

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2023

Tereza Novotná

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Molekulární klasifikace receptoru HER-3 a jeho klinický
význam u karcinomu prsu**

Diplomová práce

Bc. Tereza Novotná

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

Vedoucí práce: RNDr. Ing. Libor Staněk, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Tereza NOVOTNÁ
Osobní číslo: R210604
Studijní program: N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Molekulární klasifikace receptoru HER-3 a jeho klinický význam u karcinomu prsu
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Stanovení cílů diplomové práce.
2. Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
3. Výběr pacientek.
4. Histologická verifikace nádoru a stanovení TNM klasifikace.
5. Imunohistochemické stanovení exprese HER-2 receptoru a amplifikace genu *Her-2/neu* cyto geneticky metodou FISH. Následné rozdělení HER-2 pozitivních a triplenegativních pacientek s karcinomem prsu.
6. Imunohistochemické stanovení exprese HER-3 receptoru a amplifikace genu *ERBB3* cyto geneticky metodou FISH.
7. Imunohistochemické stanovení exprese PD-L1.
8. Statistické zpracování laboratorních výsledků s klinickými daty analyzovaných pacientek. Ověřit význam exprese PD-L1 pro následnou imunoterapii a exprese HER-3 jako prognostického markeru.
9. Vypracování diplomové práce a prezentace pro následnou obhajobu. Předpokládáme publikování dosažených výsledků v časopise s IF.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- Asztalos S, Pham TN, Gann PH, Hayes MK, Deaton R et al. High incidence of triple negative breast cancers following pregnancy and an associated gene expression signature. Springerplus. 2015;19,4:710.
- Göthlin Eremo A, Tina E, Wegman P, Stål O, Fransén K, et al. HER4 tumor expression in breast cancer patients randomized to treatment with or without tamoxifen. Int J Oncol. 2015 ;47(4):1311-20.
- Hammoda GE, El-Hefnawy SM, Abdou AG, Abdallah RA. Human Epidermal Growth Factor Receptor-3 mRNA Expression as a Prognostic Marker for Invasive Duct Carcinoma not Otherwise Specified. J Clin Diagn Res. 2017; Feb;11(2).
- Hui Lyu, Amy Han, Erik Polsdofer, Shuang Liu, Bolin Liu. Understanding the biology of HER3 receptor as a therapeutic target in human cancer, Acta Pharmaceutica Sinica B, 2018; Volume 8, Issue 4: 503-510.
- Koutras AK, Fountzilias G, Kalogeras KT, Starakis I, Iconomou G, Kalofonos HP. The upgraded role of HER3 and HER4 receptors in breast cancer. Crit Rev Oncol Hematol. 2010;74(2):73-8.
- Staněk L, Tesařová P., Gurlích R. Molekulární onkologie v kazuistikách. Praha: Current Media 2018: 45-56.

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Ing. Libor Staněk, Ph.D.**
3. LF, Chirurgická klinika, Praha

Datum zadání diplomové práce: **3. listopadu 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **31. července 2023**

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 4. listopadu 2021

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Tereza Novotná
Název práce:	Molekulární klasifikace receptoru HER-3 a jeho klinický význam u karcinomu prsu
Typ práce:	diplomová
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce:	RNDr. Ing. Libor Staněk, Ph.D.
Rok obhajoby:	2023
Klíčová slova:	karcinogeneze, karcinom prsu, HER-3, PD-L1, TNBC, rodina HER, HER-2
Počet stran:	41
Počet příloh:	0
Jazyk:	čeština

SOUHRN

Karcinom prsu je celosvětově primární onkologickou příčinou úmrtí na rakovinu u žen. S biologickým vývojem dochází k vývoji v oblasti diagnostiky a terapie. V případě karcinomu prsu hrají významnou roli receptory HER rodiny. Dimerizace HER-2 receptoru s dalšími členy HER rodiny je hlavním hnacím mechanismem růstu a přežití nádorových buněk. HER-3 může zprostředkovat rezistenci na určitá terapeutika cílená na EGFR nebo HER-2. Zajímavé je, že exprese HER-3 může být markerem v imunoterapii u TNBC. Předpokládá se, že se podílí na proliferaci a přežití buněk i regulaci exprese PD-L1. Exprese PD-L1 je u karcinomu prsu heterogenní a souvisí s výskytem lymfocytů infiltrujících nádor a dalšími faktory se špatnou prognózou (nízký věk, vysoký proliferační index, negativita hormonálních receptorů, vysoká exprese HER-2). Naše studie prokázala amplifikaci/expresi *ErbB3*/HER-3 u 2/20 v případě TNBC a 13/20 v případě HER-2 pozitivních pacientek. Exprese PD-L1 byla potvrzena u 3/13 HER-3 pozitivních (HER-2 pozitivní pacientky) a 2/2 HER-3 pozitivních (TNBC). Mezi pozitivními HER-3 a PD-L1 byla silná korelace ($p \leq 0,001$). Zdá se, že nadměrná exprese HER-3 bude mít negativní i pozitivní prognostický a klinický dopad.

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Tereza Novotná
Title: HER-3 molecular classification and clinical importance in breast cancer
Type of thesis: diploma
Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc
Supervisor: RNDr. Ing. Libor Staněk, Ph.D.
The year of presentation: 2023
Keywords: carcinogenesis, breast cancer, HER-3, PD-L1, TNBC, HER family, HER-2
Number of pages: 41
Number of appendices: 0
Language: czech

SUMMARY

Breast cancer is the primary oncological cause of cancer death in women worldwide. With biological development comes development in diagnostics and therapy. HER family receptors play an important role in breast cancer. Dimerization of the HER-2 receptor with other members of the HER family is the main driving mechanism of tumor cell growth and survival. HER-3 may mediate resistance to certain therapeutics targeting EGFR or HER-2. Interestingly, HER-3 expression may be a marker in immunotherapy in TNBC. It is believed to be involved in cell proliferation and survival as well as regulation of PD-L1 expression. PD-L1 expression is heterogeneous in breast cancer and is related to the occurrence of tumor-infiltrating lymphocytes and other factors with poor prognosis (young age, high proliferation index, hormone receptor negativity, high HER-2 expression). Our study demonstrated *ErbB3*/HER-3 amplification/expression in 2/20 TNBC and 13/20 HER-2 positive patients. PD-L1 expression was confirmed in 3/13 HER-3 positive (HER-2 positive patients) and 2/2 HER-3 positive (TNBC) patients. There was a strong correlation between HER-3 and PD-L1 positivity ($p \leq 0.001$). HER-3 overexpression appears to have both negative and positive prognostic and clinical impact.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Ing. Libora Staňka*, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

*Chirurgická klinika, 3. lékařská fakulta – Univerzita Karlova v Praze, synlab czech s.r.o., Laboratoř Praha, CUBE, sekce genetiky

V Olomouci dne:

Podpis:

Ráda bych poděkovala vedoucímu své diplomové práce RNDr. Ing. Liboru Staňkovi, Ph.D. za jeho čas, pomoc, přátelský přístup, trpělivost a vstřícnost po celou dobu trvání naší spolupráce. Ráda bych také poděkovala své rodině a blízkým za podporu při studiu.

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	CÍLE PRÁCE.....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Karcinogeneze	3
3.2	Karcinom prsu	9
3.2.1	Epidemiologie a etiologie karcinomu prsu	9
3.2.2	Biologické a buněčné aspekty rodiny HER	13
3.2.2.1	Význam exprese HER-3 a dalších členů této rodiny u invazivního karcinomu prsu	16
3.2.3	PD-1/PD-L1 dráha u karcinomu prsu	17
3.2.4	Triple-negativní karcinom prsu (TNBC)	18
3.2.4.1	Exprese HER-3 u triple-negativního karcinomu prsu.....	18
3.3	Imunoterapie karcinomu prsu	19
3.3.1	Nádorové onemocnění a imunitní systém.....	20
4	MATERIÁL a METODY	22
4.1	Biologický materiál	22
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	22
4.3	Laboratorní pomůcky.....	23
4.4	Seznam použitých přístrojů a zařízení	23
4.5	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	23
4.5.1	Zpracování tkáně.....	23
4.5.2	Imunohistochemický průkaz (IHC) HER-2, HER-3.....	23
4.5.3	Imunohistochemický průkaz (IHC) exprese PD-L1	24
4.5.4	Cytogenetický průkaz numerických změn genu <i>Her-2/neu</i> a <i>ErbB3</i> metodou FISH.....	24
5	VÝSLEDKY	26

5.1	Výběr pacientů.....	26
5.2	Imunohistochemický průkaz (IHC) HER-2, HER-3.....	26
5.3	Imunohistochemický průkaz (IHC) exprese PD-L1	27
5.4	Cytogenetický průkaz numerických změn genu <i>Her-2/neu</i> a <i>ErbB3</i> metodou FISH	27
5.5	Celkový nález	30
6	DISKUSE	32
7	ZÁVĚR.....	35
8	LITERATURA	36

SEZNAM SYMBOLŮ a ZKRATEK

APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1
APC	adenomatous polyposis coli
ATM	ataxia-telangiectasia mutated
BER	base excision repair
CFLAR	caspase-8 and FADD-like apoptosis regulator
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
DCIS	duktální karcinom <i>in situ</i>
DD	death domain
DED	death effector domain
DISC	death-inducing signalling complex
DL	death ligand
DR	death receptor
ER	estrogenový receptor
FADD	Fas-associated protein with death domain
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
GAP	GTPase activating proteins
HDAC	histondeacetyláza
HER/EGFR	human epidermal growth factor receptor
IAP	inhibitors of apoptosis
IDC	invazivní duktální karcinom
IHC	imunohistochemie
LCIS	lobulární karcinom <i>in situ</i>
NEDD4	E3 ubikvitin-protein ligáza
NER	nucleotide excision repair
NFκB	nuclear factor kappa B

NHEJ	non-homologous end joining
NOXA	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
Nrdp1	neuregulin receptor degradation protein-1
OS	overall survival
PD-L1	programmed cell death ligand 1
PD-1	programmed cell death protein 1
PFS	progression-free survival
PIP2	4,5-fosfatidylinositoldifosfát
PIP3	3,4,5-fosfatidylinositoltrifosfát
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PKB/AKT	proteinkináza B
PR	progesteronový receptor
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis; BBC3
TF	transkripční faktory
TIL	tumor infiltrující lymfocyty
TNBC	triple-negativní karcinom prsu
TNF	tumor necrosis factor
TRAF	TNF-receptor-associated factors

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1:** Incidence karcinomu prsu na základě věku (převzato z: <https://www.svod.cz>)
- Obrázek 2:** Histologická klasifikace karcinomu prsu včetně prekancerózních změn (převzato z: <https://www.saintjohnscancer.org>)
- Obrázek 3:** Incidence a mortalita u rakoviny prsu (převzato z: <https://www.svod.cz>)
- Obrázek 4:** Srovnání incidence karcinomu prsu v České republice a zahraničí (převzato z: <https://www.svod.cz>)
- Obrázek 5:** Receptor HER-2 a jeho možné dimerizace a ovlivnění buněčných dějů (převzato z: Fornaro *et al.*, 2011)
- Obrázek 6:** Mechanismus účinku checkpoint inhibitorů (převzato z de Mello *et al.*, 2016)
- Obrázek 7:** Imunohistochemický průkaz zvýšené exprese HER-2 receptoru (zvětšeno 200x)
- Obrázek 8:** Negativní imunohistochemický nálezn exprese HER-2 receptoru (zvětšeno 200x)
- Obrázek 9:** Imunohistochemický průkaz zvýšené exprese HER-3 receptoru (zvětšeno 200x)
- Obrázek 10:** Imunohistochemický průkaz exprese PD-L1 (zvětšeno 200x)
- Obrázek 11:** Cytogenetický průkaz genu *Her-2/neu* ukazuje na amplifikovaný stav, kdy je detekováno několik lokus specifických signálů (červený signál) a 2 centromerické signály (zelený signál) – detail jádra (zvětšení 1000x)
- Obrázek 12:** Cytogenetický průkaz genu *Her-2/neu* ukazuje na normální stav, kdy jsou detekovány 2 lokus specifické signály (červený signál) a 2 centromerické signály (zelený signál) – detail jádra (zvětšeno 1000x)
- Obrázek 13:** Cytogenetický průkaz genu *ErbB3* ukazuje na amplifikovaný stav, kdy je detekováno několik lokus specifických signálů (červený signál) a 2 centromerické signály (zelený signál) – detail jádra (zvětšeno 1000x)

Obrázek 14: Cytogenetický průkaz genu *ErbB3* ukazuje na normální stav, kdy jsou detekovány 2 lokus specifické signály (červený signál) a 2 centromerické signály (zelený signál) – detail jádra (zvětšeno 1000x)

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Kompletní výsledky analýz u pacientek s HER-2 pozitivním karcinomem prsu

Tabulka 2: Kompletní výsledky analýz u pacientek s TNBC

1 ÚVOD

Rakovina prsu je celosvětově nejčastěji se vyskytující rakovinou u žen a je tedy výzvou pro veřejné zdraví v celosvětovém měřítku. Karcinom prsu je heterogenní onemocnění a díky pokroku v molekulární biologii se znalosti o tomto onemocnění v posledních desetiletích rozšířily na buněčné, molekulární a genomické úrovni. Přežití závisí jak na stádiu onemocnění, tak na molekulárním podtypu, a právě molekulární klasifikace poskytuje vhled do nových léčebných strategií a stratifikací pacientek. V případě karcinomu prsu hrají důležitou roli receptory rodiny HER, protože dimerizace HER-2 receptoru s dalšími receptory HER rodiny je hlavním mechanismem podporujícím růst a přežití nádorových buněk. Léčba rakoviny prsu je komplexní a kombinuje různé modalities včetně chirurgie, radioterapie, chemoterapie, hormonální terapie nebo biologické terapie. Klasifikace a podtypy rakoviny prsu, hlavní signální dráhy ovlivňující vývoj rakoviny, běžné genové mutace u rakoviny prsu a regulační role epigenetiky mají vliv na prognózu a klinickou léčbu onemocnění.

