



MUDr. Zuzana Slobodová

**ROLE TPL-2 A CD40 U KARCINOMU
MLÉČNÉ ŽLÁZY**

Autoreferát dizertační práce

**ROLE TPL-2 A CD40 U KARCINOMU
MLÉČNÉ ŽLÁZY**

MUDr. Zuzana Slobodová

Školitel: Prof. MUDr. Jiří Ehrmann, Ph.D.

Ústav patologie FN Olomouc

Laboratoř molekulární patologie LF UP

Studijní obor: Patologická anatomie a soudní lékařství

Číslo oboru: 51-03-9

Olomouc 2011

Dizertační práce byla vypracována v rámci kombinované formy doktorandského studia na Ústavu patologie v Laboratoři molekulární patologie LF UP a FN Olomouc.

Předkladatel: MUDr. Zuzana Slobodová
Laboratoř molekulární patologie
Ústav patologie LF UP
Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

Školitel: Prof. MUDr. Jiří Ehrmann, Ph.D.
Laboratoř molekulární patologie
Ústav patologie LF UP
Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

Oponenti: Prof. MUDr. Markéta Hermanová, Ph.D.
I.patologicko anatomický ústav LF MU a FN
Pekařská 53, 656 91 Brno

Doc. MUDr. Karol Kajo, Ph.D.
Fakultná nemocnica s poliklinikou
Ústav patológie JLF a MFN
Kollárova 2, 03 659 Martin, SR

Autoreferát byl rozeslán dne

Obhajoba dizertační práce se koná dne vhodin před komisí pro obhajoby dizertační práce v oboru Patologická anatomie a soudní lékařství. S dizertační prací je možné se seznámit na Oddělení vědy a výzkumu LF UP, tř. Svobody 8, Olomouc.

Prof. MUDr. Rostislav Kod'ousek, Dr.Sc.

Předseda oborové komise pro obor Patologická anatomie a soudní lékařství.

ÚVOD

Karcinom mléčné žlázy je celosvětově nejčastějším typem rakoviny u žen.

Pro prognózu pacienta s karcinomem mléčné žlázy je stále určující stanovení histologického typu karcinomu, diferenciacie („grading“), velikosti tumoru, ipsilaterální rekurence, metastazování do uzlin. Pro predikci terapie však jen určení histologického typu dlouhodobě nedostačuje. Jako významné se ukázalo stanovení expresního profilu hormonálních receptorů, později i receptorové kinázy c-erb-B2 (*Her-2/neu*). Trendy v klasifikaci směřují k systému, který by charakterizoval nejen histologické, ale i prognostické (odhadující biologické chování) a prediktivní faktory (hodnotící benefit specifické terapie) onemocnění. Tomuto požadavku se zatím nejvíce blíží předběžná klasifikace karcinomu mléčné žlázy na podkladě molekulárních znaků, dělící nádory na podkladě expresního profilu genů (estrogenového a progesteronového receptoru (*ER*, *PR*) a c-erb-B2 (*Her-2/neu*)) do pěti subtypů - luminal A,B,C, *Her-2* a basal-like.

V současné době směřují snahy všech odborníků zapojených do diagnostiky a léčby nádorů mléčné žlázy k jedinému cíli, a tím je terapie šitá na míru. Z tohoto důvodu se hledají a stanovují stále nové znaky, které by spolehlivě predikovaly citlivost karcinomů k léčbě nebo určily prognózu (při jeho nepřítomnosti nebo výskytu). Kromě dosud známých prediktivních a prognostických znaků jako je estrogenový receptor, progesteronový receptor a *Her-2/neu* se setkáváme i s dalšími (*Ki-67*, *PCNA*, *TOP2 α* nebo *Bcl-2*).

Paleta zkoumaných molekul je široká a mnohé z těchto molekul mají význam nejenom u karcinomu mléčné žlázy, ale i u dalších typů nádorů. Vzhledem k tomu, že v karcinogenezi u mnoha zhoubných novotvarů byla zjištěna role *CD40* a *Tpl-2*, byla položena otázka, jakou roli hrají u karcinomu mléčné žlázy.

CD40

CD40 je glykosylovaný fosfoglykoprotein, který je kódován genem nacházejícím se na 20. chromozomu (20q12-q13.2). Výhradní ligandou vázící se s receptorem CD40 je CD40 liganda, byly však popsány různé další molekuly, které mohou vést ke zvýšení exprese CD40 (IFN- γ). I když samostatná molekula CD40 nemá vlastní kinázovou aktivitu, její cytoplazmatický konec obsahuje vazebná místa pro faktory, které jsou asociovány s TNF receptorem (TRAF = TNF receptor-associated factor). Souběžně dochází i aktivaci četných proteinkináz.

Aktivace molekuly CD40 vede k expresi genů regulujících různé intercelulární procesy, z nichž většina souvisí s imunitní odpovědí. V návaznosti na ní má CD40 významnou roli v přežívání buněk a v apoptóze, kterou následně spouštějí buňky imunitního systému. Molekula CD40 současně přímo reguluje proces buněčné smrti – při nízké úrovni vazby zabezpečuje CD40-CD40L interakce přežití buňky, zatímco vysoké hladiny vazby vedou k apoptóze.

