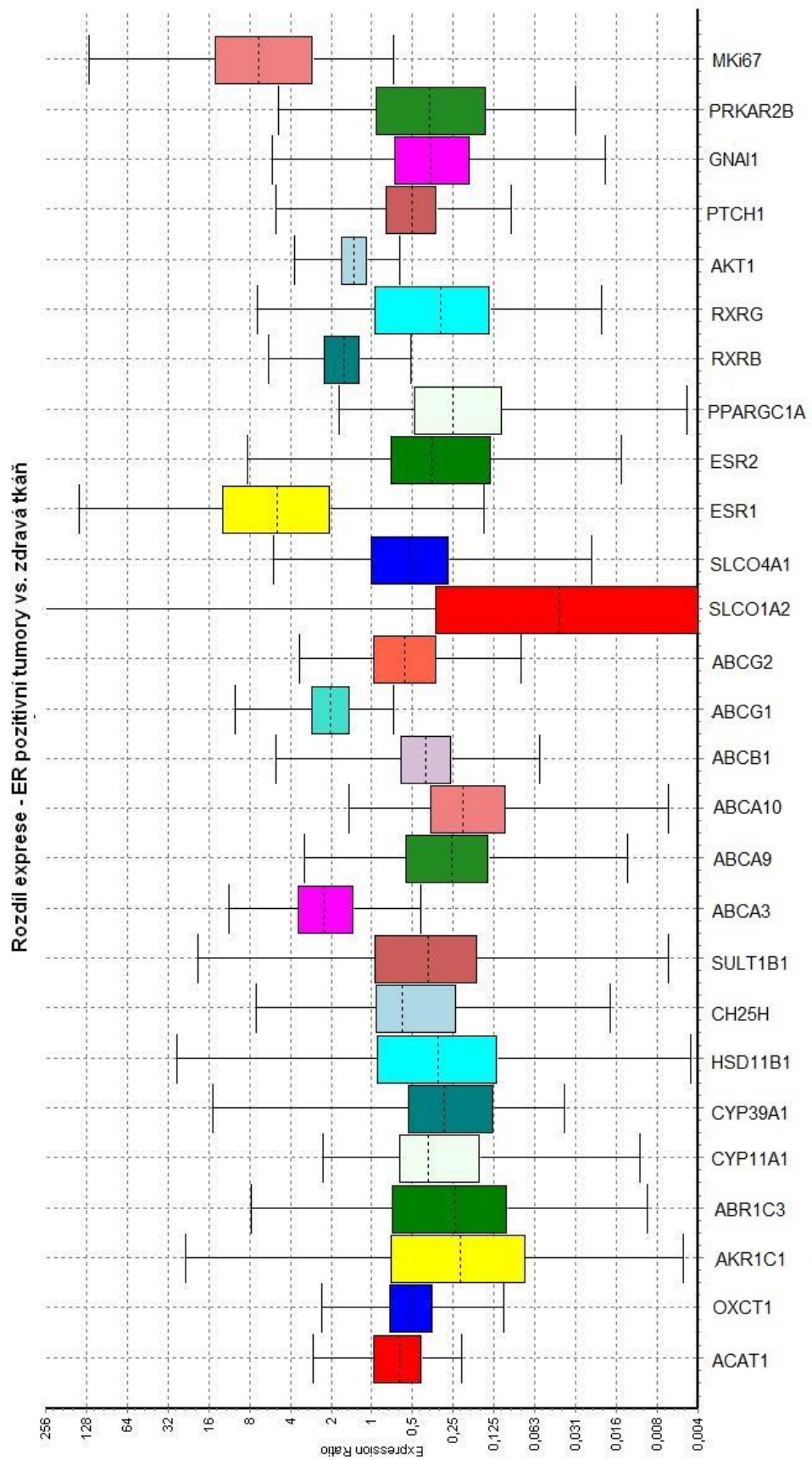
Prvním cílem studie bylo stanovení rozdílů v expresních hladinách všech vybraných genů (Kapitola 4.7, Tabulka 9) mezi ER pozitivními a ER negativními tumory, a mezi ER+/- tumory a nenádorovými tkáněmi. Celkem bylo k dispozici 39 tkáňových vzorků, z toho bylo 17 ER+ tumorů, 12 ER- tumorů a 10 nenádorových tkání. Vzhledem k velkému počtu analyzovaných genů byla cDNA před měřením genové exprese preamplifikována (viz Kapitola 4.6) a 32x naředěna v TE puftru. Pro statistické vyhodnocení byl použit program REST 2009.

5.1.1 ER+ vs. zdravá tkáň

Srovnání exprese bylo provedeno u ER pozitivních tumorů (n = 17) a zdravých tkání (n = 10). V Tabulce 10 a na krabicovém diagramu (Obr. 18) jsou zobrazena data pouze pro geny, u nichž vyšel signifikantní rozdíl v expresi (fold change) mezi sledovanými skupinami.

Gen	Účinnost reakce	Změna exprese (ER+ vs. Zdravá tkáň)	95% konfidenční interval	p-hodnota	Výsledek
Oxysterolová dráha					
<i>ACAT1</i>	0,94	0,65	0,25 - 1,82	0,016	<i>Snížená exprese</i>
<i>OXCT1</i>	0,97	0,52	0,15 - 1,91	<0,001	<i>Snížená exprese</i>
Metabolismus					
<i>AKR1C1</i>	1,00	0,23	0,01 - 8,32	0,006	<i>Snížená exprese</i>
<i>AKR1C3</i>	0,99	0,27	0,02 - 4,11	0,002	<i>Snížená exprese</i>
<i>CYP11A1</i>	0,95	0,32	0,03 - 1,84	0,001	<i>Snížená exprese</i>
<i>CYP39A1</i>	0,96	0,32	0,05 - 2,93	0,006	<i>Snížená exprese</i>
<i>HSD11B1</i>	0,99	0,34	0,01 - 10,80	0,029	<i>Snížená exprese</i>
<i>CH25H</i>	0,99	0,49	0,06 - 4,16	0,031	<i>Snížená exprese</i>
<i>SULT1B1</i>	0,98	0,41	0,03 - 5,73	0,038	<i>Snížená exprese</i>
Transport					
<i>ABCA10</i>	1,00	0,19	0,02 - 1,08	<0,001	<i>Snížená exprese</i>
<i>ABCA9</i>	0,92	0,26	0,02 - 1,96	0,001	<i>Snížená exprese</i>
<i>ABCB1</i>	0,92	0,41	0,09 - 1,94	0,002	<i>Snížená exprese</i>
<i>ABCG2</i>	0,93	0,57	0,11 - 2,31	0,028	<i>Snížená exprese</i>
<i>SLCO1A2</i>	0,96	0,03	0,00 - 105,11	0,007	<i>Snížená exprese</i>
<i>SLCO4A1</i>	1,00	0,51	0,06 - 3,81	0,029	<i>Snížená exprese</i>
<i>ABCA3</i>	0,95	2,16	0,55 - 7,90	0,002	<i>Zvýšená exprese</i>
<i>ABCG1</i>	0,97	2,10	0,90 - 5,96	<0,001	<i>Zvýšená exprese</i>
Regulace					
<i>ESR2</i>	1,00	0,35	0,03 - 3,79	0,006	<i>Snížená exprese</i>
<i>PPARGCIA</i>	0,96	0,22	0,01 - 1,27	<0,001	<i>Snížená exprese</i>
<i>RXRG</i>	0,94	0,34	0,03 - 4,04	0,01	<i>Snížená exprese</i>
<i>ESR1</i>	1,00	5,34	0,41 - 73,13	<0,001	<i>Zvýšená exprese</i>
<i>RXRB</i>	0,97	1,62	0,63 - 3,61	0,004	<i>Zvýšená exprese</i>
Signální dráhy					
<i>GNAI1</i>	0,97	0,36	0,04 - 2,99	0,002	<i>Snížená exprese</i>
<i>PRKAR2B</i>	0,95	0,37	0,05 - 2,77	0,003	<i>Snížená exprese</i>
<i>PTCH1</i>	1,00	0,52	0,12 - 2,16	0,008	<i>Snížená exprese</i>
<i>AKT1</i>	0,96	1,42	0,75 - 2,83	0,004	<i>Zvýšená exprese</i>
Diagnóza					
<i>MKI67</i>	1,00	6,27	0,87 - 54,66	<0,001	<i>Zvýšená exprese</i>

Tabulka 10: Porovnání genové exprese mezi ER pozitivními tumory a zdravými tkáněmi. p-hodnoty zvýrazněné tučně jsou signifikantní i po FDR korekci mnohočetné analýzy.



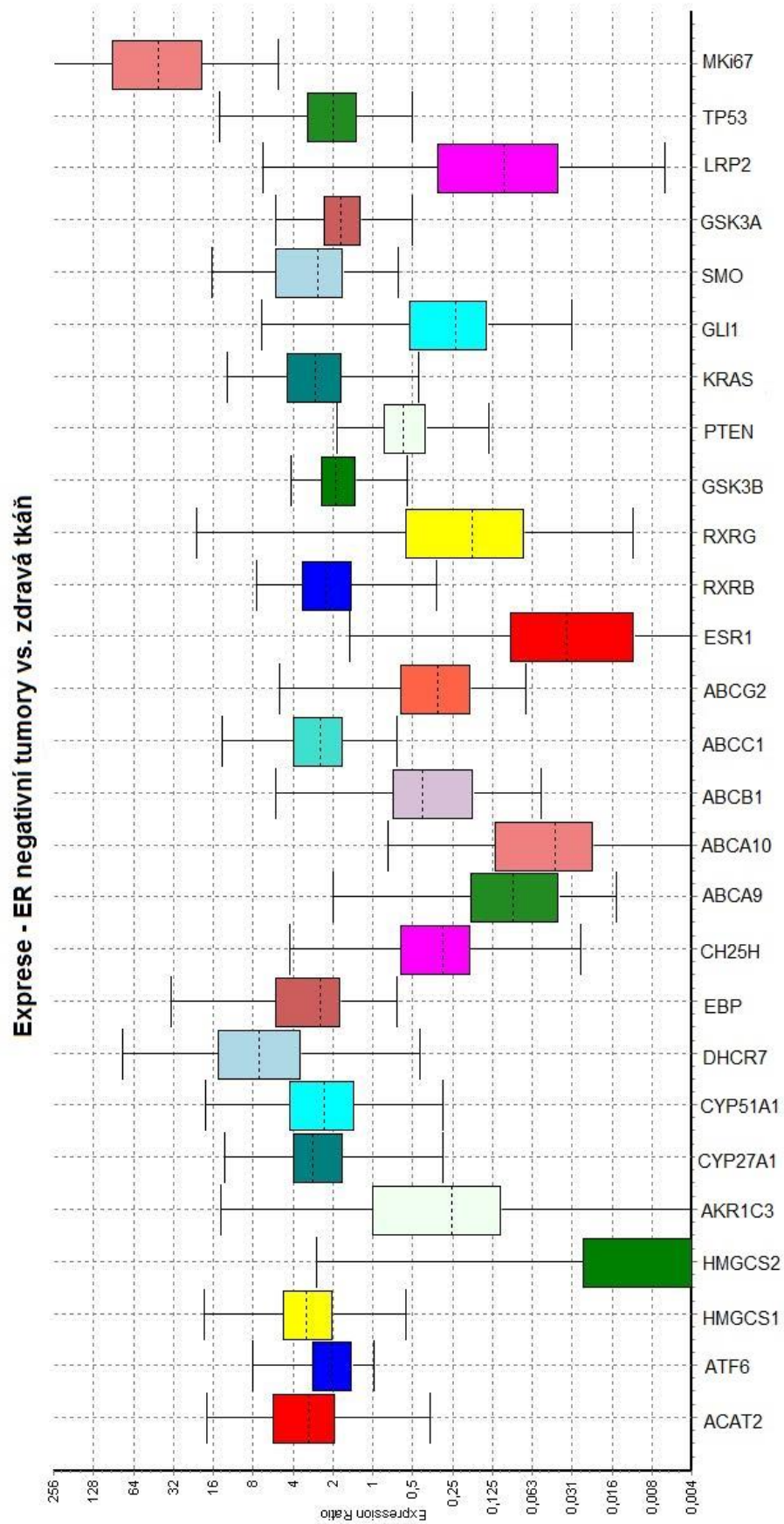
Obr. 18: Krabicový diagram pro srovnání genové exprese mezi ER pozitivními tumory a zdravou tkání.

5.1.2 ER- vs. zdravá tkáň

Rozdíly v expresi byly dále studovány u ER negativních tumorů (n = 12) a zdravých tkání (n = 10). Ze všech měřených genů jsou v tabulce opět zaznamenány pouze ty, u nichž se exprese statisticky významně lišila mezi ER- nádory a nenádorovými kontrolami. Výsledky (Tabulka 11, Obr. 19) ukazují jak zvýšenou, tak sníženou expresi u některých genů mezi srovnávanými skupinami pacientek.