2 CÍLE PRÁCE

Hypotéza:

Předpokládá se, že určité procento diagnostikovaných karcinomů prsu, a to jak HER-2 pozitivních tak TNBC, bude asociováno s amplifikací a následnou expresí receptoru HER-3. Tyto pacientky dle předpokladu budou mít jinou prognózu onemocnění a pravděpodobně také odezvu na terapii. Dále se podle zatím dostupných studií ukazuje, že imunoterapie pomocí anti-PD-1 monoklonálních protilátek může být spojena s dobrou odpovědí na léčbu, nicméně zde opět může hrát roli výše zmíněná exprese HER-3.

Cílem práce je u vybraných pacientek s karcinomem prsu ověřit výše zmíněnou hypotézu a ověřit souvislosti těchto biologických markerů na kohortě 40 pacientek s diagnostikovaným TNBC (20 pacientek) a HER-2 pozitivním karcinomem (20 pacientek) pomocí histologických, cytogenetických a imunohistochemických metod.

1. Stanovení cílů diplomové práce.
2. Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
3. Výběr pacientek.
4. Histologická verifikace nádoru a stanovení TNM klasifikace.
5. Imunohistochemické stanovení exprese HER-2 receptoru a amplifikace genu *Her-2/neu* cytogeneticky metodou FISH. Následné rozdělení HER-2 pozitivních a triple-negativních pacientek s karcinomem prsu.
6. Imunohistochemické stanovení exprese HER-3 receptoru a amplifikace genu *ERBB3* cytogeneticky metodou FISH.
7. Imunohistochemické stanovení exprese PD-L1.
8. Statistické zpracování laboratorních výsledků s klinickými daty analyzovaných pacientek. Ověřit význam exprese PD-L1 pro následnou imunoterapii a exprese HER-3 jako prognostického markeru.
9. Vypracování diplomové práce a prezentace pro následnou obhajobu. Předpokládáme publikování dosažených výsledků v časopise s IF.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Karcinogeneze

Proces karcinogeneze je možné rozdělit do tří fází: iniciace, promoce a progresse. První iniciační fáze je výsledkem nevratné genetické změny, kdy došlo s největší pravděpodobností k jedné či více jednoduchým mutacím, transverzi, transici nebo k malým delecím v dvoušroubovici DNA. V reverzibilní fázi promoce nejsou zahrnuty změny struktury DNA, ale spíše změny v genové expresi umožněné prostřednictvím interakce promotoru a receptoru. Pro ireverzibilní stádium progresse je charakteristická karyotypická nestabilita a maligní růst (Pitot, 1993).

Na malignitu nádoru má vliv mnoho genetických změn, které vznikají genotoxickým působením biologických, chemických či fyzikálních vlivů. Nádor se stává maligním na základě kumulací somatických alterací specifických genů. Na vznik zhoubného nádoru mají vliv také genetické predispozice, tzv. hereditární mutace. Alterace těchto predispozičních genů jsou vysoce penetrantní (Staněk *et al.*, 2023).

Rozvoj nádoru je významně ovlivněn také epigenetickými faktory, které mají dopad na expresi genetické informace. V případě kumulace alterací může docházet k poruchám nitrobuňčné signalizace, což může způsobit nádorovou transformaci. Maligní transformace je zapříčiněna poruchami řízení buněčného cyklu a také unikáním buněk apoptóze, současně také dochází k inaktivaci opravných mechanismů DNA (Staněk *et al.*, 2023).

Kritické jsou poruchy týkající se mechanismu regulace buněčného cyklu, a to především v úvodní fázi, kdy nastává vstup do buněčného cyklu a regulace kontrolními body buněčného cyklu. Jedná se zejména o chyby v mitotické signalizaci a s tím související selhání buněčného cyklu. Procesy v buněčném cyklu jsou umožněny díky signálním kaskádám, kterých se účastní ligandy – signální molekuly, příslušné receptory proteinového charakteru, popřípadě transduktory, které přenášejí mitotický signál na systém kináz. Kinázy jsou zodpovědné za modulaci aktivity transkripčních faktorů regulujících expresi genů, které jsou zodpovědné za průchod buňky buněčným cyklem. Poruchy nastávají deregulací onkogenů a tumor supresorových genů (Staněk *et al.*, 2023).

Onkogeny kódují jednotlivé proteinové komponenty účastnící se signálních drah a způsobují jejich aktivaci bez ohledu na to, zda je přítomna stimulace nadřazené signální molekuly. Mezi typické somatické alterace v buňkách nádoru patří například mutace genů

PI3K, *EGFR* a *k-Ras*. Tyto alterace způsobují promitotickou hyperstimulaci, která je nezávislá na přítomnosti nadřazeného signálu, co se regulace týče (Staněk *et al.*, 2023).

Obdobně účinkují také amplifikace genů (alely přítomny ve více kopiích), které kódují jednotlivé proteinové komponenty transdukčních kaskád. Jedná se například o gen *ErbB-2*, který kóduje HER-2 receptor pro lidský epidermální růstový faktor. Tento receptor heterodimerizuje s dalšími receptory HER rodiny nebo jinými (Staněk *et al.*, 2023).

Tumor supresorové geny jsou za fyziologických podmínek zodpovědné za inhibici signální kaskády, pokud ale dojde k mutaci v těchto genech, má to za následek podobné účinky jako předchozí somatické alterace. Příkladem je mutace neurofibrominu – NF-1, která způsobuje ztrátu aktivity proteinů aktivujících GTPázu – GAP. Tyto proteiny umožňují prodloužení existence aktivovaného Ras-GTP, čímž dochází k promitotické hyperstimulaci. Dalším příkladem je inaktivující mutace APC (adenomatous polyposis coli), jehož genovým produktem je protein APC. Tento protein je za fyziologických okolností zodpovědný za inaktivaci β -kateninové signalizace retencí β -kateninu, čímž je v cytoplasmě umožněno uvolnění β -kateninu, jeho translokace do jádra a transkripce regulátorů buněčného cyklu. Další možnou alterací tumor supresorových genů je mutace genu *PTEN*, která má za následek inaktivaci PTEN fosfatázy (phosphatase and tensin homolog). Tato fosfatáza defosforyluje PIP3 (3,4,5-fosfatidylinositoltrifosfát) na signálně neaktivní PIP2 (4,5-fosfatidylinositoldifosfát), přičemž PIP3 je podmínkou pro aktivaci kinázové kaskády PKB/AKT. V důsledku inaktivace PTEN fosfatázy je prodloužen biologický poločas PIP3, který aktivuje kinázovou kaskádu AKT nezávisle na přítomnosti stimulačních signálů nadřazených PIP3 (Staněk *et al.*, 2023).

Kromě poruch buněčného cyklu je také kritická porucha apoptózy, která umožňuje růst maligních buněk v rámci primárního ložiska při iniciální klonální expanzi transformovaných buněk. Růst maligních buněk může být také způsoben poruchou v iniciaci mechanismů apoptózy (Staněk *et al.*, 2023).

Iničiační fáze apoptózy a samotné navození procesu probíhá dvojí cestou – intrinsické (vnitřní) a extrinsické (vnější) navození buněčné smrti. Poruchy apoptózy týkající se iniciace extrinsickou cestou (sestavení DISC komplexu – death-inducing signalling complex) eliminují u imunokompetentních buněk jejich regulační vliv. U intrinsické cesty aktivace programované buněčné smrti je charakteristický vznik apoptosomu.

Intrinsická cesta umožňuje jednak existenci nádorové buňky a její dělení i přes poškození DNA, ale také poruchy v šíření signálu apoptózy kaskádou kaspáz (Staněk *et al.*, 2023).

Komplex DISC vzniká na základě trimerizace death receptorů (DR), které jsou exprimovány na povrchu téměř všech buněk, výjimkou jsou buňky imunologicky privilegovaných tkání. Tyto receptory jsou stimulovány death ligandy (DL), což jsou signální ligandy membránově vázané na povrchu imunokompetentních buněk. V nádorových buňkách je interakce receptorů a ligandů inhibována sníženou expresí death receptorů na úrovni genové exprese. Příkladem je inaktivace transkripčních faktorů inhibicí, mutací, ubikvitinylací p53 nebo inhibiční fosforylací transkripčních faktorů FOXO skupiny, které transaktivují promotor pro Apo1, CD95 a FasR (Staněk *et al.*, 2023).

Další možností je inhibice death ligandy, které se váží na decoy receptory. Jedná se o death receptory postrádající intracytoplazmatickou část, která obsahuje doménu smrti – death domain (DD). Tato doména umožňuje vznik aktivního DISC komplexu na základě asociace adaptorových molekul. Převážná část aktivních komplexů death receptorů má za následek vznik proměnlivých signálních komplexů závislých na výskytu adaptorových molekul v buňce. Změny v genové expresi adaptorových proteinů mohou kriticky ovlivnit indukci apoptózy. Například navázáním FADD proteinu (Fas-associated protein with death domain), který obsahuje DD a také death effector doménu (DED), je umožněno dokončení aktivace DISC komplexu navázáním prokaspázy 8 a dále její aktivaci na kaspázu 8. Aktivovaný DR trimer s adaptory TRAF (TNF-receptor-associated factors) iniciuje přes několik kináz „signální přesmyk“, který např. aktivuje transkripční faktory NFκB s výraznými antiapoptickými účinky. Aktivací APAF1 a navázáním prokaspázy 9 vzniká apoptosom v intrinsické části apoptózy, který je ovlivněný translokací cytochromu C z mitochondriálního intermembránového prostoru do cytoplazmy. Tento děj reguluje hlavní skupina bílkovin, kterou je rodina Bcl-2 proteinů. Ta obsahuje proapoptotické proteiny (Bax) i antiapoptotické proteiny (Bcl-2), které asociují s vnější mitochondriální membránou. Poměrem proapoptotických a antiapoptotických proteinů je citlivě regulována schopnost indukce intrinsické části apoptózy. Iniciací intrinsické části apoptózy může být znemožněna hyperexpresí antiapoptotických členů, což způsobuje např. amplifikace jejich genů. Dále snížením exprese proapoptotických zástupců rodiny Bcl-2, která je např. indukovaná poruchou genové exprese způsobenou inhibicí transkripčních faktorů regulujících jejich genovou

expresi. Typická je mutace v genu *p53*, který kóduje protein p53 způsobující transaktivaci exprese genů *Bax*, *PUMA* (p53-upregulated modulator of apoptosis; BBC3) a *NOXA*. Tyto geny kódují proapoptotické proteiny (Staněk *et al.*, 2023).

Dalším mechanismem způsobujícím inhibici apoptózy je porucha v aktivaci kaspáz. V nádorových buňkách je v extrinsické cestě inhibice aktivace proximální kaspázy 8 (FLICE) způsobena zvýšením exprese proteinu CFLAR (caspase-8 and FADD-like apoptosis regulator), který postrádá proteolytickou aktivitu. Mezi proteinem CFLAR a molekulou prokaspázy 8 dochází ke kompetici o vstup do DISC komplexu, čímž protein znemožňuje aktivaci prokaspázy. V řadě nádorových buněk dochází k inhibici aktivity exekutivních kaspáz vlivem proteinů patřících do skupiny IAP (inhibitors of apoptosis), které jsou zvýšeně exprimované (Staněk *et al.*, 2023).

Poslední dobou se ukazuje, že mezi klíčové patří také poruchy reparačních mechanismů DNA. Za fyziologických podmínek jsou reparační mechanismy DNA plně aktivní a znemožňují tak kumulaci a toleranci genových inzultů. V nádorových buňkách dochází důsledkem poruch reparačních mechanismů DNA k alteraci genů, které regulují buněčný cyklus a apoptózu. Za fyziologických podmínek tedy reparační mechanismy DNA vytváří ochrannou bariéru, která brání vzniku maligních transformovaných buněk. Procesy reparace úzce souvisí s regulací buněčného cyklu i apoptózy, protože za fyziologických podmínek do buněčného cyklu mohou vstupovat jen buňky, které mají intaktní genomovou DNA. Projít buněčným cyklem a postoupit do finální fáze buněčného cyklu může pouze buňka, ve které proběhla korektně a přesně replikace genomové DNA. Následně probíhá vlastní mitóza a finální cytokineze pouze u buněk, u kterých došlo k symetrické segregaci duplikovaného genetického materiálu. Pokud nejsou splněny tyto podmínky, tak je buněčný cyklus zastaven a je umožněna reparace genomové DNA. V případě selhání reparace dochází k iniciaci mechanismů apoptózy (Staněk *et al.*, 2023).

Regulace buněčného cyklu, reparace DNA a apoptóza jsou na molekulární úrovni reprezentovány regulačními proteiny ovlivňujícími signalizaci všech zmíněných signálních cest. Příkladem je proteinkináza ATM (ataxia-telangiectasia mutated), která je aktivovaná dvouřetězcovými zlomy v DNA. Proteinkinázou ATM dochází k iniciaci aktivace oprav DNA (např. fosforylace proteinu BRCA1), ale také fosforyluje protein p53, čímž tento transkripční faktor aktivuje. Na základě aktivovaného transkripčního faktoru dochází k rychlému zvýšení exprese $p21^{waf1/cip1}$, který je inhibitorem buněčného

cyklu. Dále je aktivovaný transkripční faktor zodpovědný za apoptózu stimulujících zástupců rodiny Bcl-2 (Staněk *et al.*, 2023).

V nádorových buňkách může docházet k poruchám všech DNA reparačních systémů. Poruchy opravných mechanismů na úrovni bází (BER a NER systémy) mají za následek vznik mikromutací missense nebo nonsense. Dále mohou vznikat alterace při opravách dvouřetězcových zlomů DNA, a to méně přesnou reparací mechanismem NHEJ (non-homologous end joining) nebo vysoce účinným procesem homologní rekombinace. Inaktivace těchto mechanismů způsobuje chromosomální translokace, ztráty či amplifikace genetického materiálu. V nádorových buňkách pak nastává fyzická likvidace alel tumor supresorových genů a amplifikace úseků chromosomů, které kódují onkogeny. Tyto poruchy patří mezi nejčastější projevy iniciálních stádií kancerogeneze. U sporadických nádorových onemocnění (tzv. nehereditárních) dochází somatickými mutacemi k inaktivaci řady genů, které kódují proteiny účastníci se reparačních procesů. Může se jednat o bodové mutace, ale i rozsáhlé delece, které postihují celé geny. Dalším možným způsobem inaktivace je hypermetylace promotorů příslušných genů (Staněk *et al.*, 2023).