Další důležitá role interakce CD40-CD40L byla prokázána u angiogeneze, a to nejen u karcinomů.

Exprese CD40 je pro organizmus nezbytná. Nadměrná exprese CD40 v orgánech nebo tkáních, ve kterých se běžně nedetekuje, vede často k narušení intercelulárních pochodů. Aberantní exprese molekul MHC II. třídy v endokrinních orgánech může například přispívat k autoimunitním onemocněním (roztroušená skleróza, revmatoidní artritida, diabetes mellitus I. typu, autoimunitní tyreoiditida).

Prognostický význam CD40 byl prokázán u mnohých typů nádorů v různých lokalizacích a současně bylo nalezeno rozdílné chování nádorů v závislosti na lokalizaci a typu. Nicméně molekula CD40 a její ligand CD40L mají i nezanedbatelný potencionální prediktivní význam a to v léčbě nádorů zejména v oblasti imunoterapie. Probíhají studie připravující různé vakcíny, které mají

stimulovat imunitu a podpořit reakci vlastního imunitního systému proti nádorovým buňkám v organizmu.

TPL-2/COT

Tpl-2 (Tumor progression locus 2) je protoonkogen, který kóduje serin/threoninovou proteinkinázu (Cot), jež je členem rodiny mitogen aktivovaných protein kináz (MAPK). Tpl-2 je v neaktivním stavu součástí regulační podjednotky p105. Aby došlo k uvolnění Tpl-2 z p105, je potřebná řada fosforylací na Tpl-2 i p105. K aktivaci a fosforylaci Tpl-2 vedou různé stimuly (IL-1, TLR, TNFR1, CD40 a další).

Kináza Tpl-2 je jako součást p105 zapojena do mnoha intracelulárních signálních drah (ERK 1/2, NF- κ B, NFAT, COX-2, PAR). Její uplatnění je zejména v imunitních procesech, nicméně objevují se i práce poukazující na význam v apoptóze, angiogeneze, buněčné migraci a diferenciaci.

Molekula Tpl-2 je aktivní v běžné zdravé buňce řádově v minutách a je rychle degradována v proteasomu. Z hlediska biologické funkce je pro aktivaci onkogenního potenciálu důležitá zvýšená exprese Tpl-2 a/nebo změna C-terminálního konce molekuly, což podporuje buněčnou proliferaci a zabraňuje apoptóze. Exprese a význam Tpl-2 byl popsán zatím pouze u některých nádorů (T buněčné lymfomy, karcinom plic, adenokarcinom tlustého střeva).

CÍLE PRÁCE

Cílem disertační práce je stanovit vztah níže uvedených proteinů k prognóze pacientů s karcinomem prsu:

1. Vztah exprese CD40 k prognostickým znakům u karcinomu prsu.
(Expese CD40 již byla u nádoru prsu popsána, zatím nebyly stanoveny asociace mezi běžně užívanými standardními

prognostickými znaky, eventuálně nalezení nových souvislostí s klinickými daty).

2. Vztah exprese Tpl-2 k prognostickým znakům u karcinomu prsu. *(Molekula Tpl-2 je relativně málo prostudovanou oblastí a u karcinomu prsu nebyla zatím podrobněji zkoumána. Tímto je naše práce unikátní).*

MATERIÁL A METODIKA

Materiál

Z archivu Laboratoře molekulární patologie a Ústavu patologie LF UP a FN v Olomouci byly získávány vzorky pacientů s karcinomem prsu. Soubor obsahoval 181 pacientů. Následně byla v archivu Onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc získávána klinická data pacientů.

Zjištěná klinická data zahrnovala: věk pacienta v období začátku nemoci; datum počátku nemoci; lokalizace karcinomu; typ chirurgické léčby; začátek, ukončení a počet cyklů adjuvantní/neoadjuvantní chemoterapie; začátek a ukončení radioterapie; délka trvání léčby; délka trvání nemoci; délka sledování; relaps; úmrtí pacienta; příčinu úmrtí; poslední kontrola; rodinná anamnéza se zaměřením na nádorová onemocnění a zejména karcinom prsu; věk v období menarche; věk v době menopauzy; počet těhotenství; počet potratů; antikoncepce; hormonální substituční terapie. Interval sledování pacientů byl 14-30 měsíců.

Zjištěná histopatologická data obsahovala: typ vzorku; typ karcinomu; diferenciacie nádoru – „grading“; stádium; vyšetření hormonálních receptorů - estrogenový receptor (ER), progesteronový receptor (PR); vyšetření Her-2/neu; Bcl-2; proliferační aktivita – PCNA. Histopatologické stanovení typu karcinomu, stádia nemoci

a diferenciaci nádoru „gradingu“ bylo provedeno podle WHO klasifikace. Stanovení hormonálních receptorů a Her-2/neu bylo provedeno v souladu s doporučeními.