Gen	Účinnost	Expese (ER- vs. Zdravá tkáň)	95% konfidenční interval	p-hodnota	Výsledek
Oxysterolová dráha					
<i>HMGCS2</i>	0,95	<0,01	0,00 - 0,91	<0,001	<i>Snížená expese</i>
<i>ACAT2</i>	0,92	3,19	0,66 - 13,56	0,001	<i>Zvýšená expese</i>
<i>ATF6</i>	0,96	2,09	1,04 - 5,74	<0,001	<i>Zvýšená expese</i>
<i>HMGCS1</i>	0,93	3,24	0,87 - 15,23	<0,001	<i>Zvýšená expese</i>
Metabolismus					
<i>AKRIC3</i>	0,99	0,28	0,01 - 9,61	0,04	<i>Snížená expese</i>
<i>CH25H</i>	0,99	0,32	0,05 - 2,31	0,001	<i>Snížená expese</i>
<i>CYP27A1</i>	0,95	2,48	0,39 - 9,08	0,004	<i>Zvýšená expese</i>
<i>CYP51A1</i>	0,98	2,29	0,48 - 9,97	0,009	<i>Zvýšená expese</i>
<i>DHCR7</i>	1,00	6,90	0,69 - 53,56	<0,001	<i>Zvýšená expese</i>
<i>EBP</i>	0,94	3,17	0,93 - 26,12	<0,001	<i>Zvýšená expese</i>
Transport					
<i>ABCA10</i>	1,00	0,05	0,00 - 0,55	<0,001	<i>Snížená expese</i>
<i>ABCA9</i>	0,92	0,09	0,02 - 1,10	<0,001	<i>Snížená expese</i>
<i>ABCB1</i>	0,92	0,38	0,08 - 2,55	0,008	<i>Snížená expese</i>
<i>ABCG2</i>	0,93	0,37	0,08 - 2,79	0,005	<i>Snížená expese</i>
<i>ABCC1</i>	0,99	2,61	0,69 - 9,20	<0,001	<i>Zvýšená expese</i>
Regulace					
<i>ESR1</i>	1,00	0,04	0,00 - 0,52	<0,001	<i>Snížená expese</i>
<i>RXRG</i>	0,94	0,20	0,02 - 6,14	0,004	<i>Snížená expese</i>
<i>RXRB</i>	0,97	2,12	0,42 - 6,38	0,007	<i>Zvýšená expese</i>
Signální dráhy					
<i>GLII</i>	0,95	0,28	0,05 - 2,79	0,004	<i>Snížená expese</i>
<i>LRP2</i>	1,00	0,12	0,01 - 2,41	0,002	<i>Snížená expese</i>
<i>PTEN</i>	0,87	0,56	0,16 - 1,49	0,007	<i>Snížená expese</i>
<i>GSK3A</i>	0,99	1,69	0,72 - 4,09	0,003	<i>Zvýšená expese</i>
<i>GSK3B</i>	0,94	1,72	0,66 - 3,84	0,002	<i>Zvýšená expese</i>
<i>KRAS</i>	0,91	2,77	0,73 - 11,35	0,001	<i>Zvýšená expese</i>
<i>SMO</i>	0,99	2,90	0,65 - 14,17	0,001	<i>Zvýšená expese</i>
Diagnóza					
<i>MKI67</i>	1,00	42,60	5,984 - 319,57	<0,001	<i>Zvýšená expese</i>
<i>TP53</i>	1,00	2,12	0,728 - 9,22	0,003	<i>Zvýšená expese</i>

Tabulka 11: Porovnání genové exprese mezi ER negativními tumory a zdravými tkáněmi. p-hodnoty zvýrazněné tučně jsou signifikantní i po FDR korekci mnohočetné analýzy.



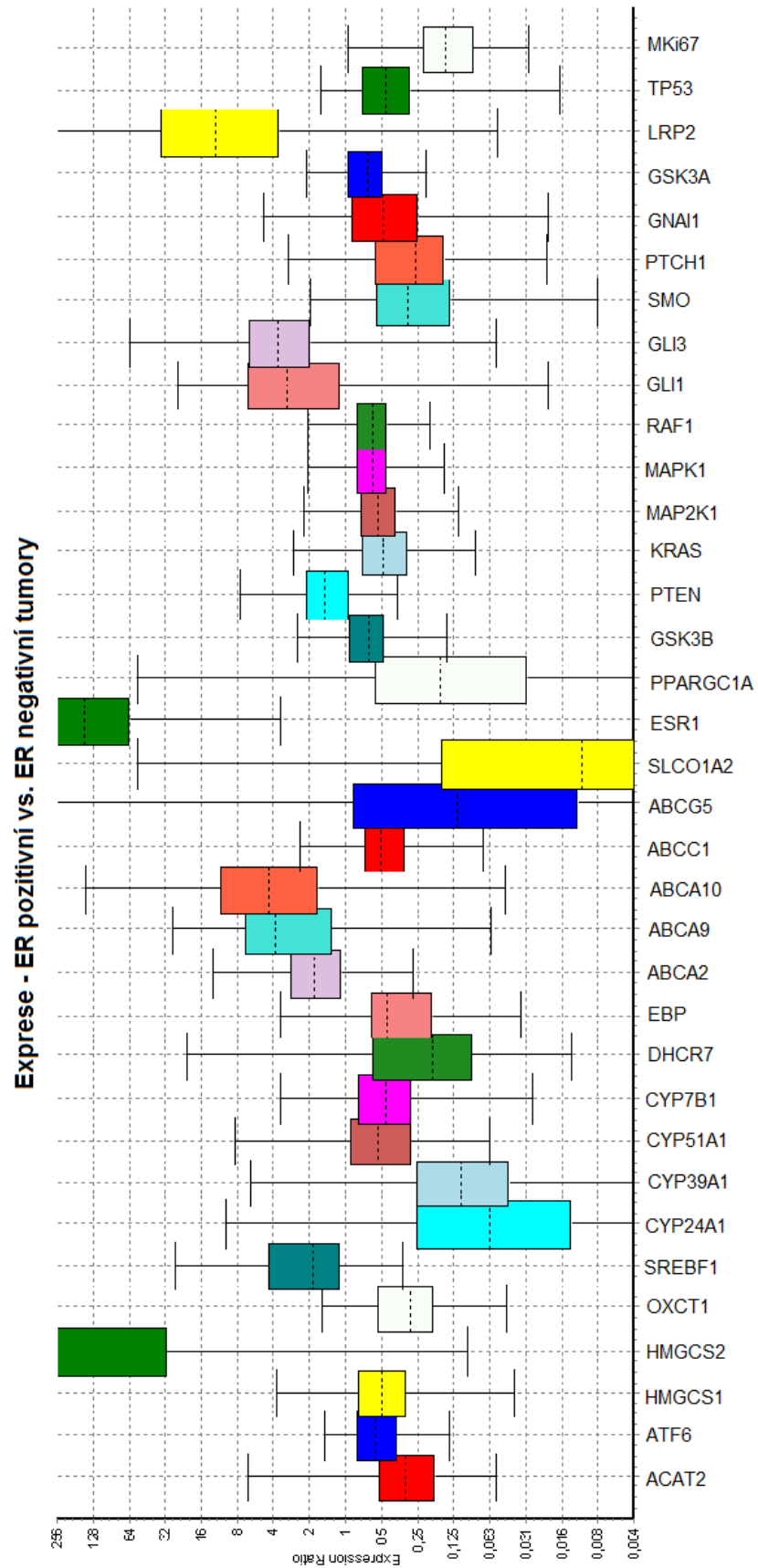
Obr. 19: Krabicový diagram pro srovnání genové exprese mezi ER negativními tumory a zdravou tkání.

5.1.3 ER+ vs. ER-

Poslední srovnání bylo provedeno mezi ER pozitivními tumory (n = 17) a ER negativními tumory (n = 12). Výsledky tohoto srovnání jsou uvedeny v Tabulce 12 a graficky zaznamenány na krabicovém diagramu (Obr. 20)

Gen	Účinnost	Expresa (ER+ vs. ER-)	95% konfidenční interval	p-hodnota	Výsledek
Oxysterolová dráha					
<i>ACAT2</i>	0,92	0,32	0,07 - 2,21	<0,001	Snížená exprese
<i>ATF6</i>	0,96	0,54	0,19 - 1,20	<0,001	Snížená exprese
<i>HMGCS1</i>	0,93	0,47	0,09 - 1,80	0,001	Snížená exprese
<i>OXCT1</i>	0,97	0,31	0,07 - 1,21	<0,001	Snížená exprese
<i>HMGCS2</i>	0,95	240,86	0,77 - 78 754,20	<0,001	Zvýšená exprese
<i>SREBF1</i>	0,95	2,18	0,51 - 13,02	0,003	Zvýšená exprese
Metabolismus					
<i>CYP24A1</i>	0,92	0,05	0,00 - 3,10	<0,001	Snížená exprese
<i>CYP39A1</i>	0,96	0,11	0,01 - 1,58	<0,001	Snížená exprese
<i>CYP51A1</i>	0,98	0,55	0,12 - 3,09	0,019	Snížená exprese
<i>CYP7B1</i>	0,96	0,45	0,08 - 2,25	0,001	Snížená exprese
<i>DHCR7</i>	1,00	0,23	0,02 - 4,70	0,002	Snížená exprese
<i>EBP</i>	0,94	0,36	0,04 - 1,84	<0,001	Snížená exprese
Transport					
<i>ABCC1</i>	0,99	0,47	0,13 - 1,64	<0,001	Snížená exprese
<i>ABCG5</i>	0,98	0,11	0,00 - 289,47	0,024	Snížená exprese
<i>SLCO1A2</i>	0,96	0,01	0,00 - 8,78	<0,001	Snížená exprese
<i>ABCA10</i>	1,00	4,04	0,19 - 53,23	0,003	Zvýšená exprese
<i>ABCA2</i>	1,00	1,78	0,37 - 6,91	0,011	Zvýšená exprese
<i>ABCA9</i>	0,92	2,86	0,31 - 14,04	0,004	Zvýšená exprese
Regulace					
<i>PPARGC1A</i>	0,96	0,17	0,00 - 28,03	0,006	Snížená exprese
<i>ESR1</i>	1,00	149,59	12,19 - 1 715,34	<0,001	Zvýšená exprese
Signální dráhy					
<i>GNAI1</i>	0,97	0,44	0,05 - 2,74	0,005	Snížená exprese
<i>GSK3A</i>	0,99	0,68	0,28 - 1,63	0,009	Snížená exprese
<i>GSK3B</i>	0,94	0,66	0,22 - 2,08	0,016	Snížená exprese
<i>KRAS</i>	0,91	0,47	0,15 - 1,57	<0,001	Snížená exprese
<i>MAP2K1</i>	0,99	0,53	0,18 - 1,57	<0,001	Snížená exprese
<i>MAPK1</i>	1,00	0,60	0,21 - 1,44	<0,001	Snížená exprese
<i>PTCH1</i>	1,00	0,28	0,04 - 1,76	<0,001	Snížená exprese
<i>RAF1</i>	0,92	0,60	0,29 - 1,40	0,001	Snížená exprese
<i>SMO</i>	0,99	0,26	0,03 - 1,46	<0,001	Snížená exprese
<i>GLI1</i>	0,95	2,54	0,13 - 21,28	0,018	Zvýšená exprese
<i>GLI3</i>	0,99	3,26	0,13 - 43,66	<0,001	Zvýšená exprese
<i>LRP2</i>	1,00	11,59	0,35 - 327,13	<0,001	Zvýšená exprese
<i>PTEN</i>	0,87	1,50	0,62 - 4,70	0,011	Zvýšená exprese
Diagnóza					
<i>MKI67</i>	1,00	0,15	0,04 - 0,56	<0,001	Snížená exprese
<i>TP53</i>	1,00	0,41	0,06 - 1,33	<0,001	Snížená exprese

Tabulka 12. Porovnání genové exprese mezi ER pozitivními tumory a ER negativními tumory. p-hodnoty zvýrazněné tučně jsou signifikantní i po FDR korekci mnohočetné analýzy.



Obr. 20. Krabicový diagram pro srovnání genové exprese mezi ER pozitivními tumory a ER negativními tumory.

5.2 Srovnání exprese vybraných genů u ER+ nádorů s klinicko-patologickými daty

V další části studie byla měřena genová exprese 25 genů z oblasti metabolismu a transportu oxysterolů, jejichž expresní hladiny se nejvíce lišily mezi ER+ a ER- negativními vzorky. Tato exprese byla měřena v tkáňových vzorcích dalších 50 ER pozitivních pacientek s diagnostikovaným karcinomem prsu. Vzorky cDNA v tomto případě nebyly preamplifikovány a byly ředěny 8x v NFW.

5.2.1 Soubor pacientek - klinicko-patologická data

Do této části studie bylo zařazeno celkem 50 pacientek s diagnostikovaným karcinomem prsu ve věku mezi 37 - 86 let s mediánem 65 let. Všechny vzorky pocházely z ER pozitivních tumorů. Protože premenopauzální pacientky byly pouze tři, nebyl menopauzální status zařazen mezi porovnávaná klinicko-patologická data.

Průměrná doba sledování pacientek byla $22,6 \pm 8$ měsíců ($n = 48$). Dvě pacientky byly z dalšího sledování vyřazeny (přeložení do jiné nemocnice $n = 1$, smrt z jiné příčiny $n = 1$). U jedné pacientky došlo k relapsu onemocnění, 6 pacientek projevilo intoleranci k podávané hormonální terapii z neznámé příčiny. Kvůli zatím krátké době sledování nemohlo být v rámci studie hodnoceno přežívání pacientek vzhledem k použité léčbě.

V souboru 50 pacientek byla zahrnuta jedna žena, která před samotným chirurgickým odstraněním nádoru podstoupila neoadjuvantní terapii. Při vynechání genových expresí tohoto vzorku ze statistického testování nebyly sledovány žádné rozdíly ve výsledcích, proto byl vzorek v analýze ponechán.

Všechna klinicko-patologická data a počty pacientek v jednotlivých skupinách shrnuje Tabulka 13.

Klinicko-patologická data		
Věk pacientek	rozsah souboru	37 - 86 let
	medián	65 let
Menopauza	postmenopauzální	45
	premenopauzální	3
	neznámo	2
Karcinom v rodině	ano	27
	ne	11
	neznámo	12
Karcinom prsu a/nebo ovaria v rodině	ano	6
	ne	32
	neznámo	12
Typ nádoru	IDCA	42
	jiný	6
	neznámo	2
Grade	G1	18
	G2	30
	G3	1
	neznámo	1
Stádium	S1	29
	S2	18
	S3	2
	S4	1
Velikost tumoru (TNM klasifikace)	T1	42
	T2	8
Postižení regionálních lymfatických uzlin (TNM klasifikace)	N0	34
	N1	14
	neznámo	2
Vzdálené metastázy (TNM klasifikace)	M0	50
	M+	0
Expres ER	ER+	50
	ER-	0
Expres PR	PR+	44
	PR-	6
Expres HER2	HER2+	4
	HER2-	46
Neoadjuvantní terapie	ano	1
	ne	49
Intolerance k hormonální terapii	ano	6
	ne	35
	neznámo	9

Tabulka 13. Klinicko-patologická data pacientek

5.2.2 Porovnání exprese s klinickými daty

Výsledky expresí byly nejprve normalizovány na stejné referenční geny jako v první části studie a otestovány Kolmogorov-Smirnovovým testem. Protože exprese některých genů nevykazovaly normální rozdělení, ke statistickému vyhodnocení byly využity neparametrické testy - Kruskal-Wallisův test a Spearmanův korelační test. Signifikantní výsledky analýzy jsou zaznamenány v Tabulce 14 a 15. Měřené geny, pro které nevyšel žádný signifikantní výsledek po analýze s klinickými daty (*ESR1*, *HMGCS2*, *SREBF1*, *DHCR7*, *HMGCS1*, *CYP7B1*, *ATF6*, *CYP51A1* a *RXRG*), v tabulce uvedeny nejsou, gen *SLCO1A2* byl z analýzy vyřazen kvůli příliš nízkým expresím.