Na karcinogenezi mají zásadní vliv také epigenetické modifikace. Jako epigenetické se označují dědičné změny, které hrají roli v expresi genů, ale nemění sekvenci DNA. Jedná se především o metylace DNA a acetylace histonů. Methylace je negenotoxický mechanismus karcinogeneze, který způsobuje epigenetické změny a ovlivňuje tím expresi normálních genů. Schopnost epigenetické modifikace svého genomu mají buňky díky kovalentnímu navázání metylové skupiny na 5. pozici cytosinového kruhu v dinukleotidu CpG, čehož se účastní enzym metyltransferáza. V savčím genomu je asi 70 % CpG oblastí metylováno. Rozmístění CpG je nerovnoměrné a převážná část genomu je na CpG chudá. Vyskytují se nahromaděné v hojně se vyskytujících repetitivních sekvencích v oblastech satelitů, centromer nebo v ostrůvcích zvaných „CpG islands“. Ostrůvky se nachází zejména poblíž místa počátku transkripce v promotorové oblasti genů. Obvykle jsou tato místa nemetylovaná, tím pádem za normální situace probíhá transkripce genů za účasti příslušných transkripčních faktorů (Staněk *et al.*, 2023).

Genomické sekvence repetitivního charakteru rozptýlené ve zbytku genomu jsou silně metylovány a jsou součástí vývoje nekódujících DNA oblastí. Methylace cytosinových zbytků souvisí s několika procesy: navázání specifických proteinů (tj. methyl-binding domain proteins), aktivace histon deacetyláz, aktivace histon metyltransferáz, modifikace

histonů, kondenzace chromatinu a transkripční inaktivace příslušného genu. Zárodečná a tkáňově specifická genová exprese je epigeneticky kontrolována na základě metylace CpG ostrůvků souhrou metylačních a demetylačních enzymů. Metylací DNA může také docházet ke zvýšení mutací a může dědičně tlumit geny, u kterých jsou promotory asociovány s CpG ostrůvkem a které zodpovídají za kontrolu buněčné proliferace. U normálních buněk je zabráněno *de novo* metylaci takových promotorů prozatím neznámými mechanismy. Genom je tedy celkově spíše hypometylován, ale hypometylace je doprovázena specifickou hypermetylací, která je místně specifická a jejími cílovými místy jsou CpG ostrůvky. Hypermetylované promotory tumor supresorových genů v ostrůvcích CpG jsou utlumeny, a tím získávají tyto buňky růstovou výhodu. Metylace DNA má vliv také na mutagenezi a může ji usnadnit. Důvodem je, že 5-methylcytosin je schopen spontánní deaminace na thymin (Staněk *et al.*, 2023).

V genomu je hypometylovaná DNA spojena s vyšší genovou expresí. Regulace genové exprese je také ovlivněna strukturou chromatinu, která je dána histony. Jedná se o typ proteinů fungujících jako přechodný mezistupeň mezi genotypem a fenotypem. Jejich funkce ovlivňující strukturu chromatinu a genovou aktivitu je velmi dynamická. Mohou podléhat modifikacím jako je: acetylace, metylace, fosforylace a ubiquitinace. Konce histonů podléhají také specifické modifikaci enzymy histontransferázami a tato modifikace se přímo pojí s aktivní či tlumenou transkripcí. Chromatin nacházející se v kompaktní struktuře je pro transkripci represivní. Existuje řada látek, které inhibují histonové deacetylázy (HDAC), čímž může vznikat otevřená struktura chromatinu. Takto je umožněna aktivace určitých genů inhibujících růst nádoru, čehož je možné využívat v terapii (např. butyrát či trichostatin). Histony se účastní tvorby a udržení tzv. „epigenetické paměti“ (Staněk *et al.*, 2023).

Řada závažných syndromů u dědičných nádorů je způsobena relativně vzácně se vyskytujícími hereditárními mutacemi. Tvoří obvykle méně než 5–10 % nádorů a jedná se např. o geny *ATM*, *BRCA 1*, *BRCA 2*, *MRE11*, *MSH/MLH*. Riziko maligní transformace je výrazně zvýšeno preexistujícími alteracemi obvykle jedné z alel genů. Na regulaci genové exprese signálních regulátorů, které ovlivňují mitotickou signalizaci, mají vliv také molekuly miRNA (mikroRNA). Ty působí jako onkogenní a tumor supresorové signály. Mutace miRNA nebo změny v jejich genové expresi mají pravděpodobně podíl na patogenezi mnoha nádorových onemocnění. Bylo prokázáno, že mají vliv na udržování proliferativní signalizace, vyhýbání se růstovým supresorům,

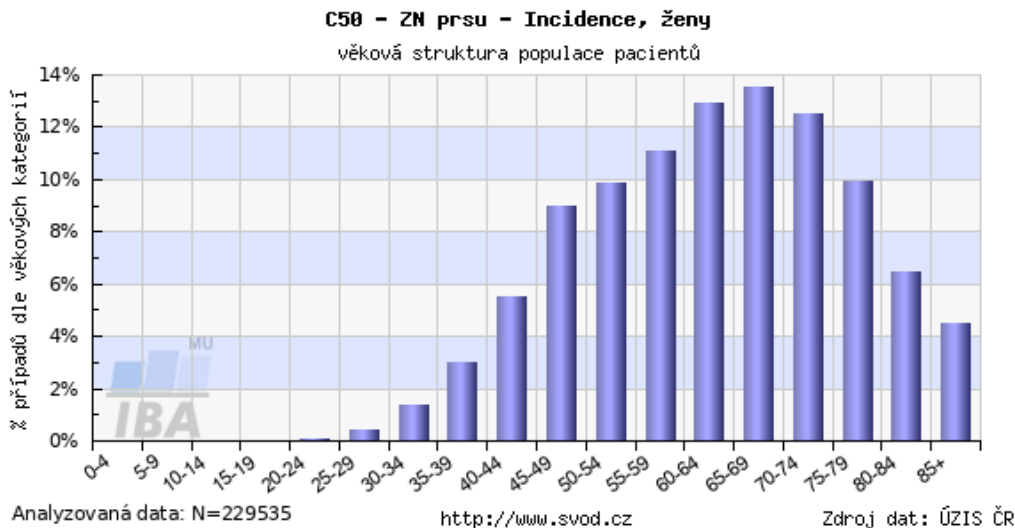
vyhýbání se buněčné smrti, aktivaci invaze a metastáze a indukci angiogeneze (Peng a Croce, 2016). Mimo mutace mohou mít na negativní regulátory mitotické stimulace vliv i epigenetické změny na úrovni hypermetylace (Staněk *et al.*, 2023).

3.2 Karcinom prsu

3.2.1 Epidemiologie a etiologie karcinomu prsu

Zejména v raných stádiích je léčba rakoviny prsu velmi úspěšná, ale i tak je karcinom prsu nejčastěji diagnostikovaným nádorovým onemocněním u žen a celosvětově také primární onkologickou příčinou úmrtí na rakovinu u žen. V České republice se jedná o nejčastější zhoubné nádorové onemocnění u žen. Ve většině případů je rakovina prsu diagnostikována ve věku 60–65 let, ale postihuje často také ženy v produktivním věku do 60 let, u kterých je výskyt až 43 % (Staněk *et al.*, 2020). Na Obrázku 1 lze vidět srovnání incidence karcinomu prsu v jednotlivých věkových skupinách.

Obrázek 1: Incidence karcinomu prsu na základě věku (převzato z: <https://www.svod.cz>)



Diagnostikována může být jako sporadické či dědičně podmíněné onemocnění. U převážné většiny pacientek s karcinomem prsu se vyskytuje sporadická forma onemocnění, která vzniká v buňkách prsní žlázy nahromaděním somatických mutací. Deregulace signálně-transdukčních cest je kritická a způsobuje nádorovou transformaci mamárních epitelů. K deregulaci dochází aktivací protoonkogenů a inaktivací tumor

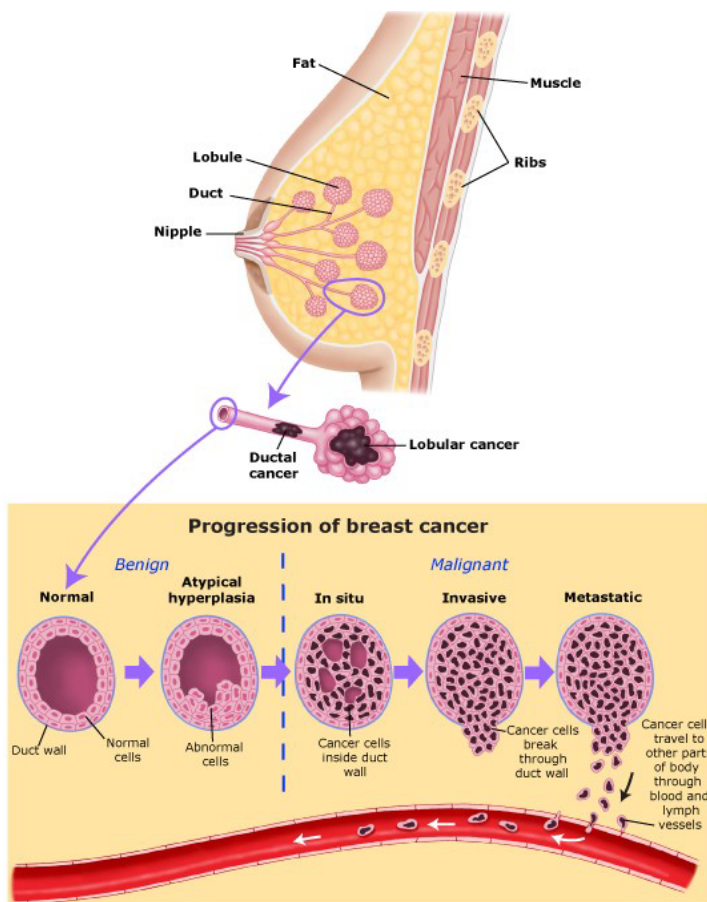
supresorových genů, k čemuž dochází genetickými poruchami, které doprovází epigenetické změny. Může docházet k deregulaci buněčného dělení, reparačních mechanismu DNA i apoptózy. Tyto selhání mají za následek vznik maligně transformovaných buněk *in situ*, které mohou vytvářet geneticky nestabilní dceřiné buňky tolerující defekty genomu. Genomové defekty mohou dále postihovat další regulační mechanismy. Vše probíhá z důvodu genomové nestability, která je způsobena poruchami reparačních mechanismů DNA (Staněk *et al.*, 2018).

Dědičně podmíněná forma karcinomu prsu se vyskytuje v 15–20 % prsních tumorů. Jedná se o familiární nádory tvořící se u žen, které mají pozitivní rodinnou anamnézu, ale není zřejmá genetická mutace a hereditární nádory, které se nacházejí u 5–10 % nemocných pacientek. U tohoto typu nádorů jsou v predispozičních genech přítomny patogenní mutace. Tyto predispoziční geny kódují proteiny, které se účastní tkáňově specifického procesu nádorové suprese. Patogenní alterace predispozičních genů značně zvyšují riziko vzniku rakoviny prsu, jedná se například o mutaci v genech *BRCA1* nebo *BRCA2*. Mezi rizikové geny pro vznik karcinomu prsu méně často se vyskytující patří například *ATM*, *CASP-8*, *NBS1 (NBN)*, *CHEK2*, *TP53*, *PTEN*, *PALB2*, *TGFβ1*, *LKB1/STK11* a další. Jedná se o pestrou skupinu genů s nízkou a střední penetrancí. Geny účastnící se vzniku hereditárních nádorů karcinomu prsu jsou nápadně spojeny s pochody, které přímo zprostředkovávají nebo regulují kontrolní body buněčného cyklu (checkpoints) a reparaci genomové DNA. Modifikace rizika vzniku karcinomu prsu i dalších nádorů predispozičními geny není rovnoměrná. Patogenní alterace u některých vysoce penetrantních genů jsou spojené s vysokým rizikem vzniku karcinomu prsu, příkladem jsou geny *BRCA 1* a *BRCA 2*. Některé predispoziční geny zvyšují riziko středně nebo málo a je možné předpokládat, že některé varianty dokonce snižují riziko vzniku nádoru (Staněk *et al.*, 2018).

Z histologického hlediska mohou karcinomu prsu předcházet premaligní změny. Mezi prekancerózy se řadí duktální hyperplazie, atypická duktální hyperplazie a lobulární hyperplazie (Prausová, 2010). Hyperplazie se vyvíjí nejdříve v neinvazivní karcinomy „*in situ*“, které mohou přerůst v invazivní karcinomy (Staněk *et al.*, 2020). Z hyperplazií se tedy nejprve vyvíjí neinvazivní karcinomy, které mohou přerůst v invazivní karcinomy. Neinvazivní karcinomy vyrůstají z maligně transformovaných epitelových buněk vývodů, v tomto případě se jedná o duktální karcinom *in situ* (DCIS). Druhou možností je lobulární karcinom *in situ* (LCIS), který vyrůstá z epitelových buněk lalůček.

Invazivní karcinomy prsu lze rozdělit na duktální (84 %) a lobulární (15 %). Další formou je karcinom erysipeloidní (inflamatorní). Tato forma je velmi agresivní a obvykle jde o málo diferencovaný duktální karcinom, který infiltruje celý prs i lymfatické cévy kůže (Prausová, 2010).

