

KARLOVA UNIVERZITA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOCHEMIE



Přírodovědecká fakulta
UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE



Vliv zinečnatých iontů na kancerogenezi nádorů prsu

**The effect of zinc ions on breast tissue
cancerogenesis**

Rigorózní práce

Mgr. Monika Kratochvílová

Praha 2016

Abstrakt

Karcinom prsu je pojem, který zahrnuje řadu závažných onemocnění. Jedná se o jedno z nejčastějších nádorových onemocnění u žen celosvětově. Mezi nejproblematictější podtypy se řadí trojitě negativní karcinom prsu. Tento typ je charakteristický ztrátou exprese hormonálních receptorů a HER-2 a tudíž neodpovídavostí na dostupnou cílenou léčbu. Karcinom prsu, tak jako jiné malignity, má vztah k zinečnatým iontům. Zinek je esenciální prvek a je zapojen do mnoha významných buněčných dějů a tak může přímo i nepřímo ovlivňovat karcinogenezi. U karcinomu prsu bylo popsáno zvýšení obsahu zinku v maligní prsní tkáni oproti tkáni zdravé. Ale zinek má dokumentovány také antikancerogenní vlastnosti. Cílem této studie bylo popsat, zda zvýšená suplementace zinkem významně ovlivní rozvoj karcinomu prsu *in vivo*. Jako model byla zvolena buněčná linie 4T1 charakterizující trojitě negativní karcinom prsu u *mus musculus* a kmen myši BALB/c. Celková dávka podávaného zinku byla 0,15 mg/kg. Sledován byl nejen růst a rozvoj tumoru, ale také exprese vybraných genů a antioxidační kapacita organismu. Velikost primárního tumoru byla významně ovlivněna suplementací zinkem, ale efekt na rozvoj metastáz prokázán nebyl. Zinek tedy může ovlivnit rozvoj karcinomu prsu, ale pouze v časných fázích karcinogeneze.

Klíčová slova: karcinom prsu, zinek, metalothionein, 4T1, trojitě negativní karcinom prsu

Abstract

The concept of breast cancer describes a wide range of serious diseases. It is one of the most common cancer diseases among women worldwide. The most difficult and problematic subtype is the triple negative breast cancer. This subtype is characteristic by the loss of expression of hormone receptors and HER-2, which makes it unresponsive to available targeted therapy. The breast cancer, as well as other malignancies, has a relationship with zinc ions. Zinc is an essential element and it is involved in many of important cellular processes and thus it is able to directly or indirectly affect the cancerogenesis. Increased levels of zinc ions in malignant breast cancer tissue compared to healthy tissue were well described. However, zinc has documented anticancer properties. The aim of this study was to determine if excessive supplementation with zinc ions has an effect on breast cancer development *in vivo*. The cell line 4T1 was chosen as a model of the triple negative subtype in *mus musculus*. The mouse strain BALB/c was used as an animal model. A total dose of zinc sulphate per one gram of mouse weight used in the experiment was 0.15 mg. We determined not only the growth of primary tumour, but also an expression levels of selected genes and antioxidant capacity of the whole organism. The volume of primary tumour was significantly affected by the zinc supplementation, but it had no effect on the metastasis development. Zinc is able to influence the breast cancer tumourigenesis, but probably only in the early stages.

Keywords: breast cancer, zinc, metallothionein, 4T1, triple negative breast cancer

Poděkování:

Na tomto místě děkuji doktorce Martině Raudenské za rady a připomínky k práci. Děkuji také inženýrce Markétě Svobodové a dalším spoluautorům za spolupráci na přípravě výsledků a publikace.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně s použitím uvedených podkladů a zdrojů v literatuře. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

.....

Monika Kratochvílová

Obsah

ABSTRAKT	7
ABSTRACT.....	8
OBSAH.....	6
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
1. ÚVOD	12
1.1. KARCINOM PRSU.....	12
1.2. DĚLENÍ KARCINOMU PRSU NA JEDNOTLIVÁ ONEMOCNĚNÍ.....	14
1.2.1. <i>Trojité negativní karcinom prsu</i>	<i>17</i>
1.2.2. <i>Model pro experimenty.....</i>	<i>20</i>
1.3. ZINEK A MALIGNÍ TRANSFORMACE	21
1.4. ZINEK A KARCINOM PRSU.....	24
2. CÍLE PRÁCE	27
3. PRAKTICKÁ ČÁST	28
3.1. MATERIÁL A METODY	28
3.1.1. <i>Kultivace/pasážování buněčných linií</i>	<i>28</i>
3.1.2. <i>Stanovení počtu buněk v suspenzi.....</i>	<i>29</i>
3.1.3. <i>Krátkodobý zinkový treatment 4T1 linie</i>	<i>30</i>
3.1.4. <i>MTT test</i>	<i>30</i>
3.1.5. <i>Proliferační a růstový test v reálném čase založený na impedanci</i>	<i>31</i>
3.1.6. <i>Izolace RNA</i>	<i>31</i>
3.1.7. <i>Kontrola čistoty RNA a stanovení její koncentrace</i>	<i>32</i>
3.1.8. <i>Reverzní transkripce.....</i>	<i>33</i>
3.1.9. <i>Kvantitativní PCR v reálném čase.....</i>	<i>33</i>
3.1.10. <i>Indukce tumorů a suplementace zinkem.....</i>	<i>34</i>
3.1.11. <i>Příprava tkáňových vzorků</i>	<i>35</i>
3.1.12. <i>Elektrochemická detekce zinečnatých iontů.....</i>	<i>35</i>
3.1.13. <i>Elektrochemická detekce metalothioneinu</i>	<i>36</i>
3.1.14. <i>Analýza celkového obsahu sulfidových skupin</i>	<i>36</i>
3.1.15. <i>Statistické metody.....</i>	<i>36</i>
4. VÝSLEDKY	37
4.1. <i>IN VITRO EFEKTY NA LINII 4T1.....</i>	<i>37</i>
4.1.1. <i>Viabilita</i>	<i>37</i>
4.1.2. <i>Genová exprese.....</i>	<i>38</i>

4.2.	ZVÍŘECÍ MODEL	38
4.2.1.	<i>Hmotnost zvířat</i>	38
4.2.2.	<i>Velikost tumoru</i>	39
4.2.3.	<i>Genová exprese</i>	40
4.2.4.	<i>Analýza sulfidických skupin, MT proteinu a hladiny zinku</i>	41
5.	DISKUZE	43
6.	ZÁVĚR	46
7.	PUBLIKACE	48
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:	49
	PŘÍLOHA:	83

Seznam použitých zkratk

Akt	„Akt“ odkazuje na označení myši pěstovaných Jacobem Furthem a „t“ na spontánní lymfomy thymu (brzlíku), protein kináza; (také protein kináza B)
ALDH1A1	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1 (rodina aldehyd dehydrogenáz, člen A1)
ANOVA	Analysis of variance (analýza rozptylu)
AP-1	Activator protein 1 (aktivační protein 1, transkripční faktor)
APC	Adenomatosis polyposis coli (tumor supresorový gen)
AR	Androgenní receptor
ATM	Ataxia telangiectasia mutated, serin/treoninová kináza (mutovaný ataxia telangiectasia)
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR), nebo FRAP-related protein 1 (FRP1); (ataxia telangiectasia a Rad3 asociovaný protein, FRAP asociovaný protein)
BAD	Bcl-2-associated death promoter (s Bcl-2 asociovaný spouštěč smrti)
BALB/c	Inbrední kmen <i>mus musculus</i>
Bax	Bcl-2-associated X protein (proapoptotický protein)
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma 2 (antiapoptotický protein)
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large (antiapoptotický protein)
BRCA1	breast cancer gene 1, breast cancer susceptibility gene/protein 1 (gen karcinomu prsu 1, gen/protein citlivosti karcinomu prsu 1)
BSA	Bovine serum albumin (bovinní sérový albumin)
CD	Cluster of Differentiation (skupina rozlišení)
CDH1	Cadherin 1, epithelial cadherin (epiteliální kadherin)
CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (cyklin dependentní kinázový inhibitor 1B)
cDNA	Komplementární DNA
c-erbB2	(HER-2, HER2/neu, CD340, Neu, ERBB2) Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2, human epidermal growth factor receptor 2 (receptor lidského epidermálního růstového faktoru)

CK	Cytokeratin
c-kit	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase (receptorová tyrozin kináza)
DMSO	Dimethyl sulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
EGFR	Epidermal growth factor receptor (receptor epidermálního růstového faktoru)
EMA	(MUC1, Mucin1) Epithelial membrane antigen, antigen membrány epitelu
ER	Estrogenní receptor
Erk1/2	Extracellular-signal-regulated kinase (extracelulárními signály regulovaná kináza)
Fas (CD95)	Apoptosis antigen 1 (APO-1 nebo APT), cluster of differentiation 95 (CD95), nebo tumor necrosis factor receptor superfamily member 6 (TNFRSF6); (apoptotický antigen 1, klastr rozlišování 95, nebo člen super rodiny tumor nekrotizující faktor receptorů)
FBS	Fetální bovinní sérum
GATA	Rodina transkripčních faktorů, charakteristická vazbou k DNA v místech sekvencí „GATA“
Grb7	Growth factor receptor-bound protein 7 (receptor růstového faktoru vazný protein 7)
GSH	Glutation
IC₅₀	Half maximal inhibitory concentration (poloviční inhibiční koncentrace)
JNK	c-Jun N-terminal kinase (c-Jun N-koncová kináza)
LD₅₀	Median lethal dose (střední smrtelná dávka)
MAP3K1	(MEK) Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (mitogeny aktivovaná protein kináza kinázy kinázy)
MAPK	Mitogeny aktivovaná protein kináza
Mdm2	Mouse double minute 2 homolog (homolog myšního dvojité minuty proteinu, double minute je označení pro nejadernou DNA)

MMP-9	Matrix metalloproteinase 9, matrix metalloproteinase-9 (matrix metaloproteináza 9)
MRE	Metal responsive element (na kovy odpovídající prvek)
MSH3	MutS Homolog 3 (homolog bakteriálního mismatch opravného proteinu)
MT	Metallothionein
MTF-1	Metal regulatory transcription factor 1 (kovy regulující transkripční faktor)
mTOR	Mammalian target of rapamycin (savčí cíl rapamycinu)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
Nf-κB	Nukleární faktor kappa B
NGFR	Low-affinity Nerve Growth Factor Receptor (receptor pro neuronální růstový faktor s nízkou afinitou)
p21Cip1/WAF1	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (inhibitor cyklin dependentních kináz 1)
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase (poly ADP-ribóza polymeráza)
PBS	Phosphate-buffered saline (fosfátový pufr)
PCR	Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát 3-kináza)
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha (fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát 3-kináza, katalytická podjednotka alfa)
PR	Progesteronový receptor
PTEN	Phosphatase and tensin homolog, nebo phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase (homolog fosfatázy a tenzinu, nebo fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát 3-fosfatáza)
RAD17	Cell Cycle Checkpoint Protein (protein kontrolního bodu buněčného cyklu)
RAD50	DNA repair protein
RB1	Retinoblastoma protein
RING	Really interesting new gene (opravdu zajímavý nový gen, doména se zinkovými prsty)

ROS	Reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
RT-PCR	Real time – polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce v reálném čase)
SLC30A	Solute carrier family 30 (rodina nosičů rozpuštěné látky)
SOD	Superoxid dismutáza
STAT1	Signal transducers and activators of transcription (signální přenašeče a aktivátory transkripce)
STK11/LKB1	Serin-threoninová kináza 11
TNFR	Tumor necrosis factor receptor (receptor pro tumor nekrotizující faktor)
TNFα	Tumor necrosis factor α (tumor nekrotizující faktor α)
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor (vaskulární endoteliální růstový faktor receptor)
VIM	Vimentin
Wnt-5a	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A (signální lipidické glykoproteiny)
XRCC4	X-ray repair cross-complementing protein 4 (protein zapojený do DNA oprav)
ZIP	Zinc transporter precursor (prekurzor zinkového přenašeče)
ZnT	Zinc transporter (zinkový přenašeč)

1. Úvod

1.1. Karcinom prsu

Zdravá prsní tkáň je tvořena kanálky a laloky lemovanými dvěma vrstvami buněk. Vnitřní, neboli luminální buněčná populace, spolu s vnější vrstvou buněk, která je přilehlá k bazální membráně [1, 2]. Jednotlivé vrstvy mohou být rozlišeny pomocí imunofenotypu a několika dalších markerů. Luminální epiteliální buňky exprimují nízkomolekulární luminální cytokeratiny CK7, CK8, CK18, CK19 a markery jako MUC1 alfa-6 integrin, Bcl-2, estrogení receptor, progesteronový receptor, GATA3 a epiteliální adhezni molekuly [3].

Vnější vrstva buněk je morfologicky a imunofenotypicky heterogenní a její vlastnosti závisí na konkrétní lokalizaci a hormonálním statusu tkáně. Buňky mají vlastnosti epitelu i hladkého svalu a jsou proto nazývány myoepiteliálními. Obvykle exprimují vysokomolekulární bazální cytokeratiny, CK5, CK14, CK17 a aktin hladké svaloviny SMA, těžký řetězec myosinu, calponin, caldesmon, p63, β 4 integrin, laminin, maspin, CD10, P-cadherin, calveolin1, NGFR a další [4-12]. Myoepiteliální buňky jsou obvykle negativní na luminální CK, epiteliální membránový antigen EMA, desmin, estrogení receptor a progesteronový receptor [13-23]. Myoepiteliální buňky jsou nazývány také bazální, což odkazuje na buněčnou populaci, která je přilehlá k bazální membráně a exprimuje bazální CK [21, 24].

Karcinom prsu je jedním z nejčastějších nádorových onemocnění, každý rok je zaznamenáno více než 1 300 000 případů a 450 000 úmrtí celosvětově [25]. Je to druhá nejčastější příčina úmrtí v důsledku maligního onemocnění u žen [26] a to i přes zlepšení diagnostických technik a rozšíření terapeutických možností [27, 28]. Klinicky se jedná o heterogenní onemocnění, dělené podle různých kritérií do mnoha skupin. Každá z podskupin má odlišné vlastnosti a jinou odpověď na léčbu. V odpovědi na léčbu se mohou jednotlivé tumory lišit, i když mají zjevně homogenní morfologii [29]. Primární karcinom prsu může být lokálně léčen chirurgicky, obvykle ale několik málo buněk nádorové tkáně není zachyceno a ty jsou následně zdrojem vzniku metastáz a to i po terapii. Mezi další možnosti terapie patří ozařování, hormonální terapie nebo chemoterapie [26].

Bylo stanoveno, že až 30 % pacientů s negativními uzlinami a ještě větší část s pozitivními uzlinami vyvine vzdálené metastázy i přes standardní léčbu [30, 31]. Vzdálené rekurentní metastázy jsou i přes současné pokroky v terapii nádorových

onemocnění považovány za nevyléčitelné. Diseminace karcinomu prsu není náhodná, jedná se o organotropní kontrolovaný proces [32]. Rozvoj tumoru z brzké předneoplastické léze, přes invazivní karcinom, až po klinicky detekovatelné vzdálené metastázy je evolučním procesem, který zahrnuje genetické a epigenetické změny u původních nádorových buněk. Musí být ovlivněny samotné buňky i nádorové stroma, aby byl umožněn rozvoj vzdálených metastáz. Pravděpodobnost, že cirkulující nádorové buňky uvolněné z primárního tumoru vytvoří metastatickou kolonii ve vzdáleném orgánu nebo tkáni, je extrémně nízká. Většina buněk, které opustí tumor, zahyne. Často nemají schopnost přežít ve volné cirkulaci, nebo proniknout do cizích tkání [33, 34]. Data z preklinických studií na animálních modelech ukazují, že pouze méně než 0,02 % cirkulujících nádorových buněk je schopných přežít a vytvořit metastáze [35]. Nejčastějším místem metastázování karcinomu prsu jsou kosti, plíce, játra a mozek [36, 37]. Pacienti s osamocenými lézemi přežívají déle, než ti s mnohočetnými [38]. ER pozitivní (luminální) tumory často metastazují do kostí, zatímco ER negativní tumory metastázy vyvíjejí rychleji a do vnitřních orgánů [36, 38-40]. Pacienti pozitivní na HER-2 častěji metastazují do mozku, jater a plic [41].

Karcinom prsu je, jako jiná nádorová onemocnění, spojován s mutacemi v genech zapojených do důležitých regulačních mechanismů. Mezi nejdiskutovanější mutované geny u karcinomu prsu patří *BRCA1*.

Zárodečné mutace v *BRCA1* a *BRCA2* spolu s několika dalšími variantami zahrnují pouze pětinu případů karcinomu prsu vyskytujících se familiárně. To dokazují dvě populační studie, kde pouze 15 % případů karcinomu prsu v rodinách s případy postižených sester a matek bylo spojeno s mutacemi v *BRCA1* a *BRCA2* [42, 43]. Mezi všemi případy karcinomů prsu čítají pouze méně než 5 %. Ženy, které nesou tuto mutaci, mají celoživotní riziko incidence karcinomu prsu 60 – 80 % [44, 45]. Penetrance této mutace je asi 36 % [46]. Rodinná anamnéza ale zůstává hlavním prediktivním faktorem pro riziko karcinomu prsu i u rodin bez mutací *BRCA1* a *BRCA2* [47]. Medián věku diagnostikovaných žen s touto mutací je 42 let, což je více než o 20 let dříve, než u žen neselektovaných sledováním této mutace [48]. *BRCA1* mutace jsou nalézány častěji u žen s několika primárními tumory různých typů, které mají jak osobní, tak rodinnou anamnézu karcinomu prsu [49].

