

Egyszerűsített, alacsony költségű génexpressziós teszt az emlődaganatos betegségek kimenetelének előrejelzésére rutin patológiai blokkok felhasználásával

Szász A. Marcell dr.^{1*} ■ Ács Balázs^{1*} ■ Ágoston Emese dr.^{2*}
Sztupinszki Zsófia³ ■ Tótkés Anna-Mária dr.^{1, 4} ■ Szittyá Liliána dr.¹
Székely Borbála dr.¹ ■ Szendrői Miklós dr.⁵ ■ Li Qiyuan dr.⁶
Harsányi László dr.² ■ Tímár József dr.¹ ■ Szállási Zoltán dr.^{6, 7}
Swanton Charles dr.^{8, 9} ■ Győrffy Balázs dr.³ ■ Kulka Janina dr.¹

¹Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, II. Patológiai Intézet, Budapest

²Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. Sebészeti Klinika, Budapest

³Magyar Tudományos Akadémia, Gyermekgyógyászati és Nefrológiai Kutatólaboratórium, Budapest

⁴Magyar Tudományos Akadémia–Semmelweis Egyetem, Daganatprogresszió Kutatócsoport, Budapest

⁵Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Ortopédiai Klinika, Budapest

⁶Center for Biological Sequence Analysis, BioCentrum, Technical University of Denmark, Lyngby Kgs, Dánia

⁷Informatics Program, Children's Hospital Boston,

Harvard Medical School, Boston, MA, Amerikai Egyesült Államok

⁸Cancer Research UK, London Research Institute,

Translational Cancer Therapeutics Laboratory, London, Egyesült Királyság

⁹University College London Cancer Institute, London WC1E 6BT, London, Egyesült Királyság

Bevezetés: Közepesen differenciált (grade 2) tumorok esetén a beteg prognózisa és a terápia eredményessége e tényező alapján nem becsülhető meg biztonsággal. *Célkitűzés:* Vizsgálni a szerzők által leírt, kromoszomális instabilitást tükröző prognosztikus génexpressziós indexet kiegészítve további génekkel egy kiterjesztett betegcsoporton. *Módszerek:* Publikus adatbázisokból választottak ki kilenc cél-, valamint három kontrollgént. Ezek expresszióját valós idejű polimeráz láncreakcióval határozták meg. Az analízisben 249, formalinban fixált, paraffinba ágyazott emlőcarcinoma vizsgálatát végezték el és az eredményeiket a betegségmentes túléléssel összefüggésben elemezték. *Eredmények:* A gének expressziójának mértéke alapján a grade 2 carcinomák a grade 1, illetve a grade 3 tumorokhoz hasonló prognózisú csoportokra különültek el. Pusztán a FOXM1, TOP2A és CLDN4 gének együttes vizsgálatával a grade 2 daganatok magas és alacsony kockázatú alcsoportokba oszthatóak. *Következtetés:* Megfelelően választott kontrollgének vizsgálatával három célgén expressziója alapján a hisztológiai grade-től függetlenül elkülöníthető az emlőcarcinomák jó és rossz prognózisú csoportja. Orv. Hetil., 2013, 154, 627–632.

Kulcsszavak: emlőrák, grade, prognózis, génexpresszió

*A szerzők egyenlő mértékben járultak hozzá a közleményhez.

Prediction of the prognosis of breast cancer in routine histologic specimens using a simplified, low-cost gene expression signature

Background: Grade 2 breast carcinomas do not form a uniform prognostic group. **Aim:** To extend the number of patients and the investigated genes of a previously identified prognostic signature described by the authors that reflect chromosomal instability in order to refine characterization of grade 2 breast cancers and identify driver genes. **Methods:** Using publicly available databases, the authors selected 9 target and 3 housekeeping genes that are capable to divide grade 2 breast carcinomas into prognostic groups. Gene expression was investigated by polymerase chain reaction in 249 formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors. The results were correlated with relapse-free survival. **Results:** Histologically grade 2 carcinomas were split into good and a poor prognosis groups. Centroid-based ranking showed that 3 genes, FOXM1, TOP2A and CLDN4 were able to separate the good and poor prognostic groups of grade 2 breast carcinomas. **Conclusion:** Using appropriately selected control genes, a limited set of genes is able to split prognostic groups of breast carcinomas independently from their grade. *Orv. Hetil.*, 2013, 154, 627–632.