K vyšetření byly použity vzorky fixovány v 10 % formalinu a zality do parafinových bloků. Z dostupné škály vzorků byly vybrány bloky s nejlepší kvalitou a největším procentuálním zastoupením karcinomu.

Metodika

Imunohistochemické vyšetření

Z parafinových bloků byly zhotoveny 4 µm silné tkáňové řezy. Ty byly následně fixovány na skla po dobu 60 minut při teplotě 65 °C. Následně bylo provedeno odparafinování v xylénové řadě a odvodnění v alkoholové řadě. Zpřístupnění antigenů, tzv. „antigenový retrieval“, bylo provedeno v multifunkčním mikrovlném histoprocesoru (Milestone) v roztoku citrátového pufru s pH 6 při nejvyšším výkonu a teplotě 120 °C po dobu 5 minut.

Zchlazení bylo provedeno při pokojové teplotě po dobu 20 minut. Endogenní peroxidová aktivita byla inhibována 6 % peroxidem vodíku v methanolu po dobu 15 minut. Potom byla skla dvakrát promyta Tris pufrem a následně pak inkubována po dobu 5 minut ve Tris/Tween. Dále byla provedena inkubace s primárními protilátkami při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Použity byly tyto primární protilátky (Lidský estrogenový receptor; α klon 1D5; monoklonální; myši; Dako; ředění 1:20 / Progesteronový receptor; PgR636; monoklonální; myši; NovoCastra; ředění 1:100 / c-erbB2 (Her-2/neu); monoklonální; myši; Dako; ředění 1:5000 / Lidský Bcl-2; Bcl-2/100; monoklonální; myši; BioGenex; ředění 1:100 / Proliferating cell nuclear antigen; PC-100; monoklonální; myši; Dako; ředění 1:200 / CD40; C-20; polyklonální; králičí; Santa Cruz Biotechnology; ředění 1:50 / Tpl-2; polyklonální; králičí; Santa Cruz Biotechnology; ředění 1:50).

V dalším kroku byla přidána sekundární protilátka. Byl užit systém EnVision™+ Dual Link System-HRP (Dako) a následovala

inkubace při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Promytí bylo provedeno dvakrát v Tris pufri a následovala inkubace 5 minut ve Tris/Tween. Vizualizace byla dosažena barvením diaminobenzidinem (DAB) (Dako) a řezy byly kontrastně dobarveny hematoxylinem. Skla byla dehydratována v alkoholu a následně promyta xylenem. Ke krytí skel byl použit jako montovací médium kanadský balzám (Sigma-Aldrich).

Negativní kontrola při barvení byla provedena stejným způsobem pouze s vynecháním primární protilátky. Pro barvení CD40 sloužila jako pozitivní vnitřní kontrola membránová exprese na povrchu lymfocytů (dle výrobce). Pro barvení Tpl-2 sloužila jako pozitivní vnitřní kontrola cytoplazmatická exprese u lymfocytů (dle výrobce).

Hodnocení imunohistochemického vyšetření

Pro hodnocení imunohistochemického barvení jsme použili stanovení tzv. imunohistochemického skóre. Hodnotilo se procento nejintenzivněji obarvených nádorových buněk, kterým byla posléze přiřazena hodnota: 0 pro méně než 1 % pozitivních nádorových buněk, 1 pro 1-30 % nádorových buněk, 2 pro 31-60 % nádorových buněk, 3 pro 61 % a více nádorových buněk.

Dále byla hodnocena intenzita barvení a té byla přiřazena následující hodnota: 1 - slabá intenzita, 2 - středně silná intenzita, 3 - silná intenzita barvení.

Celkové imunohistoskóre s hodnotami 0-9 bylo získáno násobením procentuálního zastoupení nejintenzivněji obarvených nádorových buněk a stupně intenzity barvení. Exprese s imunohistoskóre 0 byla zhodnocena jako negativní, neboli bez exprese proteinu. Skóre v rozmezí 1 až 3 bylo popsáno jako slabá exprese, 4 až 6 bylo zhodnoceno jako středně silná a 7 až 9 označovalo silnou expresi.

Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí statistického softwaru SPSS verze 15 (SPSS Inc., Chicago, USA). Parametry mezi skupinami byly porovnávány použitím Mann-Whitney U-testu. Kvalitativní a kategorizované kvalitativní hodnoty byly porovnávány užitím Fischerova exaktního testu. Rozdíly v kvantitativních hodnotách byly testovány použitím Wilcoxon rank sum testu. Celkové přežívání (overall survival) a přežívání bez nemoci (disease free survival) bylo hodnoceno Kaplan-Meierovým testem. Hranicí statistické signifikance byla $\leq 0,05$.

VÝSLEDKY

Vztah exprese CD40 k prognostickým znakům u karcinomu mléčné žlázy

Expresie CD40 v nenádorových duktech a v buňkách karcinomu mléčné žlázy

V nenádorových duktech byla exprese CD40 nalezena ve 30 %, přičemž byla omezena na luminální vrstvu buněk duktů. Intenzita barvení byla slabá a exprese byla výhradně cytoplazmatická, membránovou expresi jsme nenalezli. V nenádorových tubuloduktálních jednotkách jsme našli jadernou expresi, a to pouze v luminální vrstvě, intenzita exprese se pohybovala od středně silné do silné exprese. Buňky bazální vrstvy nevykazují žádný typ exprese CD40. Expresie byla přítomna u 30 % případů.