Gen	Karcinom v rodině		Karcinom BC/OVC		Typ nádoru		Node	
	ano (27)	ne (11)	ano (6)	ne (32)	IDCA (42)	jiný (6)	pozitivní (14)	negativní (34)
Oxysterolová dráha								
<i>ACAT2</i>	$1,13 \pm 0,02$	$1,14 \pm 0,01$	$1,12 \pm 0,01$	$1,14 \pm 0,02$	NS	NS	$1,13 \pm 0,02$	$1,14 \pm 0,02$
	0,012		0,041				0,050	
<i>OXCT1</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Metabolismus								
<i>EBP</i>	NS	NS	$1,09 \pm 0,04$	$1,12 \pm 0,02$	NS	NS	NS	NS
			0,039					
<i>CH25H</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	$1,20 \pm 0,04$	$1,18 \pm 0,04$
							0,048	
<i>CYP24A1</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>CYP39A1</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Transport								
<i>ABCA10</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>ABCA2</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	$1,13 \pm 0,03$	$1,11 \pm 0,02$
							0,018	
<i>ABCA9</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>ABCC1</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	$1,15 \pm 0,03$	$1,13 \pm 0,03$
							0,039	
<i>ABCG1</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	$1,12 \pm 0,03$	$1,10 \pm 0,02$
							0,040	
<i>ABCG2</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	$1,24 \pm 0,05$	$1,21 \pm 0,04$
							0,018	
Regulace								
<i>ESR2</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>PPARGC1A</i>	NS	NS	NS	NS	$1,32 \pm 0,05$	$1,28 \pm 0,02$	NS	NS
					0,027			
<i>RXRA</i>	$1,08 \pm 0,03$	$1,05 \pm 0,03$	NS	NS	NS	NS	$1,08 \pm 0,03$	$1,06 \pm 0,02$
	0,010						0,013	

Tabulka 14: Srovnání genové exprese s vybranými klinicko-patologickými daty. Tabulka zahrnuje signifikantní výsledky korelace mezi expresí uvedených genů a klinicko-patologickými daty. Signifikantní výsledky jsou uvedeny jako průměr normalizovaných Cq hodnot \pm směrodatná odchylka, společně s příslušnou p-hodnotou. Nesignifikantní výsledky jsou uvedeny jako NS (non significant). Typ tumoru – jiný (5x ILCA - invazivní lobulární karcinom, 1x smíšený karcinom).

Gen	Grade		Stage		HER2		PR	
	G1 (18)	G2 a G3 (31)	S1 (29)	S2, S3, S4 (21)	pozitivní (4)	negativní (46)	pozitivní (44)	negativní (6)
Oxysterolová dráha								
<i>ACAT2</i>	NS	NS	$1,14 \pm 0,02$	$1,13 \pm 0,02$	NS	NS	NS	NS
			0,028					
<i>OXCT1</i>	$1,12 \pm 0,02$	$1,14 \pm 0,03$	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	0,019							
Metabolismus								
<i>EBP</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>CH25H</i>	NS	NS	$1,17 \pm 0,03$	$1,21 \pm 0,05$	NS	NS	NS	NS
			0,001					
<i>CYP24A1</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>CYP39A1</i>	NS	NS	$1,23 \pm 0,05$	$1,27 \pm 0,07$	NS	NS	NS	NS
			0,041					
Transport								
<i>ABCA10</i>	NS	NS	$1,21 \pm 0,04$	$1,27 \pm 0,06$	NS	NS	NS	NS
			0,001					
<i>ABCA2</i>	NS	NS	$1,10 \pm 0,02$	$1,12 \pm 0,03$	NS	NS	NS	NS
			0,015					
<i>ABCA9</i>	NS	NS	$1,15 \pm 0,04$	$1,20 \pm 0,06$	NS	NS	NS	NS
			0,003					
<i>ABCC1</i>	NS	NS	$1,13 \pm 0,03$	$1,15 \pm 0,03$	$1,11 \pm 0,02$	$1,14 \pm 0,03$	NS	NS
			0,005		0,042			
<i>ABCG1</i>	NS	NS	$1,10 \pm 0,02$	$1,12 \pm 0,03$	NS	NS	NS	NS
			0,006					
<i>ABCG2</i>	NS	NS	$1,21 \pm 0,04$	$1,24 \pm 0,05$	NS	NS	NS	NS
			0,007					
Regulace								
<i>ESR2</i>	NS	NS	$1,33 \pm 0,05$	$1,38 \pm 0,06$	NS	NS	NS	NS
			0,003					
<i>PPARGCIA</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>RXRA</i>	NS	NS	$1,06 \pm 0,02$	$1,08 \pm 0,03$	NS	NS	$1,06 \pm 0,03$	$1,09 \pm 0,03$
			0,004				0,039	

Tabulka 15: Srovnání genové exprese s vybranými klinicko-patologickými daty. Tabulka zahrnuje signifikantní výsledky korelace mezi expresí uvedených genů a klinicko-patologickými daty. Signifikantní výsledky jsou uvedeny jako průměr normalizovaných Cq hodnot \pm směrodatná odchylka, společně s příslušnou p-hodnotou. Nesignifikantní výsledky jsou uvedeny jako NS (non significant). p-hodnoty zvýrazněné tučně jsou signifikantní i po FDR korekci mnohočetné analýzy.

5.3 Expres ve tkáňových kulturách

Expres vybraných 25 genů byla také stanovena ve dvou buněčných modelech karcinomu prsu – v ER pozitivní linii MCF-7 a ER negativní linii MDA-MB-231. Stanovení exprese bylo provedeno na neamplifikované cDNA, 8x ředěné v NFW. Výsledky Cq hodnot a rozdíly v expresi genů mezi MCF-7 linií oproti ER negativní linii MDA-MB-231 (fold change, Pfaffl (2001)) jsou uvedeny v Tabulce 16. Hodnoty některých expresí byly pod limitem detekce, ve výsledcích jsou značeny jako BLQ (below limit of quantification).

	Cq MCF-7	Cq MB-231	Změna exprese (MCF-7 vs MDA-MB-231)	Výsledek
Oxysterolová dráha				
<i>ACAT2</i>	26,51	24,33	0,32	Snížená exprese
<i>SREBF1</i>	24,66	25,35	2,09	Zvýšená exprese
<i>ATF6</i>	26,74	26,70	1,29	Beze změny
<i>HMGCS1</i>	26,27	25,28	0,69	Beze změny
<i>OXCT1</i>	27,93	27,65	1,09	Beze změny
<i>HMGCS2</i>	36,34	BLQ	Nehodnoceno	
Metabolismus				
<i>CYP24A1</i>	26,18	24,86	0,56	Snížená exprese
<i>CYP39A1</i>	36,26	29,61	0,02	Snížená exprese
<i>CH25H</i>	37,04	34,28	0,20	Snížená exprese
<i>DHCR7</i>	22,86	23,04	1,50	Zvýšená exprese
<i>CYP51A1</i>	23,33	23,36	1,35	Beze změny
<i>EBP</i>	25,48	25,36	1,23	Beze změny
<i>CYP7B1</i>	BLQ	BLQ	Nehodnoceno	
Transport				
<i>ABCA10</i>	33,64	36,07	7,16	Zvýšená exprese
<i>ABCA2</i>	24,99	27,27	6,38	Zvýšená exprese
<i>ABCC1</i>	25,84	26,29	1,80	Zvýšená exprese
<i>ABCG1</i>	28,17	BLQ	Nehodnoceno	Zvýšená exprese
<i>ABCG2</i>	27,21	30,95	15,48	Zvýšená exprese
<i>ABCA9</i>	BLQ	36,48	Nehodnoceno	
<i>SLCO1A2</i>	36,748	BLQ	Nehodnoceno	
Regulace				
<i>PPARGC1A</i>	35,40	32,66	0,21	Snížená exprese
<i>ESR1</i>	22,82	35,91	11 497,68	Zvýšená exprese
<i>RXRA</i>	24,95	25,55	1,96	Zvýšená exprese
<i>ESR2</i>	32,98	33,09	1,42	Beze změny
<i>RXRG</i>	BLQ	BLQ	Nehodnoceno	
Referenční geny				
<i>EIF2B1</i>	26,04	25,09	Referenční gen	
<i>ELF1</i>	23,56	24,19	Referenční gen	
<i>UBB</i>	22,01	21,04	Referenční gen	

Tabulka 16: Hodnoty Cq vybraných genů a změna exprese mezi měřeními ER+ a ER- buněčnými liniemi. Změna exprese alespoň 1,5 fold change byla brána jako významná (tzn. $\geq 1,5$ a $\leq 0,67$). Shodné trendy mezi liniemi a nádory pacientek jsou zvýrazněny šedě, protichůdné trendy pak žlutě. Významné rozdíly pro geny *CH25H*, *ABCG1*, *ABCG2* a *RXRA* u pacientů nebyly nalezeny.

6 Diskuze

Karcinom prsu je vysoce heterogenním onemocněním, pro které existuje řada různých léčebných režimů v závislosti na biologických vlastnostech konkrétního nádoru. Významným limitujícím faktorem pro léčbu pacientek s nádory exprimujícími hormonální receptory je rezistence k léčbě hormonální terapií. K příčinám této rezistence může patřit mimo jiné i působení oxysterolů, které mohou interferovat s účinky hormonálních terapeutik a ovlivňovat buněčnou proliferaci. Náplní této diplomové práce je nalezení kandidátních genů pro jejich další studium jako případných prognostických a prediktivních markerů pro pacientky léčené hormonální terapií.

Do studie byly zařazeny geny hlavní oxysterolové dráhy, geny metabolismu a transportu sterolů, geny regulační (zahrnující především transkripční faktory) a geny signálních drah, jež mohou být působením oxysterolů ovlivněny. Náplní práce bylo v první řadě nalézt rozdíly v expresi těchto genů mezi nádory exprimujícími estrogenový receptor a nenádorovými kontrolami, včetně rozdílů v expresi mezi touto skupinou a skupinou bez ER exprese, tedy geny specificky deregulované v ER+ nádorech. Exprese těchto genů byla následně stanovena na souboru 50 pacientek s pozitivní expresí ER a vyhodnocena v souvislosti s klinicky používanými prognostickými a prediktivními charakteristikami nádorů.

6.1.1 Geny oxysterolové dráhy

První studovanou skupinou jsou faktory oxysterolové dráhy. Jedná se o geny, jejichž proteinové produkty úzce souvisí s hladinami a účinky oxysterolů v buňce nebo v odpovědi na množství oxysterolů zprostředkovávají příslušnou buněčnou odpověď.

Exprese genů *ACAT2*, *OXCT1*, *HMGCS1* a *ATF6* byla významně snižena u ER+ nádorů oproti ER-, naopak výrazně zvýšená exprese byla pozorována u genů *HMGCS2* a *SREBF1*. Enzymy *ACAT1/2* zajišťují esterifikaci cholesterolu i oxysterolů uvnitř buněk a jsou v literatuře spojovány s nádorovou progresí či horší prognózou pacientek. Inhibice *ACAT1* redukuje LDL indukovanou proliferaci u HR negativních buněk MDA-MB-231, což naznačuje negativní význam *ACAT1* pro prognózu ER- pacientek (Antalis et al., 2010). V předkládané práci byla detekována zvýšená exprese genu *ACAT2* v ER negativních karcinomech prsu oproti ER pozitivním, a to jak u tkáňových vzorků, tak u buněčných linií. Vyšší hladiny *ACAT2* u souboru ER+ pacientek (n = 50) překvapivě asociovaly s výskytem

karcinomu prsu či ovárii v rodině. Asociace byla zjištěna také pro vyšší stadium onemocnění a zasažení lymfatických uzlin nádorovými buňkami. Vyšší hladina *ACAT2* byla dále nalezena u pacientek s intolerancí k hormonální terapii (na hranici signifikance, $p = 0,055$). Souvislost exprese *ACAT* s klinicko-patologickými daty podporuje literární zdroje, kde je exprese těchto proteinů negativním prognostickým faktorem. Vztah vyšší exprese k intoleranci hormonální terapii může být také velmi významný, vzhledem k tomu, že proteiny *ACAT* patří k buněčným cílům, na které je zaměřeno působení tamoxifenu (De Medina et al., 2004).

Proteiny *ACAT1/2* spolu s *OXCT1/2* a *HMGCS2* jsou zároveň klíčové enzymy syntézy a reutilizace ketolátek (aceton, acetoacetát a β -hydroxybutyrát), která podporuje nádorovou progresi a vznik metastáz (Martinez-Outschoorn et al., 2012). Změna exprese genu *OXCT1* je využívána v rámci Mammaprint testu pro určení rizika relapsu u pacientek bez zasažení lymfatických uzlin (Van't Veer et al., 2002). Specifická downregulace u ER+ nádorů oproti nenádorovým tkáním a asociace s gradem nalezená v rámci této diplomové práce naznačuje význam *OXCT1* v progresi ER+ nádorů. Exprese *HMGCS2* byla výrazně zvýšená u ER+ karcinomů prsu v porovnání s ER- skupinou. Naopak v práci Wang et al. (2013a) byla exprese tohoto genu zvýšená u ER- karcinomů prsu v porovnání se zdravými kontrolami i ER+ nádory. Vzhledem k nižšímu množství porovnávaných vzorků v obou pracích je možné, že rozpor ve výsledcích je způsoben velkou variabilitou mezi nádorovými vzorky. Exprese *HMGCS2* byla dále spojena s rezistencí k hormonální terapii u ER+ pacientek s karcinomem prsu po relapsu (Maraga et al., 2007), další studium významu těchto dvou genů pro účinnost hormonální terapie je tedy namístě.

Transkripční faktory ATF6 a SREBP ovlivňují expresi cholesterologenních a lipogenních enzymů. Společnou vlastností těchto transkripčních faktorů je lokalizace v endoplazmatickém retikulu a štěpení proteázami MBTPS1 a MBTPS2 (Ye et al., 2000). Transkripční faktor SREBP1 je v souvislosti s karcinogenezí studován důkladněji teprve v posledních letech. Jeho zvýšená exprese byla zjištěna u řady nádorových onemocnění včetně duktálního karcinomu prsu *in situ* v porovnání s nenádorovou kontrolou (Pandey et al., 2013). SREBP1 byl dokonce navržen jako prognostický marker pacientů s hepatocelulárním karcinomem, jeho vyšší exprese významně korelovala s nižším bezpříznakovým i celkovým přežíváním pacientů (Li et al., 2014). Exprese genu *SREBF1* byla zvýšená v ER+ tumorech ve srovnání s ER- tumory, ovšem asociací s klinicko-patologickými prognostickými markery nebyla nalezena žádná souvislost svědčící o významu tohoto genu v progresi ER+ nádorů.