Obrázek 2: Histologická klasifikace karcinomu prsu včetně prekancerózních změn (převzato z: <https://www.saintjohnscancer.org>)

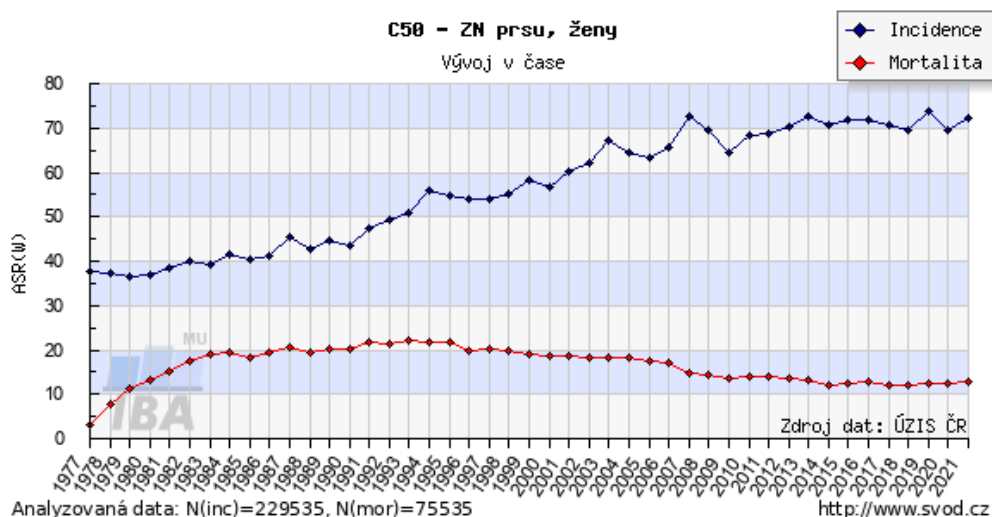


U nádoru je kromě histologického typu nutné posoudit i stupeň diference, tzv. grade. Nejpomaleji rostoucí a nejméně agresivní jsou dobře diferencované nádory (grade 1). Málo diferencované (dediferencované) nádory (grade 3) jsou charakteristické rychlým růstem a mají tendenci šířit se do okolí a metastazovat. Při diagnóze je možné zjistit uzlinové metastázy u značného procenta pacientů s negativním palpačním nálezem v axile. Už u subklinického nádoru může nastat hematogenní šíření do kostí, kůže, pleury, plic, jater a mozku. Tzv. paralelní model metastazování je charakteristický pro karcinom prsu, kdy jsou metastázy založeny již v čase subklinické diagnózy primárního tumoru

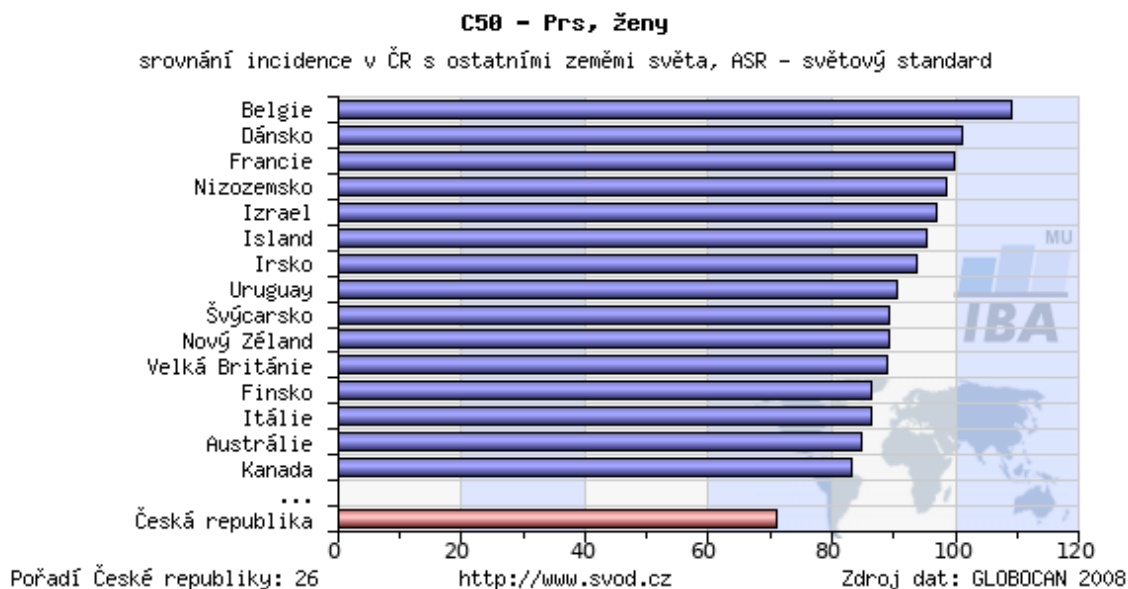
(Staněk *et al.*, 2018). U molekulárního pohledu na karcinom prsu došlo za poslední desetiletí k výrazným změnám. Byly charakterizovány základní typy karcinomu prsu („intrinsic“) podle profilů genové exprese. Karcinomy prsu se dělí na 5 typů: luminální A, luminální B, basal like, HER-2 pozitivní a normal like, což je normální tkáň prsu podobný typ (Llombart-Cussac *et al.*, 2017). Toto taxonomické značení se již standardně používá ve výzkumu rakoviny prsu. Na základě nově zjištěných poznatků bylo prokázáno, že karcinom prsu s pozitivními ER (estrogenový receptor) a negativními ER jsou zcela rozdílná onemocnění s různými prekuzory, cestami diseminace, klinickým chováním a také odpovědí na léčbu. U invazivního karcinomu prsu pozitivního na ER s nízkým gradem bude zcela odlišný genetický profil než u karcinomu prsu ER negativního s vysokým gradem. S gradingem nádoru souvisí stupeň genetické nestability nádoru. U dosud nejrepresentativnějšího souboru karcinomu prsu byl v roce 2012 popsán úplný genový profil. Zajímavostí je, že u luminálních karcinomů prsu ER pozitivních bylo nalezeno nejširší spektrum genových mutací (Staněk *et al.*, 2018).

Včasná diagnostika je u tohoto onemocnění zcela zásadní a důležité je také vyšetření nádoru pro identifikaci a výběr pacientek vhodných pro cílenou léčbu. Mezi rutinní metody již patří detekce proteinu HER-2 imunohistochemií (IHC) a amplifikace genů fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH) (Mrozkowiak *et al.*, 2004). Na obrázku 3 lze vidět, že mortalita u karcinomu prsu klesá díky léčbě a screeningu i přes to, že incidence stoupá. Ve srovnání se zahraničím je v České republice nižší incidence díky dobře propracovanému screeningu, viz obrázek 4.

Obrázek 3: Incidence a mortalita u rakoviny prsu (převzato z: <https://www.svod.cz>)



Obrázek 4: Srovnání incidence karcinomu prsu v České republice a zahraničí (převzato z: <https://www.svod.cz>)



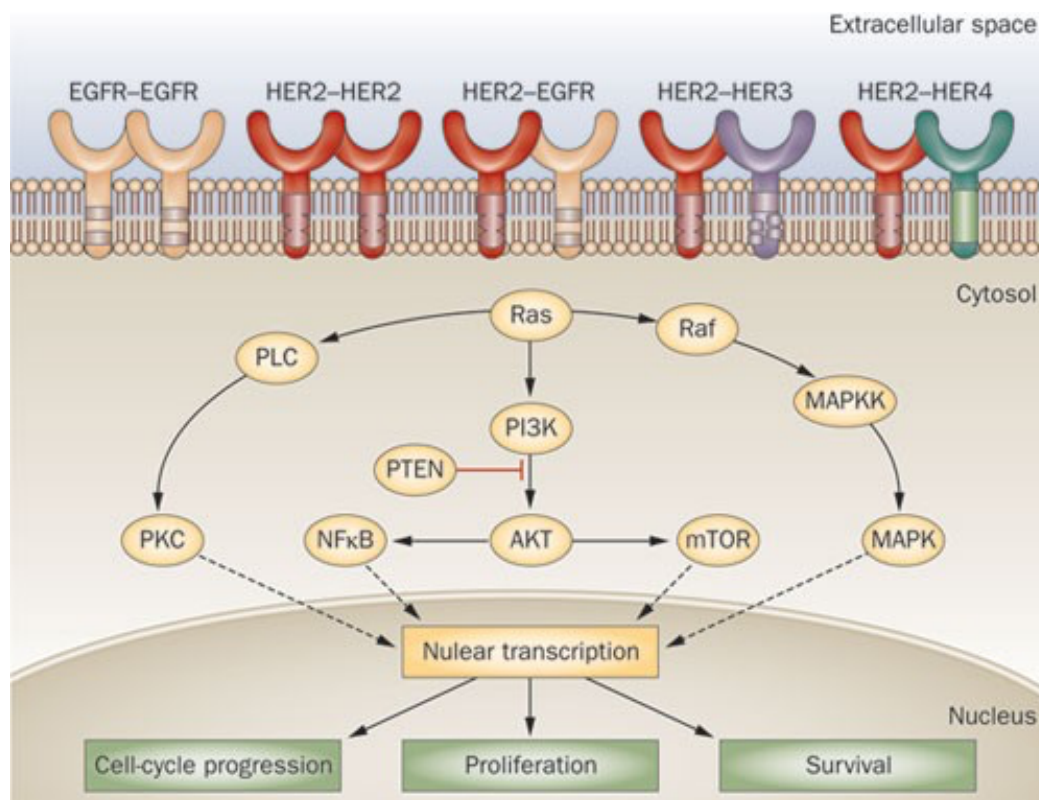
3.2.2 Biologické a buněčné aspekty rodiny HER

Vývoj v molekulární biologii vedl k identifikaci potenciálních prognostických a terapeutických markerů u karcinomu prsu. Zásadní význam v případě karcinomu prsu mají HER receptory (Staněk *et al.*, 2020).

Receptory rodiny HER (také zvané ErbB či receptory pro epidermální růstový faktor – EGFR) jsou transmembránové glykoproteiny, které obsahují extracelulární ligandovou vazebnou doménu, transmembránovou a intracelulární doménu s tyrosinkinázovou aktivitou. Jedná se o čtyři homologické receptory – HER-1 (zvaný i EGFR a ErbB1), HER-2 (také známý jako ErbB2), HER-3 (známý i jako ErbB3) a HER-4 (zvaný i ErbB4). Signalizace receptorů probíhá jejich heterodimerizací a homodimerizací, čímž podporují motilitu, proliferaci buněk, invazi buněk a inhibici apoptózy. EGFR receptory aktivují signální dráhy zprostředkované PI3 kinázou, PLC γ , JNK a Ras-Raf-MAPK (Masuda *et al.*, 2012). Tyto dráhy jsou navzájem propojené, čímž aktivace EGFR receptorů stimuluje celou signální síť. Aktivace těchto receptorů má vliv na esenciální tumorogenní procesy a má zásadní význam v patogenezi rakoviny prsu (Staněk *et al.*, 2020).

U rakoviny prsu je často přítomna dysregulovaná exprese HER receptorů a jejich zvýšená aktivita. Se špatnou prognózou je spjata nadměrná exprese HER-1, HER-2 a HER-3 receptorů, zatímco zvýšená exprese HER-4 je spojena s vyšší úspěšností léčby (Nuciforo *et al.*, 2015). V případě cílené terapie již představuje testování HER-2 základní algoritmus. Současné studie mají za cíl zjistit prognostický význam a frekvenci nadměrné exprese i u dalších receptorů HER rodiny, především receptoru HER-3 a HER-4 u invazivních karcinomů prsu (Staněk *et al.*, 2020).

Obrázek 5: Receptor HER-2 a jeho možné dimerizace a ovlivnění buněčných dějů (převzato z: Fornaro *et al.*, 2011)



Pozitivita HER-2 receptoru představovala u rakoviny prsu zpočátku nepříznivý prognostický faktor. Díky moderní léčbě monoklonálními protilátkami se pohled na HER-2 pozitivitu změnil. Terapeutickým cílem je z molekulárního hlediska heterodimerizace receptorů HER-2 a HER-3, protože dimerizace HER-2 s dalšími receptory rodiny HER je největším hnacím mechanismem růstu a přežití nádorových buněk (Staněk *et al.*, 2020). Poslední dobou je pozornost zaměřena na receptor HER-3

(Campbell *et al.*, 2022). Předpokládá se, že v buňkách karcinomu prsu s amplifikací genu *Her-2/neu* dochází ke spontánní homodimerizaci a aktivaci receptoru pro lidský epidermální růstový faktor HER-2. Další potenciální mechanismus fosforylace HER-2 je transaktivace receptoru HER-3, kdy může dojít k fosforylaci HER-3 pomocí HER-2. Takto fosforylovaný HER-3 je schopný napojit se na dráhu fosfatidylinositol-3-OH kinázy (PI3K)/Akt přímo, kdežto HER-2 nikoliv. HER-2/HER-3 heterodimery tak tvoří nejvíce mitogenní a transformující komplex ze všech transmembránových receptorových tyrosinkináz rodiny HER. Významným mezníkem se stalo přidání monoklonální protilátky pertuzumabu ke standardní terapii založené na léčbě trastuzumabem a docetaxelem. Pertuzumab a trastuzumab se váží na stejný cíl, ale pertuzumab se váže na jiném vazebném místě, čímž inhibuje heterodimerizaci HER-2 a HER-3 receptorů. Kombinovaný přístup zlepšuje blokádu signální dráhy HER-2 (Stanek *et al.*, 2022).

Receptor pro lidský epidermální růstový faktor 3 (HER-3) neboli receptorová tyrosin-protein kináza erbB-3 je membránově vázaný protein. Kóduje ho gen *ErbB3*, který je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 12 (12q13). Kódován je 23 651 páry bází, které se překládají do 1 342 aminokyselin. Extracelulární doména HER-3 je rozdělena na čtyři subdomény (I–IV) (Mishra *et al.*, 2018).

Dvě subdomény (I a III), které jsou bohaté na leucin, určují specifickou vazbu ligandu a podílí se na jeho vazbě (Mishra *et al.*, 2018). Subdomény II a IV jsou bohaté na cystein (Diwanji *et al.*, 2019) a pravděpodobně se podílí na konformaci a stabilitě proteinů vytvářením disulfidových vazeb. Subdoména II zahrnuje také dimerizační smyčku, která je potřebná pro tvorbu dimeru (Staněk *et al.*, 2020). Ligandy ErbB3 jsou hereguliny a neureguliny. Jejich vazbou dochází ke změně konformace, která vede k dimerizaci receptorů, aktivaci tyrosinkináz a c-koncové fosforylaci. Za účasti adaptorových proteinů dochází k aktivaci downstream drah (PI3K/AKT, MAPK a JAK/STAT), které vedou k progresi nádoru (Mishra *et al.*, 2018).

HER-3 receptor může heterodimerizovat s jiným ze tří členů HER rodiny. Dimer ErbB2-ErbB3 je považován za neaktivnější z možných dimerů HER receptorů. Je to zčásti kvůli tomu, že je ErbB2 preferovaným dimerizačním partnerem všech ErbB členů a ErbB3 je preferovaným členem pro ErbB2 (Way a Lin, 2005).