V nádorových vzorcích jsme našli expresi CD40 jak v cytoplazmě, tak na membráně nádorových buněk. V buňkách, kde byla zjištěna membránová exprese, byla současně přítomna i cytoplazmatická exprese. Expresie byla zjištěna i v jádrech nádorových buněk, souvislost s expresí v cytoplazmě nebyla nalezena. Je zajímavé, že v nádorových buňkách, ve kterých byla nalezena membránová exprese, jaderná exprese popsána nebyla. Obdobný nález byl potvrzen i obráceně. Charakter exprese CD40

nebyl u pacientů stejný. Některé nádory vykazovaly homogenní expresi, jiné obsahovaly části s různou intenzitou místy i negativitou CD40.

Cytoplazmatickou expresi jsme našli u 53,5 % (95 pacientů). Membránová exprese byla přítomna u 7,7 % (14 pacientů). U všech případů s membránovou expresí byla současně přítomna i cytoplazmatická exprese.

Jaderná exprese byla stanovena u 81,2 % (147 pacientů). Slabá intenzita byla zjištěna u 32 % (58 pacientů), středně silná a silná intenzita byla přítomna u 49,2 % (89 pacientů).

Vztah cytoplazmatické exprese CD40 ke klinicko-patologickým datům bez ohledu na hormonální profil a Her-2/neu profil

V souboru pacientů byl vyšší podíl CD40 pacientů ve skupině duktálního invazivního karcinomu mléčné žlázy, i když nedosáhl statistické signifikance ($p=0,077$).

Při hodnocení diferenciaci karcinomu – „gradingu“ nebyly nalezeny výraznější statisticky významné rozdíly mezi skupinami s rozdílným typem gradu ($p=0,267$), i když můžeme pozorovat s rostoucí dediferenciací stoupající podíl CD40 negativních případů.

Při porovnání exprese CD40 v jednotlivých stádiích byly tyto rozdíly statisticky signifikantní ($p=0,016$). Poměr CD40 negativních pacientů byl v pokročilém stádiu signifikantně vyšší v porovnání k poměru CD40 negativních pacientů v časném stádiu.

Bcl-2 je nezávislý prognostický znak u karcinomu mléčné žlázy a v našem souboru byl hodnocený u všech pacientů. Rozdíly v poměru CD40 negativních případů ve skupině s expresí Bcl-2 a CD40 negativních případů ve skupině Bcl-2 negativní byly statisticky významné ($p=0,002$).

Neoadjuvantní chemoterapie je indikována u nádorů větších rozměrů nebo u metastatických nádorů k zmenšení objemu nádorové hmoty. Podíl CD40 pozitivních pacientů ve skupině s neoadjuvantní chemoterapií je signifikantně nižší v porovnání se skupinou

bez neoadjuvantní chemoterapie. Rozdíl mezi těmito skupinami je signifikantně významný ($p=0,043$).

Při porovnávání celkového přežívání ve skupině s přítomností cytoplazmatické exprese CD40 a bez ní byla pozorována častější úmrtí ve skupině bez přítomnosti exprese CD40. Rozdíl mezi těmito skupinami je signifikantně významný ($p=0,05$).

Statistická analýza ukázala, že intenzita cytoplazmatické exprese CD40 nemá vztah ke klinicko-patologickým charakteristikám nádorů.

Vztah exprese CD40 k hormonálnímu profilu a Her-2/neu profilu

Tabulka č. 1 ukazuje různé typy exprese CD40 ve skupinách pacientů s různým hormonálním profilem a Her-2/neu profilem.

Skupiny	Počet pacientů ve skupinách	CD40 cytoplazma pozitivní/negativní	CD40 jádro pozitivní/negativní	CD40 membrána
Luminální typ A Er+Pr+ cerbB-2/Her-2/neu -	104	62 (59,6 %) 42 (40,4 %) 3:2	88 (84,6 %) 16 (15,4 %) 7:1	4x
Triple negativní typ Er-Pr- cerbB-2/Her-2/neu -	36	14 (39 %) 22 (61 %) 2:3	28 (77,8 %) 8 (22,2 %) 3:1	7x
Her-2 typ Er-Pr- cerbB-2/Her-2/neu +	16	1 (12,5 %) 15 (87,5 %) 1:7	9 (56,3 %) 7 (43,7 %) 1:1	0x
Luminální typ B Er+Pr+ cerbB-2/Her-2/neu +	25	18 (72 %) 7 (28 %) 3:1	22 (88 %) 3 (12 %) 4:1	3x

Tabulka č. 1: *Expresce CD40 ve vztahu ke skupinám s různou expresí hormonálních a Her-2/neu receptorů.*

Při hodnocení různého typu exprese u různých subtypů karcinomů byly nalezeny statisticky signifikantní rozdíly pouze u cytoplazmatického typu exprese.