BRCA1 je tumor supresorový gen kódující jaderný protein, který obsahuje mimo jiné zinek vázající RING doménu [50] a působí jako transkripční koaktivátor [51]. Spouští transkripci hlavně p53 responzivních genů, včetně *p21* a *BclX* [52, 53]. *BRCA1* se váže

k BRCA2, p53, RAD51 a dalším faktorům zapojeným do regulace buněčného cyklu a odpovědi na DNA poškození [54, 55]. BRCA1 je zapojen také do diferenciaci prsních epitelálních buněk a proto může jeho deaktivace vést k rozvoji tumorů s fenotypem kmenových buněk [56, 57]. BRCA1 reguluje také dráhy estrogenního receptoru [58]. Nefunkční BRCA1 může mít roli v rozvoji nejen dědičného, ale i sporadického karcinomu prsu.

Buněčná proliferace je klíčovým faktorem karcinogeneze. U karcinomu prsu je popsáno několik různých procesů, které regulují buněčné dělení. Zvýšená exprese c-erbB2(HER-2/neu) membránového proteinu patřícího mezi tyrozinkinázy je asociována s aktivací signálních drah, které iniciují buněčný cyklus a diferenciaci buněk [59-61]. Další faktory asociované s buněčným dělením u buněk karcinomu prsu jsou mutovaný p53 [62, 63], P-glykoprotein [64], DNA-topoisomeráza II-alfa [65], kathepsin D [66] a telomerázová aktivita [67]. S úrovní proliferace nádorových buněk karcinomu prsu souvisí i snížená exprese Bcl-2 a BRCA1 [63, 68, 69].

Další geny spojené s karcinomem prsu jsou *STK11/LKB1* serin-threoninová kináza, fosfatáza atenzin homolog *PTEN*, androgenní receptor, *ATM* [70], nebo *PIK3CA*, *AKT1*, *GATA3*, *CDH1*, *RBI*, *MAP3K1* a *CDKN1B* [25].

1.2. Dělení karcinomu prsu na jednotlivá onemocnění

Diagnóza karcinomu prsu není pouze jediné onemocnění. Bylo popsáno mnoho podtypů a podskupin dle různých kritérií. Autoři publikací se liší v klasifikaci tohoto nádorového onemocnění a je jasné, že s novými poznatky budou data znovu upravována.

Klinická léčba karcinomu prsu spoléhá na tradiční prognostické a prediktivní faktory včetně histologie, klinických a biologických znaků, jako je exprese receptorů hormonů, nebo lidského epidermálního růstového faktoru 2 (HER-2) [71]. Podle těchto kritérií se karcinomy prsu klinicky dělí do tří hlavních skupin na základě buněčných markerů, které odpovídají dostupným cíleným léčbám. První skupina je pozitivní na estrogenní, nebo progesteronový receptor. Druhá skupina je pozitivní na lidský epidermální růstový faktor receptor 2 (HER-2) a má amplifikovaný erbB2. Tato skupina může, ale nemusí být pozitivní na receptory hormonů. Třetí skupina je trojitě negativní (viz další kapitola). Cílené terapie jsou dostupné pouze pro první dvě skupiny [72].

Skupina pozitivní na estrogenní receptor (ER) je nejčetnější a zahrnuje nejvíce podtypů [25]. Několika genetickými testy lze předpovědět pozitivitu na expresi receptoru

a odpovídavost na endokrinní terapii [73, 74]. Úspěšným léčivem v tomto případě je například tamoxifen. Tumory ale často mohou získat rezistenci k těmto látkám a onemocnění progreduje [75]. ER pozitivní tumory neexprimují pouze receptor, ale ve zvýšené míře i geny, které jsou jím aktivovány a které jsou typické pro lumenální epiteliální buňky prsu.

Skupina s amplifikovaným HER-2 (erbB2) [76] může být efektivně léčena díky terapeutickému zacílení HER-2 [25] protilátkou trastuzumab [77]. HER-2 je členem rodiny membránových receptorů spojených s tyrozin kinázami (HER-1 – HER-4) [77]. Gen je amplifikován v 15 – 20 % případů karcinomu prsu.

Klasifikace karcinomu prsu je prováděna také podle podobností v jejich genové expresi [77]. Expresní profily jsou stanovovány hierarchickou klastrovou analýzou. Do klastrů jsou sestaveny případy podle podobné exprese skupin genů. Profil exprese skupin genů se liší více u různých typů onemocnění, než u vzorků s tumory typu stejného. Na základě několika studií může být onemocnění karcinomem prsu rozděleno nejméně do 5 odlišných molekulárních podtypů [78-82]. Základní rozdělení je na dvě hlavní skupiny, estrogenní receptor pozitivní a estrogenní receptor negativní. Tyto skupiny mohou být potom dále děleny na klinicky i biologicky relevantní podtypy.

Estrogenní receptor pozitivní podtyp je díky svému expresnímu profilu podobnému lumenálním buňkám nazýván lumenální. Dvě podskupiny *lumenální A* a *lumenální B* jsou členěny podle genů a drah regulujících proliferaci a nebo HER-2 [80, 83, 84].

Lumenální A tumory jsou citlivé k endokrinní terapii. Exprimují ER a/nebo PR a nemají amplifikovaný HER-2. Lumenální B tumory jsou pozitivní na ER a/nebo PR i na amplifikaci HER-2.

Estrogenní receptor negativní tumory jsou rozděleny do tří větších skupin. Jedna vykazuje amplifikaci HER-2, další je podobná bazálním buňkám a třetí jsou normálnímu prsu podobné tumory.

HER-2 pozitivní tumory exprimují vysoké hladiny genů vyskytujících se v *HER-2* amplikonu, včetně HER-2 a proteinu vázaného k receptoru růstového faktoru 7 (GRB7). Mají také vysoké hladiny aktivovaného Nf-κB a transkripčního faktoru GATA4 a neexprimují GATA3 [85, 86]. Tyto tumory mohou být zacíleny monoklonálními protilátkami proti HER-2, nebo HER-2 tyrozin kinázovými inhibitory.

Bazálním buňkám podobné tumory neexprimují ER a HER-2 ani geny odpovídající na signály těchto receptorů [87], ale exprimují geny charakteristické pro

bazální epiteliální buňky prsu [78]. Velká část těchto genů je zapojena do buněčné proliferace, potlačování apoptózy, migrace a invazivity a obecně všech znaků nádorového onemocnění [88, 89]. Zvýšená exprese je popsána u cytokeratinů CK5, CK6, CK14 a CK17, aktinu hladkých svalů, p-cadherinu, c-kit a EGFR [81, 90].

Tento typ karcinomu prsu má největší frekvenci chromozomálních přestaveb, amplifikací a delecí, v porovnání s dalšími typy. Často má vysoký histologický grade a nefunkční dráhy regulované BRCA1. Nejsou funkční také dráhy zapojené do oprav DNA. U téměř 100 % těchto tumorů byla prokázána ztráta lokusu 5q11, který obsahuje geny zapojené do klíčových kontrolních bodů a oprav DNA a také tumor supresorové geny (*MSH3*, *RAD17*, *APC*, *RAD50* a *XRCC4*) [91-93].

Vzhledem k tomu, že většina bazálních buňkám podobných tumorů ztrácí expresi ER, PR a HER-2, jsou proto spojovány se skupinou trojitě negativních karcinomů [94]. Tyto dva podtypy ale nejsou totožné ani podle expresních matic [90, 95]. Podle analýz RNA exprese trojitě negativní karcinomy zahrnují nejen bazálních buňkám podobné tumory, ale také normálnímu prsu podobné [78, 79, 83, 84, 96].

Skupina bazálních buňkám podobných karcinomů prsu popisuje 8 – 20 % všech případů [78, 79, 97-104]. Jedná se o velmi heterogenní skupinu. Buňky mohou mít některé fenotypové vlastnosti charakteristické pro kmenové buňky prsní tkáně. Odpovídá tomu i profil povrchových antigenů, CD44 je exprimována zvýšeně, CD24 exprese je nízká nebo nedekovatelná a zároveň je exprimována aldehyd dehydrogenáza 1 (*ALDH1A1*) [105]. Většinou tento typ tumorů vzniká z buněk lumenálního progenitorového kompartmentu [106, 107]. Tumory obsahují také větší množství buněk procházejících epiteliálně-mezenchymální tranzicí [108].

Většina případů je popisována jako duktální, tubulární smíšená [103], metaplastická [109], nebo medulární [110]. Vyskytuje se u pacientů mladšího věku, buňky jsou polymorfické, mají vysoký poměr jader k cytoplazmě, ztrácí formované tubuly, mají vysoký mitotický index, hojně apoptotické buňky a invadující okraje s centrální nekrotickou tkáně. Tumor také obsahuje metaplastické elementy, jako jsou vřetenovité a dlaždicovité buňky, centrální jizvu, mikrovaskulární proliferaci a stromální lymfocytární odpověď [83, 97, 111-117].

Tumory rostou velmi rychle [118] a agresivně, pacienti mají špatnou prognózu, protože se snadno vyvíjejí lokoregionální i distální metastázy. Metastázy vznikají nejčastěji v mozku a plicích [101, 119, 120], méně často v kostech a játrech [57, 113, 115, 121, 122]. Typická je krátká doba přežití a vysoká mortalita [80, 102, 103, 112,

113, 123]. Tyto karcinomy mohou odpovídat na specifické terapeutické postupy a inhibitory poly(ADP-ribóza)polymerázy (PARP).

Normálnímu prsu podobné karcinomy prsu připomínají zdravou prsní tkáň s relativně vysokou expresí mnoha genů charakteristických pro adipoidní buňky a další neepiteliální buněčné typy. Mají také nízkou expresi genů lumenálních epiteliálních buněk [3].

Medulární karcinom prsu je vzácný podtyp, který se vyskytuje v méně než 1 % případech [77]. Karcinom je obvykle dobře vymezený, ale histologicky jsou buňky špatně diferencované. Buňky se spojují do splývajících vrstev a tumory mají vysoký grade. Stroma tumoru invaduje do okolní tkáně a obsahuje infiltrované lymfocyty. Prognóza je obvykle dobrá [77].

Metaplastický karcinom je termín, který popisuje heterogenní skupinu tumorů. Jedná se o adenokarcinomy s převažujícími oblastmi vřetenových buněk, dlaždicovitých buněk a buněk podléhajících maligní mezenchymální diferenciaci [77].

Všechny tyto podtypy karcinomu prsu mají odlišný klinickopatologický charakter. Liší se prognózou i v terapeutických cílech, které exprimují. Částečně odpovídají histopatologickým skupinám. Nejlepší prognózu nese skupina lumenální A a nejhorší prognózu má obvykle skupina pozitivní na HER-2 a bazální buňkám podobné tumory [78-81, 124].

1.2.1. Trojitě negativní karcinom prsu

Trojité negativní karcinom prsu je definován jako tumor, který neexprimuje ER, PR ani HER-2. Tumory zahrnuté do této skupiny ale mohou obsahovat až 10 % buněk, které oba receptory exprimují [77]. Tento typ karcinomu prsu je diagnostikován u 10 – 20 % případů žen s tímto nádorovým onemocněním [77, 78, 125, 126]. Ty mají relativně špatnou prognózu a nemohou být léčeny endokrinní terapií, nebo terapiemi cílenými na receptor pro lidský epidermální růstový faktor typ 2 (HER-2), jako je trastuzumab [77]. Léčba je prováděna pouze dostupnými chemoterapeutiky [25]. Možné terapeutické cíle jsou EGFR, VEGFR a mTOR. Dále se uvažuje o inhibici PARP. Protože trojitě negativní karcinomy nejsou poháněny hormonálními receptory ani HER-2/neu, je pravděpodobné, že se do popředí dostávají jiné signální dráhy [127].

Trojité negativní karcinom má vysoký grading [3, 128]. Objevuje se také zvýšený počet mitotických buněk, vysoký poměr jader k cytoplazmě, centrální nekróza, časté

apoptotické buňky a invadující okraje. Histologicky se jedná o ductální karcinomy, ale vyskytují se i tubulární, smíšené, medulární, nebo metaplastické [129]. Tak jako u bazálních buňkám podobného tumoru.

Trojité negativní a bazálním buňkám podobné fenotypy by mohly být funkčně stejné [130, 131], ale klinická, mikročipová expresní, ani imunohistochemická data to nedokazují. Trojitě negativní karcinom navíc zahrnuje i jiné subtypy [77]. Trojitě negativní tumory tedy nejsou synonymem pro bazálním buňkám podobné tumory [128, 132-134].

U tohoto fenotypu často dochází ke ztrátě heterozygosity genu *BRCA1*, projeví se tak hereditární mutovaná alela [77, 80, 135]. Většina karcinomů prsu asociovaná s *BRCA1* je trojitě negativní [136] a exprimuje bazální CK a další markery exprimované také u tumorů s bazálním buňkám podobným fenotypem (p53, P-cadherin, EGFR) [56, 80, 135, 137-141]. Nefunkční *BRCA1* a jeho dráhy jsou spojeny se specifickou chybou v opravách DNA. Zvýšená exprese EGFR je zde častější než u ostatních typů [77]. Hojně dochází i ke změnám u *PTEN* [142], což je spojeno s rezistencí k anti-EGFR terapii. Důležitou roli v patogenezi hrají také *HER1/EGFR*, *KIT*, *Ki47*, *p53*, *AKT*, *VEGFR*, poly(ADPribóza)polymeráza 1 (*PARP1*) a *MAP* [90, 125, 143].

Rizikové faktory pro tento podtyp jsou odlišné od těch běžně spojovaných s karcinomem prsu [77]. Riziko mimo jiné roste u žen s vyšším poměrem obvodu pasu a boků, vliv má i kojení, nebo mateřství [144]. Dalším rizikovým faktorem je nadváha, nebo obezita [145]. Spojení může být nalezeno také s metabolickým syndromem (obezita a rezistence k inzulinu) [146, 147]. Dochází ke společnému působení mnoha genetických a sociálních faktorů, které způsobují zvýšené riziko u žen afroamerického, nebo hispánského původu [77, 123]. Hormonální odchylky v průběhu života mohou výrazně ovlivnit případný rozvoj tohoto typu tumoru, který je pak necitlivý k působení hormonů. Riziko se zvyšuje s počtem dětí a nízkým věkem prvního početí, ale kojení naopak riziko snižuje [144]. Bezdětnost snižuje riziko vzniku trojitě negativního karcinomu, ale zvyšuje riziko rozvoje ER pozitivního tumoru [148]. Hormonální antikoncepce užívaná déle než rok je spojena s 2,5 násobným rizikem rozvoje tohoto typu onemocnění [149].

Trojité negativní karcinomy jsou při diagnóze větší než ostatní subtypy a jedná se o invazivní karcinomy bez uzlů, zasaženy bývají i lymfatické uzliny [150-153]. Jsou popisovány jako intervalové karcinomy, tedy ty, které se rozvinou mezi dvěma preventivními kontrolami. Slabý je vztah mezi velikostí primárního tumoru a pravděpodobností přežití [151, 154]. Karcinom má horší prognózu než luminální

tumory. Tumory se vyskytují u mladých žen a rostou velmi rychle a agresivně [77, 155]. Výrazný pokles v době přežití je během prvních 3 – 5 let po diagnóze, ale vzdálený relaps je méně častý [150, 151, 153, 156, 157]. Zvýšená je incidence metastáz oproti jiným typům [151]. Šíří se hematologicky a metastazují s největší pravděpodobností do mozku a plic [158]. Důležité prognostické faktory jsou status uzlin, velikost tumoru a přítomnost exprese androgenního receptoru [134].

Na transkripční úrovni se i v případě trojitě negativního karcinomu prsu jedná o heterogenní skupinu, bylo identifikováno několik dalších podtypů [131, 159-161]. Jedná se o fenotyp, který zahrnuje tumory s buňkami podobnými bazálním i normálním a na claudin chudé molekulární podtypy. Skládá se z dalších 6 skupin, které mají unikátní biologii a odpovídají na různou terapii [162].

Dva podtypy jsou podobné bazálním buňkám. Jeden má zvýšenou pouze expresi genů pro odpověď na DNA poškození a regulaci buněčného cyklu (BL1). Druhý podtyp má zvýšenou i expresi drah odpovídajících na růstové faktory a myoepiteliálních markerů (BL2). Oba mají zasaženy dráhy, které zahrnují regulaci buněčného cyklu a odpovědi na DNA poškození (ATR, BRCA), což významně urychluje proliferaci buněk [159].

Další dva podtypy jsou mezenchymální se zvýšenou expresí genů spojených s diferenciací buněk a signálování růstových faktorů (M a MSL). Obsahují genové klastry ovlivňující buněčnou pohyblivost, interakce s extracelulární matrix, epiteliálně mezenchymální tranzici a signály spojené s růstovými faktory [163].

Imunomodulační podtyp (IM) je ovlivněn procesy imunitních buněk. Imunomodulační podtyp je spojen se zvýšenými aktivitami drah T a B buněk, NK buněk a dendritických buněk. Nadprůměrné jsou i signály pro prezentování antigenu, cytokiny, Nf- κ B, JAK/STAT a TNF. Luminální androgenní podtyp (LAR) je charakteristický androgenním signálováním. Luminální androgenní podtyp je nejvíce odlišný, exprimuje signální dráhy spojené s hormonálními receptory ER a AR [164].