3.2.2.1 Význam exprese HER-3 a dalších členů této rodiny u invazivního karcinomu prsu

Ze všech receptorů rodiny HER je nejvíce informací zjištěno o EGFR a HER-2, zatímco o významu receptorů HER-3 a HER-4 a jejich změn stále informace chybí. Růst a progresse karcinomu prsu mohou být zásadně ovlivněny dimerizací HER2 a HER3 receptorů (Weitsman *et al.*, 2016). HER-3 může navíc zajistit rezistenci proti terapeutikám (Kumar *et al.*, 2020), které jsou cílené na receptor EGFR či HER-2. U řady studií bylo prokázáno, že u pacientek s rakovinou prsu je s nadměrnou expresí HER-3 spojena špatná prognóza, ale jiné studie prokázaly, že tato nadměrná exprese může znamenat i pozitivní prognózu (Staněk *et al.*, 2022).

Studie zabývající se HER-4 receptorem naznačují, že jeho signalizace podporuje diferenciaci a také inhibuje růst rakovinných buněk u karcinomu prsu (Koutras *et al.*, 2010). Dále je u receptoru HER-4 důsledněji prokázáno, že je spojen s příznivou prognózou. Intracelulární doména HER-4 zprostředkovává řadu biologických aktivit. Mimo to může být ztráta exprese receptoru HER-4 markerem rezistence vůči tamoxifenu (Naresh *et al.*, 2008). Proliferace buněk a růst nádoru může záviset na trans-signalizaci receptoru, protože receptory HER rodiny jsou na sobě funkčně závislé. Vysvětlením toho, jak se tyto signalizační cesty zapojují při karcinogenezi u karcinomu prsu a v jakém rozsahu, by mohlo vést k dalším možnostem terapie (Göthlin Eremo *et al.*, 2015).

U různých druhů karcinomů je molekulárním cílem doména ErbB3 / HER-3. Nadměrná exprese receptoru HER-3 a jeho aktivace je přítomna v různých typech karcinomů, a to za podmínek získání rezistence proti léčebným intervencím HER rodiny (např. inhibitory tyrozinkináz, protilátková terapie). Exprese a signalizace HER-3 je regulována mnoha proteiny, které s HER-3 interagují. Příkladem jsou SHC, PI3K, NEDD4, E3 ubikvitin ligázy a Nrdp1 (Mujoo *et al.*, 2014). Kromě toho byla nedávno identifikována řada onkogenních mutací receptoru HER-3 u karcinomu žaludku a karcinomu tlustého střeva, čímž se objasňuje úloha HER-3 ve vývoji onemocnění. I přes silné důkazy o roli HER-3 u karcinomu je potřeba k pochopení regulace exprese a aktivace receptoru HER-3 další výzkum (Stanek *et al.*, 2022).

3.2.3 PD-1/PD-L1 dráha u karcinomu prsu

Receptor programované buněčné smrti (PD-1) je inhibítozem kontrolního bodu imunitního systému (Tang *et al.*, 2022) a je inhibítozem adaptivní i vrozené imunitní odpovědi. Exprimován je na aktivovaných T-lymfocytech, NK buňkách (natural killer), B-lymfocytech, makrofázích, dendritických buňkách a monocytech (Zatloukalová *et al.*, 2016). Vysoce exprimován je na nádorově specifických T buňkách. PD-1 může být prospěšný i škodlivý. Jeho příznivým účinkem je důležitá role při snižování regulace neúčinných nebo škodlivých imunitních odpovědí a také udržuje imunitní toleranci. Na druhou stranu způsobuje dilataci maligních buněk narušením ochranné imunitní odpovědi (Han *et al.*, 2020).

PD-L1 je ligand pro PD-1, který je exprimován makrofágy, některými aktivovanými T-lymfocyty a B-lymfocyty, dendritickými buňkami a některými epiteliálními buňkami, především při zánětlivých stavech. PD-L1 je také exprimován nádorovými buňkami, kde vytváří „adaptivní imunitní mechanismus“, který je schopen unikat protinádorovým reakcím (Munari *et al.*, 2021). V rakovinných buňkách působí PD-L1 jako tumorigenní faktor na základě vazby na své receptory, čímž dochází k aktivaci proliferačních signálních drah a signálních drah umožňujících přežití nádorových buněk. PD-L1 se tak podílí na progresi nádoru.

PD-1 receptor je aktivován ligandy PD-L1, případně PD-L2 (Ghiotto *et al.*, 2010). U solidních nádorů dochází k umlčení imunitního systému zvýšením exprese PD-L1 na povrch nádorových buněk.

Triple negativní karcinom prsu i HER-2 negativní karcinom prsu reagují na terapii blokádou imunitního kontrolního bodu na základě své vysoké imunogenicity. Exprese PD-L1 je u karcinomu prsu heterogenní a obecně je spjatá s výskytem lymfocytů infiltrujících nádor. Dále je spojena se špatnou prognózou. Příkladem je nízký věk pacientek, negativita hormonálních receptorů nebo naopak vysoký proliferační index či vysoká exprese HER-2 (Monneur *et al.*, 2018). Pro vývoj blokády imunitního kontrolního bodu a k dosažení optimálních klinických výsledků je důležitá identifikace vhodných biomarkerů a také kombinace terapií protilátkami proti PD-1/PD-L1 (Bu *et al.*, 2017). U řady nádorových onemocnění se již využívají inhibitory ovlivňující interakci PD-1 a PD-L1, díky čemuž je dosaženo zlepšení výsledků léčby a prognózy pacientů. Cílem inhibitorů kontrolních imunitních bodů (např. anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti-PD-L1) je blokování negativních drah a zvýšení aktivace T buněk (Kossai *et al.*, 2021).

3.2.4 Triple-negativní karcinom prsu (TNBC)

Karcinomy prsu, které jsou na základě imunohistochemie charakterizovány nízkou expresí estrogenového receptoru (ER), progesteronového receptoru (PR) a nízkou expresí receptoru lidského epidermálního růstového faktoru 2 (HER-2), jsou klasifikovány jako triple-negativní karcinom prsu (TNBC) (Medina *et al.*, 2020). Nízká exprese HER-2 receptoru lze také definovat nízkou amplifikací genu *HER-2/neu* metodou FISH. Triple-negativní karcinom prsu představuje přibližně 15–20 % všech karcinomů prsů a patří mezi nejnáročnější podtyp rakoviny prsu co se léčby týče (Zhou *et al.*, 2021). TNBC má vysoce agresivní klinický průběh ve srovnání s karcinomem prsu pozitivním na hormonální receptory (ER, PR) nebo HER-2 receptor. Dále je spojen s dřívějším věkem nástupu a větším metastatickým potenciálem (Diana *et al.*, 2020). Klinické výsledky jsou oproti jiným typům karcinomu prsu horší, což naznačuje i vyšší míra relapsu a nižší míra přežití (Garrido-Castro *et al.*, 2019). Vzhledem k tomu, že TNBC nádory postrádají ER, PR a HER-2, nejsou citlivé na endokrinní léčbu a HER-2 léčbu (Yin *et al.*, 2020).

3.2.4.1 Exprese HER-3 u triple-negativního karcinomu prsu

Předpokládá se, že by exprese HER-3 mohla být využita jako prognostický marker u TNBC. Ve velké studii byly použity vzorky ze 100 případů, z toho 40 fibroadenomů a 60 invazivních duktálních karcinomů (IDC) více nespecifikovaných (Hammoda *et al.*, 2017). U všech pacientek byla provedena modifikovaná radikální mastektomie. Proběhlo vyšetření vzorků metodou imunohistochemie (IHC), kdy byla zjišťována exprese HER-2, ER a PR. Dále byla kvantitativně stanovena exprese HER-3 mRNA pomocí metody PCR v reálném čase. U vzorků karcinomu byla prokázána výrazně vysoká hladina HER-3 mRNA ve srovnání s fibroadenomech. V případě maligních karcinomů měla hladina HER-3 mRNA významnou spojitost s pokročilým T stádiem, gradem, velikostí nádoru, počtem pozitivních lymfatických uzlin a případy s komponentou *in situ*. Kromě toho měla hladina HER-3 mRNA nejvyšší hodnoty ve skupině pozitivní na *HER-2/neu*, následované případy triple-negativního karcinomu prsu, kde byla nejnižší hladina v lumenální skupině ($p < 0,05$). V invazivních duktálních karcinomech, zejména v těch se špatnými prognostickými rysy, je HER-3 upregulován. Studie ukazuje, že na základě úrovně HER-3 mRNA je možné identifikovat skupinu pacientů se špatnou prognózou, u kterých by se dále mohla zhodnotit účinnost protinádorové léčby HER-3 (Stanek *et al.*, 2022).

Další studie se zabývala vyhodnocením prognostického významu exprese HER-3 u invazivních karcinomů prsu. Byly použity vzorky z 950 případů invazivního karcinomu prsu s dlouhodobými klinickými následnými daty (medián 109,7 měsíců). Na základě imunohistochemie byla charakterizována exprese ER, PR, EGFR, HER-2 a HER-3, čímž byl každý z případů klasifikován pomocí IHC do jednoho ze čtyř subtypů, které jsou založené na expresi hormonálních a HER2 receptorů. Skupina HER3 (+) v subtypu TNBC vykazovala oproti skupině HER3 (-) horší přežití (DFS, P = 0,010) a dále celkové přežití (OS, P = 0,015). Skupina HER3 (+) v podtypu HER2 vykazovala oproti skupině HER3 (-) taktéž horší přežití (DFS, P = 0,022) a celkové přežití (OS, P = 0,077). U pacientů s karcinomem prsu HR-pozitivním nebyl zaznamenán žádný rozdíl. U podtypů TNBC a HER2 byla exprese HER3 spojena se špatným DFS a u podtypu TNBC s kratším OS. Bylo tedy potvrzeno, že nadměrná exprese HER3 hraje důležitou roli prognostického markeru u karcinomu prsu s negativními hormonálními receptory. K objasnění možností léčby cílené na HER-3 je potřeba provést další studie (Bae *et al.*, 2013).

3.3 Imunoterapie karcinomu prsu

Léčba rakoviny prsu je komplexní a využívá veškerých dostupných modalit. Vývojem možností léčby se zlepšila prognóza u mnoha pacientek a jedním z největších pokroků v léčbě nádorových onemocnění se v poslední době stala imunoterapie.

I přes pokroky v léčbě onemocnění dochází u skupiny pacientek k relapsu a u části pacientek je již iniciálně diagnostikováno metastatické onemocnění. Dlouhodobě se k léčbě pokročilého karcinomu využívá chemoterapie a hormonální léčba. Mimo to je možností také cílená léčba (anti-HER-2 terapie, inhibitory cyklin-dependentních kináz), díky které došlo k prodloužení přežití bez známek progresu (PFS, progression-free survival) i celkového přežití (OS, overall survival). Terapií metastatického TNBC je stále standardně pouze chemoterapie a výsledky terapie nejsou uspokojivé. Předmětem zkoumání jsou další léčebné možnosti, které by mohly alespoň zčásti zvrátit tento nepříznivý stav (Gupta *et al.*, 2020). Jednou z možností je právě imunoterapie, která využívá checkpoint inhibitory (Holánek, 2019).

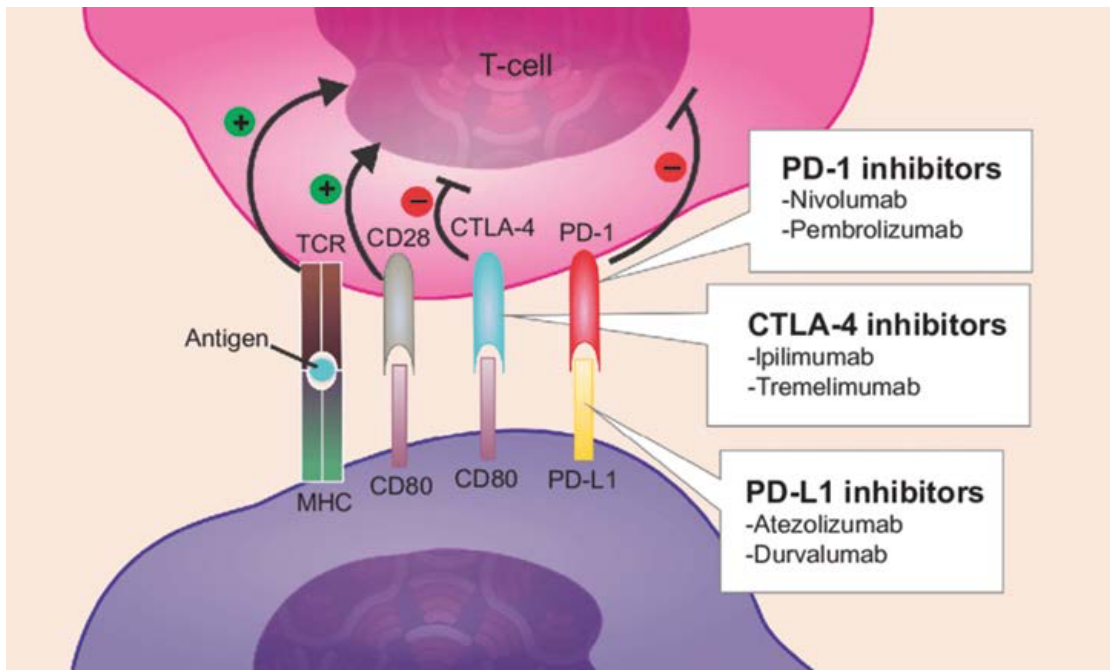
3.3.1 Nádorové onemocnění a imunitní systém

Komplexní mikroprostředí nádorového onemocnění tvoří kromě nádorových buněk mnoho dalších elementů. Mikroprostředí je tvořeno také buňkami imunitního systému, fibroblasty a krevními cévami (Denton *et al.*, 2018) (Baglolle *et al.*, 2006). Dříve byl karcinom prsu charakterizován jako méně imunogenní onemocnění, ve kterém imunitní systém hraje jen zanedbatelnou roli, avšak bylo zjištěno, že u některých karcinomů má imunitní systém zásadní význam. Příkladem je vzácný podtyp TNBC – medulární karcinom prsu, který má dobrou prognózu částečně díky vysoké lymfocytární infiltraci. Nejvyšší lymfocytární infiltrace je u karcinomu prsu HER-2 pozitivního a TNBC, menší u luminal-like tumorů. Tvoří ji z velké části T-lymfocyty a méně pak B-lymfocyty, NK buňky, makrofágy a dendritické buňky.