U lumenálních subtypů je procento pacientů s cytoplazmatickou CD40 expresí vyšší než u triple negativních a Her-2/neu subtypů. Tyto rozdíly v expresi ve skupinách dosáhly hodnoty $p=0,00003$.

Při porovnávání jednotlivých skupin mezi sebou byly rozdíly statisticky signifikantní (viz. Tabulka č. 2).

Porovnávané skupiny	Porovnávané skupiny	Hodnoty P Fischerova exaktního testu
Triple-negative	Luminal B	0,018
Triple-negative	Luminal A	0,035
Triple-negative	her2/neu	0,021
Luminal B	Luminal A	0,359
Luminal B	her2/neu	0,0001
Luminal A	her2/neu	0,0001

Tabulka č. 2: *Korelace cytoplazmatické exprese CD40 mezi jednotlivými skupinami.*

Rozdíly nebyly statisticky signifikantně významné pouze při porovnávání skupiny luminal A a luminal B.

Dále bylo provedeno hodnocení korelace exprese CD40 s klinickými daty pacientů ve čtyřech podskupinách. Signifikantní rozdíly byly nalezeny pouze u subtypu luminal A.

Vztah exprese CD40 ke klinicko-patologickým datům u subtypu luminal A

Skupina pacientů s karcinomy subtypu luminal A obsahovala 104 případů. Různé histologické typy karcinomů nevykazují výraznější rozdíly v expresi CD40. Rozdíly mezi skupinami nebyly statisticky významné, hodnota signifikance dosáhla $p=0,200$.

Podíl pacientů bez exprese CD40 byl v časném stádiu výrazně nižší než ve skupině s pokročilým stádiem. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky signifikantní ($p=0,006$).

I když případů s neoadjuvantní chemoterapií bylo pouze 9, podíl CD40 negativních případů byl výrazně vyšší než u případů bez neoadjuvantní chemoterapie. Rozdíly ve skupinách se blížily hladině signifikance ($p= 0,073$).

U pacientů s přítomností relapsu byl nalezen vyšší podíl CD40 negativních karcinomů, oproti skupině pacientů bez relapsu. Rozdíl mezi skupinami byl statisticky významný ($p= 0,024$).

Statistická analýza ukázala, že intenzita cytoplazmatické exprese CD40 nemá vztah ke klinicko-patologickým charakteristikám nádorů.

Nukleární exprese CD40 a vztah ke klinicko-patologickým datům

V naší skupině byla jaderná exprese zjištěna u 147 pacientů (81,2 %). Pozorovali jsme slabou až silnou nukleární expresi, přičemž slabou expresi u 58 pacientů (32 %), střední a silnou u 89 pacientů (49,2 %).

Při hodnocení exprese jako samostatného znaku (bez asociací s hormonálním profilem a Her-2/neu profilem) a klinicko-patologických dat jsme nenalezli výraznější signifikantní korelaci.

Při hodnocení rozdílů jaderné exprese CD40 ve skupinách s různou expresí hormonálních receptorů a Her-2/neu nedosáhly hodnoty Fischerova testu statistické signifikance ($p=0,054$). Obdobně i hodnocení rozdílů nukleární exprese CD40 v rámci těchto

skupin a následná korelace s klinicko-patologickými daty nedosáhly hladiny statistické signifikance.

Statistická analýza ukázala, že intenzita nukleární exprese CD40 nemá vztah ke klinicko-patologickým charakteristikám nádorů kromě vztahu k neoadjuvantní chemoterapii, kde byla signifikantní pozitivní asociace mezi intenzitou nukleární exprese a aplikací neoadjuvantní chemoterapie ($p=0,038$).

Vztah exprese Tpl-2 k prognostickým znakům u karcinomu mléčné žlázy

Expresí Tpl-2 v nenádorových duktech a v buňkách karcinomu mléčné žlázy

Expresi Tpl-2 jsme pozorovali v cytoplazmě nádorových i nenádorových buněk. V nenádorových duktulolobulárních jednotkách byla exprese pozorována u 69 % případů, intenzita byla slabá až středně silná.

Ve skupině karcinomu mléčné žlázy byla exprese Tpl-2 přítomna u 56 % případů, intenzita byla slabá až středně silná.

V případech, kde byl kromě invazivního nádoru přítomen i *in situ* karcinom, jsme pozorovali výraznější intenzitu exprese Tpl-2 v *in situ* strukturách.

Proto jsme z celé skupiny vybrali případy, u kterých byly přítomny jak nenádorové okrsky, tak karcinom *in situ* (konkrétně DCIS) a duktální karcinom. Z celé skupiny 181 případů bylo vybráno 58 případů.

V 52 případech byly ve vzorku zastíženy okrsky karcinomu i nenádorových duktů; ve 25 případech byly přítomny současně nenádorové dukty a DCIS. Ve 25 případech byly současně přítomny karcinom i DCIS.

V nenádorových duktech byla v této malé skupině přítomna exprese Tpl-2 v 69 %; u DCIS byla exprese Tpl-2 přítomna u 76 %; u invazivního duktálního karcinomu u 74 %. V případě nepřítomnosti Tpl-2 v nenádorových duktech nebyla exprese nalezena ani u karcinomů.