1.2.2. Model pro experimenty

Xenograftové modely, kde jsou lidské nádorové buňky aplikovány do imunodeficientních myší, se hojně využívají pro studium růstu tumorů a metastázování a pro validaci specifických genů jako cílů pro léčiva v nádorové terapii. Lidské xenograftové modely jsou většinou schopné tvorby primárního tumoru, ale tvorba metastáz bývá omezená [165-167]. Lidské nádorové buňky obvykle metastazují v myších jen obtížně a často se jedná o metastázy netypické pro dané onemocnění. Naopak u myších nádorových modelů dochází k efektivnější tvorbě metastáz a charakteristiky jsou podobné těm pozorovaným u pacientů s daným maligním onemocněním [168].

4T1 prsní nádorová buněčná linie byla původně izolována skupinou Miller at al. [169, 170]. Jedná se o epiteliální buněčnou linii odvozenou z karcinomu prsu IV. stupně u *mus musculus*. Tumory jsou ER negativní a charakterizují trojitě negativní model lidského karcinomu prsu. Buněčné linii chybí mimo jiné i exprese p53 [171], Wnt-5a a PR [172]. Její využití v poslední době vzrostlo díky schopnosti účinně metastazovat do kostí a dalších orgánů, jako jsou plíce, játra a mozek [173-177]. Metastázy 4T1 tumorů u BALB/c myší jsou doprovázeny rozsáhlou nekrózou a zánětem v místě primárního tumoru a hematopézou u několika orgánů včetně slinivky a jater [178, 179]. Také bylo prokázáno, že tumor dokáže u myší vyvolat zánětlivou odpověď i tvorbu protilátek proti 4T1 antigenům v séru [180].

1.3. Zinek a maligní transformace

Zinek je běžný prvek přítomný v relativně vysokých koncentracích ve všech tkáních v těle i v sekretech. Celkový obsah zinku v těle je 1,4 – 2,3 g [181]. Je uložen v intracelulárních organelách včetně jádra, endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu, endozomů, lyzozomů a mitochondrií [182-184]. Mnohé buněčné typy také obsahují specializované váčky zvané zinkozomy, které ukládají vysoké množství zinku a jsou schopny jej uvolnit po stimulaci [185, 186]. Zinek má mnoho významných funkcí u savčích buněk a je zásadním mikronutrientem jako esenciální prvek, který je součástí velkého počtu metaloproteinů v lidském těle [187-189]. Zapojuje se do jejich strukturní a regulační funkce [190]. Zinečnaté ionty interagují se zinek vázajícími motivy, jako například se zinkovými prsty, a působí jako kofaktor několika stovek enzymů asi v 50 třídách [189, 191-195]. Mnoho transkripčních faktorů obsahuje domény se zinkovými prsty, které jim usnadňují vazbu k DNA [196, 197]. A zinečnaté ionty se také specificky vážou k různým membránovým receptorům, transportérům a kanálům a ovlivňují tak jejich aktivitu [198]. Samotné zinečnaté ionty mohou navíc fungovat i jako intracelulární druhý posel [199].

Zinek hraje důležitou roli při metabolismu nukleových kyselin, proteinů i karbohydrátů, stejně jako při replikaci a obnově tkáně. Je přítomný v matrixmetaloproteinázách (MMP) a rodině endopeptidáz, které regulují remodelaci tkání [200-202]. MMP kontroluje proteolýzu extracelulární matrix a dalších proteinů, což umožňuje pohyb buněk prostorem. Štěpí také adhezní molekuly a mezibuněčné spoje. Aktivace MMP umožňuje migraci a invazivitu nádorových buněk [203].

Zinek je nezbytný pro DNA syntézu, RNA transkripci, buněčné dělení i aktivaci buněk [204]. Obsahují jej proteiny kontrolující opravy poškození DNA [204-207]. Je zapojen do regulace buněčného růstu [208, 209] a smrti a tak chrání buněčný růst, včetně růstu neoplastických buněk [210]. Proto byl studován také vliv nedostatku zinku v dietě na metabolismus buněk zdravých i nádorových [208, 211].

Nedostatek zinku způsobuje poruchy buněčných dějů a apoptózu u různých buněčných typů [212-223]. Apoptóza vyvolaná nedostatkem zinku je závislá na mitochondriích a formaci apoptozomu. Nízké hladiny zinku zvyšují přítomnost hypo-fosforylovaných forem AKT a ERK, což umožňuje translokaci BAD na mitochondrii a následnou BAX a BAD řízenou buněčnou smrt [224]. Podmínky s nedostatkem zinku mohou také přímo aktivovat kaspázy [225]. Dochází ke kolapsu potenciálu vnitřní mitochondriální membrány a následné aktivaci kaspázy 3 [226], což

naznačuje, že zinek také reguluje aktivitu kaspáz [227-229]. Nedostatek zinku může způsobit oxidativní poškození lipidů, proteinů i DNA [230-234] a indukuje chromozomální zlomy [235, 236]. Nízké hladiny totiž zvyšují expresi p53, ale zabraňují jeho schopnosti vázat se k DNA [237]. Naopak zinek dokáže i potlačit proces apoptózy interakcí s několika molekulami u různých buněčných typů [238-240].

Zinek je asociován nejen s maligními onemocněními, ale i s různými patologickými poruchami, jako je nedostatečná imunita, poškozený růst, poruchy vývoje mozku a špatné hojení ran [241-243].

Zinečnaté ionty mají důležitou roli antioxidantů a brání účinkům volných radikálů na buňku [244, 245]. Zinek spolu s mědí mají důležitou roli jako kofaktory superoxid dismutázy (SOD) [246]. SOD odstraňuje superoxidový radikál [222]. Tento enzym chrání buňky před účinky volných radikálů a před faktory, které způsobují jejich vznik (ionizující záření, antibiotika, protinádorová léčiva) [247-249]. Zinek dokáže vyvolat navíc produkci metalothioneinu, který vyvazuje oxidačně-redukčně aktivní kovy a hydroxylové radikály přes cysteinové zbytky [250-252]. Jedním z hlavních efektů nedostatku zinku je tak inhibice SOD a následná indukce programované buněčné smrti díky oxidativnímu stresu [253]. To může být jedním z efektů, jak je zinek zapojen do iniciace neoplastických procesů. Zinek by však měl působit jako ochránce buněčného růstu. Tento jev byl demonstrován na zvířecích modelech, kde transplantované tumory byly inhibovány při udržování diety bez zinku [254-259].

Byl objeven volně vázaný cytoplazmatický zinek, který může ovlivňovat různé buněčné děje. Je ale nedefinovatelný, protože většina molekul Zn je vázána na nízkomolekulární ligandy a proteiny, což je činí nestanovitelnými. Koncentrace labilního zinku je v jádře nižší než v cytoplazmě [223, 260]. Zinečnaté ionty ale nejsou schopny projít přes buněčné membrány pasivní difuzí. I když jsou buňky vystaveny mikromolárním koncentracím volného zinku, intracelulární hladiny volného zinku zůstávají v řádech femtomolů. I takto malé změny v koncentracích volného zinku ovlivňují transkripci transportérů pro tok zinku do buněk, nebo ven. Na udržování homeostázy zinečnatých iontů se podílí hlavně dvě velké rodiny proteinů [182, 261]. Rodina ZRT IRT-like proteinových transportérů (ZIP, SLC39A) transportuje zinek přes membránu do cytozolu [262], rodina ZnT (SLC30A) transportérů transportuje zinek ven z cytozolu do organel, nebo z buňky [263] a jako další se zapojují i zinek vázající metalothioneiny [263-266]. Nejméně 14 ZIP transportérů přenášejících zinek do cytozolu již bylo popsáno [264]. U člověka bylo popsáno 9 ZIP transportérů a většina je

lokalizována na plasmatické membráně a transportují zinek dovnitř buněk [262, 267-269]. ZnT transportérů bylo popsáno 10 [261].

Metalothioneiny jsou ubiquitousní proteiny s nízkou molekulovou hmotností. Jejich produkce je indukovaná stresem, mají antioxidantní vlastnosti a jsou bohaté na cystein [251]. Jsou schopné vázat kovy, přednostně zinek a měď, podílejí se na udržování nízké hladiny volného zinku [270] a u lidí jsou jejich funkční izoformy kódovány 10 geny [271-274]. Exprese jednotlivých izoform je závislá na buněčném typu a je speciálně regulována [275, 276]. Při růstu a vývoji organismu hrají důležitou regulační funkci [277, 278]. Vysoké hladiny metalothioneinů byly popsány během pozdních fází gestace a v neonatálních obdobích [279]. Zvýšená exprese metalothioneinu u rychle se dělících tkání naznačuje jeho důležitou roli při normálním i neoplastickém růstu [279]. Metalothionein je schopen zásobovat zinkem enzymy nezbytné pro replikační procesy [280]. Bylo popsáno, že zinečnaté ionty jsou schopné přestupovat mezi metalothioneinem a jinými proteiny vázajícími zinek [281-283]. MT může ale také přímo interagovat s některými transkripčními faktory, například s p50 podjednotkou Nf- κ B [284], ovlivňuje také transkripční aktivitu p53 [285]. ApoMT (bez navázaného kovu) je schopen odebírat zinek z p53 domén modulací jeho konformačních změn [236, 281, 282, 286-288]. Metalothionein spolu se zinkem chrání buňky před oxidativním stresem a zabraňuje tak apoptóze spouštěné volnými radikály [289].

Nejdůležitějším transkripčním faktorem zapojeným do regulace kovů obecně a indukující expresi například MT je MRE-binding transcription factor – 1 MTF-1 [290]. Volný zinek je schopný jej aktivovat a způsobit jeho přesun do jádra [291]. Váže se na metal responsive elements MRE v promotoru genu pro metalothionein a spouští jeho expresi.

Mnoho studií popsalo zapojení zinku do rozvoje nádorových onemocnění. I když jsou hladiny zinku v séru špatným ukazatelem celkového statusu zinku v těle, změny v hladinách mědi a zinku v plazmě i tkáni byly popsány u lidí i zvířecích modelů [292]. Studie prokázaly, že zinek je spojený s progresí karcinomů [293] prostaty [294] a jater [295]. Epidemiologické studie popsaly spojení mezi nedostatkem zinku v dietě a zvýšeným rizikem rozvoje nádorového onemocnění [296]. Hladiny zinku v séru a maligních tkáních se snižují u pacientů s karcinomem jater, žlučníku, zažívacího ústrojí, nebo prostaty [294, 295, 297-299]. Studie popisující úlohu zinku v maligních procesech mají dlouhou historii, ale často si odporují [300]. Na zvířecích modelech bylo prokázáno, že zinek je zapojen do několika fází maligní transformace, včetně iniciace a rozvoje [301].

Stále však nebylo objasněno, zda změny v hladinách zinku jsou příčinou nebo následkem vzniku neoplazií. Významná role zinku při onkogenezi je prokázána jeho stabilizačním účinkem na RNA a DNA polymerázu, inhibičním efektem na fosfodiesterázu a aktivačním účinkem na adenylát cyklázu [302].

Měď i zinek mohou interagovat s dráhami pro přenos signálu uvnitř buněk. Interagují například s mitogen-aktivovanými protein kinázami (MAPK) [303, 304], fosfoinozitol-3-kináza (PI3K)/Akt dráhou [305, 306], Nf-κB a AP-1 [237, 307] a p53 [308, 309]. Zinek MAPK aktivuje a to včetně ERK1/2, JNK a p38 [100, 310, 311]. Tyto dráhy jsou totiž deaktivovány pouze na zinku závislou defosforylací [100, 312]. Částečně k tomu dochází díky inhibici několika proteinových tyrozin fosfatáz, které jsou zinkem inhibovány již při nízkých koncentracích [186, 313, 314].

Tumor supresorový protein p53 je důležitý regulátor buněčné odpovědi na oxidativní stres a genotoxické poškození. Po aktivaci se p53 hromadí v jádře, kde spouští expresi mnoha faktorů, jako je p21Cip1/WAF1 a mdm2. Indukce p21 může sloužit jako indikátor aktivace p53 a může způsobit inhibici proliferace zastavením buněčného cyklu v G1, nebo G2 fázi, nebo apoptózu, či další buněčné změny [315-319]. Nejčastějšími změnami u nádorových onemocnění jsou inaktivace, nebo mutace v genech jako je p53. Mutace v p53 jsou spojeny s nepříznivou prognózou a progresí nádorového onemocnění. Zinek je nezbytný pro vazbu k DNA a transkripční aktivitu p53 [285, 288, 320]. Zinek při vysokých koncentracích chrání nádorové buňky před apoptózou [321], ale při nízkých hladinách apoptózu spouští spolu se zvýšením exprese p53, FasL a FasR [322-325].

1.4. Zinek a karcinom prsu

Nádorové buňky prsu jsou unikátní ve schopnosti akumulovat vysoké hladiny zinku, který jim poskytuje ochranu před apoptózou [185, 326]. Pro zinkem indukovanou apoptózu je u prsních nádorových buněk potřebný funkční p53 a jeho přesun na mitochondrii [327].

Nedostatek zinku, selenu a vápníku se může podílet na karcinogenezi prsní tkáně, díky účasti těchto prvků při regulaci buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy [328-330]. Zinek a selen mají antioxidační vlastnosti a zesilují imunitní odpověď [293, 329, 331]. Epidemiologické studie popisují, že riziko vzniku karcinomu prsu je spojeno s příjmem zinku [332-339]. Ve studiích Lee et al. bylo prokázáno, že u prsních tumorů vyvolaných N-metyl-N-nitrosoureou u potkana [340] se zinek akumuluje (až 19 krát vyšší koncentrace) a to nezávisle na příjmu zinku v dietě [341] a že snížený

příjem zinku může karcinogenezi prsní tkáně potlačit [342, 343]. Také vysoké dávky zinku podávané orálně měly antimetastatický efekt na experimentálním modelu [344].

U pacientů s karcinomem prsu se hladiny zinku snižují v séru a zvyšují v maligní tkáni [297, 299, 300, 345, 346]. Biopsie prsní tkáně pacientů s nádorem obsahovaly signifikantně vyšší hladiny zinku v porovnání se zdravou tkání [299, 347-349]. V epidemiologických studiích byl stanoven vztah mezi vysokými koncentracemi zinku v prsní tkáni a rozvojem karcinomu prsu [350]. Tkáň karcinomu prsu má také signifikantně vyšší příjem zinku [351]. Byla prokázána selektivně zvýšená exprese proteinů importujících zinek do buněk v porovnání se zdravou tkání [181]. Obecně funkci zinku jako tumor protektoru podporuje fakt, že nádorová tkáň je často schopná zinek akumulovat [352-355]. Vysoké hladiny zinku v tkáních také nekorespondují se zvýšenými hladinami v séru, což podtrhuje jeho úlohu [354, 356, 357].

V teorii by měření hladiny zinku v séru nebo plasmě mohlo být využito pro určení prognózy [297, 332, 335, 358, 359]. Hladiny zinku v krvi jsou ale udržovány homeostázou, takže je lze považovat pouze za slabý marker celkového stavu v těle [360]. Podle některých studií jsou lepším ukazatelem hladiny zinku v erytrocytech [361], protože ty nemohou být spojovány s nedostatkem zinku v potravě [362]. U pacientů s karcinomem prsu byla popsána také vysoká exkrece zinku v moči [363] a významný rozdíl byl nalezen u žen s benigními a maligními lézemi [364]. Pozměněná homeostáza zinku může přispět k závažnosti nádorového onemocnění [241, 365, 366].

Vyšetřením biopsií karcinomu prsu i buněčných kultur byla zjištěna abnormální exprese mnoha proteinů, které ovlivňují homeostázu zinku, včetně ZIP6 [365], ZIP7 [185], ZIP10 [241] a ZnT2 [367]. ZIP6 je lokalizován na plazmatické membráně prsních epiteliálních buněk a přenáší zinek do cytoplazmy. Zvýšené hladiny proteinu ZIP6 pozitivně korelují s hladinami estrogenního receptoru [368, 369] a jsou markerem pro lumenální A podtyp karcinomu prsu [366]. Vysoké hladiny ZIP6 byly nalezeny i u metastatického karcinomu prsu [370, 371] a pozitivně korelují se zasažením lymfatických uzlin [372, 373]. ZIP6 může hrát roli v progresi onemocnění, reguluje přesun Snail do jádra, což tlumí transkripci epiteliálních adhezivních molekul E-cadherinů [374, 375].

Některé druhy transportérů zinku jsou spojené s metastazováním karcinomu prsu do lymfatických uzlin [299]. Metastazující a pokročilé karcinomy prsu exprimují ZIP10 transportér víc, než nemetastazující [261]. ZIP10 importuje zinek do buněk, takže buňky mohou přijímat ze séra více zinku. Experimenty Kagara at al. prokázaly, že zinek

transportovaný přes ZIP10, ale ne přes ZIP6, je zapojen do invazivního chování buněk karcinomu prsu [241]. ZIP6 je zapojen do metastázování do lymfatických uzlin [373], jeho aminokyselinové složení je podobné jako ZIP10 [376], takže mohou mít podobné funkce. Pokud je expresní hladina ZIP6 ale u tkáně karcinomu prsu mnohem vyšší než ZIP10, je to klinicky asociováno s lepší prognózou [377]. ZIP10 migrační aktivita je vyvolána ne zinkem v cytozolu, ale samotným transportérem aktivovaným při přenosu iontu přes membránu [241]. Zinek je zřejmě zapojen i do reorganizace cytoskeletu buněk karcinomu prsu [241]. Zvýšená exprese ZnT2 chrání nádorové buňky bez metalothioneinu před účinky zinkem vyvolané cytotoxicity tím, že jej přesouvá do váčků [367].