Míra nádorové infiltrace (TIL, tumor infiltrující lymfocyty) u HER-2 pozitivního a TNBC karcinomu prsu souvisí s mírou odpovědi na léčbu a s prognózou onemocnění. Imunitní odpověď na nádor se spustí pouze pokud je imunitní systém schopen rozeznat antigeny charakteristické pro nádorové onemocnění a reagovat na ně a pokud tyto antigeny nejsou součástí zdravých buněk. Míra imunitní odpovědi závisí na vztahu aktivátorů a inhibitorů mechanismů ovlivňujících aktivitu TIL. Buňky nádoru jsou schopny podporovat inhibici této odpovědi, což směřuje k progresi onemocnění.

Hlavními regulátory protinádorové odpovědi jsou CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4) a PD-1 (programmed cell death 1) (Zhang *et al.*, 2021). Regulační membránový protein PD-1 je exprimován řadou buněk imunitního systému i T-lymfocyty. K jeho aktivaci dochází ligandem (PD-L1, PD-L2) nacházejícím se na B-lymfocytech, dendritických buňkách a makrofázích. Aktivace PD-1 způsobuje utlumení lymfocytární reakce vedoucí k utlumení imunitní odpovědi. Zvýšená exprese PD-1 v případě nádorových buněk je jeden z nejčastějších mechanismů utlumení imunitní odpovědi. Ovlivnění interakce mezi PD-1 a ligandem PD-L1 prostřednictvím checkpoint inhibitorů vede k obnově protinádorové imunitní reakce pomocí T-lymfocytů. U karcinomů prsu je míra exprese PD-1 a PD-L1 odlišná. U nádorů SR negativních, HER-2 pozitivních a TNBC je charakteristická zvýšená exprese PD-1 / PD-L1. Dále je zvýšená exprese typická pro nádory vyššího gradu a pro nádory s vysokými hodnotami proliferačního antigenu Ki-67 (Holánek, 2019).

Obrázek 6: Mechanismus účinku checkpoint inhibitorů (převzato z de Mello *et al.*, 2016)



V současné době jsou dostupnými checkpoint inhibitory monoklonální protilátky anti-PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) i anti-PD-L1 (atezolizumab). Nejslibnější výsledky jsou dosahovány u HER-2 pozitivního karcinomu prsu a TNBC (Holánek, 2019).

4 MATERIÁL a METODY

4.1 Biologický materiál

Vzorky biopsií (fixované ve formolu a zalité do parafinu) pro veškerá vyšetření pocházejí z archivů Ústavu patologie, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady (FNKV). Jedná se o kohortu pacientek z Chirurgické kliniky FNKV. Celková kohorta zahrnovala 40 pacientek s karcinomem prsu. Všechny vzorky byly histologicky verifikovány na základě barvení hematoxylinem a eozinem.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie:

- DAPI/antifade (MetaSystems Probes, kat. č. D-0902-500-DA)
- destilovaná voda UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Thermo Fisher Scientific™, kat. č. 10977015)
- ethanol 96% (Penta, kat. č. 70390-11001)
- kyselina octová 99,8% (Penta, kat. č. 19990-11000)
- methanol (VWR, kat. č. APRSC019)
- Optimal Hypotonic Solution (Genial Helix, kat. č. GGS-JL005b)
- xylen (Penta, kat. č. 28430-11000)

Použité soupravy:

- králičí monoklonální protilátka – Anti-PD-L1 antibody (Clone 28-8, Dako)
- králičí monoklonální protilátka – Anti-HER-2 (Roche, clone 4B5, prediluted, Ventana anti-HER2/neu)
- králičí monoklonální protilátka – Anti-HER-3 (clone HER3/c-erbB-3RMab)
- ZytoLight® SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (Zytovision Pragostem, kat. č. Z-2015-200)
- ZytoLight® SPEC ERBB3/CEN 12 Dual Color Probe (Zytovision Pragostem, kat. č. Z-2056-200)

4.3 Laboratorní pomůcky

- automatické pipety v rozsahu 1–200 µl (Eppendorf)
- plastové špičky (Eppendorf)
- podložní sklo SuperFrost Plus (Thermo Fisher Scientific™)

4.4 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- barvicí přístroj BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems, Roche)
- centrifuga Universal 320 R (Hettich)
- fluorescenční mikroskop (Olympus)
- hybridizační pec (Cleaver Scientific Ltd)
- inkubátor ThermoBrite (Abbott Molecular)
- laminární box Clean Air (Schoeller)
- mikrotomu Leica SM 2010R (Baria)
- minicentrifuga Spectrafuge™ mini – centrifuge (Labnet)
- světelný mikroskop (Olympus)
- vodní lázeň Julabo TW8 (Schoeller)
- vortex IKA MS2 mini shaker (Gemini BV)

4.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.5.1 Zpracování tkáně

Všechny vzorky jsou okamžitě fixovány v 10% formalínu. Dále jsou vzorky rutinně zpracovány a zality do parafínu. Histologické hodnocení je provedeno na sklíčkách, kde jsou vzorky obarveny hematoxylinem a eozinem. K pozorování je použit mikroskop Olympus BX53.

4.5.2 Imunohistochemický průkaz (IHC) HER-2, HER-3

Tkáň je nakrájena na řezy o tloušťce cca 4–8 µm na mikrotomu Leica SM 2010R, řezy jsou na vodní hladině napnuty a nanášeny na podložní sklo SuperFrost, kde se nechají zaschnout. Následně je z řezů xylenem odstraněn parafín a řezy jsou zavodněny v alkoholové řadě.

Automatické barvení HER-2 a HER-3 je provedeno imunostainerem BenchMark Ultra podle pokynů výrobce s použitím ultraView Universal DAB Detection kitu a modřícího činidla jako vizualizačního činidla a chromogenu. Všechny materiály byly získány od společnosti Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo.

IHC je provedena pomocí monoklonální králičí protilátky proti proteinu HER-2 (Roche, clone 4B5, prediluted, Ventana anti-HER2/neu) a monoklonální protilátky proti proteinu HER-3 (clone HER-3/c-erbB-3RMab).

4.5.3 Imunohistochemický průkaz (IHC) exprese PD-L1

Tkáň je nakrájena na řezy o tloušťce cca 4–8 µm na mikrotomu Leica SM 2010R, řezy jsou na vodní hladině napnuty a nanášeny na podložní sklo SuperFrost, kde se nechají zaschnout. Následně je z řezů xylenem odstraněn parafin a řezy jsou zavodněny v alkoholové řadě.

Automatické barvení PD-L1 je provedeno imunostainerem BenchMark Ultra podle pokynů výrobce s použitím ultraView Universal DAB Detection kitu a modřícího činidla jako vizualizačního činidla a chromogenu. Všechny materiály byly získány od společnosti Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo.

Samotná IHC analýza exprese PD-L1 je provedena pomocí myších monoklonálních protilátek Anti-PD-L1 antibody (Clone 28-8, Dako). Jednalo se o robotický přístup na přístroji BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems) Roche. Vyhodnocení je provedeno na světelném mikroskopu Olympus.

4.5.4 Cytogenetický průkaz numerických změn genu *Her-2/neu* a *ErbB3* metodou FISH

Cytogeneticky jsou analyzovány ultratenké řezy tkání příslušných nádorů v interfázi za použití lokus specifických sond ZytoLight® SPEC HER2/CEN 17 Dual Color probe a ERBB3 gene amplification ZytoLight® SPEC ERBB3/CEN12 Dual Color Probe (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Germany). Testovací postupy zahrnující materiály přesně dodržovaly pokyny výrobce. Interpretace je provedena na fluorescenčním mikroskopu Olympus.

Principem metody FISH je denaturace DNA nádorových buněk s následnou hybridizací příslušných sond. Vzorek deparafinujeme pomocí xylenu a následně dehydratujeme alkoholovou řadou. Následuje proces hypotonie po dobu 30 minut, kdy dojde k narušení buněčných membrán. Po hypotonii následuje fixace směsí methanolu a kyseliny octové v poměru 3:1. Po fixaci aplikujeme 10 μ l sondy a DNA denaturujeme na ohřívací destičce při 75–80 °C po dobu 2 minut.

Hybridizace sondy poté probíhá v termostatu při 37 °C přes noc. K odstranění nespecifických signálů je použit horký pufovaný solný roztok po dobu 2 minut při teplotě 75 °C. Podbarvení je provedeno pomocí DAPI. Preparát je překryt krycím sklem a uchováván v lednici při teplotě 12 °C.

5 VÝSLEDKY

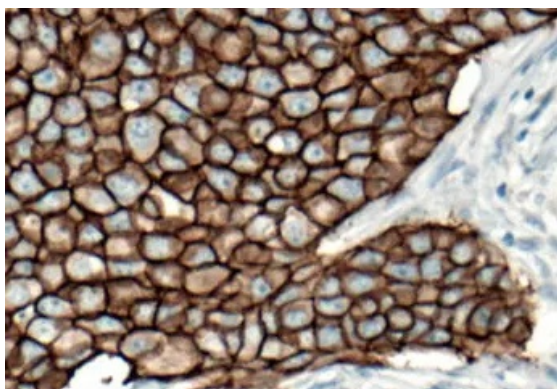
5.1 Výběr pacientů

Celkem byly odebrány vzorky 40 pacientek, u kterých byl diagnostikován a potvrzen karcinom prsu.

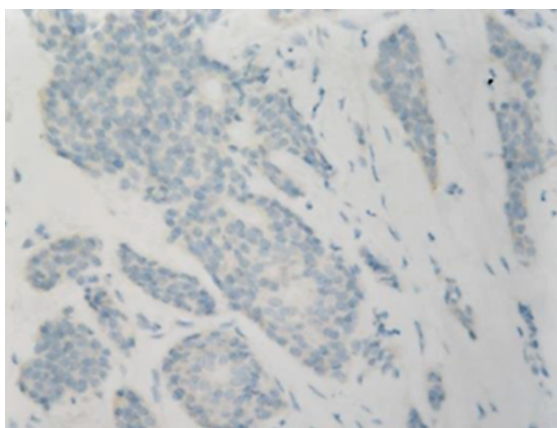
5.2 Imunohistochemický průkaz (IHC) HER-2, HER-3

Pomocí imunohistochemie byla prokázána nebo vyvrácena exprese HER-2 receptoru a následně byly pacientky rozděleny na HER-2 pozitivní a triple negativní pro další analýzu.

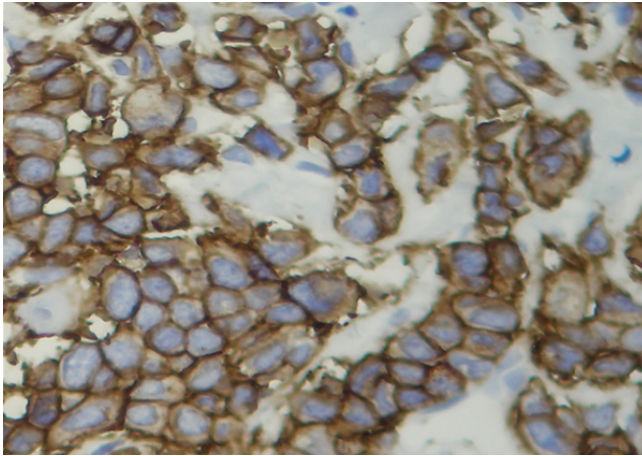
Obrázek 7: Imunohistochemický průkaz zvýšené exprese HER-2 receptoru (zvětšeno 200x)



Obrázek 8: Negativní imunohistochemický nález exprese HER-2 receptoru (zvětšeno 200x)

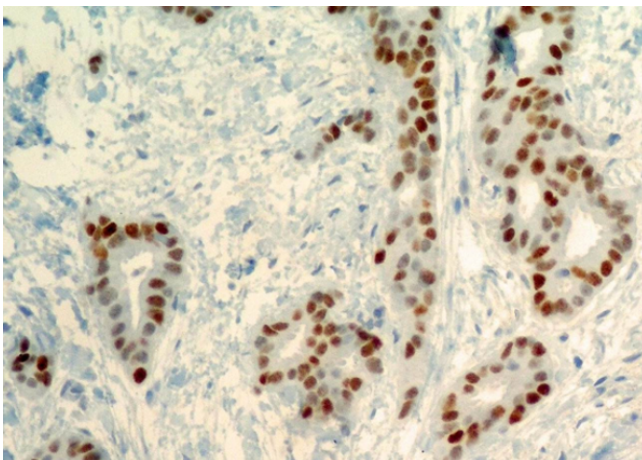


Obrázek 9: Imunohistochemický průkaz zvýšené exprese HER-3 receptoru (zvětšeno 200x)



5.3 Imunohistochemický průkaz (IHC) exprese PD-L1

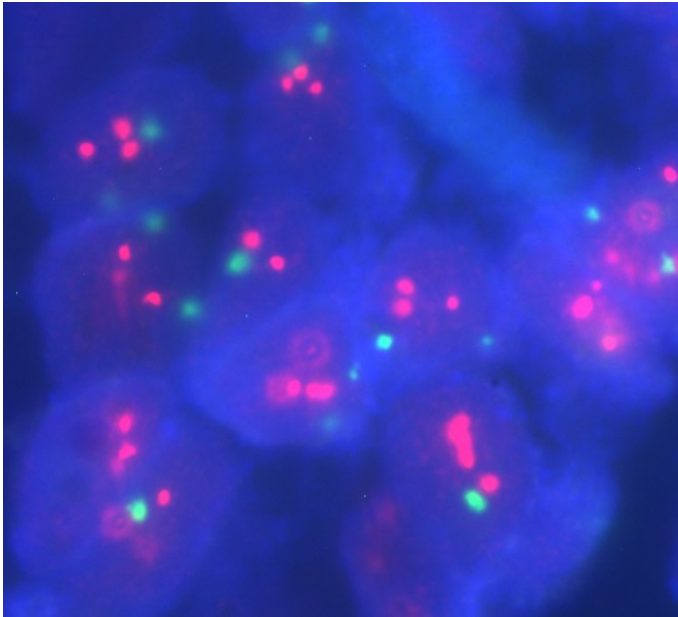
Obrázek 10: Imunohistochemický průkaz exprese PD-L1 (zvětšeno 200x)



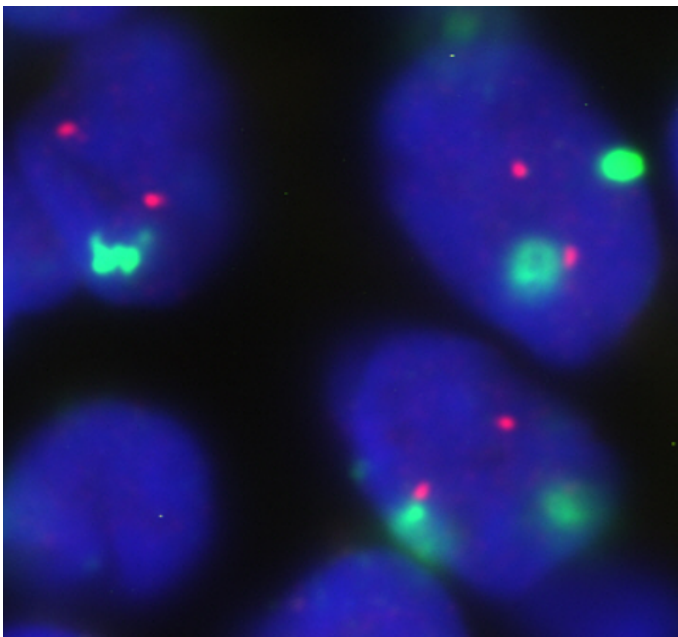
5.4 Cytogenetický průkaz numerických změn genu *Her-2/neu* a *ErbB3* metodou FISH

Byla provedena cytogenetická analýza genu *Her-2/neu* a *ErbB3* pro potvrzení imunohistochemického nálezu HER-2 a HER-3 pozitivity.