Keywords: breast, grade, prognosis, gene expression

(Beérkezett: 2013. február 24.; elfogadva: 2013. március 14.)

Rövidítések

CIN = kromoszomális instabilitás; CLDN4 = claudin-4; ER = ösztrogénreceptor; FFPE = formalinban fixált és paraffinba ágyazott; FOXM1 = forkhead box protein M1; GGI = genomikai grade index; PAM = prediction analysis of microarrays; qPCR = kvantitatív polimeráz láncreakció; TOP2A = topozomeráz-II-alfa

Az emlődaganatok prognózisának megítélésében az egyik legerősebb faktor a Nottingham grade rendszer alapján felállított szövettani differenciáltsági fok. Ennek alapján az emlőrákok három csoportba – jól (grade 1), közepesen (grade 2) és alacsonyan differenciált (grade 3) tumorokra – oszthatóak. A rendszer a tubulusformáló képességet, a magi pleomorfizmust és a mitotikus indexet veszi figyelembe [1, 2]. Nagy esetszámú vizsgálatok eredményei alapján a grade független prognosztikai és prediktív faktornak tekinthető [3], amely szerint a jól és alacsonyan differenciált tumorok jellemzően elkülönülnek, a grade 2 daganatok azonban köztes csoportot képeznek. A beosztás szubjektív volta, az egyes vizsgálók és centrumok közti értékelési különbségek [4], valamint a közepesen differenciált carcinomák pontosabb értékelése érdekében hasznos lehet az emlőrákok differenciáltságát vizsgáló objektív, a mindennapi gyakorlat számára hozzáférhető módszer kidolgozása.

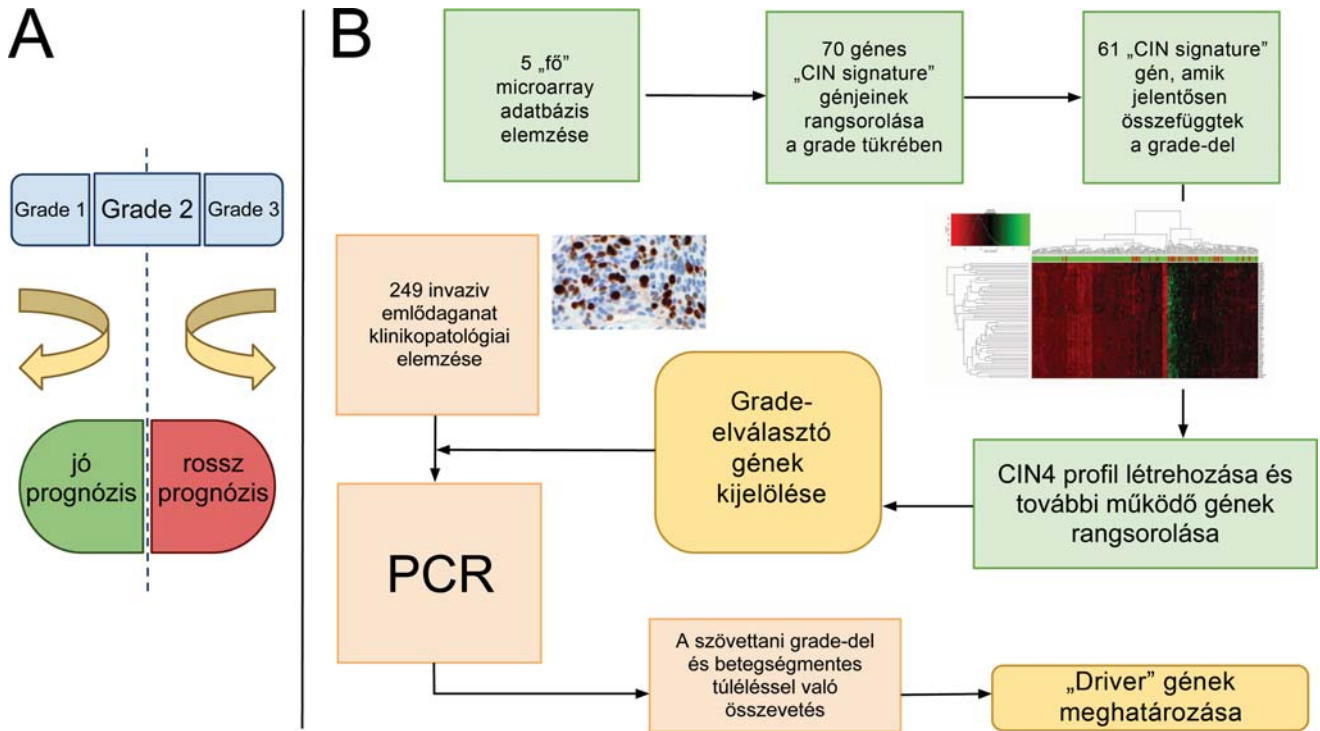
Az utóbbi évtizedben az emlődaganatok osztályozása és viselkedésének előrejelzése forradalmi változásokon ment keresztül [5, 6] a diagnosztikus eszközök egyidejű kifejlesztése mellett [7, 8]. Mindezek ellenére számos beteg esetében a prognózis nem ítéhető meg biztonsággal. Génexpressziós vizsgálatok [9, 10, 11] eredményei arra utalnak, hogy a grade 2 daganatok egy része a grade 1, más része a grade 3 tumorokhoz hasonló [8], ami a betegek túlélési eredményeivel is alátámasztható [11].