Izoforma metalothioneinu MT-2A má blízký vztah k proliferační aktivitě nádorových buněk prsu. Pomocí imunohistochemických analýz byla popsána vyšší exprese metalothioneinu u karcinomu prsu [378-380]. Jeho vysoká exprese koreluje s chemorezistencí a špatnou prognózou [381, 382]. Zvýšená exprese metalothioneinů chrání nádorové buňky proti poškození volnými radikály, inhibuje apoptózu a podporuje buněčnou proliferaci a nekontrolovaný růst [383]. Interakce metalothioneinu se zinečnatými ionty je zapojena do regulace mnoha transkripčních faktorů, které přispívají ke karcinogenezi [251, 383, 384]. Zvýšená koncentrace MT je pozitivně asociovaná s histologickým gradem [385, 386] a rezistencí k radiaci [387] a chemoterapeutikům [388] u invazivních duktálních karcinomů prsu. U lobulárních karcinomů je exprese metalothioneinů slabá [379, 389].

2. Cíle práce

- Stanovit IC_{50} koncentraci zinečnatých iontů pro linii 4T1
- Popsat změny v genové expresi po působení zinečnatých iontů
- Indukovat tumor Balb/c myším a simulovat tak onemocnění karcinomem prsu
- Stanovit efekt suplementace zinkem na proces tumorigeneze karcinomu prsu

3. Praktická část

3.1. Materiál a metody

3.1.1. Kultivace/pasážování buněčných linií

Jedná se o proces, při kterém jsou zajištěny ideální podmínky pro růst buněčných linií. Při pasážování jsou buňky sklizeny a přeneseny do nových kultivačních lahví.

4T1 buněčná linie:

Adherentní epiteliální buněčná linie. Původem z *mus musculus*, karcinomu prsu stage IV. (*American Type Culture Collection, CRL-2539, 2004*)

Pomůcky a chemikálie:

- mikroskop, centrifuga, termostat, sterilní box, plastové lahve pro kultivaci buněčných linií, jednorázové skleněné pipety, automatické pipety
- trypsin: Trypsin 10x v 2,5% PBS; EDTA: 0,02% roztok v PBS, sterilní (trypsin:EDTA 1:9); *PAA Laboratories GmbH Pasing, Austria*
- PBS; *Invitrogen Corp. Carlsbad, CA, USA*
- EDTA; *Sigma Aldrich Co. St. Luis, MO, USA*
- kompletní kultivační médium; *PAA Laboratories GmbH Pasing, Austria*
 - RPMI-1640 s indikátorem (fenolová červeň) s 10 % FBS, antibiotikum (penicilin/streptomycin)
- kultivační médium bez FBS

Postup:

- Kryozkumavka s buněčnou suspenzí byla ponechána při pokojové teplotě, dokud veškerý obsah neroztál
- Suspenze byla opatrně promíchána s 5 ml média zahřátého na pokojovou teplotu
- Směs byla centrifugována při 4 °C, 2700 otáčkách a po dobu 7 minut
- Supernatant byl odstraněn a sediment rozsuspendován v 2 ml odpovídajícího média
- Suspenze buněk byla rozpipetována do sterilních kultivačních lahví s čerstvým médiem
- Obsah lahví byl lehce promíchán a lahve byly umístěny do termostatu
- Kultivace probíhala při 37 °C a 5 % CO₂

- Průběžně byl sledován nárůst buněk na dně lahví a vyměňováno kultivační médium, jakmile buňky dosáhly 80% nárůstu, byly sklizeny
- Médium bylo odsáto z lahví
- Buňky adherované na dně lahví byly promyty čistým médiem pokojové teploty bez obsahu FBS
- Buňky byly uvolněny z povrchu působením 10% roztoku trypsinu v EDTA po dobu asi 2 minut (doba působení se liší dle buněčné linie a použitého treatmentu)
- Uvolněné buňky byly spláchnuty do 3 ml čistého média s obsahem FBS a přeneseny do centrifugační zkumavky
- Centrifugace probíhala při 4 °C, 2700 otáčkách a po dobu 7 minut
- Supernatant byl odstraněn a získaný buněčný pelet byl rozsuspendován
- Vzniklá buněčná suspenze může být použita k další kultivaci nebo k jiným metodám

3.1.2. Stanovení počtu buněk v suspenzi

Stanovení celkového počtu buněk bylo provedeno pomocí přístroje Casy model TT system (*Roche Applied Science, USA*). Reagencie i plast byly dodány výrobcem. Před prvním použitím byl přístroj nakalibrován na námi používané buněčné linie.

Pomůcky a chemikálie:

- Casy model TT system; *Roche Applied Science, USA*
- Plastové jednorázové nádoby s víčkem, sterilní roztok „Casy Tone“ s dávkovačem; *Roche Applied Science, USA*
- Buněčná suspenze, PBS, médium

Postup:

- Sklizené buňky v suspenzi byly rozsuspendovány ve vhodném množství média nebo PBS (podle dalšího využití buněk)
- Do nádoby s 10 ml „Casy Tone“ roztokem bylo napipetováno 100 µl buněk a obsah byl promíchán otáčením nádoby v rukou
- Na přístroji byl navolen odpovídající program a bylo spuštěno čištění kapiláry
- Po dokončení čistícího procesu bylo provedeno kontrolní měření s čistým „Casy Tone“
- Každý vzorek byl změřen dvakrát

- Na přístroji byl odečten počet buněk v jednom mililitru původní suspenze a procento viabilních buněk

3.1.3. Krátkodobý zinkový treatment 4T1 linie

Buňky narostlé do 60 až 70% konfluence byly podrobeny působení zinečnatých iontů.

Pomůcky a chemikálie:

- 10 mM roztok síranu zinečnatého ve vodě (zásobní roztok 2 mol/l, vhodný pro buněčnou kultivaci); *Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA*
- PBS: 1x PBS (5 tablet v 1 litru deionizované H₂O); *Amresco, Ohio USA*

Postup:

- Nejprve bylo odsáto médium, buňky byly propláchnuty 3 ml roztoku PBS
- K buňkám bylo přidáno čerstvé médium a do označených lahví bylo napipetováno potřebné množství roztoku Zn₂SO₄, tak aby výsledné koncentrace odpovídaly 0 – 100 μM
- Po 48 hodinách byly buňky sklizeny a dále zpracovány

3.1.4. MTT test

Ke stanovení buněčné viability při působení různých látek a následnému určení hodnoty IC₅₀ pro danou látku je využíván MTT test. Při této metodě je využito barevné změny při metabolickém zpracování (redukci) žlutého 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromidu na nerozpustné fialové krystaly. K této reakci dochází pouze v živých buňkách, výsledná intenzita zbarvení tedy odpovídá množství viabilních buněk.

Pomůcky a chemikálie:

- Devadesátišesti jamkové destičky, Versa Max microplate reader; *Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA*
- Kompletní médium, síran zinečnatý, roztok MTT (*Sigma Aldrich, USA*), DMSO (*Sigma Aldrich, USA*), glycinový pufr

Postup:

- Sklizené buňky byly spočítány
- Buněčná suspenze byla vhodně naředěna a rozpipetována do mikrotitrační destičky (5000 buněk/jamka/200 μl média)
- Do 1. a 12. jamky bylo pipetováno pouze čisté médium.

- Destička byla uložena do CO₂ termoboxu a buňky byly kultivovány 1-3 dny až dosáhly požadované konfluence
- V jamkách s buňkami bylo vyměněno médium a byla přidána testovaná látka v koncentrační logaritmické řadě
- Destička byla znovu umístěna do CO₂ termoboxu na 48 h
- Médium v 1. i všech jamkách obsahujících buňky bylo odsáto
- Do prázdných jamek bylo napipetováno 200 μ l čerstvého média a 50 μ l MTT (5 mg/ml)
- Destička byla zabalena do alobalu (MTT se na světle rozkládá) a na 4 h uložena do CO₂ termoboxu
- Obsah jamek 1-11 byl opatrně odsát a bylo přidáno 200 μ l DMSO a 25 μ l glycinového pufru, tak aby se vzniklé krystaly dokonale rozpustily
- Absorbance při 570 nm byla změřena a ze získaných hodnot vypočtena IC₅₀

3.1.5. Proliferační a růstový test v reálném čase založený na impedanci

RTCA xCELLigence systém je přístroj, který na základě změn impedance elektrody měří relativní rychlost proliferace buněk. (*Roche Applied Science and ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA*). Přístroj byl využíván podle instrukcí výrobce. Experimentu předcházelo stanovení optimální koncentrace buněk v destičce E-plate. Počet buněk byl optimalizován na 10 000/ jamka. Po nasazení na desku byly buňky monitorovány průběžně každých 15 minut po dobu 200 hodin. Výsledky byly vyhodnoceny v originálním softwaru na základě manuálu výrobce.

3.1.6. Izolace RNA

Pomůcky a chemikálie:

- High Pure RNA Isolation Kit, sada firmy *Roche, Německo*

Postup:

- Sklizené buňky byly rozsuspendovány v 200 μ l PBS. K suspenzi bylo přidáno 400 μ l lyzačního pufru (Lysis/-Binding Buffer)
- Směs byla promíchána na vortexu a přenesena na kolonku
- Kolonka vložená do mikrozkuřavky byla centrifugována po dobu 15 sekund
- Roztok, který protekl přes kolonku, byl odstraněn

- Následně bylo na kolonku přidáno 100 μ l předem připravené DNázy (90 μ l DNase Incubation Buffer a 10 μ l DNase I), inkubace po dobu 15 minut při pokojové teplotě
- Na kolonku bylo napipetováno 500 μ l promývacího pufru I (Wash Buffer I). Kolonka byla centrifugována a protečený roztok odstraněn
- Bylo přidáno 500 μ l Promývacího pufru II (Wash Buffer II), následovala opět centrifugace, odstranění protečeného roztoku
- Dalších 200 μ l Promývacího pufru II (Wash Buffer II) bylo napipetováno na kolonku, kolonka byla centrifugována na maximální otáčky po dobu 2 minut
- Roztok, který protekl, byl odstraněn a kolonka byla vložena do čisté mikrozkušavky
- Poté bylo přidáno 70 μ l Elučního pufru (Elution Buffer) a kolonka centrifugována po dobu jedné minuty
- Po poslední centrifugaci obsahuje mikrozkušavka roztok s vyizolovanou RNA
- RNA je skladována při -70°C nebo dále zpracována

3.1.7. Kontrola čistoty RNA a stanovení její koncentrace

Čistota RNA byla, stejně jako koncentrace, změřena spektrofotometricky. Čistá RNA má parametry $A_{260}/A_{280} > 2$ (poměr charakterizuje kontaminaci bílkovinami) a $A_{260}/A_{230} > 1,8$ (kontaminace chaotropními solemi a fenolem).

Pomůcky:

- NanoDrop, Spectrophotometer, ND-1000; *Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA*

Postup:

- Do přístroje byly pipetovány 2 μ l izolátu, tak aby nezvnikly bublinky
- Jako blank byl použit eluční roztok, ve kterém je RNA rozpuštěna
- Po každém měření byly obě kontaktní plochy pečlivě očištěny sterilním ubrouskem

3.1.8. Reverzní transkripce

Pro qRealTime PCR je třeba cDNA, aby proběhla amplifikace. Z vyizolované jednovláknové RNA ji získáme přepisem pomocí reverzní transkriptázy.

Pomůcky a chemikálie:

- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit; *Roche, Německo*

Postup:

- Mastermix pro jednu reakci:
 - Vzorek naředěný vodou do objemu 11 μ l
 - Random Hexamer Primer (600 pmol/ μ l) 2 μ l
 - Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer (5x konc.) 4 μ l
 - Protector RNase inhibitor (40 U/ μ l) 0,5 μ l
 - Deoxynucleotide Mix (10 mM každý) 2 μ l
 - Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/ μ l) 0,5 μ l
- Celkový objem mastermixu je 20 μ l
- Vzorke byly naředěny PCR vodou z kitu tak, aby v každé reakci bylo stejné množství RNA (500 ng)
- Reakce probíhá v termocykléru dle následujícího programu:
 - 10 min 25°C
 - 60 min 50°C
 - 5 min 85°C
- Získaná cDNA je uchována při -20 °C, nebo je ihned použita k qRealTime-PCR

3.1.9. Kvantitativní PCR v reálném čase

Do mastermixu byly přidány specifické primery pro cílové geny a referenční gen (β -aktin) a navíc specifické TaqMan sondy, které se vážou na cílové struktury a po rozložení exonukleázovou aktivitou DNA-polymerázy fluoreskují. Fluorescence je zaznamenána přístrojem.

Pomůcky a chemikálie:

- Real-Time PCR: ABI Prism 7500 Sequence Detection Systems; *Applied Biosystems, USA*
- veškeré roztoky jsou dodávány firmou *Applied Biosystems, USA*
- expresní sondy (primer + sonda): β -aktin (assay ID: Mm00607939_s1), *MT1A* (Mm00496660_g1), *MT2A* (Mm04207591_g1), *p53* (Mm01731290_g1), *MTF-1*

(Mm00485274_m1) byly vybrány z TaqMan gene expression assays; *Life Technologies, USA*

Postup:

- Reakční směs:
 - Produkt reverzní transkripce byl naředěn 5 x a do každé jamky mikrotitrační destičky jej bylo napipetováno 5 μ l
 - 10 μ l Master Mix (dodáno výrobcem)
 - 1 μ l roztoku sonda + primer
 - 4 μ l vody
- Reakce probíhala v přístroji ABI PRISM 7500 dle programu:
 - 50 °C 2 min
 - 95 °C 10 min
 - 95 °C 15 s
 - 60 °C 1 min

} 40x
- Vyhodnocení získaných dat z přístroje bylo provedeno metodou „delta delta Ct“ podle metodiky navržené Applied Biosystems (viz následující vzorec)
- Expres referenčního genu se používá pro normalizování hodnot exprese cílového genu

$$R = 2^{-\{(Ct_{sledovaný\ gen\ vzorek} - Ct_{referenční\ gen\ vzorek}) - (Ct_{sled.gen\ kontrola} - Ct_{ref.gen\ kontrola})\}}$$

3.1.10. Indukce tumorů a suplementace zinkem

Osmitýdenní samice Balb/c (váha 21 – 24 g) byly náhodně rozděleny do 2 x 2 skupin. Dvě skupiny s indukovaným tumorem, dvě skupiny suplementované zinkem. Metastatická linie karcinomu prsu 4T1 byla využita pro indukci rozvoje tumoru.

Postup:

- Buňky narostlé do 70 % konfluence byly běžným způsobem sklizeny
- Sklizené buňky byly spočítány pomocí Casy přístroje
- Buňky byly naředěny na koncentraci 1×10^5 ve 20 μ l PBS
- Suspenze buněk byla smíchána s Matrigelem 1:1
- Zvířata byla podrobena celkové anestezii (1 % Narkamon + 2 % Rometar, 0,5 ml/100 g hmotnosti)
- Směs s nádorovými buňkami byla vpravena do tukového polštáře náležejícího ke čtvrtému páru prsních žláz

Dávka zinku podávaná intraperitoneálně byla určena jako polovina LD₅₀ dávky stanovené Domingo et al. [390]. Celkem bylo podáváno 0,15 mg/g síranu zinečnatého. Celková dávka byla rozdělena do 4 částí (0,025 + 0,05 + 0,05 + 0,025 mg/g).

Zvířata byla krmena *ad libitum* a denně pozorována. Klece byly umístěny v místnosti se stálou teplotou a udržovány v čistotě. Objem tumoru byl měřen dvakrát týdně (délka x výška)² x 0,5.

Po jednom měsíci byla zvířata terminována. Po pitvě byla stanovena velikost a váha tumoru a byly odebrány orgány k dalším analýzám (primární tumor, mozek, játra, plíce, slezina a ledviny).

Použití zvířat pro experimenty podléhalo pokynům Evropské společnosti a bylo schváleno Etickou komisí Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně.

3.1.11. Příprava tkáňových vzorků

Tkáňové vzorky byly před dalším použitím homogenizovány. Bylo použito asi 0,01 g tkáně v 500 µl PBS a homogenizace probíhala mechanicky za použití UltraTurrax T8 homogenizer (*IKA-Werke, Staufen, Německo*), na ledu po 3 minuty na 25 000 rpm.

Homogenáty byly dále termolizovány při 99 °C, 15 minut na termonixeru (*Eppendorf 5430, Eppendorf, Hamburg, Německo*). Denaturované homogenáty byly centrifugovány při 4 °C, 15 000 g, po dobu 30 minut. Teplo účinně denaturuje a odstraňuje termolabilní proteiny a proteiny s velkou molekulovou hmotností. Takto připravené vzorky byly použity pro stanovení metalothioneinu a sulfidových skupin.

3.1.12. Elektrochemická detekce zinečnatých iontů

Elektrochemický analyzátor Model Metrohm AG (*Herisau, Švýcarsko*) byl použit pro stanovení zinečnatých iontů. Analyzátor (757 VA Computrace) poskytuje konvenční tří-elektrodovou konfiguraci s rtuťovou kapkou (HMDE) jako pracovní elektrodou: 0,4 mm², Ag/AgCl/ 3M KCl jako referenční elektrodou a platinovou pomocnou elektrodou. Diferenciální pulzní voltametrie byla provedena za následujících podmínek: deoxygenace byla provedena argonem po dobu 60 s, nanášecí potenciál – 1,3 V, doba nanášení 240 s, startovní potenciál – 1,3 V, konečný potenciál 0,15 V, pulzní amplituda 0,025 V, pulzní čas 0,04 s, krokový potenciál 5,035 mV a čas krokového potenciálu 0,3 s. [391]

3.1.13. Elektrochemická detekce metalothioneinu

Detekce byla provedena pomocí Autolab Analyser (*Eco Chemie, Utrecht, Nizozemí*) přístroje s klasickým tří-elektrodoým uspořádáním za použití diferenciální pulzní voltametrie Brdičkovou reakcí. Analyzovaný vzorek byl akumulován na pracovní elektrodě, kterou byla visící rtuťová kapka. Po akumulaci byl detekován pomocnou elektrodou s kobaltitými solemi v amoniovém pufru o pH 9,6 [392].