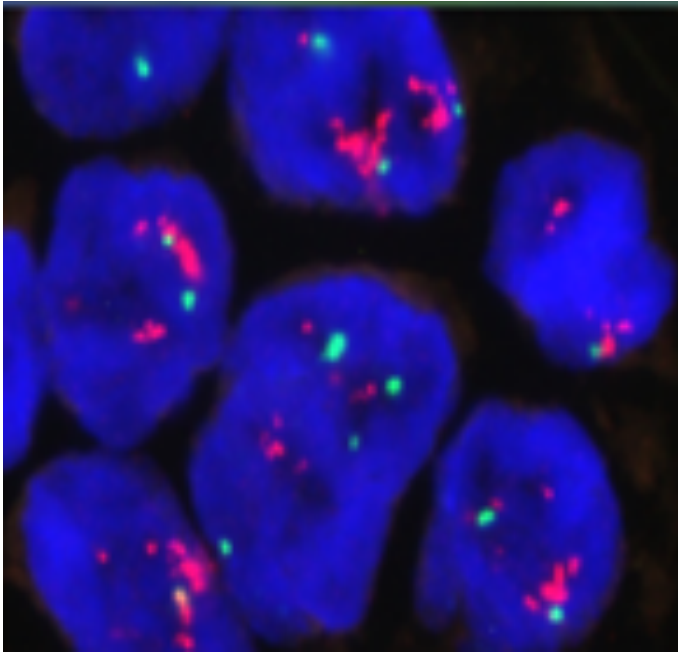
Obrázek 11: Cytogenetický průkaz genu *Her-2/neu* ukazuje na amplifikovaný stav, kdy je detekováno několik lokus specifických signálů (červený signál) a 2 centromerické signály (zelený signál) – detail jádra (zvětšení 1000x)



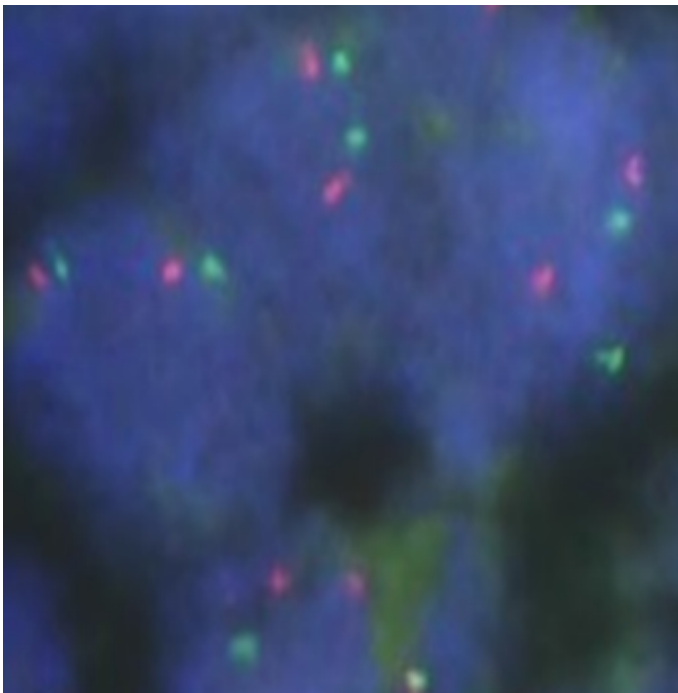
Obrázek 12: Cytogenetický průkaz genu *Her-2/neu* ukazuje na normální stav, kdy jsou detekovány 2 lokus specifické signály (červený signál) a 2 centromerické signály (zelený signál) – detail jádra (zvětšeno 1000x)



Obrázek 13: Cytogenetický průkaz genu *ErbB3* ukazuje na amplifikovaný stav, kdy je detekováno několik lokus specifických signálů (červený signál) a 2 centromerické signály (zelený signál) – detail jádra (zvětšeno 1000x)



Obrázek 14: Cytogenetický průkaz genu *ErbB3* ukazuje na normální stav, kdy jsou detekovány 2 lokus specifické signály (červený signál) a 2 centromerické signály (zelený signál) – detail jádra (zvětšeno 1000x)



5.5 Celkový nále

Výsledky provedených analýz (imunohistochemické barvení a stav cytogenetické analýzy) u pacientek s karcinomem prsu jsou shrnuty v Tabulce 1 a Tabulce 2. U pacientek s HER-2 pozitivním karcinomem prsu byla prokázána amplifikace genu *ErbB3* u 13/20 případů. Stejně výsledky byly potvrzeny také na základě imunohistochemie analýzou exprese HER-3 receptoru, kdy 13/20 případů bylo pozitivních na HER-3 a jednalo o stejné pacientky.

Tabulka 1: Kompletní výsledky analýz u pacientek s HER-2 pozitivním karcinomem prsu

Vzorky HER-2 pozitivních	HER-2/neu gen	HER-2	ERBB3 gen	HER-3	PD-L1
1	poz	poz			
2	poz	poz	poz	poz	
3	poz	poz	poz	poz	poz
4	poz	poz	poz	poz	
5	poz	poz	poz	poz	poz
6	poz	poz	poz	poz	
7	poz	poz	poz	poz	
8	poz	poz			
9	poz	poz	poz	poz	
10	poz	poz	poz	poz	
11	poz	poz	poz	poz	
12	poz	poz	poz	poz	
13	poz	poz			
14	poz	poz			
15	poz	poz	poz	poz	
16	poz	poz	poz	poz	poz
17	poz	poz			
18	poz	poz	poz	poz	
19	poz	poz			
20	poz	poz			

Expresce PD-L1 byla prokázána u 3 z 20 pacientek s HER-2 pozitivním karcinomem prsu. Expresce HER-3 korelovala s PD-L1 ve 100 %. Mezi pozitivními HER-3 a PD-L1 byla silná korelace ($p \leq 0,001$).

V případě pacientek s triple-negativním karcinomem prsu byla expresce CERB3/HER-3 prokázána u 2 z 20 případů. Expresce PD-L1 byla potvrzena u 5 pacientek z 20.

V případě TNBC byla tedy expresce PD-L1 detekována v 5 případech, z toho ve 2 případech byla prokázána expresce HER-3.

Tabulka 2: Kompletní výsledky analýz u pacientek s TNBC

Vzorky TNBC	HER-2/neu gen	HER-2	ERBB3 gen	HER-3	PD-L1
1	neg	neg			
2	neg	neg			
3	neg	neg			poz
4	neg	neg			
5	neg	neg			poz
6	neg	neg			
7	neg	neg	poz	poz	poz
8	neg	neg			
9	neg	neg			
10	neg	neg			
11	neg	neg			
12	neg	neg			
13	neg	neg			
14	neg	neg	poz	poz	poz
15	neg	neg			
16	neg	neg			
17	neg	neg			
18	neg	neg			poz
19	neg	neg			
20	neg	neg			

6 DISKUSE

Karcinom prsu a mnoho dalších solidních nádorů vykazují zvýšení aktivace receptorů růstového faktoru. Konkrétně se jedná o receptory epidermálního růstového faktoru (EGFR/HER1) a další členy HER rodiny (HER2, HER3, HER4), které podporují proliferaci, inhibují apoptózu a také indikují tvorbu druhotných ložisek nádoru (Nautiyal *et al.*, 2010).

Předpokladem je, že účinná terapeutická strategie u triple-negativního karcinomu prsu bude inhibice EGFR a dalších členů (Araujo a Logothetis, 2010) (Lyu *et al.*, 2018). Pro receptor HER-3 u karcinomu prsu souvisejícím s expresí HER-3 je prozatím nedostatek biomarkerů a je to tedy velká výzva pro klinický vývoj HER-3 cílených protilátek. Cílem naší studie bylo lépe pochopit regulaci HER-3 receptorů, čímž by mělo dojít ke zlepšení cílové terapeutické strategie HER-3 při léčbě rakoviny (Chiu *et al.*, 2010).

Tímto tématem se zabývala řada studií. Jedna ze studií byla provedena na kohortě 4046 pacientek, u kterých byl diagnostikován invazivní karcinom prsu, s mediánem 12,5 let následného sledování. U pacientek byla sledována exprese receptorů HER rodiny (Haratani *et al.*, 2020). K analýze byly použity vzorky tkání fixovaných ve formolu a zalitých do parafínu. Imunohistochemicky (IHC) bylo provedena analýza exprese HER1 (EGFR), HER2, HER3 a HER4. Dále byla tkáň vyšetřena metodou fluorescenční *in situ* hybridizace s použitím amplifikačních sond a byl potvrzen HER-2, stejný postup proběhl i v naší studii.

V této studii byl u 10 % nádorů nadměrně exprimován HER-3, což bylo zároveň signifikantním markerem kratšího přežití. V případě naší studie byl HER-3 exprimován u 37,5 % nádorů. Diskrepanci mezi výsledky studií přisuzujeme provedení naší studie na malé kohortě pacientek ve srovnání se zmiňovanou studií. Předpokládáme avšak, že exprese HER-3 bude v populaci vyšší. Dále tato studie prokázala, že u pacientek s invazivním karcinomem prsu je stav HER-3 důležitým prognostickým ukazatelem přežívání. Podle našich výsledků může být identifikována podskupina pacientek se špatnou prognózou onemocnění na základě hodnocení úrovně exprese HER-3. Tyto pacientky by mohly profitovat z terapeutik cílených na HER-3.

Členové rodiny HER (receptory lidského epidermálního růstového faktoru) hrají roli v procesu tumorigeneze, a to v případě deregulace jejich signálních funkcí. Klíčovým znakem signalizace HER rodiny a aktivace PI3K / Akt dráhy je trans-signalizace, která je

kriticky důležitá u nádorových onemocnění. Řízena je hlavně fosforylací v trans membránové inaktivní kináze HER-3. Tím, že je HER-3 inaktivní kináza, není přímým cílem inhibitorů kináz a v současné době je terapeuticky obtížně přístupná. Přesto má HER-3 významnou roli u nádorových onemocnění. Zprostředkovává rezistenci na inhibitory EGFR a HER-2 (Hsieh a Moasser, 2007), případně u pacientů se solidními nádory může být nádorově specifická exprese HER-3 příčinou rezistence vůči PD-1 inhibitoru (Zawlik *et al.*, 2016).

Jiné je to ovšem v případě TNBC. Předpokládá se, že exprese receptoru HER-3 reguluje expresi PD-L1, tím by se mohlo jednat o potenciální cíl imunoterapie a o prediktivní marker u triple-negativního karcinomu prsu. V naší studii jsme detekovali zvýšenou expresi receptoru HER-3 pouze u 2/20 nádorů. V případě HER-2 pozitivních byla exprese HER-3 detekována u 13/20 nádorů. U PD-L1 naše studie prokázala expresi PD-L1 v případě HER-2 pozitivních u 3/20 nádorů a v případě TNBC u 5/20 nádorů. U HER-2 pozitivních karcinomů exprese HER-3 korelovala s expresí PD-L1 ve 100 %. V případě TNBC byla prokázána exprese PD-L1 u 5/20 nádorů, tedy více než u HER-2 pozitivních, z toho ale pouze u 2 případů byla detekována exprese HER-3.

To potvrzují i další studie, které popisují u TNBC vyšší expresi PD-L1 než u HER-2 pozitivních, čímž se imunogenicita stává významná právě u TNBC (Dua a Tan, 2017). Výsledky naší studie ukazují, že exprese PD-L1 nemusí přímo záviset na expresi HER-3. Další studie prokázala, že se u TNBC exprimuje PD-L1 ve zvýšené míře na povrchu rakovinných buněk, i když zatím je role PD-L1 jako biomarkeru nejasná (Dua a Tan, 2017).

Otázkou tedy je, jak velký význam má exprese v predikci pro odpověď na léčbu. Velký vliv bude hrát také variabilita v metodologii hodnocení exprese PD-L1, různé numerické hraniční hodnoty positivity a záleží také na analýze prováděné na různých typech tkání. Tkáně mohou zahrnovat čerstvé, archivované, primární nebo metastatické vzorky, a proto jsme se v naší studii snažili vycházet ze standardně používaných parafinových bloků, které se používají pro archivaci tkáně.

Antigeny spojené s nádorem vyvolávají vyšší imunitní odpověď, která je obecně spojena s přítomností lymfocytů infiltrujících nádor (TIL). Vyšší úroveň těchto lymfocytů byla prokázána u TNBC ve srovnání s karcinomy prsu HR-positivními (Dua a Tan, 2017). Pro triple-negativní karcinom prsu je obecně charakteristická genomová nestabilita a vysoká

míra genetických mutací. Takové mutace implikují produkci většího množství neoantigenů a také zvýšení imunogenicity. Z tohoto důvodu se zvažuje terapeutické cílení na TNBC monoklonálními protilátkami blokujícími dráhu PD-1 / PD-L1 (Kossai *et al.*, 2021).