A differenciáltsági fokot genetikai alapon elemző vizsgálatok nagyfokú átfedést mutatnak az egyes génkifejeződési profilokban. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a legtöbb, grade-et pontosító gén kifejeződése ugyanazon információt tükrözi [12]. Így viszonylag kis számú, helyesen kiválasztott gén segítségével ugyanazt az összefüggést tudjuk modellezni, mint sok száz gént használó microarray-alapú vizsgálatokat alkalmazva [13]. Jelen munkánkban nyilvánosan elérhető adatbázisok anyagából a kromoszomális instabilitást tükröző számos gén expressziója alapján jelöltük ki a „grade-elválasztó” profil kevesebb gént tartalmazó változatát, amely prognosztikus információt tükröző felosztást tesz lehetővé emlőcarcinomák esetében [1. A) és B) ábra].

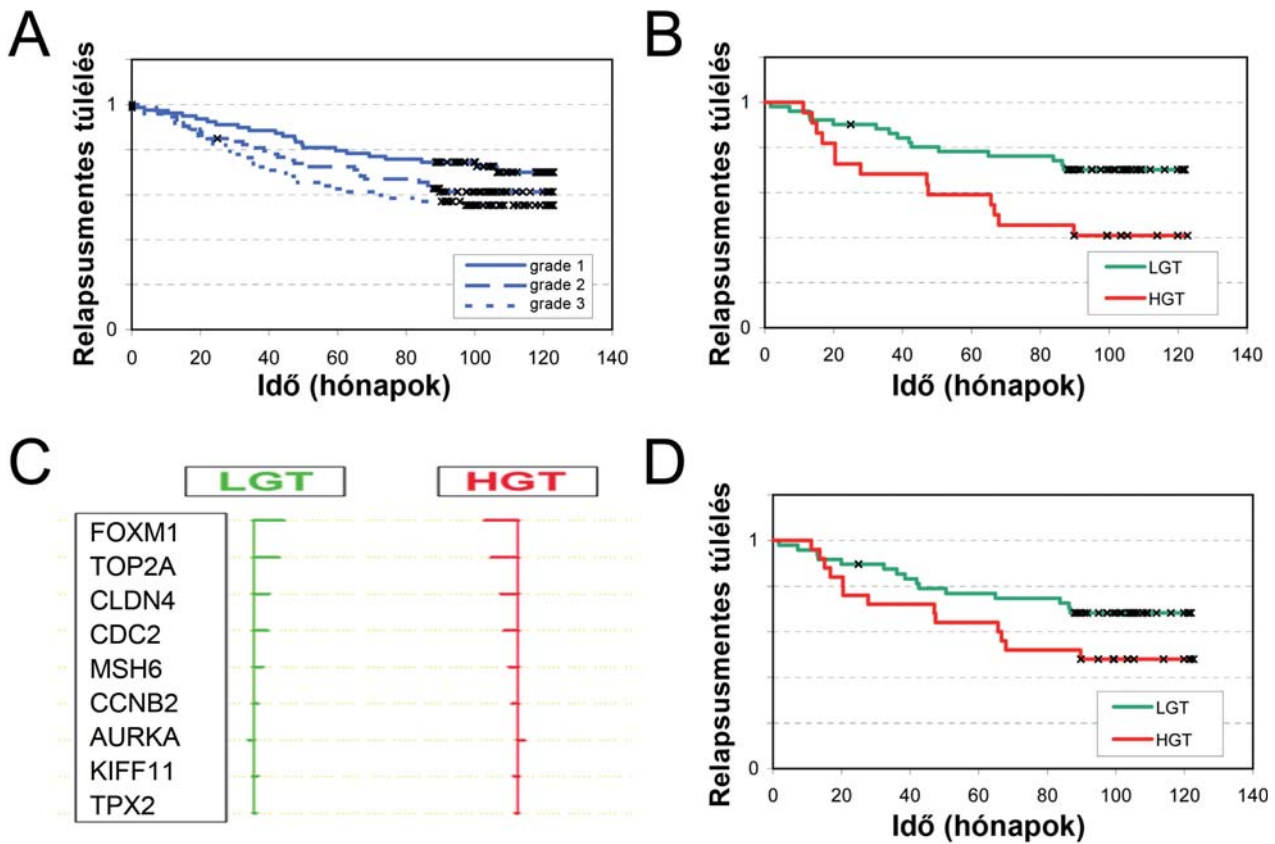
Módszer

Öt nyilvánosan elérhető cDNS-microarray-adatbázis [6, 8, 9, 11, 14] elemzésével *in silico* jelöltük ki a vizsgálni kívánt gének kiegészített listáját. Mindegyik adatbázisban a kromoszomális instabilitás (CIN) kifejeződési mintázat génjeit vizsgáltuk a szövettani differenciáltsági fokkal való összefüggésben [13]. Korábbi eredményeink szerint a CLDN4 expressziója összefügg a daganatos differenciációval [15, 16], ezért ennek kifejeződését ugyancsak vizsgáltuk.