Protein HMGCS1 katalyzuje první krok v mevalonátové dráze a tím se uplatňuje především v cholesterolové syntéze. Podobně jako *HMGCS2* (či *ACAT*) je jeho genová exprese regulována přes SRE element. V této studii byla exprese *HMGCS1* významně zvýšená u ER- nádorů oproti nenádorovým tkáním i ER+ skupině, tzn. tento enzym by se mohl významně uplatňovat v progresi ER- nádorů.

6.1.2 Geny metabolismu oxysterolů

Druhou skupinou studovaných genů jsou geny, jejichž produkty se účastní cholesterolového a oxysterolového metabolismu – zejména vzniku oxysterolů a jejich dalších úprav. Exprese genů *CYP39A1*, *CYP24A1*, *CYP51A1*, *CYP7B1*, *DHCR7* a *EBP* byla významně snížena v ER+ nádorech oproti ER-.

CYP39A1 katalyzuje reakci přeměny oxysterolů ve žlučové kyseliny. V této práci byla pozorována jeho snížená exprese v ER+ tumorech ve srovnání s ER- tumory i zdravou tkání. Toto zjištění odpovídá také dalším studiím – v případě karcinomu ovaria byla zjištěna hypermethylace genu *CYP39A1* (Huang et al., 2009). Snížená hladina *CYP39A1* byla v případě předkládané studie také asociována s karcinomy vyššího stádia. Tento výsledek je v souladu s jinou prací, kde pozmeněná hladina proteinu *CYP39A1* byla zjištěna v tkáních cholangiokarcinomu, přičemž hladina exprese korelovala s prognózou pacienta (Khenjanta et al., 2014).

U genu *CYP24A1* nebyl pozorován rozdíl v expresi mezi tumory a zdravou tkání, v porovnání mezi ER+ a ER- tumory byla zjištěna snížená exprese pro ER pozitivní karcinomy. Enzymatický produkt tohoto genu metabolizuje vitamin D3, který je následně z těla vylučován. Vzhledem k povaze vitaminu D3, který má na buňku antiproliferativní, diferenciacní či dokonce proapoptotický účinek, je *CYP24A1* považován za proto-onkogen. Zvýšená hladina mRNA genu *CYP24A1* byla zjištěna v řadě studií u různých typů nádorů, mezi něž mimo jiné patří karcinom plic, ovarii a kolorekta (Anderson et al., 2006), avšak hladina mRNA v tkáních karcinomu prsu studovaných v této práci byla naopak snížena. V jiné práci byla exprese *CYP24A1* na úrovni mRNA zvýšená v nádorové buněčné linii MCF-7 oproti nenádorovým buňkám MCF-10F, ovšem na úrovni proteinu byla exprese snížena jak v buněčné linii MCF-7, tak v nádorové tkáni (Fischer et al., 2009). Ve vzorcích maligních tumorů byly při imunodetekci metodou Western blot odhaleny kromě wild-type proteinu (56 kDa) také pruhy o velikosti 40 kDa, v buněčných liniích byly detekovány

dokonce tři pruhy, což naznačuje roli případných sestřihových variant tohoto proteinu v maligní tkáni.

Také další enzymy z rodiny cytochromu P450 (*CYP7B1*, *CYP11A1*, *CYP27A1*, *CYP51A1*), u kterých byl nalezen signifikantní rozdíl v transkripci mezi porovnávanými skupinami, by jistě měly být předmětem dalších analýz. Ačkoli v této diplomové práci nebyla prokázána jejich asociace s klinicko-patologickými daty, jejich další studium je jistě žádoucí. Kupříkladu činnost *CYP7B1* a *CYP27A1* ovlivňuje hladinu endogenního SERM – 27-HC. Již dříve byla prokázána jejich souvislost s délkou přežívání pacientek s ER pozitivními tumory, nebo s gradingem (DuSell et al., 2008; Nelson et al., 2013).

Expresí aldo-ketoreduktázy *AKRIC3* a cholesterol 25-hydroxylázy (*CH25H*) byla významně snížena u obou typů nádorů (ER+, ER-) oproti nenádorovým tkáním. Snížená exprese *AKRIC3* spolu s *AKRIC1* v nádorech karcinomu prsu již byla v minulosti sledována (Ji et al., 2004; Lewis et al., 2004), naopak nedávná studie (Mittempergher et al., 2013) popsala asociaci nízkých hladin *CH25H* s nižším rizikem relapsu (časných i pozdních metastáz) u ER+ pacientek. V souboru vzorků předkládané studie vysoké hladiny *CH25H* asociovaly s lokálně pokročilým stádiem onemocnění bez zasažení lymfatických uzlin metastázami, což podporuje prognostický význam tohoto genu u ER+ skupiny pacientek.

Další rozdíl v expresi byl zjištěn u genů *DHCR7* a *EBP*, jejichž hladina byla vyšší u ER negativních tumorů oproti ER pozitivním i zdravé tkáni. Naproti tomu však byla zjištěna vyšší exprese *DHCR7* v ER+ buněčné linii MCF-7. Proteiny *DHCR7* a *EBP* tvoří dohromady komplexy nazývané jako AEBS nebo také ChEH; jejich hlavní rolí je regulace syntézy cholesterolu. Tento komplex je jedním z potenciálních cílů pro tamoxifen, jehož vazba způsobuje snížení produkce mutagenního CT a zvyšuje hladinu α/β -CE, kdy minimálně u α -CE byly popsány protirakovinné účinky podporující zastavení buněčného cyklu (Ishimaru et al., 2008). Vyšší hladina mRNA pro komponenty ChEH v nádorových tkáních patrně podporuje růst nádorových buněk. U pacientů s karcinomem kolorekta byla zjištěna zvýšená hladina CT ve stolici ve srovnání se zdravými jedinci (Reddy and Wynder, 1977), což by mohlo nasvědčovat vyšší aktivitě ChEH v nádorových buňkách tohoto karcinomu. Avšak u karcinomu ovaria byla zjištěna hypermethylace genu *EBP*, která by vedla ke snížené expresi tohoto genu (Huang et al., 2009). Zvýšená exprese *DHCR7* je u pacientek s ER+ karcinomem prsu spojována s horší odpovědí na tamoxifen, přičemž *DHCR7* podle autorů patří mezi geny, jejichž exprese koreluje s ER-signalizační dráhou (Pitroda et al., 2009), díky čemuž by se dala

očekávat změna exprese tohoto genu spíše u ER+ tumorů, než u ER-, jak vyšlo ve výsledcích předkládané studie.

Zajímavým genem je také *HSD11B1*, jehož exprese byla snížena u ER+ tumorů v porovnání s nenádorovou tkání. Tyto výsledky odpovídají dříve zjištěnému snížení *HSD11B1* na proteinové úrovni, které ovšem nijak nekorelovalo s expresí estrogenových receptorů (Lu et al., 2011). Tento enzym může kromě některých oxysterolů redukovat také glukokortikoid kortizon na aktivnější kortizol, který může na nádorové buňky prsu působit inhibičně; z tohoto důvodu může snížení hladiny tohoto proteinu podporovat nádorovou progresi. V další studii byla potom v tukové tkáni zdravých postmenopauzálních žen zjištěna korelace mezi expresí *HSD11B1* a *ESR2* na úrovni mRNA, autoři se proto domnívali, že estrogenová signalizace prostřednictvím ER β může zvyšovat expresi a aktivitu *HSD11B1* (McInnes et al., 2012). Ve výsledcích této diplomové práce byla nalezena snížená exprese jak pro *HSD11B1*, tak pro *ESR2* gen. Výsledky jsou tedy v souladu s touto teorií.

6.1.3 Geny transportu oxysterolů

Další skupinou genů zařazených do studie byly buněčné transportéry, a to ABC a SLC transportéry sterolů. Exprese genů *ABCA9*, *ABCA10*, *ABCB1* a *ABCG2* byla významně snížena v nádorech karcinomu prsu oproti nenádorovým tkáním nezávisle na expresi ER, což odpovídá dříve zjištěným výsledkům (Hlavac et al. 2013), s výjimkou *ABCG2*, jehož exprese byla ve zmíněné práci nezměněna.

Exprese *ABCA9*, *ABCA10* a *ABCA2* byla zvýšená u ER+ nádorů oproti ER-, zároveň vysoké hladiny genů asociovaly s nižším stádiem onemocnění. Transkripce těchto genů je mimo jiné regulována hladinami sterolů v buňce (Davis et al., 2004; Piehler et al., 2002). Jsou tedy dalšími kandidáty pro sledování jejich významu v účinnosti hormonální terapie. Naopak hladina genu *ABCA1*, jehož exprese souvisí s vyšším rizikem návratu onemocnění a úmrtí u ER+ pacientek, celkově tedy se špatnou odpovědí na hormonální terapii (Pitroda et al., 2009), se nelišila u žádné z porovnávaných skupin.

V případě ER+ tumorů byla detekována zvýšená exprese *ABCG1*, což odpovídalo také expresi v buněčných liniích. Toto zjištění je v souladu také s předchozími studiemi z Oddělení toxikogenomiky, a to jak na tkáni karcinomu prsu (Hlavac et al., 2013), tak například u karcinomu pankreatu (Mohelnikova-Duchonova et al., 2013). Vyšší exprese svědčí o deregulaci v hospodaření s hladinou cholesterolu v nádorových buňkách. Dostatek cholesterolu pro nádorové buňky, které dynamicky rostou a metabolizují, je velmi významný.

Upregulace těchto proteinů však mohou mít pro buňky i jiný význam – přenašečové proteiny ABCA1 a ABCG1 reagují také na hladinu oxysterolů a v případě jejich zvýšené koncentrace v buňce dochází k jejich aktivnímu transportu do lipoproteinových částic (Xu et al., 2009). Jejich exprese navíc může souviset s působením hormonální terapie. V případě této diplomové práce byla zjištěna souvislost mezi vyšší expresí *ABCG1* a intolerancí k hormonální terapii ($p = 0,022$). Tento význam *ABCG1* proteinu je však neznámý, v rámci statistického porovnání byla k dispozici pouze malá kohorta pacientek s intolerancí vůči hormonální terapii. Pro ověření platnosti tohoto výsledku a ke zjištění případného mechanismu bude tedy potřeba další analýza na větším souboru pacientek.

Expresí transportérů *ABCC1* a *SLCO1A2* byla naopak významně snižena u ER+ nádorů v porovnání s ER-. Aktivita *ABCC1* a *ABCG2* transportérů mimo jiné přispívá k rezistenci u ER+ nádorů (Takabe et al., 2010). Proteinová exprese *ABCC1* asociovala s časnějším návratem onemocnění nebo celkově kratším přežíváním pacientek léčených cyklofosfamidem, methotrexátem a fluorouracilem, ovšem u pacientek léčených tamoxifenem a goserelinem takový efekt pozorován nebyl (Filipits et al., 2005). V této práci nemohlo být analyzováno přežívání kvůli zatím krátkému času sledování pacientek, další studie by tedy mohly pomoci objasnit tyto rozdíly.

SLCO1A2 zajišťuje import do jaterních buněk, mezi transportované molekuly patří především žlučové kyseliny, estrogenové metabolity a další steroidní molekuly. Snižování transkripce tohoto genu v nádorové tkáni ovšem neodpovídá předchozí studii, která přišla s hypotézou, že zvýšená exprese *SLCO1A2*, ovlivněná mimo jiné transkripčním faktorem PXR (pregnane X receptor), může přispívat k patogenezi karcinomu prsu v důsledku zvýšení efektu působení estrogenů prostřednictvím importu estron 3-sulfátu do buněk (Zu Schwabedissen et al., 2008). V této studii Zu Schwabedissen et al. (2008) zjistil v nádorových tkáních prsu osmkrát vyšší expresi genu *SLCO1A2* i *PXR* na úrovni mRNA v porovnání se zdravou tkání. Podobný výsledek byl publikován ve studii karcinomu prostaty, kde zvýšená exprese *SLCO1A2* podporovala růst nádorových buněčných linií v důsledku importu dehydroepiandrosteron sulfátu (Arakawa et al., 2012). Expresí *SLCO1A2* nebyla v případě této práce zahrnuta do porovnání s klinicko-patologickými daty kvůli příliš nízkým hladinám exprese (BLQ), jiné práce ovšem ukazují kupříkladu jeho korelaci se stádiem nádoru (Zu Schwabedissen et al., 2008).

6.1.4 Regulační geny

Do skupiny regulačních genů byly zařazeny především geny kódující transkripční faktory, případně jejich koaktivátory a korepresory. Zvýšená hladina exprese v ER+ tumorech byla detekována pro *ESR1* a *RXRβ*, snížená hladina potom pro geny *ESR2*, *PPARGC1A* a *RXRG*.

Zvýšená/snížená hladina transkripce *ESR1* v ER+, respektive ER- tumorech odpovídá i proteinové hladině detekované v tkáních pacientek. Zatímco zvýšená exprese *ESR1* je spojována s rezistencí a na estrogenu nezávislým růstu (Tolhurst et al., 2011), prognostický význam exprese *ESR2* není v současnosti stále plně objasněn. Studie se neshodují v tom, zda je pozitivním, či negativním prognostickým faktorem (viz bakalářská práce Kloudová, 2013). Součástí zjištěných výsledků je signifikantní souvislost mezi sníženou expresí *ESR2* a vyšším stádiem karcinomu prsu, což by nasvědčovalo pozitivnímu prognostickému významu.

Receptory RXR (*RXRα*, *RXRβ*, *RXRγ*) patří mezi transkripční faktory schopné tvořit jednak homodimery, jednak také heterodimery například s LXR receptorem, jaderným transkripčním faktorem aktivovaným oxysteroly. Vzniklý heterodimer mimo jiné reguluje expresi genů metabolismu a transportu lipidů. Zdá se, že *RXRα* a *RXRβ* by mohly v progresi karcinomu prsu hrát opačnou úlohu. Zatímco exprese *RXRβ* je spojována s kratším celkovým i bezpříznakovým přežíváním pacientek s triple-negative karcinomem prsu (bez exprese HR a HER2), u *RXRA* je vztah k přežívání opačný (Liu et al., 2012). V této práci byla pozorována zvýšená exprese *RXRβ* v obou typech tumorů, jeho pronádorové účinky tedy patrně nemusí být specifické pro ER-, respektive triple-negativní tumory. V případě *RXRA* byla nalezena jen zvýšená exprese v ER+ MCF-7 linii oproti ER- MDA-MB-231. Exprese *RXRA* však byla také vyšší v tumorech nižšího stádia a bez metastáz v lymfatických uzlinách, což by potvrzovalo výsledky studie Liu et al. (2012), tedy že exprese *RXRA* je pozitivním prognostickým faktorem pro přežívání pacientek. Exprese *RXRG* byla snížena v případě obou typů tumorů v porovnání s nenádorovými kontrolami. Jeho funkce je patrně spíše proapoptotická a ztráta jeho exprese způsobuje rezistenci k apoptóze a progresi buněk karcinomu ovaria (Kalra and Bapat, 2013), souvislost s klinicko-patologickými daty však v předkládané práci nebyla zjištěna. V případě oxysterolového působení dochází k ovlivnění některých buněčných mechanismů skrze dimery LXR/RXR. Navzdory deregulaci *RXR* genů však nebyl pozorován žádný rozdíl v expresi *LXRA*, ani *LXRB*.