7 ZÁVĚR

V rámci své diplomové práce jsem se zaměřila na karcinom prsu, který je nejčastější onkologickou příčinou úmrtí u žen. Receptory HER rodiny mají v karcinomu prsu významnou roli a jsou důležité pro diagnostiku i terapii onemocnění. Receptor HER-3 bude mít v karcinomu prsu mnohem komplexnější roli, než se dříve předpokládalo. Ukazuje se, že nadměrná exprese HER-3 receptoru bude mít jak pozitivní, tak i negativní prognostický význam. Dosažené výsledky ukazují, že charakteristika na molekulární úrovni má v karcinogenezi prsu podstatnou roli a amplifikace ErbB-3 a exprese HER-3 se zdají být vhodným biologickým markerem pro terapii nebo prognózu onemocnění, je však potřeba provést další studie. Pozornost by měla být věnována celé signální cestě i s aktivací imunitního systému v souvislosti s imunoterapií. Naše výsledky potvrdily závěry velkých studií. Ty ukazují, že u TNBC je nalezena zvýšená exprese PD-L1 ve větší míře ve srovnání s HER-2 pozitivními karcinomy prsu, nicméně dále naše výsledky ukazují, že je současně detekována exprese HER-3. To by mohlo mít v případě použití checkpoint inhibitorů negativní dopad, zejména u TNBC.

8 LITERATURA

Araujo J, Logothetis C. Dasatinib: a potent SRC inhibitor in clinical development for the treatment of solid tumors. *Cancer Treat Rev.* 2010 Oct;36(6):492-500.

Bae SY, La Choi Y, Kim S, Kim M, Kim J, Jung SP, Choi MY, Lee SK, Kil WH, Lee JE, Nam SJ. HER3 status by immunohistochemistry is correlated with poor prognosis in hormone receptor-negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2013 Jun;139(3):741-50.

Baglole CJ, Ray DM, Bernstein SH, Feldon SE, Smith TJ, Sime PJ, Phipps RP. More than structural cells, fibroblasts create and orchestrate the tumor microenvironment. *Immunol Invest.* 2006;35(3-4):297-325.

Bai X, Sun P, Wang X, Long C, Liao S, Dang S, Zhuang S, Du Y, Zhang X, Li N, He K, Zhang Z. Structure and dynamics of the EGFR/HER2 heterodimer. *Cell Discov.* 2023 Feb 13;9(1):18.

Bu X, Yao Y, Li X. Immune Checkpoint Blockade in Breast Cancer Therapy. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1026:383-402.

Campbell MR, Ruiz-Saenz A, Peterson E, Agnew C, Ayaz P, Garfinkle S, Littlefield P, Steri V, Oeffinger J, Sampang M, Shan Y, Shaw DE, Jura N, Moasser MM. Targetable HER3 functions driving tumorigenic signaling in HER2-amplified cancers. *Cell Rep.* 2022 Feb 1;38(5):110291.

de Mello RA, Veloso AF, Esrom Catarina P, Nadine S, Antoniou G. Potential role of immunotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *Onco Targets Ther.* 2016 Dec 16;10:21-30.

Denton AE, Roberts EW, Fearon DT. Stromal Cells in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1060:99-114.

Diana A, Carlino F, Franzese E, Oikonomidou O, Criscitiello C, De Vita F, Ciardiello F, Orditura M. Early Triple Negative Breast Cancer: Conventional Treatment and Emerging Therapeutic Landscapes. *Cancers (Basel).* 2020 Mar 29;12(4):819.

Diwanji D, Thaker T, Jura N. More than the sum of the parts: Toward full-length receptor tyrosine kinase structures. *IUBMB Life.* 2019 Jun;71(6):706-720.

Dua Isha, Tan AR. Immunotherapy for Triple-Negative Breast Cancer: A Focus on Immune Checkpoint Inhibitors. *AJHO* 2017; 13 (4): 20–27.

Fornaro L, Lucchesi M, Caparello C, Vasile E, Caponi S, Ginocchi L, Masi G, Falcone A. Anti-HER agents in gastric cancer: from bench to bedside. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011 Jun 7;8(7):369-83.

Garrido-Castro AC, Lin NU, Polyak K. Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment. *Cancer Discov*. 2019 Feb;9(2):176-198.

Ghiotto M, Gauthier L, Serriari N, Pastor S, Trunch A, Nunès JA, Olive D. PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1. *Int Immunol*. 2010 Aug;22(8):651-60.

Göthlin Eremo A, Tina E, Wegman P, Stål O, Fransén K, Fornander T, Wingren S. HER4 tumor expression in breast cancer patients randomized to treatment with or without tamoxifen. *Int J Oncol*. 2015 Oct;47(4):1311-20.

Gupta GK, Collier AL, Lee D, Hoefler RA, Zheleva V, Siewertsz van Reesema LL, Tang-Tan AM, Guye ML, Chang DZ, Winston JS, Samli B, Jansen RJ, Petricoin EF, Goetz MP, Bear HD, Tang AH. Perspectives on Triple-Negative Breast Cancer: Current Treatment Strategies, Unmet Needs, and Potential Targets for Future Therapies. *Cancers (Basel)*. 2020 Aug 24;12(9):2392.

Hammoda GE, El-Hefnawy SM, Abdou AG, Abdallah RA. Human Epidermal Growth Factor Receptor-3 mRNA Expression as a Prognostic Marker for Invasive Duct Carcinoma not Otherwise Specified. *J Clin Diagn Res*. 2017 Feb;11(2):XC01-XC05.

Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*. 2020 Mar 1;10(3):727-742.

Haratani K, Yonesaka K, Takamura S, Maenishi O, Kato R, Takegawa N, Kawakami H, Tanaka K, Hayashi H, Takeda M, Maeda N, Kagari T, Hirotsu K, Tsurutani J, Nishio K, Doi K, Miyazawa M, Nakagawa K. U3-1402 sensitizes HER3-expressing tumors to PD-1 blockade by immune activation. *J Clin Invest*. 2020 Jan 2;130(1):374-388.

Holánek M. Imunoterapie karcinomu prsu. *Onkologie [online]*. 2019, 13(2), 69-72 [cit. 2023-04-25]. ISSN 18024475.

Hsieh AC, Moasser MM. Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER3. *Br J Cancer*. 2007 Aug 20;97(4):453-7.

Chiu CG, Masoudi H, Leung S, Voduc DK, Gilks B, Huntsman DG, Wiseman SM. HER-3 overexpression is prognostic of reduced breast cancer survival: a study of 4046 patients. *Ann Surg*. 2010 Jun;251(6):1107-16.

Kossai M, Radosevic-Robin N, Penault-Llorca F. Refining patient selection for breast cancer immunotherapy: beyond PD-L1. *ESMO Open*. 2021 Oct;6(5):100257.

Koutras AK, Fountzilas G, Kalogeras KT, Starakis I, Iconomou G, Kalofonos HP. The upgraded role of HER3 and HER4 receptors in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010 May;74(2):73-8.

Kumar R, George B, Campbell MR, Verma N, Paul AM, Melo-Alvim C, Ribeiro L, Pillai MR, da Costa LM, Moasser MM. HER family in cancer progression: From discovery to 2020 and beyond. *Adv Cancer Res*. 2020;147:109-160.

Llombart-Cussac A, Cortés J, Paré L, Galván P, Bermejo B, Martínez N, Vidal M, Pernas S, López R, Muñoz M, Nuciforo P, Morales S, Oliveira M, de la Peña L, Peláez A, Prat A. HER2-enriched subtype as a predictor of pathological complete response following trastuzumab and lapatinib without chemotherapy in early-stage HER2-positive breast cancer (PAMELA): an open-label, single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017 Apr;18(4):545-554.

Lyu H, Han A, Polsdofer E, Liu S, Liu B. Understanding the biology of HER3 receptor as a therapeutic target in human cancer. *Acta Pharm Sin B*. 2018 Jul;8(4):503-510.

Masuda H, Zhang D, Bartholomeusz C, Doihara H, Hortobagyi GN, Ueno NT. Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Nov;136(2):331-45.

Medina MA, Oza G, Sharma A, Arriaga LG, Hernández Hernández JM, Rotello VM, Ramirez JT. Triple-Negative Breast Cancer: A Review of Conventional and Advanced Therapeutic Strategies. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Mar 20;17(6):2078.

Mishra R, Patel H, Alanazi S, Yuan L, Garrett JT. HER3 signaling and targeted therapy in cancer. *Oncol Rev*. 2018 May 16;12(1):355.

- Monneur A, Gonçalves A, Bertucci F. Expression de PD-L1 et inhibiteurs de la voie PD-1/PD-L1 dans le cancer du sein [PD-L1 expression and PD-1/PD-L1 inhibitors in breast cancer]. *Bull Cancer*. 2018 Mar;105(3):263-274. French.
- Mrozkowiak A, Olszewski WP, Piaścik A, Olszewski WT. HER2 status in breast cancer determined by IHC and FISH: comparison of the results. *Pol J Pathol*. 2004;55(4):165-71.
- Mujoo K, Choi BK, Huang Z, Zhang N, An Z. Regulation of ERBB3/HER3 signaling in cancer. *Oncotarget*. 2014 Nov 15;5(21):10222-36.
- Munari E, Mariotti FR, Quatrini L, Bertoglio P, Tumino N, Vacca P, Eccher A, Ciompi F, Brunelli M, Martignoni G, Bogina G, Moretta L. PD-1/PD-L1 in Cancer: Pathophysiological, Diagnostic and Therapeutic Aspects. *Int J Mol Sci*. 2021 May 12;22(10):5123.
- Naresh A, Thor AD, Edgerton SM, Torkko KC, Kumar R, Jones FE. The HER4/4ICD estrogen receptor coactivator and BH3-only protein is an effector of tamoxifen-induced apoptosis. *Cancer Res*. 2008 Aug 1;68(15):6387-95.
- Nautiyal J, Yu Y, Aboukameel A, Kanwar SS, Das JK, Du J, Patel BB, Sarkar FH, Rishi AK, Mohammad RM, Majumdar AP. ErbB-inhibitory protein: a modified ectodomain of epidermal growth factor receptor synergizes with dasatinib to inhibit growth of breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2010 Jun;9(6):1503-14.
- Nuciforo P, Radosevic-Robin N, Ng T, Scaltriti M. Quantification of HER family receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2015 Apr 9;17:53.
- Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2016 Jan 28;1:15004.
- Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*. 1993 Aug 1;72(3 Suppl):962-70.
- Prausová J. Karcinom prsu – problém i v 21. století. [online] 2010, 12(1), 26-32. [2021-24-4] ISSN 1212-7299. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/int/2010/01/05.pdf>
- Staněk L, Gürlich R, Soumarova R. (2023) Molekulární diagnostika nádorů pro chirurgické obory. © Current Media, s.r.o.

- Stanek L, Gurlich R, Whitley A, Tesarova P, Musil Z, Novakova L. HER-3 molecular classification, expression of PD-L1 and clinical importance in breast cancer. *Bratisl Lek Listy*. 2022;123(10):719-723.
- Staněk L, Tesařová P, Gurlich R. Molekulární onkologie v kazuistikách. Praha: Current Media 2018: 45–56.
- Staněk L, Tesařová P, Gurlich R, Musil Z, Mateička F. Clinical importance of HER-3 in breast cancer. *Onkologie* [online]. 2020, 14(1), 32-36 [cit. 2023-04-26]. ISSN 18024475. Dostupné z: doi:10.36290/xon.2020.003
- SVOD. [online] [navštíveno 27.4.2023]. Dostupné z: <https://www.svod.cz>
- Tang Q, Chen Y, Li X, Long S, Shi Y, Yu Y, Wu W, Han L, Wang S. The role of PD-1/PD-L1 and application of immune-checkpoint inhibitors in human cancers. *Front Immunol*. 2022 Sep 13;13:964442.
- Types of Breast Cancer | Saint John's Cancer Institute. Advanced Cancer Research and Treatment | Saint John's Cancer Institute [online]. Copyright ©2023 Saint John [cit. 26.04.2023]. Dostupné z: <https://www.saintjohnscancer.org/breast/breast-cancer/types-of-breast-cancer/>
- Way TD, Lin JK. Role of HER2/HER3 co-receptor in breast carcinogenesis. *Future Oncol*. 2005 Dec;1(6):841-9.
- Weitsman G, Barber PR, Nguyen LK, Lawler K, Patel G, Woodman N, Kelleher MT, Pinder SE, Rowley M, Ellis PA, Purushotham AD, Coolen AC, Kholodenko BN, Vojnovic B, Gillett C, Ng T. HER2-HER3 dimer quantification by FLIM-FRET predicts breast cancer metastatic relapse independently of HER2 IHC status. *Oncotarget*. 2016 Aug 9;7(32):51012-51026.
- Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu SC. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res*. 2020 Jun 9;22(1):61.
- Zatloukalová P, Pjechová M, Babčanová S, Hupp TR, Vojtěšek B. Úloha PD-1/PD-L1 signalizace v protinádorové imunitní odpovědi [The Role of PD-1/PD-L1 Signaling Pathway in Antitumor Immune Response]. *Klin Onkol*. 2016 Fall;29 Suppl 4(Suppl 4):72-77.

Zawlik I, Gablo N, Szymanska B, Pawlowska Z, Chudobinski C, Chalubinska-Fendler J, Morawiec Z, Zielinska-Blizniewska H, Morawiec-Sztandera A, Kolacinska A. Immune checkpoints in aggressive breast cancer subtypes. *Neoplasma*. 2016;63(5):768-73.

Zhang H, Dai Z, Wu W, Wang Z, Zhang N, Zhang L, Zeng WJ, Liu Z, Cheng Q. Regulatory mechanisms of immune checkpoints PD-L1 and CTLA-4 in cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021 Jun 4;40(1):184.

Zhou Y, Tian Q, Wang BY, Yang J, Zhao SD, Yang J. The prognostic significance of TILs as a biomarker in triple-negative breast cancer: what is the role of TILs in TME of TNBC? *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021 Apr;25(7):2885-2897.