1999 és 2002 között 462, invazív emlőrákkal diagnosztizált beteg paraffinba ágyazott anyagát vizsgáltuk a Budai MÁV Kórház archívumából, amelyeket ugyanazon patológus szakorvos (K. J.) értékelt. A betegek átlagéletkora 58,8 év volt: 59,9, 59,2 és 56,5 a grade 1, 2 és 3 csoportokban [2. A) ábra]. A leggyakrabban előforduló szövettani altípus az invazív ductalis carcinoma volt (65,8%). Az RNS-izolálást követően 314 eset került génexpressziós elemzésre, amelyek közül 249 volt értékelhető: 86 grade 1, 86 grade 2 és 77 grade 3 [1. táblázat és 2. A) ábra]. A vizsgálatot a Tudományos



1. ábra | Vizsgálatunkban a grade 2 differenciáltságú tumorok prognosztikus alcsoportjainak meghatározását tűztük ki célul (A). Ehhez párhuzamosan bioinformatikai elemzést végeztünk nyilvánosan elérhető génexpressziós adatokat felhasználva, és 249 beteg daganatát elemezve validáltuk a meghatározott PCR-alapú génexpressziós profilt (B)



2. ábra | Relapsusmentes túlélés a három szövettani differenciáltsági csoportban a vizsgált betegekben (A). A grade 2 tumorokat sikeresen kettéválasztottuk a kilenc gén kifejeződése alapján egy jól differenciált (LGT) és egy alacsonyan differenciált (HGT) típusú csoportra (B). A centroid plot elemzés eredménye, amely alapján az elkülönítéshez alkalmazott géneket rangsoroltuk, felülről lefelé láthatóak az „erősségüknek” megfelelően (C). A szűkített génlista alapján a grade 2-es daganatok prognosztikus elkülönítése (LGT vs. HGT) lehetséges (D)