Protein PPARGC1A, jinak také PGC1- α , je transkripční koaktivátor významný zejména v expresi metabolických genů. Může se vázat s transkripčními faktory jako je ER, LXR, či RXR. Hladina jeho exprese může být negativně regulována přítomností estrogenů (Macari et al., 2010), čemuž odpovídá také námi zjištěná snížená exprese v ER+ tkáních. Snížená hladina *PPARGC1A* u karcinomu prsu byla zjištěna také v jiné studii, a to na úrovni mRNA i proteinu (Yu and Xin, 2013 podle Watkins et al., 2004). Jeho snížená exprese je v literatuře spojována s buněčnou dediferenciací, zvýšení exprese naopak souvisí s apoptózou. V předkládané studii se podařilo prokázat negativní korelaci mezi expresí *PPARGC1A* a *MKi67* ($p = 0,005$), což značí vyšší proliferaci buněk v případě snížené exprese tohoto genu.

6.1.5 Geny signálních drah

Poslední sledovanou skupinou jsou geny kódující některé komponenty signálních drah, které mohou být ovlivněné účinky oxysterolů, jako je MAP kinázová dráha, SHH dráha, nebo PI3K/AKT signalizace. V porovnání ER+ a ER- tumorů byla detekována snížená exprese genů *GNAI1*, *GSK3A*, *GSK3B*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MAPK1*, *PTCH1*, *RAF1* a *SMO* u ER+ karcinomů. Naopak vyšší exprese byla zjištěna pro *GLI1*, *GLI3*, *LRP2* a *PTEN*. Exprese faktorů signálních drah nebyla prozatím zahrnuta do druhé části studie a porovnávána s klinicko-patologickými daty pacientek

Proto-onkogen K-ras je jedním z nejskloňovanějších proteinů v nádorové biologii, deregulace jeho funkce, nejčastěji prostřednictvím mutací, je známa u řady typů nádorů. Mezi buněčné signalizace aktivované K-ras se řadí MAP kinázová dráha a PI3K/AKT dráha, jejichž aktivace souvisí s nádorovým růstem a proliferací. Aktivace MAPK kaskády bývá spojována s rezistencí pacientek na tamoxifen, její zablokování zvyšuje odpověď pacientek na léčbu (Kurokawa et al., 2000; McGlynn et al., 2009). Tento účinek souvisí patrně s aktivací ER prostřednictvím fosforylace serinových zbytků (Joel et al., 1998; Kato et al., 1995), která je na ligandu nezávislá. V této studii byla však zjištěna upregulace některých genů MAPK dráhy u ER- tumorů, zatímco ER+ vzorky nevykazovaly změny v této signální dráze na úrovni mRNA.

Další drahou aktivovanou K-ras proteinem je PI3K/AKT/mTOR. Také aktivace této dráhy je spojována s rezistencí k hormonální léčbě díky aktivaci proteinu ER α (Campbell et al., 2001). Kromě toho se zdá, že estrogen může prostřednictvím ER α signalizace aktivovat tuto dráhu a podporovat tak buněčnou proliferaci a růst nádoru (Lee et al., 2005b). V případě této signalizace byla pozorována zvýšená exprese *AKT1* kinázy v ER+ tumorech ve srovnání

se zdravou tkání, transkripce ostatních genů byla nezměněna. Vyšší aktivita této kinázy (hladina fosforylované Akt – pAkt) je spojena s horší prognózou pacientek s invazivním duktálním karcinomem prsu a koreluje se zvýšenou expresí HER2. Hladina pAkt v jádře koreluje s ER a PR expresí. Zdá se však, že její cytoplazmatická aktivita nijak nesouvisí s expresí hormonálních receptorů (Park and Kim, 2007). PI3K/AKT signalizace může být ovlivněna tumor-supresorovým proteinem – fosfatázou PTEN, která působí proti účinku PI3 kinázy. Jeho snížená exprese je spojována s relapsem onemocnění u pacientek léčených tamoxifenem (Shoman et al., 2005). Nižší exprese *PTEN* však byla detekována pouze v ER-karcinomech. Vzhledem k tomu, že se ale inaktivace (nejen) tohoto tumor-supresoru často odehrává na úrovni mutace DNA, nemusí být analýza jeho transkripce dostatečným ukazatelem jeho buněčné aktivity.

PI3K/AKT dráha dále může aktivovat SHH signální dráhu, která je zvýšená u buněk MCF-7 rezistentních na tamoxifen v porovnání s MCF-7 senzitivními a může k této rezistenci přispívat (Ramaswamy et al., 2012), knockdown SHH signalizace způsobil zastavení růstu tamoxifen-rezistentních buněk. (Ramaswamy et al. (2012)) zjistil zvýšenou expresi *GLII* a *SMO* u rezistentních buněk na úrovni mRNA i proteinu, zatímco exprese *GLI2*, *GLI3* a *PTCH* byla nezměněna. Exprese *GLII* byla navíc nepřímo úměrná k celkovému u bezpříznakovému přežívání pacientek. Imunohistochemická detekce v tkáních triple-negativních tumorů také odhalila zvýšenou expresi *GLII* a *SMO*, jejichž exprese korelovala se stádiem nádoru, a naopak sníženou hladinu *PTCH*. Exprese *GLII* dále negativně korelovala s expresí ER (Tao et al., 2011). Součástí výsledků této práce je nález snížené exprese *PTCH1* v ER+ vzorcích oproti ER- i zdravé tkáni, které je v souladu se druhou z citovaných studií. Předchozím výsledkům odpovídá také upregulace *SMO* v případě ER- tumorů. Protichůdným výsledkem však je snížení exprese *GLII*.

Limitujícím faktorem této studie je relativně nízký počet patientských vzorků, jejichž genové exprese byly porovnávány. Pro ověření předkládaných výsledků bude jistě vhodné provést další validační studii na nezávislém souboru pacientek. Součástí práce dále nemohly být výsledky porovnávající expresi genů s přežíváním pacientek, neboť se jedná o pacientky s diagnostikovaným karcinomem prsu v roce 2012 a pro analýzu celkového či bezpříznakového přežívání tudíž neuplynula dostatečná doba. Velmi důležité bude také ověření zjištěných expresí na proteinové úrovni pomocí imunodetekce. Tato analýza je

součástí budoucích plánů, společně se zjištěním případných mutací či polymorfismů v kandidátních genech. Velmi zajímavé a významné by bylo také studium hladiny oxysterolů v nádorové tkáni, které je ale díky jejich vysoké reaktivitě poměrně obtížné.

Za zásadní zjištění této práce lze považovat: 1/ zhodnocení komplexního expresního profilu genů oxysterolové dráhy u pacientek s karcinomem prsu lišících se expresí hormonálních receptorů, 2/ nalezení unikátních vztahů mezi stádiem nemoci a expresí řady genů této dráhy v nádorech exprimujících receptor pro estrogen, naznačující jejich potenciálně prognostický význam, a 3/ srovnání expresního profilu mezi nádorovými tkáněmi a buněčnými modely, ukazující jejich možné využití pro budoucí funkční studie. Práce tak poskytuje velmi dobré výchozí informace pro další výzkum, např. ve formě doktorského studia.

7 Souhrn

Tato diplomová práce přináší výsledky expresní studie faktorů signální a metabolické dráhy oxysterolů na úrovni transkripce, které jsou dále srovnávány s klinicko-patologickými údaji pacientek s karcinomem prsu. Na základě vyhodnocených výsledků identifikuje kandidátní geny pro další analýzy, jejich expresi zároveň srovnává s dostupnou literaturou.

K významným kandidátním genům se řadí kupříkladu *ACAT2*, jehož vyšší exprese je asociována s vyšším stádiem nádoru a souvisí s výskytem nádorových onemocnění v rodině. Na hranici signifikance je potom souvislost mezi zvýšenou expresí *ACAT2* a intolerancí k hormonální terapii. Proteinový produkt tohoto genu zprostředkovává esterifikaci sterolů v buňce, která je v literatuře spojována s vyšší buněčnou proliferací. Díky této buněčné funkci a faktu, že *ACAT* je jedním z cílů působení tamoxifenu, je další analýza tohoto proteinu v souvislosti s hormonální terapií jistě žádoucí.

Mezi proteiny, jejichž exprese významně asociovala se stádiem karcinomu, případně s dalšími klinickými daty, patří také řada ABC transportérů (*ABCA2*, *ABCA9*, *ABCA10*, *ABCC1*, *ABCG1*, *ABCG2*). Zatímco exprese *ABCC1* nebo *ABCG2* je již v řadě studií spojována se špatnou prognózou pacientek, především s rezistencí k indikované terapii, další geny této skupiny, jako *ABCA9* nebo *ABCA10*, jsou v současnosti prozkoumány méně a není příliš známo ani o jejich funkci. Patří však mezi geny, jejichž exprese je ovlivňována hladinou sterolů v buňce. Tento fakt a jejich korelace s klinickými daty z nich dělá také kandidátní geny budoucích studií.

Mezi metabolickými geny se jeví jako zajímavé především *CYP39A1*, či *CH25H*, kde byla zjištěna asociace se stádiem nádorového onemocnění, z genů regulačních jsou to potom transkripční faktory *RXR* či *ESR2*, jehož prognostický význam u pacientek s karcinomem prsu stále není jednoznačný a jeho další studium může napomoci tomuto objasnění.

Významné pro budoucí analýzy jsou ale také další geny. Například *DHCR7* a *EBP* kódující komplex AEBS, který může vázat antiestrogeny a významně tak souviset s účinky hormonální terapie. Kandidáty pro následovné analýzy jsou i další geny, jejichž asociace s klinickými daty se v této práci nejevila jako významná, ovšem v literatuře jsou spojovány s karcinogenezí, nebo jejich role nasvědčuje možnému vlivu na rozvoj nádoru či rezistenci k hormonální terapii.

V předkládané diplomové práci byly splněny vytyčené cíle. Práce přináší výsledky exprese genů, z nichž některé již byly studovány v souvislosti s karcinogenezí, v řadě případů jsou však dostupné výsledky pouze u jiných maligních onemocnění, než je karcinom prsu. Součástí výsledků jsou také údaje o expresi genů, které dosud v tomto kontextu studovány nebyly. Tato studie tak přináší i zcela původní výsledky. Jsou zde identifikovány kandidátní geny pro další studium, které bude zahrnovat především potvrzení expresních výsledků také na proteinové úrovni imunodetekcí a analýzu případných mutací či polymorfismů pomocí DNA sekvenování. Vzhledem k omezenému počtu analyzovaných a porovnávaných vzorků v této práci bude vhodné provést také validační analýzu významu genových expresí na větším souboru pacientek.

8 Seznam použité literatury

- Acconcia, F., Ascenzi, P., Bocedi, A., Spisni, E., Tomasi, V., Trentalance, A., Visca, P., and Marino, M. (2005). Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Molecular biology of the cell* *16*, 231-237.
- Amantea, C.M., Kim, W.K., Meliton, V., Tetradis, S., and Parhami, F. (2008). Oxysterol-induced osteogenic differentiation of marrow stromal cells is regulated by Dkk-1 inhibitable and PI3-kinase mediated signaling. *Journal of cellular biochemistry* *105*, 424-436.
- Anderson, K.E., Kok, E., and Javitt, N.B. (1972). Bile acid synthesis in man: metabolism of 7 - hydroxycholesterol- 14 C and 26-hydroxycholesterol- 3 H. *The Journal of clinical investigation* *51*, 112-117.
- Anderson, M.G., Nakane, M., Ruan, X., Kroeger, P.E., and Wu-Wong, J.R. (2006). Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. *Cancer chemotherapy and pharmacology* *57*, 234-240.
- Antalis, C.J., Arnold, T., Rasool, T., Lee, B., Buhman, K.K., and Siddiqui, R.A. (2010). High ACAT1 expression in estrogen receptor negative basal-like breast cancer cells is associated with LDL-induced proliferation. *Breast cancer research and treatment* *122*, 661-670.
- Arakawa, H., Nakanishi, T., Yanagihara, C., Nishimoto, T., Wakayama, T., Mizokami, A., Namiki, M., Kawai, K., and Tamai, I. (2012). Enhanced expression of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in androgen receptor-positive prostate cancer cells: possible role of OATP1A2 in adaptive cell growth under androgen-depleted conditions. *Biochemical pharmacology* *84*, 1070-1077.
- Ares, M.P., Porn-Ares, M.I., Moses, S., Thyberg, J., Juntti-Berggren, L., Berggren, P., Hultgardh-Nilsson, A., Kallin, B., and Nilsson, J. (2000). 7beta-hydroxycholesterol induces Ca(2+) oscillations, MAP kinase activation and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* *153*, 23-35.
- Arpino, G., Green, S.J., Allred, D.C., Lew, D., Martino, S., Osborne, C.K., and Elledge, R.M. (2004). HER-2 amplification, HER-1 expression, and tamoxifen response in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a southwest oncology group study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *10*, 5670-5676.
- Aye, I.L., Waddell, B.J., Mark, P.J., and Keelan, J.A. (2010). Placental ABCA1 and ABCG1 transporters efflux cholesterol and protect trophoblasts from oxysterol induced toxicity. *Biochimica et biophysica acta* *1801*, 1013-1024.
- Beatson, C. (1896). On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet* *2*, 104-107.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* *57*, 289-300.
- Berge, K.E., Tian, H., Graf, G.A., Yu, L., Grishin, N.V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R., and Hobbs, H.H. (2000). Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* *290*, 1771-1775.
- Biasi, F., Mascia, C., Astegiano, M., Chiarotto, E., Nano, M., Vizio, B., Leonarduzzi, G., and Poli, G. (2009). Pro-oxidant and proapoptotic effects of cholesterol oxidation products on human colonic epithelial cells: a potential mechanism of inflammatory bowel disease progression. *Free radical biology & medicine* *47*, 1731-1741.