Ať už jsme hodnoty exprese Tpl-2 zkategorižovali ($=0/>0$) nebo využili původní hodnoty, došli jsme vždy ke stejnému závěru: nejvyšší míra závislosti je mezi hodnotami exprese Tpl-2 v DCIS a karcinomem (Spermanova korelace $r=0,890$ a Cramerovo $V=1,0$), méně korelují hodnoty exprese Tpl-2 v DCIS a normální tkáni ($r=0,751$ a Cramerovo $V=0,816$) a nejméně korelují hodnoty exprese Tpl-2 v normální tkáni a karcinomu ($r=0,534$ a Cramerovo $V=0,642$).

Při porovnání intenzity exprese Tpl-2 u invazivního duktálního karcinomu a nenádorových duktů byla u 50 % karcinomů exprese vyšší než u nenádorových duktů. U 27 % byla exprese stejná a u 23 % byla exprese u nádoru nižší než v normální tkáni. Fischerův test prokázal statisticky signifikantní závislost mezi expresí Tpl-2 u nenádorových duktů a karcinomem ($p < 0,0001$). Neparametrický Mann-Whitney U-test prokázal v případě přítomnosti Tpl-2 exprese v nenádorových duktech signifikantně vyšší expresi u karcinomu než v nenádorové prsní tkáni ($p < 0,0001$).

Při porovnání intenzity exprese Tpl-2 u duktálního karcinomu *in situ* a nenádorových duktů nebo invazivního karcinomu byla u 85% exprese silnější u DCIS než u invazivního karcinomu nebo nenádorových duktů. Neparametrický Mann-Whitney U test prokázal signifikantně vyšší expresi Tpl-2 u DCIS v případě přítomnosti Tpl-2 u nenádorových duktů ($p = 0,0002$). Test prokázal v případě exprese Tpl-2 signifikantně vyšší expresi u DCIS než u karcinomu ($p < 0,0001$).

Vztah exprese Tpl-2 ke klinicko-patologickým datům

Při hodnocení přítomnosti Tpl-2 v celé skupině jako nezávislého znaku ve vztahu ke klinicko-patologickým charakteristikám pacientů nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v případech bez přítomnosti a v případech exprese Tpl-2. Při porovnávání exprese Tpl-2 v jednotlivých skupinách s různou expresí hormonálních receptorů a Her-2/neu nebyly rozdíly v expresi statisticky významné ($p=0,308$). I korelace exprese Tpl-2 v rámci

jednotlivých skupin s klinicko-patologickými charakteristikami nedosáhly statisticky významné signifikance.

Statistická analýza ukázala, že intenzita exprese Tpl-2 nemá vztah ke klinicko-patologickým charakteristikám nádorů, ať už v rámci celé podskupiny nebo v rámci jednotlivých podskupin s různým expresním profilem.

SOUHRN

Předložená práce se zabývá významem molekul CD40 a Tpl-2 u karcinomu mléčné žlázy. Karcinom mléčné žlázy je rozsáhle zkoumanou skupinou onemocnění se širokou paletou různých potvrzených i potencionálních prognostických znaků. Molekuly, na které jsme se zaměřili v naší práci, mají prokázany význam u jiných nádorových onemocnění.

První část práce se věnovala molekule CD40. Pozorovali jsme různé typy exprese CD40 z nichž jako prognosticky nejdůležitější se ukázala cytoplazmatická exprese. Byla prokázána spojitost cytoplazmatické exprese CD40 s klinicko-patologickými charakteristikami souvisejícími s lepší prognózou, jako je časné stádium nebo koexprese Bcl-2. Rovněž jsme zjistili korelaci cytoplazmatické exprese s delším přežíváním. Pro adekvátní terapii je nezbytné zhodnocení exprese hormonálních receptorů a Her-2/neu. O ni se opírá i nová molekulární klasifikace, podle níž byly případy rozděleny. Prokázali jsme rozdílnost exprese CD40 v podskupinách v závislosti na expresi hormonálních receptorů a Her-2/neu, přičemž skupiny s expresí hormonálních receptorů měly větší podíl případů s CD40 pozitivitou. Karcinomy mléčné žlázy, které mají horší prognózu (triple negativní a Her-2/neu) se ukázaly ve většině případů jako CD40 negativní. Navíc, podobně jako v celé skupině pacientů, i v největší skupině luminal A byla potvrzena pozitivní asociace exprese CD40 s klinicko-patologickými charakteristikami vztahujícími se k lepší prognóze.

Při imunohistochemickém vyšetření jsme navíc zjistili nukleární expresi CD40, doposud popsanou pouze u B lymfocytů a malignit z nich vycházejících. Jedná se o další biologickou funkci molekuly jako transkripčního faktoru, nejspíše v souvislosti s ovlivněním genů proliferační aktivity, což podporuje i skutečnost vyššího zastoupení případů nukleární positivity CD40 u karcinomů, na rozdíl od nenádorové tkáně mléčné žlázy. Nukleární exprese

CD40 ale nemá u karcinomu mléčné žlázy výraznější prognostický význam.