1. táblázat | A vizsgálatba bevont betegek klinikopatológiai paramétereit

Csoportok (grade alapján)	1	2	3	Összes
Betegek száma	86	86	77	249
Életkor – években (átlag, tartomány)	59,9 (35–95)	59,2 (23–87)	56,5 (29–87)	58,8 (23–95)
Szöveti típus (db, %)	IDC	61 (70,9%)	51 (59,3%)	164 (65,8%)
	ILC	6 (6,9%)	4 (4,6%)	11 (4,4%)
	Kevert	12 (13,9%)	28 (32,5%)	55 (22%)
	Egyéb	7 (8,1%)	3 (3,4%)	19 (7,6%)
Tumorméret – mm (átlag±szórás)	20,49±1,10	26,81±1,54	28,55±1,92	25,13±1,37
Érinvázio (db, %)	48 (55,8%)	65 (75,6%)	63 (81,8%)	176 (70,7%)
Nekrózis (db, %)	11 (12,7%)	23 (26,7%)	45 (58,4%)	79 (31,7%)
NPI (átlag±szórás)	3,00±0,11	4,39±0,13	5,58±0,15	4,39±1,39
ER – % (átlag±szórás)	69,33±3,99	52,46±4,49	33,82±4,98	51,88±40,12
PgR – % (átlag±szórás)	48,35±4,46	27,85±3,78	18,98±3,51	31,61±34,97
Relapsus (n, %)	Összes	23 (26,7%)	36 (41,8%)	99 (39,7%)
	Helyi	12 (13,9%)	7 (8,1%)	26 (10,4%)
	Távoli	11 (12,8%)	29 (33,7%)	67 (26,9%)
Betegségmentes túlélés (átlag, tartomány)	85,9 (12–122)	75,9 (0–123)	74,1 (0–119)	78,8 (0–123)

IDC = invazív ductalis carcinoma; ILC = invazív lobularis carcinoma; NPI = Nottingham prognosztikus index; ER = ösztrogénreceptor; PgR = progesteronreceptor

Kutatási és Etikai Bizottság hagyta jóvá (IKEB #7/2008 és 7-1/2008).

A formalinban fixált és paraffinba ágyazott (FFPE) tumorokból lementzett mintákat hematoxin-eozin festés segítségével értékeltük sejttözetétel szempontjából. RNS-izoláláshoz a teljes daganatot tartalmazó blokkokból 5–20 darab 5 µm-es réteget metszettünk le. Az RNS kivonását Qiagen FFPE kit segítségével végeztük, gyári protokoll szerint (Qiagen, Venlo, Hollandia). Az RNS-cDNS átírás az Applied Biosystems (ABI) High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix alkalmazásával történt, mintánként 1000 ng RNS felhasználásával (ABI, Foster City, CA, Amerikai Egyesült Államok).

A kvantitatív polimeráz láncreakciókat (qPCR) 20 µl reakcióelegyben duplikátumban, a Roche LightCycler® 480 rendszerben (Roche, Mannheim, Németország) futtattuk az alábbi Taqman® assay-k segítségével, figyelembe véve a cég által meghatározott feltételeket: AURKA – Hs01597773_mH, CCNB2 – Hs00270424_m1, CDC2 – Hs00364293_m1, CLDN4 – Hs00976831_s1, FOXM1 – Hs01073586_m1, KIF11 – Hs00189698_m1, MSH6 – Hs00264721_m1, TOP2A – Hs00172214_m1, TPX2 – Hs00201616_m1, B4GALT3 – Hs00186856_m1, SLC9A3R2 – Hs00191186_m1, PUM1 – Hs00206469_m1. A B4GALT3, SLC9A3R2 és a PUM1 képezik a kontrollgének csoportját, amelyek szintén a fentebb említett adatbázisok elemzése során kerültek kiválasztásra. Az egyes ismétlésekből származó eredményeket átlagoltuk, majd a ΔΔCt-eljárást alkalmaztuk. Az értékelést R statisztikai környezetben (R 2.10.1) Prediction Analysis