- Bischoff, F., and Rupp, J.J. (1946). The production of a carcinogenic agent in the degradation of cholesterol to progesterone. *Cancer research* 6, 403-409.
- Bjorkhem, I., Andersson, O., Diczfalusy, U., Sevastik, B., Xiu, R.J., Duan, C., and Lund, E. (1994). Atherosclerosis and sterol 27-hydroxylase: evidence for a role of this enzyme in elimination of cholesterol from human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 8592-8596.
- Bocchinfuso, W.P., and Korach, K.S. (1997). Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2, 323-334.
- Bowden, K., and Ridgway, N.D. (2008). OSBP negatively regulates ABCA1 protein stability. *The Journal of biological chemistry* 283, 18210-18217.
- Brown, A.J., and Jessup, W. (2009). Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Molecular aspects of medicine* 30, 111-122.
- Brown, A.J., Leong, S.L., Dean, R.T., and Jessup, W. (1997). 7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque. *Journal of lipid research* 38, 1730-1745.
- Brynychova, V., Hlavac, V., Ehrlichova, M., Vaclavikova, R., Pecha, V., Trnkova, M., Wald, M., Mrhalova, M., Kubackova, K., Pikus, T., *et al.* (2013). Importance of transcript levels of caspase-2 isoforms S and L for breast carcinoma progression. *Future oncology* 9, 427-438.
- Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A., and Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753-758.
- Bulun, S.E., Price, T.M., Aitken, J., Mahendroo, M.S., and Simpson, E.R. (1993). A link between breast cancer and local estrogen biosynthesis suggested by quantification of breast adipose tissue aromatase cytochrome P450 transcripts using competitive polymerase chain reaction after reverse transcription. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 77, 1622-1628.
- Burkard, I., von Eckardstein, A., Waeber, G., Vollenweider, P., and Rentsch, K.M. (2007). Lipoprotein distribution and biological variation of 24S- and 27-hydroxycholesterol in healthy volunteers. *Atherosclerosis* 194, 71-78.
- Cali, J.J., and Russell, D.W. (1991). Characterization of human sterol 27-hydroxylase. A mitochondrial cytochrome P-450 that catalyzes multiple oxidation reaction in bile acid biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 266, 7774-7778.
- Campbell, R.A., Bhat-Nakshatri, P., Patel, N.M., Constantinidou, D., Ali, S., and Nakshatri, H. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *The Journal of biological chemistry* 276, 9817-9824.
- Carroll, J.C., Cremin, C., Allanson, J., Blaine, S.M., Dorman, H., Gibbons, C.A., Grimshaw, J., Honeywell, C., Meschino, W.S., Permaul, J., *et al.* (2008). Hereditary breast and ovarian cancers. *Canadian family physician Medecin de famille canadien* 54, 1691-1692.
- Cohen, I. (2004). Endometrial pathologies associated with postmenopausal tamoxifen treatment. *Gynecologic oncology* 94, 256-266.
- Corcoran, R.B., and Scott, M.P. (2006). Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 8408-8413.

- Costet, P., Luo, Y., Wang, N., and Tall, A.R. (2000). Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *The Journal of biological chemistry* 275, 28240-28245.
- Couse, J.F., and Korach, K.S. (2001). Contrasting phenotypes in reproductive tissues of female estrogen receptor null mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* 948, 1-8.
- Couse, J.F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J.A., and Korach, K.S. (1997). Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* 138, 4613-4621.
- Coutts, A.S., and Murphy, L.C. (1998). Elevated mitogen-activated protein kinase activity in estrogen-nonresponsive human breast cancer cells. *Cancer research* 58, 4071-4074.
- Cummings, S.R., Eckert, S., Krueger, K.A., Grady, D., Powles, T.J., Cauley, J.A., Norton, L., Nickelsen, T., Bjarnason, N.H., Morrow, M., *et al.* (1999). The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *Jama* 281, 2189-2197.
- Dauvois, S., White, R., and Parker, M.G. (1993). The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *Journal of cell science* 106 (Pt 4), 1377-1388.
- Davis, W., Jr., Boyd, J.T., Ile, K.E., and Tew, K.D. (2004). Human ATP-binding cassette transporter-2 (ABCA2) positively regulates low-density lipoprotein receptor expression and negatively regulates cholesterol esterification in Chinese hamster ovary cells. *Biochimica et biophysica acta* 1683, 89-100.
- De Medina, P., Paillasse, M.R., Segala, G., Poirot, M., and Silvente-Poirot, S. (2010). Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBS ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 13520-13525.
- De Medina, P., Payre, B., Boubekeur, N., Bertrand-Michel, J., Terce, F., Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2009). Ligands of the antiestrogen-binding site induce active cell death and autophagy in human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism. *Cell death and differentiation* 16, 1372-1384.
- De Medina, P., Payre, B.L., Bernad, J., Bosser, I., Pipy, B., Silvente-Poirot, S., Favre, G., Faye, J.C., and Poirot, M. (2004). Tamoxifen is a potent inhibitor of cholesterol esterification and prevents the formation of foam cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 308, 1165-1173.
- DeFriend, D.J., Anderson, E., Bell, J., Wilks, D.P., West, C.M., Mansel, R.E., and Howell, A. (1994). Effects of 4-hydroxytamoxifen and a novel pure antioestrogen (ICI 182780) on the clonogenic growth of human breast cancer cells in vitro. *British journal of cancer* 70, 204-211.
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K.I., Hanna, W.M., Kahn, H.K., Sawka, C.A., Lickley, L.A., Rawlinson, E., Sun, P., and Narod, S.A. (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 4429-4434.
- DuSell, C.D., Umetani, M., Shaul, P.W., Mangelsdorf, D.J., and McDonnell, D.P. (2008). 27-hydroxycholesterol is an endogenous selective estrogen receptor modulator. *Molecular endocrinology* 22, 65-77.
- Dutta, U., and Pant, K. (2008). Aromatase inhibitors: past, present and future in breast cancer therapy. *Medical oncology* 25, 113-124.

- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, Davies, C., Godwin, J., Gray, R., Clarke, M., Cutter, D., Darby, S., McGale, P., Pan, H.C., Taylor, C., *et al.* (2011). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 378, 771-784.
- Eheman, C.R., Shaw, K.M., Ryerson, A.B., Miller, J.W., Ajani, U.A., and White, M.C. (2009). The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas: United States, 1999-2004. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 18, 1763-1769.
- Elston, C.W., and Ellis, I.O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19, 403-410.
- Engel, T., Kannenberg, F., Fobker, M., Nofer, J.R., Bode, G., Lueken, A., Assmann, G., and Seedorf, U. (2007). Expression of ATP binding cassette-transporter ABCG1 prevents cell death by transporting cytotoxic 7beta-hydroxycholesterol. *FEBS letters* 581, 1673-1680.
- Fawell, S.E., White, R., Hoare, S., Sydenham, M., Page, M., and Parker, M.G. (1990). Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the "pure" antiestrogen ICI 164,384 appears to be mediated by impaired receptor dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 6883-6887.
- Filipits, M., Pohl, G., Rudas, M., Dietze, O., Lax, S., Grill, R., Pirker, R., Zielinski, C.C., Hausmaninger, H., Kubista, E., *et al.* (2005). Clinical role of multidrug resistance protein 1 expression in chemotherapy resistance in early-stage breast cancer: the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 1161-1168.
- Fisher, B., Costantino, J.P., Redmond, C.K., Fisher, E.R., Wickerham, D.L., and Cronin, W.M. (1994). Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *Journal of the National Cancer Institute* 86, 527-537.
- Fisher, B., Costantino, J.P., Wickerham, D.L., Redmond, C.K., Kavanah, M., Cronin, W.M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J., *et al.* (1998). Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *Journal of the National Cancer Institute* 90, 1371-1388.
- Fischer, D., Becker, S., Cordes, T., Bucker, B., Diedrich, K., Friedrich, M., Salehin, D., and Thill, M. (2009). Vitamin D-24-hydroxylase in benign and malignant breast tissue and cell lines. *Anticancer research* 29, 3641-3645.
- Fuda, H., Javitt, N.B., Mitamura, K., Ikegawa, S., and Strott, C.A. (2007). Oxysterols are substrates for cholesterol sulfotransferase. *Journal of lipid research* 48, 1343-1352.
- Geisler, J., Haynes, B., Anker, G., Dowsett, M., and Lonning, P.E. (2002). Influence of letrozole and anastrozole on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast cancer patients evaluated in a randomized, cross-over study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 20, 751-757.
- Geisler, J., King, N., Anker, G., Ornati, G., Di Salle, E., Lonning, P.E., and Dowsett, M. (1998). In vivo inhibition of aromatization by exemestane, a novel irreversible aromatase inhibitor, in postmenopausal breast cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 4, 2089-2093.

- Gill, S., Chow, R., and Brown, A.J. (2008). Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised. *Progress in lipid research* 47, 391-404.
- Gong, Y., Lee, J.N., Lee, P.C., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Ye, J. (2006). Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake. *Cell metabolism* 3, 15-24.
- Gramajo, A.L., Zacharias, L.C., Neekhra, A., Luthra, S., Atilano, S.R., Chwa, M., Brown, D.J., Kuppermann, B.D., and Kenney, M.C. (2010). Mitochondrial DNA damage induced by 7-ketocholesterol in human retinal pigment epithelial cells in vitro. *Investigative ophthalmology & visual science* 51, 1164-1170.
- Guardiola, F., Dutta, P.C., Codony, R., and Savage, G.P. (2002). Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence, and biological effects (AOCS Press).
- Gutierrez, M.C., Detre, S., Johnston, S., Mohsin, S.K., Shou, J., Allred, D.C., Schiff, R., Osborne, C.K., and Dowsett, M. (2005). Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 2469-2476.
- Gylling, H., Pyrhonen, S., Mantyla, E., Maenpaa, H., Kangas, L., and Miettinen, T.A. (1995). Tamoxifen and toremifene lower serum cholesterol by inhibition of delta 8-cholesterol conversion to lathosterol in women with breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 13, 2900-2905.
- Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M.G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733-736.
- Henderson, I.C., Berry, D.A., Demetri, G.D., Cirrincione, C.T., Goldstein, L.J., Martino, S., Ingle, J.N., Cooper, M.R., Hayes, D.F., Tkaczuk, K.H., *et al.* (2003). Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21, 976-983.
- Hlavac, V., Brynychova, V., Vaclavikova, R., Ehrlichova, M., Vrana, D., Pecha, V., Kozevnikovova, R., Trnkova, M., Gatek, J., Kopperova, D., *et al.* (2013). The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma. *Pharmacogenomics* 14, 515-529.
- Horwitz, K.B. (1988). The central role of progesterone receptors and progestational agents in the management and treatment of breast cancer. *Seminars in oncology* 15, 14-19. Citováno podle Pearce, S.T., and Jordan, V.C. (2004). The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Critical reviews in oncology/hematology* 50, 3-22.
- Howell, A., DeFriend, D., Robertson, J., Blamey, R., and Walton, P. (1995). Response to a specific antioestrogen (ICI 182780) in tamoxifen-resistant breast cancer. *Lancet* 345, 29-30.
- Howell, A., Osborne, C.K., Morris, C., and Wakeling, A.E. (2000). ICI 182,780 (Faslodex): development of a novel, "pure" antiestrogen. *Cancer* 89, 817-825.
- Hozoji, M., Munehira, Y., Ikeda, Y., Makishima, M., Matsuo, M., Kioka, N., and Ueda, K. (2008). Direct interaction of nuclear liver X receptor-beta with ABCA1 modulates cholesterol efflux. *The Journal of biological chemistry* 283, 30057-30063.
- Hu, J., La Vecchia, C., de Groh, M., Negri, E., Morrison, H., Mery, L., and Canadian Cancer Registries Epidemiology Research, G. (2012). Dietary cholesterol intake and cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 23, 491-500.

- Huang, Y.W., Jansen, R.A., Fabbri, E., Potter, D., Liyanarachchi, S., Chan, M.W., Liu, J.C., Crijns, A.P., Brown, R., Nephew, K.P., *et al.* (2009). Identification of candidate epigenetic biomarkers for ovarian cancer detection. *Oncology reports* 22, 853-861.
- Hwang, P.L. (1992). Inhibitors of protein and RNA synthesis block the cytotoxic effects of oxygenated sterols. *Biochimica et biophysica acta* 1136, 5-11.
- Hwang, P.L., and Matin, A. (1989). Interactions of sterols with antiestrogen-binding sites: structural requirements for high-affinity binding. *Journal of lipid research* 30, 239-245.
- Charman, M., Colbourne, T.R., Pietrangelo, A., Kreplak, L., and Ridgway, N.D. (2014). Oxysterol-binding protein (OSBP)-related protein 4 (ORP4) is essential for cell proliferation and survival. *The Journal of biological chemistry* 289, 15705-15717.
- Chen, W., Chen, G., Head, D.L., Mangelsdorf, D.J., and Russell, D.W. (2007). Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell metabolism* 5, 73-79.
- Cheng, Y.W., Kang, J.J., Shih, Y.L., Lo, Y.L., and Wang, C.F. (2005). Cholesterol-3-beta, 5-alpha, 6-beta-triol induced genotoxicity through reactive oxygen species formation. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 43, 617-622.
- Cho, H.S., Mason, K., Ramyar, K.X., Stanley, A.M., Gabelli, S.B., Denney, D.W., Jr., and Leahy, D.J. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 421, 756-760.
- Ishimaru, C., Yonezawa, Y., Kuriyama, I., Nishida, M., Yoshida, H., and Mizushima, Y. (2008). Inhibitory effects of cholesterol derivatives on DNA polymerase and topoisomerase activities, and human cancer cell growth. *Lipids* 43, 373-382.
- Iuliano, L., Micheletta, F., Natoli, S., Ginanni Corradini, S., Iappelli, M., Elisei, W., Giovannelli, L., Violi, F., and Diczfalusy, U. (2003). Measurement of oxysterols and alpha-tocopherol in plasma and tissue samples as indices of oxidant stress status. *Analytical biochemistry* 312, 217-223.
- Jaworski, C.J., Moreira, E., Li, A., Lee, R., and Rodriguez, I.R. (2001). A family of 12 human genes containing oxysterol-binding domains. *Genomics* 78, 185-196.
- Ji, Q., Aoyama, C., Nien, Y.D., Liu, P.I., Chen, P.K., Chang, L., Stanczyk, F.Z., and Stolz, A. (2004). Selective loss of AKR1C1 and AKR1C2 in breast cancer and their potential effect on progesterone signaling. *Cancer research* 64, 7610-7617.
- Joel, P.B., Smith, J., Sturgill, T.W., Fisher, T.L., Blenis, J., and Lannigan, D.A. (1998). pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. *Molecular and cellular biology* 18, 1978-1984.
- Jusakul, A., Yongvanit, P., Loilome, W., Namwat, N., and Kuver, R. (2011). Mechanisms of oxysterol-induced carcinogenesis. *Lipids in health and disease* 10, 44.
- Kalra, R.S., and Bapat, S.A. (2013). Expression proteomics predicts loss of RXR-gamma during progression of epithelial ovarian cancer. *PloS one* 8, e70398.
- Kandutsch, A.A., Chen, H.W., and Heiniger, H.J. (1978). Biological activity of some oxygenated sterols. *Science* 201, 498-501.