3.1.14. Analýza celkového obsahu sulfidových skupin

Koncentrace SH- skupin ve tkáních byla určena pomocí 0,2 mmol/l 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoové kyseliny) (DTNB) podle Ellmanna [393]. Intra-assay CV bylo 3,5 % a inter-assay CV bylo 5,5 %. Celkový obsah sulfidových skupin byl vyjádřen v $\mu\text{mol/g}$ proteinu.

3.1.15. Statistické metody

U dat byla zkontrolována normalita a provedena logaritmická transformace. Multifaktoriální ANOVA a Bonferroni post-hoc test byl využit k analýze hlavních efektů. Dále byly vypočteny Pearsonovy korelace k odhalení závislostí mezi proměnnými. Ke statistické analýze byl využit program Statistica 12 (*StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA*). Hladina statistické významnosti byla nastavena na $p < 0,05$.

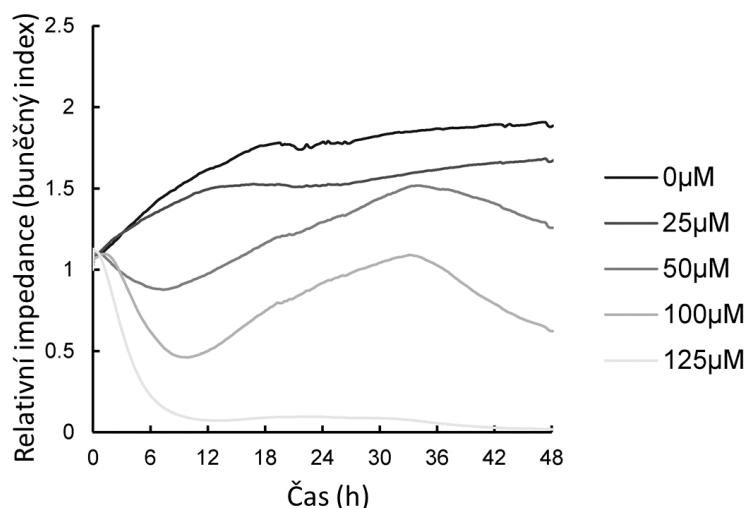
4. Výsledky

4.1. *In vitro* efekty na linii 4T1

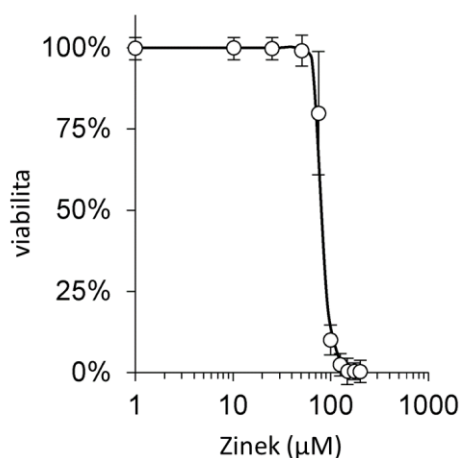
4.1.1. Viabilita

Nejprve byla testována viabilita 4T1 buněčné linie po působení zinečnatými ionty. Takto mohla být následně stanovena optimální dávka, která bude aplikována zvířecímu modelu. Pro proliferační stanovení na přístroji xCelligence byly použity koncentrace síranu zinečnatého: 0, 25, 50, 75, 100 a 125 μM . A výsledná IC_{50} po 48 h byla stanovena na 52,8 μM (obr. 1).

Hodnoty 50% inhibiční koncentrace byly určeny i pomocí MTT testu (obr. 2). Výsledná koncentrace po 48 h byl 83,7 μM .



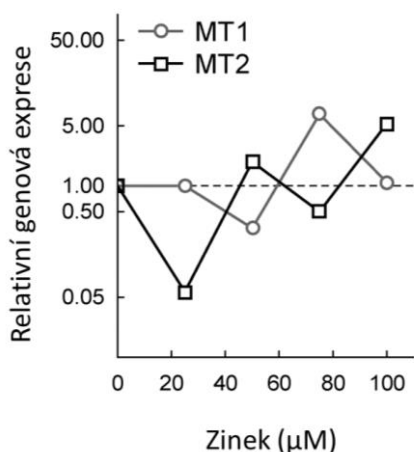
Obrázek 1: Stanovení míry proliferace po působení zinečnatých iontů u linie 4T1. Vypočtená hodnota 50% inhibiční koncentrace po 48 h byla 52,8 μM .



Obrázek 2: Výsledky MTT testu. IC_{50} po 48 h byla stanovena na 83,7 μM

4.1.2. Genová exprese

Po působení zinečnatými ionty byla stanovena exprese metalothioneinů *MT1* a *MT2* u linie 4T1 *in vitro*. Pro treatment byly použity koncentrace 0, 25, 50, 75 a 100 μM . Pomocí jednosměrné ANOVy nebyl pozorován signifikantní efekt koncentrace zinku na expresi obou genů. Zároveň nebyla nalezena žádná signifikantní korelace mezi jednotlivými geny. Je však patrné, že exprese obou genů měly po působení zinečnatými zvyšující se trend (obr. 3).

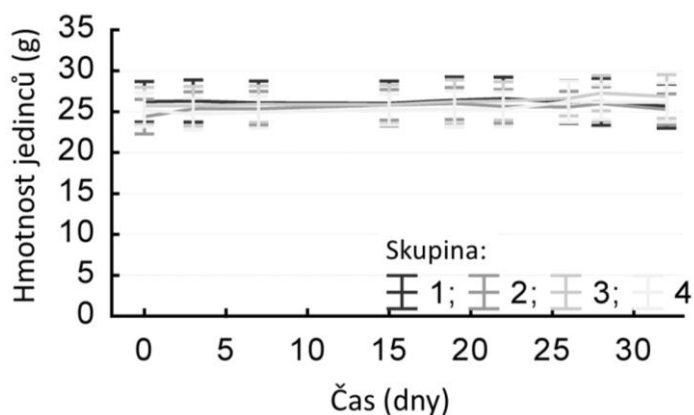


Obrázek 3: Relativní exprese MT u buněčné linie 4T1 po vystavení různým koncentracím zinečnatých iontů.

4.2. Zvířecí model

4.2.1. Hmotnost zvířat

Pokusná zvířata byla náhodně rozdělena do 4 skupin: 1.) kontrola, 2.) kontrola suplementovaná zinkem, 3.) s aplikací 4T1 buněk, 4.) s aplikací 4T1 buněk a se suplementací zinkem. Po aplikaci nádorových buněk byla zvířata celkem 9 krát pravidelně vážena a měřena. Také bylo kontrolováno, zda suplementace zinkem nezpůsobuje známky intoxikace během experimentu. V samotných změnách hmotnosti zvířat nebyl během experimentu nalezen žádný signifikantní trend (obr. 4). Při vyhodnocování dat pomocí jednosměrné ANOVy nebyl zaznamenán žádný signifikantní rozdíl v hmotnosti mezi jednotlivými skupinami. Z pozorování vyplývá, že suplementace zinkem neměla žádný závažný negativní efekt na stav celého organismu.

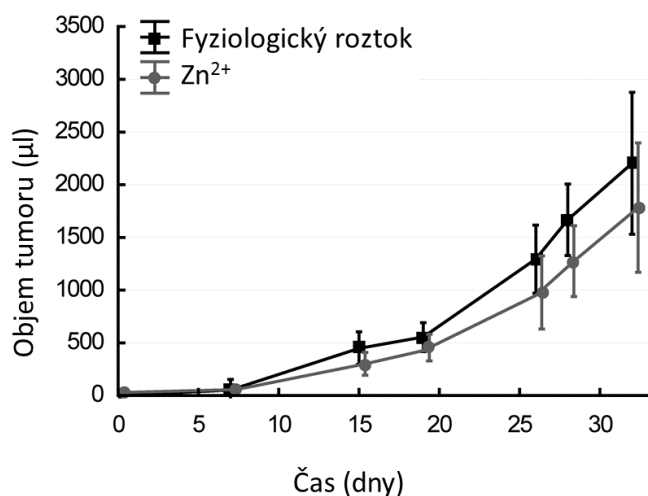


Obrázek 4: Průměrné hmotnosti jedinců ve všech skupinách. Skupina č.1 je kontrolní, č.2 byla pouze suplementována zinkem, skupině č.3 byl indukován nádor a skupině č.4 byl indukován nádor spolu se suplementací zinkem.

4.2.2. Velikost tumoru

Po aplikaci 4T1 buněk byl v obou skupinách u všech zvířat pozorován vznik a růst tumoru. V kontrolních skupinách, kde 4T1 buňky aplikovány nebyly, nebyla žádná incidence nádoru. Po pitvě byly popsány jasné známky progresu metastáz do jater, plic, kostí a slinivky a to u obou skupin. Méně časté byly metastázy v mozku a na střevech v obou skupinách.

Během experimentu byla pravidelně měřena velikost primárního tumoru, aby mohlo být stanoveno, zda suplementace zinkem ovlivnila růst nádorové tkáně. Pomocí jednosměrné ANOVy byl objeven signifikantní efekt treatmentu zinkem na růst tumoru, ($F(1, 137) = 7,2804, p = 0,008$). Po treatmentu zinkem bylo popsáno 28% snížení objemu tumoru oproti kontrole (obr. 5).



Obrázek 5: Průměrný objem tumorů u skupin s nádorem indukovaným pomocí linie 4T1. Patrný signifikantní rozdíl mezi skupinou se suplementací zinkem (světlejší) a bez suplementace (tmavší).

4.2.3. Genová exprese

Efekt suplementace zinečnatými ionty byl popsán i na úrovni genové exprese v různých tkáních (primární nádor, játra, ledviny, plíce, mozek, slezina). Analyzovány byly geny související s metabolismem kovů, metalothionein 1 a 2 (*MT-1* a *MT-2*), *MTF-1* a *TP53*. Stanoveny byly efekty indukce tumoru, zinkového treatmentu a typu tkáně.

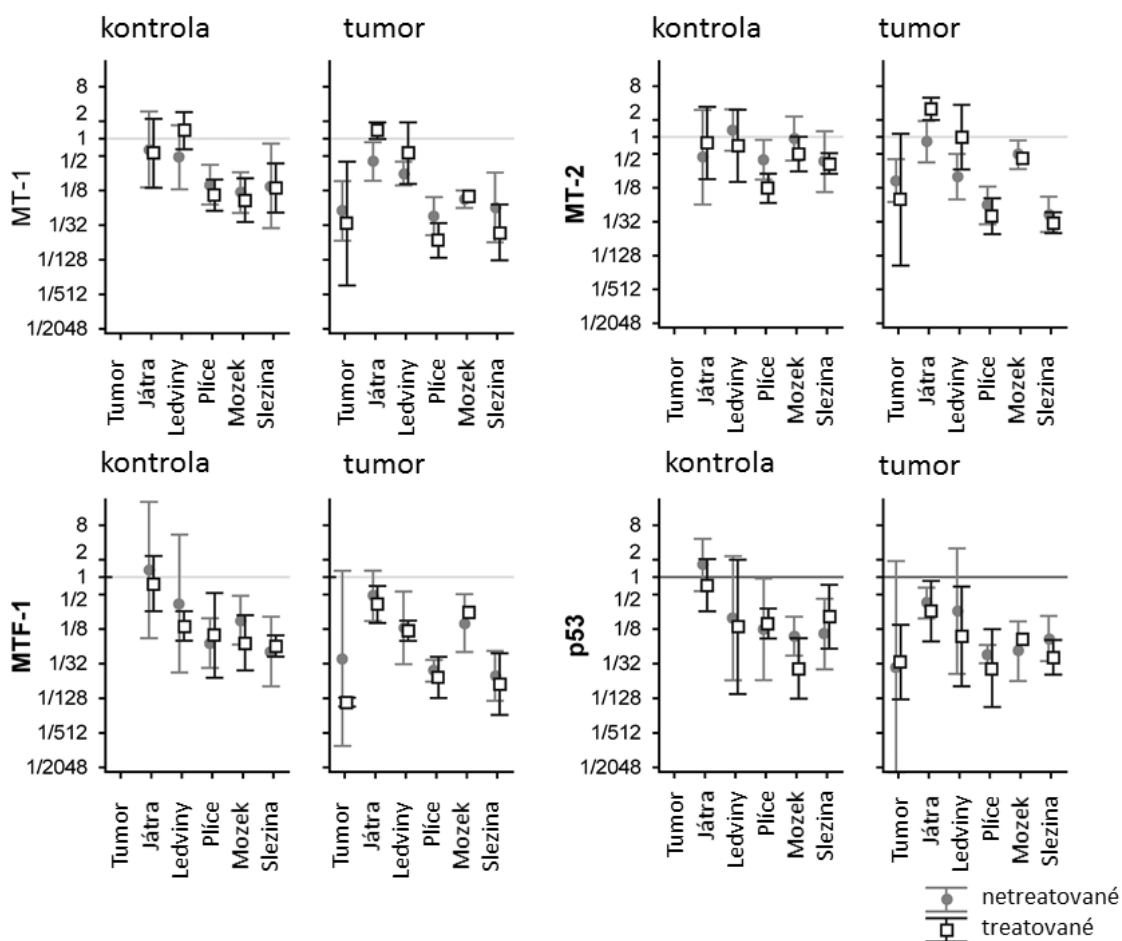
Multifaktoriální ANOVA odhalila signifikantní efekt typu tkáně na genovou expresi ($F(20, 481,86) = 12,96, p < 0,001$), po odečtení efektu ostatních proměnných. Nejvyšší exprese všech pozorovaných genů byla v játrech a ledvinách. Všechny geny se exprimovaly signifikantně méně v plicích, slezině a primárním tumoru.

Po odečtení efektu ostatních proměnných měla signifikantní efekt na hladiny genové exprese i přítomnost tumoru ($F(4, 145) = 11,36, p < 0,001$). Exprese všech sledovaných genů byla signifikantně nižší v nádorové tkáni.

Efekt samotného treatmentu na expresi pozorovaných genů nebyl signifikantní. Pokud byl ale analyzován v kombinaci s efektem indukce tumoru a typu tkáně, bylo nalezeno signifikantní působení. Kombinovaný efekt byl stanoven na $F(20, 481,86) = 1,64, p = 0,04$. Pro odhalení trendů v expresích jednotlivých genů byly exprese v odpovídajících tkáních porovnány s užitím Bonferroniho post-hoc testu.

Byl nalezen významný vzorec expresí genů, které navzájem korelují. Všechny korelace byly signifikantní při $p < 0,01$. Nejsilnější korelace byla pozorována mezi *MT1* a *MT2* ($r = 0,82$) a nejslabší, ale stále signifikantní, mezi *TP53* a *MT2* ($r = 0,32$).

Zvířata s indukovanými nádory měla signifikantně nižší expresi obou metalothioneinů v plicích oproti kontrolám. Samotný *MT2* byl exprimován signifikantně méně ve slezině u zvířat s indukovanými nádory a více v játrech. Celkově exprese *MT*, *TP53* a *MTF-1* byla nejvíce ovlivněna typem tkáně. Indukce tumoru a treatment zinkem měl významný efekt pouze na expresi *MT1* a *MT2*. Souhrné výsledky expresí všech genů jsou na obrázku č. 6.



Obrázek 6: Relativní exprese všech stanovovaných genů u všech tkání.

4.2.4. Analýza sulfidických skupin, MT proteinu a hladiny zinku

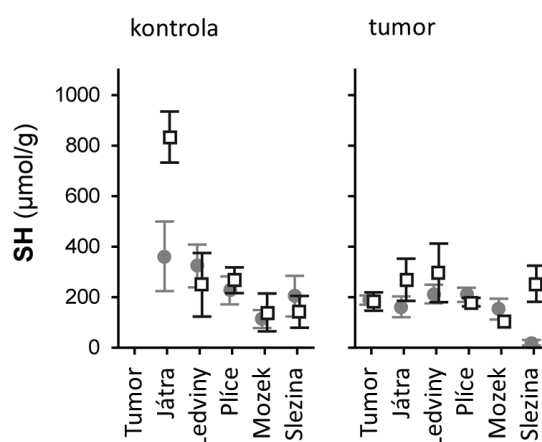
Experimenty na úrovni RNA ukázaly významné změny v hladinách metalothioneinu v závislosti na indukci tumoru. Metalothioneiny mají vysoký obsah cysteinových zbytků, které jsou schopné vázat těžké kovy. Proto byla provedena analýza sulfidických skupin. Celkový obsah SH- skupin neodráží pouze obsah metalothioneinu v buňkách, nebo tkáni, ale i jiné redoxně aktivní sloučeniny, jako je redukovaný glutathion GSH. Obsah metalothioneinu byl stanoven zvlášť, elektrochemicky. Navíc byly stanoveny i zinečnaté ionty (obr. 8).

Korelační analýza mezi těmito komponentami odhalila pouze slabou závislost mezi hladinami -SH skupin a MT ($r = 37$, $p < 0,001$). Slabá negativní korelace byla stanovena i mezi hladinami zinečnatých iontů a obsahem -SH skupin ($r = -0,31$, $p < 0,001$). Proto byly následně metalothioneiny (obr.9) a -SH skupiny (obr. 7) interpretovány samostatně.