Druhá část práce se zabývala expresí Tpl-2. Byla zjištěna asociace mezi expresí Tpl-2 u intraduktálního karcinomu a invazivního duktálního karcinomu ukazující na vztah Tpl-2 se vznikem invaze u karcinomů, potvrzující onkogenní vlastnosti Tpl-2. Prognostický význam Tpl-2 u karcinomu mléčné žlázy nebyl zjištěn, ať už šlo o Tpl-2 jako nezávislý prognostický znak, nebo v souvislosti s koexpresí hormonálních receptorů nebo Her-2/neu.

Klíčová slova

karcinom mléčné žlázy, exprese CD40, exprese Tpl-2, prognóza

SUMMARY

This thesis focuses on the significance of CD40 and Tpl-2 expression in breast cancer. While this disease is widely researched with a large range of confirmed and potential prognostic markers, the molecules examined in this research however are relevant to other types of cancer as well.

The first part of the thesis deals with the CD40 molecule. CD40 was found to be expressed in membrane, cytoplasm and nucleus but the most prognostically significant was cytoplasmic expression. We found an association between cytoplasmic expression of CD40 and clinicopathological data related to better prognosis as early stage and coexpresion of Bcl-2. We also found a correlation of cytoplasmic CD40 expression with longer overall survival. As expression of hormonal receptors and Her-2/neu is essential for adequate therapy and new molecular classification is based on them, and we included them in our research.

We found differences in expression of cytoplasmic CD40 between these groups and groups with expression of hormonal receptors showed higher ratio of C40 positive cases. Breast carcinomas with worse prognosis (triple negative and Her-2/neu) had a higher ratio of CD40 negative cases. Moreover, like the complete

group, similar positive association of CD40 expression with clinicopathological data related to better prognosis was confirmed in the luminal A group.

Immunohistochemical staining also showed nuclear expression of CD40 that had been described only in B lymphocytes and malignancies arising from these cells. Nuclear expression is related to the biological function of CD40 as a transcription factor most likely influencing the activity of proliferation genes. This supports also higher presentation of nuclear CD40 expression in breast cancer cell contrary to normal cell. Nuclear expression of CD40 in breast cancer has no marked prognostic significance.

The second part of the work was focused on expression of the Tpl-2 molecule. We found an association between Tpl-2 expression and intraductal carcinoma and invasive ductal carcinoma. This association suggests a relation of Tpl-2 to cancer invasion and confirms the oncogenic nature of Tpl-2. No prognostic significance was found for Tpl-2 in breast cancer either as an independent marker or in coexpression with hormonal or Her-2/neu expression

Keywords

breast cancer, CD40 expression, Tpl-2 expression, prognosis

PŘEHLED PUBLIKACÍ AUTORA

1. Práce související s disertační prací

Původní a souborové práce související s tématem:

1. Sadej R, Romanska H, Baldwin G, Gkirtzimanaki K, Novitskaya V, Filer AD, **Krcova Z**, Kusinska R, Ehrmann J, Buckley CD, Kordek R, Potemski P, Eliopoulos AG, Lalani el-N, Berdichevski F. CD151 regulates tumorigenesis by modulating the communication between tumor cells and endothelium. Mol Cancer Res. 2009; 7: 787-98.
IF - 4,162
2. **Slobodova Z**, Ehrmann J., Krejci V., Zapletalova J., Melichar B. Analysis of CD40 expression in breast cancer and its relation to clinicopathological characteristics. Neoplasma. 2011; 3: 189-197. doi:10.4149/neo_2011_03_189
IF - 1,19

Přehledné /souborné vědecké práce v daném oboru uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech:

1. **Krcova Z**, Ehrmann J, Krejci V, Eliopoulos A, Kolar Z. Tpl-2/COT and COX-2 in Brest cancer. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2008; 152: 21-5.

Publikovaná abstrakta prezentací související s tématem:

1. **Krčová Z.**, J. Ehrmann, A. Eliopoulos, G. Turashvili, J. Klein, J. Škarda, E. Fridman, V. Krejčí, J. Zapletalová, Z. Kolář. Tpl2/Cot jako nový prognostický a prediktivní znak u karcinomu mléčné žlázy? 4/2007XXXI. Brněnské onkologické dny.

2. **Krčová Z.**, J. Ehrmann, A. Eliopoulos, G. Turashvili, J. Klein, J. Škarda, E. Fridman, V. Krejčí, J. Zapletalová, Z. Kolář. Tpl2/Cot as a new prognostic and predictive factor in breast cancer? Virchows Arch. 2007; 451: 142-143. 9/2007 Istanbul, 21st European Congress of Pathology
3. **Slobodova Z.**, Ehrmann J., Krejčí V. Analysis of immunohistochemical expression of CD40 in breast cancer and its relation to prognosis. Virchows Arch. 2009; 455: S104. 9/2009 Florencie, 22nd European Congress of Pathology
4. **Slobodova Z.**, Ehrmann J., Krejčí V.: Prognostický a prediktivní význam exprese CD40 u karcinomu prsu. Onkologie. V. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie. Olomouc 11/2009

2. Ostatní publikace

Původní práce přímo nesouvisející s tématem uveřejněné v recenzovaných vědeckých časopisech:

1. Berková M, Berka Z, **Krčová Z.** Turnerův syndrom vyžaduje multidisciplinární přístup. Vnitř Lek. 2009; 55: 501-5.
2. Berková M, Berka Z, **Krčová Z.** Infarkt myokardu – příčina předčasné smrti u Turnerova syndromu. Vnitř Lek. 2009; 55: 523-8.