of Microarrays (PAM v. 2.19) módszer segítségével végeztük [17]. A magas előrejelzési potenciállal bíró gének kiválasztása során a PAM folyamatosan emeli a gének expressziójából levont küszöböt, amelynek hatására a korrigált génextpresszió folyamatosan csökken. Ezen „shrunken centroid”-nak nevezett csökkentett génextpresszió szignifikánsan eltérő génei adták az előre jelző génlisztát. A prognózis és a betegségmentes túlélés ábrázolásához Kaplan–Meier-metodikát használtunk. A grafikonokat Winstat for Excel program segítségével készítettük.

Eredmények

In silico eredmények

A 70 génes kromoszomális instabilitás (CIN70) génlisztát rangsoroltuk a szövettani grade-del való összefüggésének megfelelően. Így egy 61 génes CIN-profilunk (CIN61), ami mind az öt adatbázisban erősen összefüggött a szövettani differenciáltsággal (Pearson-féle korrelációs koeficiens >0,7). Ezután a legerősebb 10 génre szűkítettük le a listát minden adatbázisban (centroid). Meglepetésünkre nyolc gén azonos volt mind az öt esetben. Ezek (AURKA, CCNB2, CDC2, FOXM1, KIF11, MSH6, TOP2A, TPX2) és a hozzáadott CLDN4 képezte a kiindulási alapot a klinikai mintákban való értékelésükhöz [1. B] ábra].

A megfelelő kontrollgének kijelöléséhez ugyancsak a fenti adatbázisokat használtuk. A konzisztens módon kis variabilitást mutató géneket választottuk ki

(B4GALT3, PUM1 és SLC9A3R2). A PUM1 gén viselkedését más vizsgálatok is megerősítették [18].

Génexpressziós értékek

Az adatok qPCR-eljárással kilenc vizsgált és három kontrollgén alapján keletkeztek. Ezt követően a PAM szoftver segítségével a grade 1 és 3 esetek alapján (training set) szétválasztottuk a grade 2 tumorokat a túlélés szerint ($p = 0,095$).

Tovább finomítottuk az elemzést a klinikailag rossz prognózisú (12 hónapról hamarabb kiújuló) grade 1 (hat eset) és jó prognózisú (120 hónap után sem recidiváló) grade 3-as daganatok (nyolc eset) kihagyásával. A megmaradó grade 1 és 3 tumorokat mint „training set”-et alkalmazva a grade 2-es daganatok jó és rossz prognózisú csoportra voltak oszthatóak ($p = 0,016$) [2. B) ábra].

A meghatározott géneket expressziójuknak megfelelően újabb rangsorolásnak vetettük alá, majd ezt centroid ploton ábrázoltuk [2. C) ábra]. A két kulcsszerepet játszó gén a FOXM1 és a TOP2A volt a CLDN4 mellett. Ennek megfelelően e háromgénés kifejeződési mintázat segítségével újra elemeztük az expresszió és a betegségmentes túlélés viszonyát. A grade 2 tumorok szétválasztását ezen gének működése hajtotta, és hárman elégségesek voltak ahhoz, hogy a csoportot egy jó és egy rossz prognózisú alcsoportra bontsák ($p = 0,017$) [2. D) ábra].

Megbeszélés

Jelen vizsgálat célja a szövettanilag grade 2 emlőtumorok alacsonyán és jól differenciált csoportokba való sorolása volt. Microarray-alapú adatbázisokat használva bioinformatikai elemzéssel választottuk ki a vizsgált géneket. Ezek expresszióját vizsgáltuk qPCR-módszerrel 249, formalinban fixált és paraffinba ágyazott invazív emlőcarcinoma-mintán. Eredményeink alapján a közepesen differenciált emlőtumorok egy jobb és egy rosszabb prognózisú alcsoportba sorolhatóak, amelyet a vizsgált gének expressziója és a betegek relapsusmentes túlélése alapján állapítottunk meg.