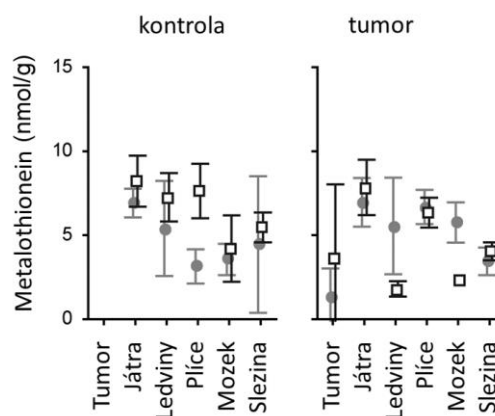
Podobně jako u analýzy genové exprese byly vypočteny efekty jednotlivých faktorů i na tyto stanovované veličiny. Signifikantně nižší koncentrace MT proteinu byly v primárním tumoru v porovnání s tkáněmi mozku, plic a jater. Naopak koncentrace zinečnatých iontů byla signifikantně vyšší v tkáni tumoru v porovnání s játry.

U zvířat s indukovaným nádorem byl 1,5 krát nižší obsah –SH skupin oproti kontrolním skupinám, hladiny MT a zinku se nelišily.

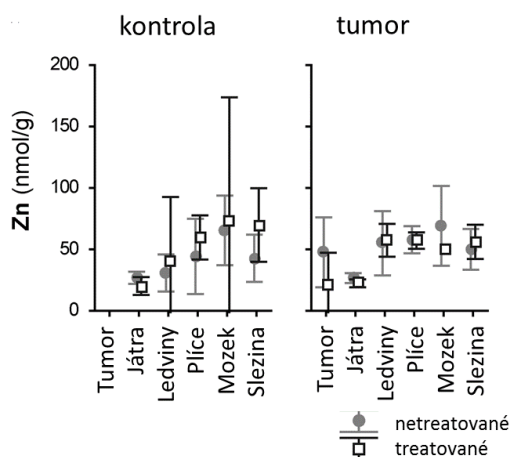
Treatment zinečnatými ionty měl signifikantní efekt na hladiny MT proteinu, –SH skupin i zinečnatých iontů ($F(3, 113) = 4,90, p = 0,003$). Post hoc testy odhalily signifikantní 1,4 krát vyšší obsah –SH skupin v treatovaných zvířatech, $p < 0,05$. Ostatní veličiny byly také zvýšené, ale pod hranicí statistické významnosti.



Obrázek 7: Obsah -SH skupin ve tkáních u všech skupin. Skupiny treatované zinkem jsou zobrazeny tmavší, oproti netreatovaným (světlejší).



Obrázek 9: Koncentrace metalothioneinu v tkáních u všech skupin. Skupiny treatované zinečnatými ionty jsou značeny tmavě, netreatované světle.



Obrázek 8: Koncentrace zinku v tkáních u všech skupin.

5. Diskuze

Cílem této studie bylo popsat, zda zinečnaté ionty mohou významně ovlivnit proces onkogeneze prsní tkáně na myším modelu. Zinečnaté ionty byly zvoleny, protože jejich účinky na procesy tumorigeneze byly dobře popsány. Jejich efekt by měl potlačovat tumorigenezi a zároveň inhibovat vazbu mědi k proteinům. Měď má oxidační a angiogenní účinky [394-397]. Dříve bylo také prokázáno, že u prsních nádorových buněk mohou zinečnaté ionty inhibovat Nf- κ B [398]. Tento transkripční faktor je často zvýšeně aktivní u karcinomu prsu nezávislého na hormonech [399]. Zinek má také přímý efekt na růst a buněčnou smrt nádorových buněk prostaty [400]. Dokonce i nízké, nebo fyziologické koncentrace zinečnatých iontů dokážou vyvolat vypuštění cytochromu c z mitochondrií a tak aktivovat kaskádu kaspáz, která vyústí v apoptózu [401]. Zinek je také zapojen do epigenetických mechanismů [402, 403]. Nedostatek zinku způsobuje sníženou metylaci DNA a histonů [404], protože histondeacetylázy a histon-lyzin metyltransferázy jsou zinek dependentní enzymy [405-407]. Inhibitory histon deacetylázy reaktivují estrogení receptor v ER negativních buňkách karcinomu prsu [408]. Deregulované hladiny zinku také způsobují oxidativní stres a produkci metalothioneinů, což může mít efekt na maligní tkáň.

V této studii byla dávka zinku podávaná intraperitoneálně určena jako polovina LD₅₀ koncentrace pro sulfát zinečnatý stanovené Domingo et al. [390]. Celkem bylo tedy podáváno 0,15 mg/g síranu zinečnatého. Při testování rozdílných dávek zinku v dietě a podávaných v různých časových intervalech Hou et al. [396] popsal, že dávky nižší než 1 mg/g nevedou k anorexii ani ztrátě hmotnosti u myší. Ani v naší studii dávky zinku podávané myším nezpůsobovaly žádné známky intoxikace a nebylo pozorováno žádné snížení hmotnosti u treatovaných myší oproti kontrolám.

Studovaný tumor byl vyvolán injekcí nádorových 4T1 buněk. Tato linie nemá funkční p53 a exprese jejích zinkových transportérů je nastavena k akumulaci zinku [241]. Proto byla testována cytotoxicita zvýšené koncentrace zinečnatých iontů na tuto linii. Dřívější studie prokázaly, že pouze nádorové epiteliální buňky prsu s funkčním p53 jsou schopné vyvolat produkci metalothioneinu po expozici kovu [409, 410]. V souladu s těmito výsledky ani zde nebyla prokázána signifikantní změna v expresi *MT1* a *MT2* po vystavení zinečnatým iontům u linie 4T1. Ani v tkáni primárních tumorů v myším modelu vystaveném suplementaci zinkem nebyla pozorována změna v expresi *MT1*,

MT2, *TP53* a *MTF1*. U skupin bez nádorů byla exprese všech genů signifikantně vyšší ($p = 0,003$).

Signifikantní změny byly objeveny také mezi tkáněmi ($p < 0,001$). Nejvyšší hladiny exprese studovaných genů byly popsány v játrech. Je to dáno zřejmě úlohou tohoto orgánu v procesech oxidativního stresu a udržování homeostázy kovů. U zvířat bez indukovaného nádoru bylo množství -SH skupin v játrech signifikantně vyšší po expozici zinkem, ale u zvířat s tumorem tento trend pozorován nebyl. Tyto změny ale nebyly nalezeny u metalothioneinu. Rozdíly, stejně jako slabé korelace mezi MT a -SH skupinami mohou být vysvětleny důležitou úlohou GSH, který také obsahuje -SH skupiny. GSH spolu s metalothioneinem poskytují vysoké množství cysteinových zbytků a společně chrání buňky před stresem [411]. Vzrůst -SH skupin v játrech tedy reflektuje mimo jiné i zvýšenou produkci GSH, což podtrhuje úlohu této tkáně v regulaci zinečnatých iontů v těle.

Uvedené výsledky potvrzují významný vliv karcinomu prsu na antioxidační kapacitu celého organismu. Vyčerpané tělo bojující s tumorem je neschopné odolávat dalšímu oxidativnímu stresu. Podle studie Feng et al. [412] u pacientů s karcinomem prsu je celková antioxidační/oxidativní rovnováha signifikantně narušena oproti zdravým kontrolám. V další studii bylo prokázáno, že karcinom prsu je spojen se zvýšenými hladinami peroxidace lipidů a sníženou antioxidační kapacitou krevních buněk [413].

V souhlasu s naší hypotézou byl primární tumor po treatmentu zinkem signifikantně menší oproti kontrole, nebyl ale pozorován žádný efekt na tvorbu metastáz. Toxicita zinečnatých iontů pro nádorovou prsní tkáň byla potvrzena ve studii Al-Qubaisi et al, kde IC_{50} NiZn feritových nanočástic byla pro zdravé prsní buňky MCF-10 skoro 15 krát vyšší, než pro nádorovou linii MCF-7 [414]. Žádné signifikantní změny v akumulaci zinku mezi tkáněmi po treatmentu zinkem, nebo u zvířat s indukovaným nádorem nebyly nalezeny. Stejně tak ve studii Woo a Wu kde bylo zjištěno, že v MNU-indukovaných tumorech se akumuluje zinek více než ve zdravé prsní tkáni, ale hladiny zinku v tělních orgánech se nezměnily [341]. Skupina Skrajnowské popsala, že potkani suplementovaní zinkem, nebo mědí akumulovali měď v nádorové tkáni, zatímco ostatní tkáně zůstaly beze změn a konečné hladiny zinku nebyly změněny vůbec [415]. Nádorové buňky s nejvyšším obsahem zinku zřejmě zemřou v důsledku spuštění apoptózy, takže výsledná celková koncentrace v nádorové tkáni jimi není ovlivněna.

Další studie v rozporu s naší studií popsaly, že růst karcinomu prsu je pozastaven spíše nedostatkem zinku, nebo jeho odstraněním [416, 417]. Studie McQuity et al popisuje, že růst karcinomu prsu byl významně inhibován ve skupině s deficientním zinkem, zatímco u skupin s adekvátními hladinami, nebo zvýšenými hladinami byl růst zpomalen jen nepatrně. Rozdíly v těchto studiích oproti této mohou být dány použitím jiných buněčných linií. Zmíněné studie využili Walker 256 buněčnou linii, nebo linii R323OAC. Walker 256 buňky jsou odvozené ze spontánně vyvinutého tumoru březího potkana a bylo zjištěno, že jsou hematopoetického původu [418]. R323OAC je potkaní adenokarcinom prsu, je to transplantovatelný tumor, může být pěstován in vitro, ale netvoří spontánní metastázy [419]. Nebyly popsány signifikantní rozdíly mezi normální potkaní prsní tkání a ER negativním R323OAC tumorem, co se týče vazných míst pro prolaktin, specifity vazeb, nebo afinity prolaktinu k receptoru [420]. Naopak 4T1 buněčná linie použitá v této studii reprezentuje typický trojitě negativní karcinom prsu, bez exprese ER, PR a HER-2 [421]. Buňky snadno tvoří metastázy a mají epiteliální charakter, navíc exprimují mezenchymální markery VIM [422]. Stejně jako lidský karcinom prsu, 4T1 indukované nádorové onemocnění se šíří z místa primárního tumoru do okolních tkání. Diseminace do lymfatických uzlin a tvorba vzdálených metastáz odpovídá lidskému karcinomu prsu [423]. Tyto výsledky naznačují, že linie 4T1 představuje lepší model pro výzkum reakce na zinkový treatment. Spolu s dalšími autory studií [328, 424, 425] bylo prokázáno, že samotný zinek může účinně tlumit růst primárního karcinomu prsu, obzvláště v časných stádiích.

6. Závěr

Karcinom prsu je závažné onemocnění a patří k nejčastějším typům malignit u žen. I přes významné pokroky v pochopení principů vzniku nádorových onemocnění obecně a následný rozvoj cílené léčby jsou pokročilá stadia malignit stále považována za neléčitelná. Karcinom prsu lze rozdělit na několik odlišných subtypů charakteristických svým expresním profilem, fenotypem i odpovědí na dostupnou léčbu. Trojitě negativní karcinom neexprimuje žádný z hormonálních receptorů a postrádá i amplifikaci HER-2. Je jedním z nejagresivnějších podtypů a léčba je odkázána pouze na standardní systémovou chemoterapii a chirurgické odstranění nádoru.

Zinek je přímo i nepřímo zapojen do mnoha významných buněčných dějů. Jeho role byla popsána i u vzniku několika různých malignit, mimo jiné i u karcinomu prsu. Mohl by tak poskytnout důležitý mezičlánek v porozumění principů rozvoje obtížněji léčitelných podtypů. Princip, jakým je zinek zapojen do kancerogeneze tkáně, ale ještě nebyl objasněn, zapojeny mohou být zinkové transportéry, nebo metalothionein. Koncentrace zinečnatých iontů je významně vyšší v nádorové prsní tkáni, než v tkáni zdravé, naopak v séru nebo plasmě hladiny zinku u pacientů klesají. Změny v koncentracích tohoto kovu navíc také významně ovlivňují odpověď na oxidativní stres a redoxní stav buněk. Dosud není ale jasné, zda jsou změny hladin zinku příčinou, nebo následkem maligní transformace.

Cílem této studie bylo popsat, zda suplementace zinkem může významně ovlivnit rozvoj karcinomu prsu na *in vivo* modelu. Použitá linie 4T1 charakterizuje trojitě negativní karcinom prsu u *mus musculus* a je schopna tvořit primární tumor i metastázy v kmeni BALB/c. Celková dávka zinku podávaná v průběhu experimentu byla stanovena jako polovina letální dávky a její efekt byl pozorován nejen na růstu samotného tumoru, ale i na expresi vybraných genů a antioxidantním statusu celého organismu.

Expozice zinečnatým iontům u obou skupin subjektů nevyvolala žádné závažné zdravotní komplikace. Expresie genů spojených s metabolismem zinku byla signifikantně vyšší u skupin bez indukovaného tumoru, rozdíly byly popsány i mezi jednotlivými tkáněmi. Nejvyšší hladiny exprese všech genů byly popsány v játrech, které jsou významně zapojeny do produkce faktorů zapojených do udržování homeostázy. Změny byly popsány i v obsahu -SH skupin a metalothioneinu. Naše výsledky jsou v souladu s dalšími studiemi a naznačují, že celková antioxidantní rovnováha je při rozvoji tumoru významně narušena a organismus pak není schopen odolávat dalšímu oxidativnímu stresu, vyvolanému treatmentem zinkem. Podávání zinečnatých iontů mělo sice

signifikantní vliv na velikost primárního tumoru, ale rozvoj metastáz ovlivněn nebyl. Lze tedy potvrdit, že zinečnaté ionty jsou zapojeny do kancerogeneze prsní tkáně, ale růst tumoru mohou tlumit pouze v časných stádiích.

7. Publikace

Sztalmachova, M., et al. (2015). "Molecular response of 4T1-induced mouse mammary tumours and healthy tissues to zinc treatment." *International Journal of Oncology* 46(4): 1810-1818.

Breast cancer patients negative for the nuclear oestrogen receptor alpha have a particularly poor prognosis. Therefore, the 4T1 cell line (considered as a triple-negative model) was chosen to induce malignancy in mice. The aim of the present study was to assess if zinc ions, provided in excess, may significantly modify the process of mammary oncogenesis. Zn(II) ions were chosen because of their documented antitumour effects. Zn(II) is also known to induce the expression of metallothioneins (MT) and glutathion (GSH). A total dose of zinc sulphate per one gram of mouse weight used in the experiment was 0.15 mg. We studied the expression of MT1 MT2, TP53 and MTF-1 genes and also examined the effect of the tumour on antioxidant capacity. Tumour-free mice had significantly higher expression levels of the studied genes ($P < 0.003$). Significant differences were also revealed in the gene expression between the tissues ($P < 0.001$). The highest expression levels were observed in the liver. As compared to brain, lung and liver, significantly lower concentrations of MT protein were found in the primary tumour; an inverse trend was observed in the concentration of Zinc(II). In non-tumour mice, the amount of hepatic hydrosulphuryl groups significantly increased by the exposure to Zn(II), but the animals with tumour induction showed no similar trend. The primary tumour size of zinc-treated animals was 20% smaller ($P = 0.002$); however, no significant effect on metastasis progression due to the zinc treatment was discovered. In conclusion, Zn(II) itself may mute the growth of primary breast tumours especially at their early stages.

(plný text v příloze)

8. Seznam použité literatury:

1. Anbazhagan, R., et al., *The development of epithelial phenotypes in the human fetal and infant breast*. The Journal of pathology, 1998. **184**(2): p. 197-206.
2. Gusterson, B.A., et al., *Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer*. Breast Cancer Research, 2005. **7**(4): p. 1.
3. Rakha, E.A., J.S. Reis-Filho, and I.O. Ellis, *Basal-Like Breast Cancer: A Critical Review*. Journal of Clinical Oncology, 2008. **26**(15): p. 2568-2581.
4. Gottlieb, C., U. Raju, and K. Greenwald, *Myoepithelial cells in the differential diagnosis of complex benign and malignant breast lesions: an immunohistochemical study*. Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, 1990. **3**(2): p. 135-140.
5. Rudland, P.S., *Histochemical organization and cellular composition of ductal buds in developing human breast: evidence of cytochemical intermediates between epithelial and myoepithelial cells*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1991. **39**(11): p. 1471-1484.
6. Wada, T., et al., *Vimentin expression in benign and malignant lesions in the human mammary gland*. Anticancer research, 1991. **12**(6B): p. 1973-1982.
7. Böcker, W., et al., *An immunohistochemical study of the breast using antibodies to basal and luminal keratins, alpha-smooth muscle actin, vimentin, collagen IV and laminin*. Virchows Archiv A, 1992. **421**(4): p. 315-322.
8. Lazard, D., et al., *Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993. **90**(3): p. 999-1003.
9. Rasbridge, S., et al., *Epithelial (E-) and placenta (P-) cadherin cell adhesion molecule expression in breast carcinoma*. The Journal of pathology, 1993. **169**(2): p. 245-250.
10. Gusterson, B., et al., *The breast myoepithelial cell and its significance in physiology and pathology*. Current Diagnostic Pathology, 1994. **1**(4): p. 203-211.
11. Nakano, S., et al., *Differential tissular expression and localization of type IV collagen alpha1 (IV), alpha2 (IV), alpha5 (IV), and alpha6 (IV) chains and their mRNA in normal breast and in benign and malignant breast tumors*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1999. **79**(3): p. 281-292.