- Kang, K.A., Chae, S., Lee, K.H., Park, M.T., Lee, S.J., Lee, Y.S., and Hyun, J.W. (2005). Cytotoxic effect of 7beta-hydroxycholesterol on human NCI-H460 lung cancer cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* 28, 1377-1380.
- Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., *et al.* (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270, 1491-1494.
- Kedjouar, B., de Medina, P., Oulad-Abdelghani, M., Payre, B., Silvente-Poirot, S., Favre, G., Faye, J.C., and Poirot, M. (2004). Molecular characterization of the microsomal tamoxifen binding site. *The Journal of biological chemistry* 279, 34048-34061.
- Khenjanta, C., Thanan, R., Jusakul, A., Techasen, A., Jarnongkan, W., Namwat, N., Loilome, W., Pairojkul, C., and Yongvanit, P. (2014). Association of CYP39A1, RUNX2 and oxidized alpha-1 antitrypsin expression in relation to cholangiocarcinoma progression. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 15, 10187-10192.
- Khwaja, A., Rodriguez-Viciana, P., Wennstrom, S., Warne, P.H., and Downward, J. (1997). Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *The EMBO journal* 16, 2783-2793.
- King, J.A., and Millar, R.P. (1991). Gonadotropin-releasing hormones. *Vertebrate endocrinology: Fundamentals and biomedical implications* 4, 1-31.
- Kitahara, C.M., Berrington de Gonzalez, A., Freedman, N.D., Huxley, R., Mok, Y., Jee, S.H., and Samet, J.M. (2011). Total cholesterol and cancer risk in a large prospective study in Korea. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 1592-1598.
- Kojetin, D.J., and Burris, T.P. (2014). REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets. *Nature reviews Drug discovery* 13, 197-216.
- Komm, B.S., and Mirkin, S. (2014). An overview of current and emerging SERMs. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 143, 207-222.
- Kupferberg, A., Cremel, G., Behr, P., Van Dorsselaer, A., Luu, B., and Mersel, M. (1991). Differential sensitivity of astrocyte primary cultures and derived spontaneous transformed cell lines to 7 beta-hydroxycholesterol: effect on plasma membrane lipid composition and fluidity, and on cell surface protein expression. *Molecular and cellular biochemistry* 101, 11-22.
- Kurokawa, H., Lenferink, A.E., Simpson, J.F., Pisacane, P.I., Sliwkowski, M.X., Forbes, J.T., and Arteaga, C.L. (2000). Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer research* 60, 5887-5894.
- Lee, H.S., Chang, J.S., Baek, J.A., Chung, M.Y., Lee, H.C., Rhim, B.Y., Sok, D.E., Rho, M.C., Kim, Y.K., and Kim, K. (2005a). TNF-alpha activates death pathway in human aorta smooth muscle cell in the presence of 7-ketocholesterol. *Biochemical and biophysical research communications* 333, 1093-1099.
- Lee, T., and Chau, L. (2001). Fas/Fas ligand-mediated death pathway is involved in oxLDL-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology Cell physiology* 280, C709-718.
- Lee, Y.R., Park, J., Yu, H.N., Kim, J.S., Youn, H.J., and Jung, S.H. (2005b). Up-regulation of PI3K/Akt signaling by 17beta-estradiol through activation of estrogen receptor-alpha, but not estrogen

receptor-beta, and stimulates cell growth in breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 336, 1221-1226.

Lemaire-Ewing, S., Prunet, C., Montange, T., Vejux, A., Berthier, A., Bessede, G., Corcos, L., Gambert, P., Neel, D., and Lizard, G. (2005). Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. *Cell biology and toxicology* 21, 97-114.

Lewis, M.J., Wiebe, J.P., and Heathcote, J.G. (2004). Expression of progesterone metabolizing enzyme genes (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, SRD5A1, SRD5A2) is altered in human breast carcinoma. *BMC cancer* 4, 27.

LHRH-agonists in Early breast Cancer Overview group (2007). Use of luteinising-hormone-releasing hormone agonists as adjuvant treatment in premenopausal patients with hormone-receptor-positive breast cancer: a meta-analysis of individual patient data from randomised adjuvant trials. *The Lancet* 369, 1711-1723.

Li-Hawkins, J., Lund, E.G., Bronson, A.D., and Russell, D.W. (2000). Expression cloning of an oxysterol 7 α -hydroxylase selective for 24-hydroxycholesterol. *The Journal of biological chemistry* 275, 16543-16549.

Li, C., Yang, W., Zhang, J., Zheng, X., Yao, Y., Tu, K., and Liu, Q. (2014). SREBP-1 has a prognostic role and contributes to invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma. *International journal of molecular sciences* 15, 7124-7138.

Li, S., Shen, D., Shao, J., Crowder, R., Liu, W., Prat, A., He, X., Liu, S., Hoog, J., Lu, C., *et al.* (2013). Endocrine-therapy-resistant ESR1 variants revealed by genomic characterization of breast-cancer-derived xenografts. *Cell reports* 4, 1116-1130.

Liao, X.H., Lu, D.L., Wang, N., Liu, L.Y., Wang, Y., Li, Y.Q., Yan, T.B., Sun, X.G., Hu, P., and Zhang, T.C. (2014). Estrogen receptor alpha mediates proliferation of breast cancer MCF-7 cells via a p21/PCNA/E2F1-dependent pathway. *The FEBS journal* 281, 927-942.

Linseisen, J., and Wolfram, G. (1998). Absorption of cholesterol oxidation products from ordinary foodstuff in humans. *Annals of nutrition & metabolism* 42, 221-230.

Liu, R.Z., Graham, K., Glubrecht, D.D., Lai, R., Mackey, J.R., and Godbout, R. (2012). A fatty acid-binding protein 7/RXRbeta pathway enhances survival and proliferation in triple-negative breast cancer. *The Journal of pathology* 228, 310-321.

Lordan, S., O'Neill, C., and O'Brien, N.M. (2008). Effects of apigenin, lycopene and astaxanthin on 7 beta-hydroxycholesterol-induced apoptosis and Akt phosphorylation in U937 cells. *The British journal of nutrition* 100, 287-296.

Lu, L., Zhao, G., Luu-The, V., Ouellet, J., Fan, Z., Labrie, F., and Pelletier, G. (2011). Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in breast cancer and adjacent non-malignant tissue. An immunocytochemical study. *Pathology oncology research : POR* 17, 627-632.

Lund, E.G., Guileyardo, J.M., and Russell, D.W. (1999). cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 7238-7243.

Lund, E.G., Kerr, T.A., Sakai, J., Li, W.P., and Russell, D.W. (1998). cDNA cloning of mouse and human cholesterol 25-hydroxylases, polytopic membrane proteins that synthesize a potent oxysterol regulator of lipid metabolism. *The Journal of biological chemistry* 273, 34316-34327.

- Lutjohann, D., Breuer, O., Ahlborg, G., Nennesmo, I., Siden, A., Diczfalusy, U., and Bjorkhem, I. (1996). Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 9799-9804.
- Lyons, M.A., and Brown, A.J. (2001). Metabolism of an oxysterol, 7-ketocholesterol, by sterol 27-hydroxylase in HepG2 cells. *Lipids* *36*, 701-711.
- Macari, C., Teyssier, C., Tribollet, V., Mouzat, K., Forcet, C., Horard, B., Lobaccaro, J.M., and Vanacker, J.M. (2010). Estrogens repress PGC1-alpha expression in the uterus. *Molecular and cellular endocrinology* *330*, 33-40.
- Mak, H.Y., Hoare, S., Henttu, P.M., and Parker, M.G. (1999). Molecular determinants of the estrogen receptor-coactivator interface. *Molecular and cellular biology* *19*, 3895-3903.
- Maraga, L., Cummings, M., Peter, M., Shaaban, A., Hanby, A., Horgan, K., and Speirs, V. (2007). Evaluating the expression of HMGCS2 in human breast cancer relapses. *Breast* *16*, S13-S13.
- Martin, K.O., Reiss, A.B., Lathe, R., and Javitt, N.B. (1997). 7 alpha-hydroxylation of 27-hydroxycholesterol: biologic role in the regulation of cholesterol synthesis. *Journal of lipid research* *38*, 1053-1058.
- Martinez-Outschoorn, U.E., Lin, Z., Whitaker-Menezes, D., Howell, A., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2012). Ketone body utilization drives tumor growth and metastasis. *Cell cycle* *11*, 3964-3971.
- McDonnell, D.P., Clemm, D.L., Hermann, T., Goldman, M.E., and Pike, J.W. (1995). Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Molecular endocrinology* *9*, 659-669.
- McDonnell, D.P., Chang, C.Y., and Nelson, E.R. (2014). The estrogen receptor as a mediator of the pathological actions of cholesterol in breast cancer. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society* *17 Suppl 2*, 60-65.
- McGlynn, L.M., Kirkegaard, T., Edwards, J., Tovey, S., Cameron, D., Twelves, C., Bartlett, J.M., and Cooke, T.G. (2009). Ras/Raf-1/MAPK pathway mediates response to tamoxifen but not chemotherapy in breast cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *15*, 1487-1495.
- McInnes, K.J., Andersson, T.C., Simonyte, K., Soderstrom, I., Mattsson, C., Seckl, J.R., and Olsson, T. (2012). Association of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I expression and activity with estrogen receptor beta in adipose tissue from postmenopausal women. *Menopause* *19*, 1347-1352.
- Mittempergher, L., Saghatchian, M., Wolf, D.M., Michiels, S., Canisius, S., Dessen, P., Delaloge, S., Lazar, V., Benz, S.C., Tursz, T., *et al.* (2013). A gene signature for late distant metastasis in breast cancer identifies a potential mechanism of late recurrences. *Molecular oncology* *7*, 987-999.
- Mohelnikova-Duchonova, B., Brynychova, V., Oliverius, M., Honsova, E., Kala, Z., Muckova, K., and Soucek, P. (2013). Differences in transcript levels of ABC transporters between pancreatic adenocarcinoma and nonneoplastic tissues. *Pancreas* *42*, 707-716.
- Nabholtz, J.M., Buzdar, A., Pollak, M., Harwin, W., Burton, G., Mangalik, A., Steinberg, M., Webster, A., and von Euler, M. (2000). Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in postmenopausal women: results of a North American multicenter randomized trial. Arimidex Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *18*, 3758-3767.

- Nachtergaele, S., Mydock, L.K., Krishnan, K., Rammohan, J., Schlesinger, P.H., Covey, D.F., and Rohatgi, R. (2012). Oxysterols are allosteric activators of the oncoprotein Smoothed. *Nature chemical biology* 8, 211-220.
- Nedelcu, D., Liu, J., Xu, Y., Jao, C., and Salic, A. (2013). Oxysterol binding to the extracellular domain of Smoothed in Hedgehog signaling. *Nature chemical biology* 9, 557-564.
- Nelson, E.R., Wardell, S.E., Jasper, J.S., Park, S., Suchindran, S., Howe, M.K., Carver, N.J., Pillai, R.V., Sullivan, P.M., Sondhi, V., *et al.* (2013). 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. *Science* 342, 1094-1098.
- Osborne, C.K., Coronado-Heinsohn, E.B., Hilsenbeck, S.G., McCue, B.L., Wakeling, A.E., McClelland, R.A., Manning, D.L., and Nicholson, R.I. (1995). Comparison of the effects of a pure steroidal antiestrogen with those of tamoxifen in a model of human breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 87, 746-750.
- Paillasse, M.R., de Medina, P., Amouroux, G., Mhamdi, L., Poirot, M., and Silvente-Poirot, S. (2009). Signaling through cholesterol esterification: a new pathway for the cholecystokinin 2 receptor involved in cell growth and invasion. *Journal of lipid research* 50, 2203-2211.
- Pandey, P.R., Xing, F., Sharma, S., Watabe, M., Pai, S.K., Iizumi-Gairani, M., Fukuda, K., Hirota, S., Mo, Y.Y., and Watabe, K. (2013). Elevated lipogenesis in epithelial stem-like cell confers survival advantage in ductal carcinoma in situ of breast cancer. *Oncogene* 32, 5111-5122.
- Park, S.S., and Kim, S.W. (2007). Activated Akt signaling pathway in invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with HER2 overexpression. *Oncology reports* 18, 139-143.
- Payre, B., de Medina, P., Boubekour, N., Mhamdi, L., Bertrand-Michel, J., Terce, F., Fourquaux, I., Goudouneche, D., Record, M., Poirot, M., *et al.* (2008). Microsomal antiestrogen-binding site ligands induce growth control and differentiation of human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism. *Molecular cancer therapeutics* 7, 3707-3718.
- Pearce, S.T., and Jordan, V.C. (2004). The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Critical reviews in oncology/hematology* 50, 3-22.
- Pedram, A., Razandi, M., Sainson, R.C., Kim, J.K., Hughes, C.C., and Levin, E.R. (2007). A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* 282, 22278-22288.
- Perey, L., Paridaens, R., Hawle, H., Zaman, K., Nole, F., Wildiers, H., Fiche, M., Dietrich, D., Clement, P., Koberle, D., *et al.* (2007). Clinical benefit of fulvestrant in postmenopausal women with advanced breast cancer and primary or acquired resistance to aromatase inhibitors: final results of phase II Swiss Group for Clinical Cancer Research Trial (SAKK 21/00). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 18, 64-69.
- Perry, R.J., and Ridgway, N.D. (2006). Oxysterol-binding protein and vesicle-associated membrane protein-associated protein are required for sterol-dependent activation of the ceramide transport protein. *Molecular biology of the cell* 17, 2604-2616.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29, e45.
- Piehler, A., Kaminski, W.E., Wenzel, J.J., Langmann, T., and Schmitz, G. (2002). Molecular structure of a novel cholesterol-responsive A subclass ABC transporter, ABCA9. *Biochemical and biophysical research communications* 295, 408-416.