Publikovaná abstrakta prezentací přímo nesouvisející s tématem:

1. **Krčová Z.**, Ehrmann J, Woodman CB., Murray PG., Melichar B. Analýza imunohistochemické exprese EZH2, H3K27 a UTX ve spinocelulárním karcinomu a nenádorovém

epitelu děložního čípku. IV. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie. Olomouc 11/2008

POUŽITÁ LITERATURA

1. Nottage MK, Kopciuk KA, Tzontcheva A, Andrulis IL, Bull SB, Blackstein ME. Analysis of incidence and prognostic factors for ipsilateral breast tumour recurrence and its impact on disease-specific survival of women with node-negative breast cancer: a prospective cohort study. *Breast Cancer Res.* 2006; 8: R44.
2. Tavassoli FA, Devilee P. (Eds). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. IARC Press. Lyon 2003.
3. <http://www.patologie.info/soubor/standardy/13-Prs.pdf>
4. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol.* 2005; 23: 7350-60.
5. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lønning P, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:10869-74.
6. Dawood S, Hu R, Homes MD, Collins LC, Schnitt SJ, Connolly J, Colditz GA, Tamimi RM. Defining breast cancer prognosis based on molecular phenotypes: results from a large cohort study. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 126:1113-7. DOI: 10.1007/s10549-010-1113-7.
7. Sekine I, Shimizu C, Nishio K, Saijo N, Tamura T. A literature review of molecular markers predictive of clinical response to

cytotoxic chemotherapy in patients with breast cancer. *Int J Clin Oncol.* 2009; 14: 112-9.

8. Urruticoechea A, Aguilar H, Solé X, Capellà G, Martin LA, Dowsett M, Germà-Lluch JR. Pre-clinical validation of early molecular markers of sensitivity to aromatase inhibitors in a mouse model of post-menopausal hormone-sensitive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008; 109: 463-70.
9. Loskog AS, Eliopoulos AG. The Janus faces of CD40 in cancer. *Semin Immunol.* 2009; 21: 301-7.
10. Eliopoulos AE, Davies C, Knox PG, Gallagher NJ, Afford SC, Adams DH, Young LS. CD40 Induces Apoptosis in Carcinoma Cells through Activation of Cytotoxic Ligands of the Tumor Necrosis Factor Superfamily. *Molecular and Cellular Biology,* August 2000; 20: 5503-5515.
11. Peters AL, Stunz LL, Bishop GA. CD40 and autoimmunity: The dark side of a great activator. *Semin Immunol.* 2009; 21: 293-300.
12. Lapteva N, Seethammagari MR, Hanks BA, Jiang J, Levitt JM, Slawin KM, Spencer DM. Enhanced activation of human dendritic cells by inducible CD40 and Toll-like receptor-4 ligation. *Cancer Res.* 2007; 67: 10528-37.
13. Lin-Lee YC, Pham LV, Tamayo AT, Fu L, Zhou HJ, Yoshimura LC, Decker GL, Ford RJ. Nuclear localization in the biology of the CD40 receptor in normal and neoplastic human B lymphocytes. *J Biol Chem.* 2006; 281: 18878-87.

14. Patriotis C, Makris A, Bear SE, Tsihchlis PN: Tumor progression locus 2 (Tpl-2) encodes a protein kinase involved in the progression of rodent T-cell lymphomas and in T-cell activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 90: 2251-5.
15. Sourvinos G, Tsatsanis C, Spandidos DA. Overexpression of the Tpl-2/Cot oncogene in human breast cancer. Oncogene. 1999; 18: 4968-73.
16. Christoforidou AV, Papadaki HA, Margioris AN, Eliopoulos GD, Tsatsanis C. Expression of the Tpl2/Cot oncogene in human T-cell neoplasias. Mol Cancer. 2004; 3: 34.
17. Hatziapostolou M, Polytarchou C, Panutsopulos D, Covic L, Tsihchlis PN. Proteinase- activated receptor-1-triggered activation of tumor progression locus-2 promotes actin cytoskeleton reorganization and cell migration. Cancer Res. 2008; 68: 1851-61.

Práce byla podporována granty: Vnitřním grantem (MSM 6198959216), 6. rámcovým programem (80110091), programem Kontakt (LSHC-CT-2006-037344), GAČR (303/09/H048) a projektem Biomedicine for regional development and human resources (BIOMEDREG) C.1.05/2.1.00/01.0030.