12. Nayar, R., et al., *Immunoreactivity of ductal cells with putative myoepithelial markers: a potential pitfall in breast carcinoma*. *Annals of diagnostic pathology*, 1999. **3**(3): p. 165-173.
13. Reis-Filho, J.S., et al., *Distribution of p63, cytokeratins 5/6 and cytokeratin 14 in 51 normal and 400 neoplastic human tissue samples using TARP-4 multi-tumor tissue microarray*. *Virchows Archiv*, 2003. **443**(2): p. 122-132.
14. Popnikolov, N.K., et al., *Benign myoepithelial tumors of the breast have immunophenotypic characteristics similar to metaplastic matrix-producing and spindle cell carcinomas*. *American journal of clinical pathology*, 2003. **120**(2): p. 161-167.
15. Wetzels, R., et al., *Basal cell-specific and hyperproliferation-related keratins in human breast cancer*. *The American journal of pathology*, 1991. **138**(3): p. 751.
16. Purkis, P., et al., *Antibody markers of basal cells in complex epithelia*. *Journal of cell science*, 1990. **97**(1): p. 39-50.
17. Heatley, M., et al., *Cytokeratin intermediate filament expression in benign and malignant breast disease*. *Journal of clinical pathology*, 1995. **48**(1): p. 26-32.
18. Stingl, J., et al., *Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue*. *Breast cancer research and treatment*, 2001. **67**(2): p. 93-109.
19. Tavassoli, F.A. and P. Devilee, *Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*. 2003: Iarc.
20. Tamiolakis, D., et al., *Immunohistochemical expression of alpha-smooth muscle actin in infiltrating ductal carcinoma of the breast with productive fibrosis*. *European journal of gynaecological oncology*, 2001. **23**(5): p. 469-471.
21. Moll, R., et al., *The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells*. *cell*, 1982. **31**(1): p. 11-24.
22. Zhang, R.R., et al., *A subset of morphologically distinct mammary myoepithelial cells lacks corresponding immunophenotypic markers*. *Breast Cancer Research*, 2003. **5**(5): p. 1.
23. Birnbaum, D., et al., *Basal and luminal breast cancers: basic or luminous?(review)*. *International journal of oncology*, 2004. **25**: p. 249-258.
24. Nagle, R.B., et al., *Characterization of breast carcinomas by two monoclonal antibodies distinguishing myoepithelial from luminal epithelial cells*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1986. **34**(7): p. 869-881.

25. Koboldt, D.C., et al., *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2012. **490**(7418): p. 61-70.
26. Weydert, C.J., et al., *Overexpression of manganese or copper–zinc superoxide dismutase inhibits breast cancer growth*. Free Radical Biology and Medicine, 2006. **41**(2): p. 226-237.
27. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA: a cancer journal for clinicians, 2011. **61**(2): p. 69-90.
28. Autier, P., et al., *Disparities in breast cancer mortality trends between 30 European countries: retrospective trend analysis of WHO mortality database*. Bmj, 2010. **341**: p. c3620.
29. Alizadeh, A.A., et al., *Towards a novel classification of human malignancies based on gene expression patterns*. The Journal of pathology, 2001. **195**(1): p. 41-52.
30. Cardoso, F., et al., *1st International consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 1)*. The Breast, 2012. **21**(3): p. 242-252.
31. Group, E.B.C.T.C., *Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials*. The lancet, 2012. **379**(9814): p. 432-444.
32. Paget, S., *The distribution of secondary growths in cancer of the breast*. The Lancet, 1889. **133**(3421): p. 571-573.
33. Luzzi, K.J., et al., *Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases*. The American journal of pathology, 1998. **153**(3): p. 865-873.
34. Kienast, Y., et al., *Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation*. Nature medicine, 2010. **16**(1): p. 116-122.
35. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Metastasis: dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(8): p. 563-572.
36. Kennecke, H., et al., *Metastatic behavior of breast cancer subtypes*. Journal of clinical oncology, 2010. **28**(20): p. 3271-3277.
37. Hess, K.R., et al., *Metastatic patterns in adenocarcinoma*. Cancer, 2006. **106**(7): p. 1624-1633.
38. Largillier, R., et al., *Prognostic factors in 1038 women with metastatic breast cancer*. Annals of Oncology, 2008: p. mdn424.

39. Smid, M., et al., *Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse*. Cancer research, 2008. **68**(9): p. 3108-3114.
40. Soni, A., et al., *Breast cancer subtypes predispose the site of distant metastases*. American journal of clinical pathology, 2015. **143**(4): p. 471-478.
41. Aversa, C., et al., *Metastatic breast cancer subtypes and central nervous system metastases*. The Breast, 2014. **23**(5): p. 623-628.
42. Warner, E., et al., *Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in unselected Ashkenazi Jewish women with breast cancer*. Journal of the National Cancer Institute, 1999. **91**(14): p. 1241-1247.
43. Group, A.B.C.S., *Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases*. British Journal of Cancer, 2000. **83**(10): p. 1301.
44. Easton, D., et al., *Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families*. The Breast Cancer Linkage Consortium. American journal of human genetics, 1993. **52**(4): p. 678.
45. Struewing, J., et al., *BRCA1 mutations in young women with breast cancer*. The Lancet, 1996. **347**(9013): p. 1493.
46. Fodor, F.H., et al., *Frequency and carrier risk associated with common BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer patients*. The American Journal of Human Genetics, 1998. **63**(1): p. 45-51.
47. Claus, E.B., et al., *Effect of BRCA1 and BRCA2 on the association between breast cancer risk and family history*. Journal of the National Cancer Institute, 1998. **90**(23): p. 1824-1829.
48. Easton, D., et al., *The genetic epidemiology of BRCA1*. The Lancet, 1994. **344**(8924): p. 761.
49. Shih, H.A., et al., *BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families with multiple primary cancers*. Clinical cancer research, 2000. **6**(11): p. 4259-4264.
50. Skolnick, M.H., *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. Science, 1994. **266**(5172): p. 66-71.
51. Chapman, M.S. and I.M. Verma, *Transcriptional activation by BRCA1*. Nature, 1996. **382**(6593): p. 678-679.
52. Zhang, H., et al., *BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity*. Oncogene, 1998. **16**(13): p. 1713-1721.

53. James, C.R., et al., *BRCA1, a potential predictive biomarker in the treatment of breast cancer*. *The Oncologist*, 2007. **12**(2): p. 142-150.
54. Scully, R., et al., *Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells*. *Cell*, 1997. **88**(2): p. 265-275.
55. Scully, R. and D.M. Livingston, *In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2*. *Nature*, 2000. **408**(6811): p. 429-432.
56. Foulkes, W., *BRCA1 functions as a breast stem cell regulator*. *Journal of Medical Genetics*, 2004. **41**(1): p. 1-5.
57. Furuta, S., et al., *Depletion of BRCA1 impairs differentiation but enhances proliferation of mammary epithelial cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. **102**(26): p. 9176-9181.
58. Fan, S., et al., *BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells*. *Science*, 1999. **284**(5418): p. 1354-1356.
59. Hung, M.-C. and Y.-K. Lau. *Basic science of HER-2/neu: a review*. in *Seminars in oncology*. 1999.
60. Farabegoli, F., et al., *c-erbB-2 over-expression in amplified and non-amplified breast carcinoma samples*. *International journal of cancer*, 1999. **84**(3): p. 273-277.
61. Pegram, M. and D. Slamon. *Biological rationale for HER2/neu (c-erbB2) as a target for monoclonal antibody therapy*. in *Seminars in oncology*. 2000.
62. Kesari, A.L., et al., *p53 tumor suppressor protein and tissue proliferative fraction in infiltrating duct carcinoma*. *Journal of surgical oncology*, 1997. **65**(3): p. 159-163.
63. Gorczyca, W., et al., *Immunohistochemical analysis of bcl-2 and p53 expression in breast carcinomas: their correlation with Ki-67 growth fraction*. *Virchows Archiv*, 1995. **426**(3): p. 229-233.
64. Seymour, L., W.R. Bezwoda, and R.D. Dansey, *P-glycoprotein immunostaining correlates with ER and with high Ki67 expression but fails to predict anthracycline resistance in patients with advanced breast cancer*. *Breast cancer research and treatment*, 1995. **36**(1): p. 61-69.
65. Lynch, B.J., D.G. Guinee, and J.A. Holden, *Human DNA topoisomerase II-alpha: a new marker of cell proliferation in invasive breast cancer*. *Human pathology*, 1997. **28**(10): p. 1180-1188.

66. Ioachim, E., et al., *Immunohistochemical localization of metallothionein in human breast cancer in comparison with cathepsin D, stromelysin-1, CD44, extracellular matrix components, P53, Rb, C-erbB-2, EGFR, steroid receptor content and proliferation*. Anticancer research, 1998. **19**(3A): p. 2133-2139.
67. Mokbel, K., et al., *The association between telomerase, histopathological parameters, and KI-67 expression in breast cancer*. The American journal of surgery, 1999. **178**(1): p. 69-72.
68. Binder, C., et al., *Bcl-2 protein expression in breast cancer in relation to established prognostic factors and other clinicopathological variables*. Annals of oncology, 1995. **6**(10): p. 1005-1010.
69. Jarvis, E.M., J.A. Kirk, and C.L. Clarke, *Loss of nuclear BRCA1 expression in breast cancers is associated with a highly proliferative tumor phenotype*. Cancer genetics and cytogenetics, 1998. **101**(2): p. 109-115.
70. Nathanson, K.N., R. Wooster, and B.L. Weber, *Breast cancer genetics: What we know and what we need*. Nat Med, 2001. **7**(5): p. 552-556.
71. Elston, C.W., I.O. Ellis, and S.E. Pinder, *Pathological prognostic factors in breast cancer*. Critical reviews in oncology/hematology, 1999. **31**(3): p. 209-223.
72. Engebraaten, O., H.K.M. Vollan, and A.-L. Børresen-Dale, *Triple-negative breast cancer and the need for new therapeutic targets*. The American journal of pathology, 2013. **183**(4): p. 1064-1074.
73. Paik, S., et al., *A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer*. New England Journal of Medicine, 2004. **351**(27): p. 2817-2826.
74. van 't Veer, L.J., et al., *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer*. Nature, 2002. **415**(6871): p. 530-536.
75. Nicholson, R. and J. Gee, *Oestrogen and growth factor cross-talk and endocrine insensitivity and acquired resistance in breast cancer*. British journal of cancer, 2000. **82**(3): p. 501-513.
76. Slamon, D., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and*. Science, 1987. **3798106**(177): p. 235.
77. Foulkes, W.D., I.E. Smith, and J.S. Reis, *Triple-Negative Breast Cancer*. New England Journal of Medicine, 2010. **363**(20): p. 1938-1948.
78. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-752.

79. Sørliie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(19): p. 10869-10874.
80. Sørliie, T., et al., *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(14): p. 8418-8423.
81. Sotiriou, C., et al., *Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(18): p. 10393-10398.
82. Zhao, H., et al., *Different gene expression patterns in invasive lobular and ductal carcinomas of the breast*. Molecular biology of the cell, 2004. **15**(6): p. 2523-2536.
83. Calza, S., et al., *Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients*. Breast Cancer Research, 2006. **8**(4): p. 1.
84. Hu, Z., et al., *The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms*. BMC genomics, 2006. **7**(1): p. 96.
85. Bertucci, F., et al., *Identification and validation of an ERBB2 gene expression signature in breast cancers*. Oncogene, 2004. **23**(14): p. 2564-2575.
86. Biswas, D.K. and J.D. Iglehart, *Linkage between EGFR family receptors and nuclear factor kappaB (NF- κ B) signaling in breast cancer*. Journal of cellular physiology, 2006. **209**(3): p. 645-652.
87. Yehiely, F., et al., *Deconstructing the molecular portrait of basal-like breast cancer*. Trends in molecular medicine, 2006. **12**(11): p. 537-544.
88. Sørliie, T., et al., *Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms*. BMC genomics, 2006. **7**(1): p. 1.
89. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
90. Nielsen, T.O., et al., *Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma*. Clinical cancer research, 2004. **10**(16): p. 5367-5374.
91. Bergamaschi, A., et al., *Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer*. Genes, Chromosomes and Cancer, 2006. **45**(11): p. 1033-1040.

92. Wang, Z.C., et al., *Loss of heterozygosity and its correlation with expression profiles in subclasses of invasive breast cancers*. *Cancer Research*, 2004. **64**(1): p. 64-71.
93. Loo, L.W., et al., *Array comparative genomic hybridization analysis of genomic alterations in breast cancer subtypes*. *Cancer Research*, 2004. **64**(23): p. 8541-8549.
94. Weigelt, B., F.L. Baehner, and J.S. Reis-Filho, *The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade*. *The Journal of pathology*, 2010. **220**(2): p. 263-280.
95. Carey, L.A., et al., *The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes*. *Clinical Cancer Research*, 2007. **13**(8): p. 2329-2334.
96. Rody, A., et al., *The erbB2+ cluster of the intrinsic gene set predicts tumor response of breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy with docetaxel, doxorubicin and cyclophosphamide within the GEPARTRIO trial*. *The Breast*, 2007. **16**(3): p. 235-240.
97. Jones, C., et al., *CGH analysis of ductal carcinoma of the breast with basaloid/myoepithelial cell differentiation*. *British journal of cancer*, 2001. **85**(3): p. 422.
98. Jones, C., et al., *Molecular cytogenetic identification of subgroups of grade III invasive ductal breast carcinomas with different clinical outcomes*. *Clinical cancer research*, 2004. **10**(18): p. 5988-5997.
99. Potemski, P., et al., *Prognostic relevance of basal cytokeratin expression in operable breast cancer*. *Oncology*, 2006. **69**(6): p. 478-485.
100. Kim, M.-J., et al., *Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes*. *Human pathology*, 2006. **37**(9): p. 1217-1226.
101. Fulford, L.G., et al., *Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival*. *Breast Cancer Research*, 2007. **9**(1): p. 1.
102. Van De Rijn, M., et al., *Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome*. *The American journal of pathology*, 2002. **161**(6): p. 1991-1996.
103. Rakha, E.A., et al., *Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance*. *European Journal of Cancer*, 2006. **42**(18): p. 3149-3156.

104. Chang, H.Y., et al., *Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(10): p. 3738-3743.
105. Morrison, B.J., et al., *Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer*. Breast Cancer Research, 2008. **10**(4): p. 1.
106. Lim, E., et al., *Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers*. Nature medicine, 2009. **15**(8): p. 907-913.
107. Molyneux, G., et al., *BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells*. Cell stem cell, 2010. **7**(3): p. 403-417.
108. Sarrió, D., et al., *Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype*. Cancer research, 2008. **68**(4): p. 989-997.
109. Reis-Filho, J.S., et al., *Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours*. Histopathology, 2006. **49**(1): p. 10-21.
110. Jacquemier, J., et al., *Typical medullary breast carcinomas have a basal/myoepithelial phenotype*. The Journal of pathology, 2005. **207**(3): p. 260-268.
111. Fulford, L., et al., *Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast*. Histopathology, 2006. **49**(1): p. 22-34.
112. Foulkes, W.D., et al., *The prognostic implication of the basal-like (cyclin Ehigh/p27low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer*. Cancer research, 2004. **64**(3): p. 830-835.
113. Banerjee, S., et al., *Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy*. Journal of clinical pathology, 2006. **59**(7): p. 729-735.
114. Rakha, E., et al., *Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation*. The Journal of pathology, 2006. **208**(4): p. 495-506.
115. Tsuda, H., et al., *Large, central acellular zones indicating myoepithelial tumor differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas as markers of predisposition to lung and brain metastases*. The American journal of surgical pathology, 2000. **24**(2): p. 197-202.

116. Langerød, A., et al., *TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer*. *Breast Cancer Research*, 2007. **9**(3): p. 1.
117. Diallo-Danebrock, R., et al., *Protein expression profiling in high-risk breast cancer patients treated with high-dose or conventional dose–dense chemotherapy*. *Clinical Cancer Research*, 2007. **13**(2): p. 488-497.
118. Seewaldt, V.L. and V. Scott, *Rapid progression of basal-type breast cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2007. **356**(13): p. e12.
119. Gaedcke, J., et al., *Predominance of the basal type and HER-2/neu type in brain metastasis from breast cancer*. *Modern pathology*, 2007. **20**(8): p. 864-870.
120. Patanaphan, V., O.M. Salazar, and R. Risco, *Breast cancer: metastatic patterns and their prognosis*. *Southern medical journal*, 1988. **81**(9): p. 1109-1112.
121. Rodriguez-Pinilla, S.M., et al., *Prognostic significance of basal-like phenotype and fascin expression in node-negative invasive breast carcinomas*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(5): p. 1533-9.
122. Hicks, D.G., et al., *Breast cancers with brain metastases are more likely to be estrogen receptor negative, express the basal cytokeratin CK5/6, and overexpress HER2 or EGFR*. *The American journal of surgical pathology*, 2006. **30**(9): p. 1097-1104.
123. Carey, L.A., et al., *Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study*. *Jama*, 2006. **295**(21): p. 2492-2502.
124. Sotiriou, C., et al., *Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis*. *Journal of the National Cancer Institute*, 2006. **98**(4): p. 262-272.
125. Cleator, S., W. Heller, and R.C. Coombes, *Triple-negative breast cancer: therapeutic options*. *The lancet oncology*, 2007. **8**(3): p. 235-244.
126. Vona-Davis, L., et al., *Triple-negative breast cancer and obesity in a rural Appalachian population*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2008. **17**(12): p. 3319-3324.
127. Maegawa, R.O.B. and S.C. Tang, *Triple-Negative Breast Cancer: Unique Biology and Its Management*. *Cancer Investigation*, 2010. **28**(8): p. 878-883.
128. Reis-Filho, J. and A. Tutt, *Triple negative tumours: a critical review*. *Histopathology*, 2008. **52**(1): p. 108-118.