A genomikai grade index (GGI) génkifejeződési mintázat, amely 97 sejtproliferációval kapcsolatos gént vizsgál cDNS-microarray felhasználásával. Segítségével a grade 2 tumorok feloszthatók alacsony és magas rizikójú csoportokba [9]. Kereskedelmi változata elérhető, azonban csak fagyasztott tumorokon alkalmazható. A közelmúltban egyes vizsgálatok PCR-alapú tesztek kifejlesztésére koncentráltak, és ezen gének számát is csökkenteni igyekeznek [19, 20]. Az általunk bevezetett eljárás ugyancsak PCR-alapú, azonban mindössze három gén együttese – a claudin-4 (CLDN4), a forkhead box protein M1 (FOXM1) és a topoizomeráz II alfa (TOP2A) – vizsgálatával képes a jó és rossz prognózisú csoportokat elválasztani.

A TOP2A a DNS-replikáció és -repair egyik kulcsenzime, az antraciklinalapú terápiák fő célpontja [21, 22, 23]. Génje a HER2 mellett, a 17-es kromoszóma rövid karján található (17q21). A gén amplifikációja nem jár minden esetben együtt a fehérje túltermelésével [20], az RNS- és fehérjeszintek pontosabban korrelálnak a betegség kimenetelével [23]. A FOXM1 jól ismert humán protoonkogén, „upregulációja” több szolid tumorban, így emlőrákban is megfigyelhető. Fontos mediátor szerepet tölt be az ösztrogén jelátviteli utak szabályozásában, deregulációja hozzájárulhat az endokrin terápiával szemben mutatott érzéketlenséghez [19]. A CLDN4 sejtkapcsoló molekula, amely a sejtmembrán apicalis oldalán levő tight junction felépítésében tölt be szerepet [24]. Ez a család legrobustusabban expresszált tagja, így vizsgálata során számos tanulmány több megbetegedésben prognosztikus információt tudott hozzá párosítani [15, 25]. A Peroumunkacsoport által leírt claudin-low altípus egyik markere [26]. A TOP2A és FOXM1 leginkább az osztódási aktivitás és magi morfológia, a CLDN4 pedig talán a ductusok kialakulásának oldaláról képes a grade-et reprezentálni.

A malignus emlődaganatok két, egymástól prognosztikai és prediktív jellemzők alapján legjobban elkülönülő csoportját az ösztrogénreceptor- (ER-) pozitív és negatív daganatok adják, emellett azonban a tumorok differenciáltsága is fontos tényező. Az általunk bevezetett módszer segítségével a grade 2 tumorok jobb és rosszabb prognózisú alcsoportokba voltak oszthatóak az ER-státustól és egyéb klinikopatológiai jellemzőktől függetlenül. Ezen módszer további kiterjesztett validációját követően fontos szerepet játszhat az adjuváns kemoterápia szükségességének megítélésében.

Köszönetnyilvánítás

Köszönet illeti *Jäckel Márta* osztályvezető főorvost, aki a betegek mintáit rendelkezésünkre bocsátotta. *Jaczó Csilla* oadaadó munkájának köszönhetően valósult meg a minta- és adatgyűjtés. *Azumab Erzsébet* segítségét köszönjük a minták feldolgozásában.

A vizsgálatot finanszírozó adatai: *Szöllős András Péterné* hagyatéka, OTKA-PD83154, ETT-088/2009, TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0001, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0013 és MTA-2012TKI643 pályázat.

Irodalom

- [1] *Elston, C. W., Ellis, I. O.*: Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 1991, 19, 403–410.
- [2] *Galea, M. H., Blamey, R. W., Elston, C. E., et al.*: The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1992, 22, 207–219.
- [3] *Rakha, E. A., El-Sayed, M. E., Lee, A. H., et al.*: Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 2008, 26, 3153–3158.