- Pietras, R.J., and Szego, C.M. (1975). Endometrial cell calcium and oestrogen action. *Nature* 253, 357-359.
- Pitroda, S.P., Khodarev, N.N., Beckett, M.A., Kufe, D.W., and Weichselbaum, R.R. (2009). MUC1-induced alterations in a lipid metabolic gene network predict response of human breast cancers to tamoxifen treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 5837-5841.
- Planas-Silva, M.D., and Waltz, P.K. (2007). Estrogen promotes reversible epithelial-to-mesenchymal-like transition and collective motility in MCF-7 breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 104, 11-21.
- Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Kwon, H.J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2007). Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 6511-6518.
- Ramaswamy, B., Lu, Y., Teng, K.Y., Nuovo, G., Li, X., Shapiro, C.L., and Majumder, S. (2012). Hedgehog signaling is a novel therapeutic target in tamoxifen-resistant breast cancer aberrantly activated by PI3K/AKT pathway. *Cancer research* 72, 5048-5059.
- Rawson, R.B., Zelenski, N.G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M.T., Chang, T.Y., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Molecular cell* 1, 47-57.
- Reddy, B.S., and Wynder, E.L. (1977). Metabolic epidemiology of colon cancer. Fecal bile acids and neutral sterols in colon cancer patients and patients with adenomatous polyps. *Cancer* 39, 2533-2539.
- Repa, J.J., Berge, K.E., Pomajzl, C., Richardson, J.A., Hobbs, H., and Mangelsdorf, D.J. (2002). Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *The Journal of biological chemistry* 277, 18793-18800.
- Rusinol, A.E., Thewke, D., Liu, J., Freeman, N., Panini, S.R., and Sinensky, M.S. (2004). AKT/protein kinase B regulation of BCL family members during oxysterol-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 279, 1392-1399.
- Sakai, J., Nohturfft, A., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1998). Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies. *The Journal of biological chemistry* 273, 5785-5793.
- Sandhu, R., Parker, J.S., Jones, W.D., Livasy, C.A., and Coleman, W.B. (2010). Microarray-based gene expression profiling for molecular classification of breast cancer and identification of new targets for therapy. *Lab Medicine* 41, 364-372.
- Sanchez, A.M., Flamini, M.I., Baldacci, C., Goglia, L., Genazzani, A.R., and Simoncini, T. (2010). Estrogen receptor-alpha promotes breast cancer cell motility and invasion via focal adhesion kinase and N-WASP. *Molecular endocrinology* 24, 2114-2125.
- Sevanian, A., and McLeod, L.L. (1986). Catalytic properties and inhibition of hepatic cholesterol-epoxide hydrolase. *The Journal of biological chemistry* 261, 54-59.
- Sever, N., Yang, T., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and DeBose-Boyd, R.A. (2003). Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain. *Molecular cell* 11, 25-33.

- Shi, L., Dong, B., Li, Z., Lu, Y., Ouyang, T., Li, J., Wang, T., Fan, Z., Fan, T., Lin, B., *et al.* (2009). Expression of ER- α 36, a novel variant of estrogen receptor α , and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 3423-3429.
- Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A., and Greene, G.L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95, 927-937.
- Shoman, N., Klassen, S., McFadden, A., Bickis, M.G., Torlakovic, E., and Chibbar, R. (2005). Reduced PTEN expression predicts relapse in patients with breast carcinoma treated by tamoxifen. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 18, 250-259.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., and Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology* 7, 3.
- Schwarz, M., Lund, E.G., Lathe, R., Bjorkhem, I., and Russell, D.W. (1997). Identification and characterization of a mouse oxysterol 7 α -hydroxylase cDNA. *The Journal of biological chemistry* 272, 23995-24001.
- Schweizer, R.A., Zurcher, M., Balazs, Z., Dick, B., and Odermatt, A. (2004). Rapid hepatic metabolism of 7-ketocholesterol by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1: species-specific differences between the rat, human, and hamster enzyme. *The Journal of biological chemistry* 279, 18415-18424.
- Sinha, S., Kaseta, J., Santner, S.J., Demers, L.M., Bremner, W.J., and Santen, R.J. (1998). Effect of CGS 20267 on ovarian aromatase and gonadotropin levels in the rat. *Breast cancer research and treatment* 48, 45-51.
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., *et al.* (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England journal of medicine* 344, 783-792.
- Smith, L.L., Smart, V.B., and Ansari, G.A. (1979). Mutagenic cholesterol preparations. *Mutation research* 68, 23-30.
- Sobin, L., Gospodarowicz, M., and Wittekind, C. (2011). *TNM Klasifikace zhoubných novotvarů. 7. vyd. Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, Praha.*
- Song, B.L., and DeBose-Boyd, R.A. (2004). Ubiquitination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in permeabilized cells mediated by cytosolic E1 and a putative membrane-bound ubiquitin ligase. *The Journal of biological chemistry* 279, 28798-28806.
- Song, C., Kokontis, J.M., Hiipakka, R.A., and Liao, S. (1994). Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10809-10813.
- Soucek, P., Anzenbacher, P., Skoumalova, I., and Dvorak, M. (2005). Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem cells* 23, 1417-1422.
- Soupas, L., Juntunen, L., Lampi, A.M., and Piironen, V. (2004). Effects of sterol structure, temperature, and lipid medium on phytosterol oxidation. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 6485-6491.

- Staprans, I., Pan, X.M., Rapp, J.H., and Feingold, K.R. (2003). Oxidized cholesterol in the diet is a source of oxidized lipoproteins in human serum. *Journal of lipid research* 44, 705-715.
- Steele, R.J., Eremin, O., Brown, M., and Hawkins, R.A. (1984). A high macrophage content in human breast cancer is not associated with favourable prognostic factors. *The British journal of surgery* 71, 456-458.
- Sun, Y., Wang, Y., Fan, C., Gao, P., Wang, X., Wei, G., and Wei, J. (2014). Estrogen promotes stemness and invasiveness of ER-positive breast cancer cells through Gli1 activation. *Molecular cancer* 13, 137.
- Sutherland, R.L., Murphy, L.C., San Foo, M., Green, M.D., Whybourne, A.M., and Krozowski, Z.S. (1980). High-affinity anti-oestrogen binding site distinct from the oestrogen receptor. *Nature* 288, 273-275.
- Szego, C.M., and Davis, J.S. (1967). Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 58, 1711-1718.
- Takabe, K., Kim, R.H., Allegood, J.C., Mitra, P., Ramachandran, S., Nagahashi, M., Harikumar, K.B., Hait, N.C., Milstien, S., and Spiegel, S. (2010). Estradiol induces export of sphingosine 1-phosphate from breast cancer cells via ABCG1 and ABCG2. *The Journal of biological chemistry* 285, 10477-10486.
- Tam, S.P., Mok, L., Chimini, G., Vasa, M., and Deeley, R.G. (2006). ABCA1 mediates high-affinity uptake of 25-hydroxycholesterol by membrane vesicles and rapid efflux of oxysterol by intact cells. *American journal of physiology Cell physiology* 291, C490-502.
- Tao, Y., Mao, J., Zhang, Q., and Li, L. (2011). Overexpression of Hedgehog signaling molecules and its involvement in triple-negative breast cancer. *Oncology letters* 2, 995-1001.
- Terasaka, N., Wang, N., Yvan-Charvet, L., and Tall, A.R. (2007). High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 15093-15098.
- Tolhurst, R.S., Thomas, R.S., Kyle, F.J., Patel, H., Periyasamy, M., Photiou, A., Thiruchelvam, P.T., Lai, C.F., Al-Sabbagh, M., Fisher, R.A., *et al.* (2011). Transient over-expression of estrogen receptor-alpha in breast cancer cells promotes cell survival and estrogen-independent growth. *Breast cancer research and treatment* 128, 357-368.
- Tonello, A., and Poli, G. (2006). Serum phytosterols not only from dietary intake. *The British journal of nutrition* 96, 791-792.
- Umetani, M., Domoto, H., Gormley, A.K., Yuhanna, I.S., Cummins, C.L., Javitt, N.B., Korach, K.S., Shaul, P.W., and Mangelsdorf, D.J. (2007). 27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen. *Nature medicine* 13, 1185-1192.
- Uno, S., Endo, K., Jeong, Y., Kawana, K., Miyachi, H., Hashimoto, Y., and Makishima, M. (2009). Suppression of beta-catenin signaling by liver X receptor ligands. *Biochemical pharmacology* 77, 186-195.
- Van't Veer, L.J., Dai, H., Van De Vijver, M.J., He, Y.D., Hart, A.A., Mao, M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., and Witteveen, A.T. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530-536.

- Van den Brink, M.R., Kapeller, R., Pratt, J.C., Chang, J.H., and Burakoff, S.J. (1999). The extracellular signal-regulated kinase pathway is required for activation-induced cell death of T cells. *The Journal of biological chemistry* 274, 11178-11185.
- Venkateswaran, A., Laffitte, B.A., Joseph, S.B., Mak, P.A., Wilpitz, D.C., Edwards, P.A., and Tontonoz, P. (2000). Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 12097-12102.
- Vrieling, A., Buck, K., Kaaks, R., and Chang-Claude, J. (2010). Adult weight gain in relation to breast cancer risk by estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis. *Breast cancer research and treatment* 123, 641-649.
- Wakeling, A.E., and Bowler, J. (1992). ICI 182,780, a new antioestrogen with clinical potential. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 43, 173-177.
- Wang, C., JeBailey, L., and Ridgway, N.D. (2002). Oxysterol-binding-protein (OSBP)-related protein 4 binds 25-hydroxycholesterol and interacts with vimentin intermediate filaments. *The Biochemical journal* 361, 461-472.
- Wang, J., Scholtens, D., Holko, M., Ivancic, D., Lee, O., Hu, H., Chatterton, R.T., Jr., Sullivan, M.E., Hansen, N., Bethke, K., *et al.* (2013a). Lipid metabolism genes in contralateral unaffected breast and estrogen receptor status of breast cancer. *Cancer prevention research* 6, 321-330.
- Wang, P.Y., Weng, J., and Anderson, R.G. (2005). OSBP is a cholesterol-regulated scaffolding protein in control of ERK 1/2 activation. *Science* 307, 1472-1476.
- Wang, S.F., Chou, Y.C., Mazumder, N., Kao, F.J., Nagy, L.D., Guengerich, F.P., Huang, C., Lee, H.C., Lai, P.S., and Ueng, Y.F. (2013b). 7-Ketocholesterol induces P-glycoprotein through PI3K/mTOR signaling in hepatoma cells. *Biochemical pharmacology* 86, 548-560.
- Wang, X., Briggs, M.R., Hua, X., Yokoyama, C., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1993). Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization. *The Journal of biological chemistry* 268, 14497-14504.
- Wang, X., Sato, R., Brown, M.S., Hua, X., and Goldstein, J.L. (1994). SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* 77, 53-62.
- Watkins, G., Douglas-Jones, A., Mansel, R.E., and Jiang, W.G. (2004). The localisation and reduction of nuclear staining of PPARgamma and PGC-1 in human breast cancer. *Oncology reports* 12, 483-488. Citováno podle Yu, H., and Xin, Y. (2013). Down-regulated expressions of PPARgamma and its coactivator PGC-1 are related to gastric carcinogenesis and Lauren's classification in gastric carcinoma. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu* 25, 704-714.
- Willy, P.J., Umesono, K., Ong, E.S., Evans, R.M., Heyman, R.A., and Mangelsdorf, D.J. (1995). LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes & development* 9, 1033-1045.
- Wyles, J.P., McMaster, C.R., and Ridgway, N.D. (2002). Vesicle-associated membrane protein-associated protein-A (VAP-A) interacts with the oxysterol-binding protein to modify export from the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* 277, 29908-29918.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., and Greenberg, M.E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331.

Xu, M., Zhou, H., Tan, K.C., Guo, R., Shiu, S.W., and Wong, Y. (2009). ABCG1 mediated oxidized LDL-derived oxysterol efflux from macrophages. *Biochemical and biophysical research communications* 390, 1349-1354.

Yan, D., Mayranpaa, M.I., Wong, J., Perttila, J., Lehto, M., Jauhiainen, M., Kovanen, P.T., Ehnholm, C., Brown, A.J., and Olkkonen, V.M. (2008). OSBP-related protein 8 (ORP8) suppresses ABCA1 expression and cholesterol efflux from macrophages. *The Journal of biological chemistry* 283, 332-340.

Yang, T., Espenshade, P.J., Wright, M.E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110, 489-500.

Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Molecular cell* 6, 1355-1364.

Yin, Y., Zeng, K., Wu, M., Ding, Y., Zhao, M., and Chen, Q. (2014). The levels of Ki-67 positive are positively associated with lymph node metastasis in invasive ductal breast cancer. *Cell biochemistry and biophysics* 70, 1145-1151.

Yoon, J.H., Canbay, A.E., Werneburg, N.W., Lee, S.P., and Gores, G.J. (2004). Oxysterols induce cyclooxygenase-2 expression in cholangiocytes: implications for biliary tract carcinogenesis. *Hepatology* 39, 732-738.

Zanardi, E., Dorigoni, V., Badiani, A., and Chizzolini, R. (2002). Lipid and colour stability of Milano-type sausages: effect of packing conditions. *Meat science* 61, 7-14.

Zhang, Y., Yu, C., Liu, J., Spencer, T.A., Chang, C.C., and Chang, T.Y. (2003). Cholesterol is superior to 7-ketocholesterol or 7 alpha-hydroxycholesterol as an allosteric activator for acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 1. *The Journal of biological chemistry* 278, 11642-11647.

Zu Schwabedissen, H.E.M., Tirona, R.G., Yip, C.S., Ho, R.H., and Kim, R.B. (2008). Interplay between the nuclear receptor pregnane X receptor and the uptake transporter organic anion transporter polypeptide 1A2 selectively enhances estrogen effects in breast cancer. *Cancer research* 68, 9338-9347.

Další zdroje:

http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx

<http://www.uzis.cz/rychle-informace/zhoubne-nadory-roce-2011>

<http://www.fda.gov/NewsEvents/Testimony/ucm115118.htm>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23762>

Kludová, A. (2013): Úloha estrogenových receptorů v prognóze a účinnosti terapie karcinomu prsu. Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha.

Weinkauf, M. (2012) Soubor pro výpočet FDR analýzy Benjamini, Hochberg. Version 1.1. Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported Licence.
<http://www.seu.ac.lk/cedpl/student%20download/BenjaminiHochberg.xlsx>