- [4] Dalton, L. W., Pinder, S. E., Elston, C. E., et al.: Histologic grading of breast cancer: linkage of patient outcome with level of pathologist agreement. *Mod. Pathol.*, 2000, 13, 730–735.
- [5] Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., et al.: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2000, 406, 747–752.
- [6] Van't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., et al.: Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 2002, 415, 530–536.
- [7] Paik, S., Shak, S., Tang, G., et al.: A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2004, 351, 2817–2826.
- [8] Van de Vijver, M. J., He, Y. D., Van't Veer, L. J., et al.: A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2002, 347, 1999–2009.
- [9] Sotiriou, C., Wirapati, P., Loi, S., et al.: Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2006, 98, 262–272.
- [10] Ignatiadis, M., Sotiriou, C.: Understanding the molecular basis of histologic grade. *Pathobiology*, 2008, 75, 104–111.
- [11] Ivshina, A. V., George, J., Senko, O., et al.: Genetic reclassification of histologic grade delineates new clinical subtypes of breast cancer. *Cancer Res.*, 2006, 66, 10292–10301.
- [12] Carter, S. L., Eklund, A. C., Kohane, I. S., et al.: A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat. Genet.*, 2006, 38, 1043–1048.
- [13] Szasz, A. M., Li, Q., Eklund, A., et al.: The CIN4 chromosomal instability qPCR classifier defines tumor aneuploidy and stratifies outcome in grade 2 breast cancer. *PLoS One*, 2013. Doi: 10.1371/journal.pone.0056707
- [14] Miller, L. D., Smeds, J., George, J., et al.: An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102, 13550–13555.
- [15] Kulka, J., Szasz, A. M., Nemeth, Z., et al.: Expression of tight junction protein claudin-4 in basal-like breast carcinomas. *Pathol. Oncol. Res.*, 2009, 15, 59–64.
- [16] Szasz, A. M., Nemeth, Z., Gyorffy, B., et al.: Identification of a claudin-4 and E-cadherin score (CURIO) to predict prognosis in breast cancer. *Cancer Sci.*, 2011, 102, 2248–2254.
- [17] Tibshirani, R., Hastie, T., Narasimhan, B., et al.: Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 6567–6572.
- [18] Lyng, M. B., Laenkholm, A. V., Pallisgaard, N., et al.: Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. *BMC Cancer*, 2008, 8, 20.
- [19] Toussaint, J., Sieuwerts, A. M., Haibe-Kains, B., et al.: Improvement of the clinical applicability of the Genomic Grade Index through a qRT-PCR test performed on frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *BMC Genomics*, 2009, 10, 424.
- [20] Ma, X. J., Salunga, R., Dahiya, S., et al.: A five-gene molecular grade index and HOXB13:IL17BR are complementary prognostic factors in early stage breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2008, 14, 2601–2608.
- [21] Järvinen, T. A., Holli, K., Kuukasjärvi, T., et al.: Predictive value of topoisomerase II alpha and other prognostic factors for epirubicin chemotherapy in advanced breast cancer. *Br. J. Cancer*, 1998, 77, 2267–2273.
- [22] Järvinen, T. A., Tanner, M., Rantanen, V., et al.: Amplification and deletion of topoisomerase II alpha associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. *Am. J. Pathol.*, 2000, 156, 839–847.
- [23] O'Malley, F. P., Chia, S., Tu, D., et al.: Topoisomerase II alpha and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2009, 101, 644–650.
- [24] Tsukita, S., Furuse, M.: The structure and function of claudins, cell adhesion molecules at tight junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2000, 915, 129–135.
- [25] Blanchard, A. A., Skliris, G. P., Watson, P. H., et al.: Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. *Virchows Arch.*, 2009, 454, 647–656.
- [26] Herschkowitz, J. I., Simin, K., Weigman, V. J., et al.: Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.*, 2007, 8, R76.

(Szász A. Marcell dr.,
Budapest, Üllői út 93., 1091
e-mail: cac@korb2.sote.hu)

ÁLLÁS

Észak-Németországban újonnan megnyíló rendelőnkbe németül jól beszélő

**ÁLTALÁNOS BELGYÓGYÁSZ, ANGIOLÓGUS, BŐRGYÓGYÁSZ, HÁZIORVOS,
KARDIOLÓGUS ÉS TUDÓGYÓGYÁSZ**

kollégákat keresünk korrekt fizetési feltételekkel.

A diploma honosításához minden segítséget megadunk.

E-mail: edit.zaborszky@gmx.de