129. Livasy, C.A., et al., *Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma*. *Modern pathology*, 2006. **19**(2): p. 264-271.
130. Sotiriou, C. and L. Pusztai, *Gene-expression signatures in breast cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2009. **360**(8): p. 790-800.
131. Kreike, B., et al., *Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas*. *Breast Cancer Research*, 2007. **9**(5): p. 1.
132. Carey, L.A., *Directed therapy of subtypes of triple-negative breast cancer*. *The oncologist*, 2011. **16**(Supplement 1): p. 71-78.
133. Bertucci, F., et al., *How basal are triple-negative breast cancers?* *International journal of Cancer*, 2008. **123**(1): p. 236-240.
134. Rakha, E.A., et al., *Prognostic markers in triple-negative breast cancer*. *Cancer*, 2007. **109**(1): p. 25-32.
135. Foulkes, W.D., et al., *Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer*. *Journal of the National Cancer Institute*, 2003. **95**(19): p. 1482-1485.
136. Lakhani, S.R., et al., *Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype*. *Clinical Cancer Research*, 2005. **11**(14): p. 5175-5180.
137. Laakso, M., et al., *Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to BRCA1 tumors*. *Modern pathology*, 2005. **18**(10): p. 1321-1328.
138. Palacios, J., et al., *Immunohistochemical characteristics defined by tissue microarray of hereditary breast cancer not attributable to BRCA1 or BRCA2 mutations differences from breast carcinomas arising in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*. *Clinical Cancer Research*, 2003. **9**(10): p. 3606-3614.
139. Arnes, J.B., et al., *Placental cadherin and the basal epithelial phenotype of BRCA1-related breast cancer*. *Clinical Cancer Research*, 2005. **11**(11): p. 4003-4011.
140. Lakhani, S.R., et al., *The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2*. *Journal of Clinical Oncology*, 2002. **20**(9): p. 2310-2318.
141. Turner, N., A. Tutt, and A. Ashworth, *Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers*. *Nature Reviews Cancer*, 2004. **4**(10): p. 814-819.

142. Marty, B., et al., *Frequent PTEN genomic alterations and activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway in basal-like breast cancer cells*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(6): p. R101.
143. Kumar, P. and R. Aggarwal, *An overview of triple-negative breast cancer*. Archives of Gynecology and Obstetrics, 2016. **293**(2): p. 247-269.
144. Millikan, R.C., et al., *Epidemiology of basal-like breast cancer*. Breast cancer research and treatment, 2008. **109**(1): p. 123-139.
145. Kwan, M.L., et al., *Epidemiology of breast cancer subtypes in two prospective cohort studies of breast cancer survivors*. Breast Cancer Research, 2009. **11**(3): p. 1.
146. Maiti, B., et al., *The association of metabolic syndrome with triple-negative breast cancer*. Breast cancer research and treatment, 2010. **121**(2): p. 479-483.
147. Pichard, C., et al., *Insulin resistance, obesity and breast cancer risk*. Maturitas, 2008. **60**(1): p. 19-30.
148. Phipps, A.I., et al., *Reproductive history and oral contraceptive use in relation to risk of triple-negative breast cancer*. Journal of the National Cancer Institute, 2011. **103**(6): p. 470-477.
149. Dolle, J.M., et al., *Risk factors for triple-negative breast cancer in women under the age of 45 years*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2009. **18**(4): p. 1157-1166.
150. Tischkowitz, M., et al., *Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer*. BMC cancer, 2007. **7**(1): p. 1.
151. Dent, R., et al., *Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence*. Clinical Cancer Research, 2007. **13**(15): p. 4429-4434.
152. Colleoni, M., et al., *Classical cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil chemotherapy is more effective in triple-negative, node-negative breast cancer: results from two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(18): p. 2966-73.
153. Cheang, M.C., et al., *Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(5): p. 1368-76.
154. Foulkes, W.D., et al., *Tumor size is an unreliable predictor of prognosis in basal-like breast cancers and does not correlate closely with lymph node status*. Breast Cancer Res Treat, 2009. **117**(1): p. 199-204.

155. Haffty, B.G., et al., *Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2006. **24**(36): p. 5652-5657.
156. Schneider, B.P., et al., *Triple-negative breast cancer: risk factors to potential targets*. Clinical Cancer Research, 2008. **14**(24): p. 8010-8018.
157. Liedtke, C., et al., *Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(8): p. 1275-81.
158. Dowsett, M., et al., *Retrospective analysis of time to recurrence in the ATAC trial according to hormone receptor status: an hypothesis-generating study*. Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(30): p. 7512-7517.
159. Lehmann, B.D., et al., *Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies*. The Journal of clinical investigation, 2011. **121**(7): p. 2750-2767.
160. Burstein, M.D., et al., *Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer*. Clinical Cancer Research, 2015. **21**(7): p. 1688-1698.
161. Jézéquel, P., et al., *Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response*. Breast Cancer Research, 2015. **17**(1): p. 1.
162. Brouckaert, O., et al., *Update on triple-negative breast cancer: prognosis and management strategies*. International journal of women's health, 2012. **4**: p. 511.
163. Yoshida, T., et al., *Eribulin mesilate suppresses experimental metastasis of breast cancer cells by reversing phenotype from epithelial–mesenchymal transition (EMT) to mesenchymal–epithelial transition (MET) states*. British Journal of Cancer, 2014. **110**(6): p. 1497-1505.
164. Ahn, S.G., et al., *Molecular Classification of Triple-Negative Breast Cancer*. Journal of Breast Cancer, 2016. **19**(3): p. 223-230.
165. Bibby, M., *Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages*. European Journal of Cancer, 2004. **40**(6): p. 852-857.
166. Eccles, S., et al., *Preclinical models for the evaluation of targeted therapies of metastatic disease*. Cell biophysics, 1994. **24**(1-3): p. 279-291.
167. Hoffman, R.M., *Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic*. Investigational New Drugs, 1999. **17**(4): p. 343-360.

168. Vernon, A.E., S.J. Bakewell, and L.A. Chodosh, *Deciphering the molecular basis of breast cancer metastasis with mouse models*. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 2007. **8**(3): p. 199-213.
169. Miller, F., *Tumor subpopulation interactions in metastasis*. Invasion & Metastasis, 1982. **3**(4): p. 234-242.
170. Miller, F., B. Miller, and G. Heppner, *Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability*. Invasion & Metastasis, 1982. **3**(1): p. 22-31.
171. Yerlikaya, A., E. Okur, and E. Ulukaya, *The p53-independent induction of apoptosis in breast cancer cells in response to proteasome inhibitor bortezomib*. Tumor Biology, 2012. **33**(5): p. 1385-1392.
172. Ford, C.E., E.J. Ekstrom, and T. Andersson, *Wnt-5a signaling restores tamoxifen sensitivity in estrogen receptor-negative breast cancer cells (Retracted Article. See vol 107, pg 22360, 2010)*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(10): p. 3919-3924.
173. Yoneda, T., et al., *Actions of bisphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma*. Cancer, 2000. **88**(S12): p. 2979-2988.
174. Lelekakis, M., et al., *A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone*. Clinical & experimental metastasis, 1999. **17**(2): p. 163-170.
175. Aslakson, C.J. and F.R. Miller, *Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor*. Cancer Research, 1992. **52**(6): p. 1399-1405.
176. Pulaski, B.A. and S. Ostrand-Rosenberg, *Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7. 1 cell-based tumor vaccines*. Cancer Research, 1998. **58**(7): p. 1486-1493.
177. Eckhardt, B.L., et al., *Genomic Analysis of a Spontaneous Model of Breast Cancer Metastasis to Bone Reveals a Role for the Extracellular Matrix1 1 Department of Defense Breast Cancer Research Program grants DAMD17-98-1-8144 (RL Anderson) and DAMD17-01-1-0371 (MD Tavaría), Susan G. Komen Breast Cancer Foundation predoctoral fellowship (EK Sloan), and NIH/National Cancer Institute grant ROI CA90291 (RL Anderson)*. Molecular Cancer Research, 2005. **3**(1): p. 1-13.
178. Hunter, K.W., *Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors*. Experimental and molecular pathology, 2007. **82**(1): p. 12-24.

179. Redelman, D. and K.W. Hunter, *The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci*. International journal of experimental pathology, 2007. **88**(5): p. 351-360.
180. Tao, K., et al., *Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer*. BMC Cancer, 2008. **8**.
181. Chasapis, C.T., et al., *Zinc and human health: an update*. Archives of toxicology, 2012. **86**(4): p. 521-534.
182. Kelleher, S.L., Y.A. Seo, and V. Lopez, *Mammary gland zinc metabolism: regulation and dysregulation*. Genes & nutrition, 2009. **4**(2): p. 83-94.
183. Kelleher, S.L., et al., *Zinc in specialized secretory tissues: roles in the pancreas, prostate, and mammary gland*. Advances in Nutrition: An International Review Journal, 2011. **2**(2): p. 101-111.
184. Seo, Y.A., V. Lopez, and S.L. Kelleher, *A histidine-rich motif mediates mitochondrial localization of ZnT2 to modulate mitochondrial function*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2011. **300**(6): p. C1479-C1489.
185. Taylor, K.M., et al., *ZIP7-mediated intracellular zinc transport contributes to aberrant growth factor signaling in antihormone-resistant breast cancer cells*. Endocrinology, 2008. **149**(10): p. 4912-4920.
186. Haase, H. and W. Maret, *Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling*. Experimental cell research, 2003. **291**(2): p. 289-298.
187. Andreini, C., et al., *Counting the zinc-proteins encoded in the human genome*. Journal of proteome research, 2006. **5**(1): p. 196-201.
188. Vallee, B.L. and K.H. Falchuk, *The biochemical basis of zinc physiology*. Physiological Reviews, 1993. **73**(1): p. 79-118.
189. Vallee, B.L. and D.S. Auld, *Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins*. Biochemistry, 1990. **29**(24): p. 5647-5659.
190. Berg, J.M. and Y. Shi, *The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc*. Science, 1996. **271**(5252): p. 1081.
191. Rink, L., *Zinc and the immune system*. Proceedings of the Nutrition Society, 2000. **59**(04): p. 541-552.

192. Heximer, S. and D. Forsdyke, *A human putative lymphocyte G0/G1 switch gene homologous to a rodent gene encoding a zinc-binding potential transcription factor*. DNA and cell biology, 1993. **12**(1): p. 73-88.
193. Klug, A., *Zinc finger peptides for the regulation of gene expression*. Journal of molecular biology, 1999. **293**(2): p. 215-218.
194. Prasad, A.S., *Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model*. The American journal of clinical nutrition, 1991. **53**(2): p. 403-412.
195. Sukegawa, J. and G. Blobel, *A nuclear pore complex protein that contains zinc finger motifs, binds DNA, and faces the nucleoplasm*. Cell, 1993. **72**(1): p. 29-38.
196. Brown, K.H., et al., *Effect of supplemental zinc on the growth and serum zinc concentrations of prepubertal children: a meta-analysis of randomized controlled trials*. The American journal of clinical nutrition, 2002. **75**(6): p. 1062-1071.
197. Prasad, A.S., et al., *Zinc in cancer prevention*. Nutrition and cancer, 2009. **61**(6): p. 879-887.
198. Huang, E.P., *Metal ions and synaptic transmission: think zinc*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(25): p. 13386-13387.
199. Yamasaki, S., et al., *Zinc is a novel intracellular second messenger*. The Journal of cell biology, 2007. **177**(4): p. 637-645.
200. Lin, C.Y., et al., *Matrix metalloproteinase-9 cooperates with transcription factor Snail to induce epithelial-mesenchymal transition*. Cancer science, 2011. **102**(4): p. 815-827.
201. Hadler-Olsen, E., et al., *Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease*. FEBS journal, 2011. **278**(1): p. 28-45.
202. Benaud, C., R.B. Dickson, and E.W. Thompson, *Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer*. Breast cancer research and treatment, 1998. **50**(2): p. 97-116.
203. Radisky, E.S. and D.C. Radisky, *Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer*. Journal of mammary gland biology and neoplasia, 2010. **15**(2): p. 201-212.
204. Prasad, A.S., *Zinc in human health: an update*. The journal of trace elements in experimental medicine, 1998. **11**(2-3): p. 63-87.
205. Taylor, D., *Zinc deficiency*. Lancet, 2002. **360**: p. 1405-9.

206. Song, Y., et al., *Zinc deficiency affects DNA damage, oxidative stress, antioxidant defenses, and DNA repair in rats*. The Journal of nutrition, 2009. **139**(9): p. 1626-1631.
207. Song, Y., et al., *Dietary zinc restriction and repletion affects DNA integrity in healthy men*. The American journal of clinical nutrition, 2009. **90**(2): p. 321-328.
208. Fenton, M.R. and J.P. Burke, *Subcellular zinc distribution in livers and tumors of plasmacytoma-bearing mice*. Nutrition Research, 1985. **5**(12): p. 1383-1391.
209. Askari, A., C.L. Long, and W.S. Blakemore, *Zinc, copper, and parenteral nutrition in cancer. A review*. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 1980. **4**(6): p. 561-571.
210. Fong, L., et al., *Induction of esophageal tumors in zinc-deficient rats by single low doses of N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA): analysis of cell proliferation, and mutations in H-ras and p53 genes*. Carcinogenesis, 1997. **18**(8): p. 1477-1484.
211. Bales, C., et al., *The effect of zinc deficiency and food restriction on prostaglandin E 2 and thromboxane B 2 in saliva and plasma of rats*. Prostaglandins, 1986. **31**(5): p. 859-868.
212. Kennedy, C., et al., *Kinetic studies on phagocytosis and lysosomal digestion of rod outer segments by human retinal pigment epithelial cells in vitro*. Experimental cell research, 1994. **210**(2): p. 209-214.
213. Mares-Perlman, J.A., et al., *Association of zinc and antioxidant nutrients with age-related maculopathy*. Archives of ophthalmology, 1996. **114**(8): p. 991-997.
214. McClain, C.J., E.J. Kasarskis Jr, and J.J. Allen, *Functional consequences of zinc deficiency*. Progress in food & nutrition science, 1984. **9**(1-2): p. 185-226.
215. Prasad, A., *Laboratory diagnosis of zinc deficiency*. Journal of the American College of Nutrition, 1985. **4**(6): p. 591-598.
216. Adler, M., et al., *Cytotoxic actions of the heavy metal chelator TPEN on NG108-15 neuroblastoma-glioma cells*. Neurotoxicology, 1999. **20**(4): p. 571-582.
217. Ahn, Y.-H., et al., *Depletion of intracellular zinc induces protein synthesis-dependent neuronal apoptosis in mouse cortical culture*. Experimental neurology, 1998. **154**(1): p. 47-56.
218. Martin, S., et al., *Programmed cell death (apoptosis) in lymphoid and myeloid cell lines during zinc deficiency*. Clinical & Experimental Immunology, 1991. **83**(2): p. 338-343.

219. McCabe Jr, M.J., S.A. Jiang, and S. Orrenius, *Chelation of intracellular zinc triggers apoptosis in mature thymocytes*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1993. **69**(1): p. 101-110.
220. Rudolf, E. and M. Cervinka, *Depletion of endogenous zinc stores induces oxidative stress and cell death in human melanoma cells*. ACTA MEDICA-HRADEC KRALOVE-, 2004. **47**(2): p. 91-96.
221. Treves, S., et al., *Apoptosis is dependent on intracellular zinc and independent of intracellular calcium in lymphocytes*. Experimental cell research, 1994. **211**(2): p. 339-343.
222. Truong-Tran, A., et al., *Cellular zinc fluxes and the regulation of apoptosis/gene-directed cell death*. The Journal of nutrition, 2000. **130**(5): p. 1459S-1466S.
223. Zalewski, P.D., I.J. Forbes, and W. Betts, *Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn (II) using zinquin [(2-methyl-8-p-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy) acetic acid], a new specific fluorescent probe for Zn (II)*. Biochemical Journal, 1993. **296**(2): p. 403-408.
224. King, L., F. Osati-Ashtiani, and P. Fraker, *Apoptosis plays a distinct role in the loss of precursor lymphocytes during zinc deficiency in mice*. The Journal of nutrition, 2002. **132**(5): p. 974-979.
225. Clegg, M.S., et al., *Zinc deficiency-induced cell death*. IUBMB life, 2005. **57**(10): p. 661-669.
226. Duffy, J., et al., *A decrease in intracellular zinc level precedes the detection of early indicators of apoptosis in HL-60 cells*. Apoptosis, 2001. **6**(3): p. 161-172.
227. Kolenko, V., et al., *Mechanism of apoptosis induced by zinc deficiency in peripheral blood T lymphocytes*. Apoptosis, 2001. **6**(6): p. 419-429.
228. Chimienti, F., et al., *Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relationship between zinc depletion, activation of caspases, and cleavage of Sp family transcription factors*. Biochemical pharmacology, 2001. **62**(1): p. 51-62.
229. Takahashi, A., et al., *Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(16): p. 8395-8400.
230. Sato, M. and I. Bremner, *Oxygen free radicals and metallothionein*. Free Radical Biology and Medicine, 1993. **14**(3): p. 325-337.

231. Cai, L., J.B. Klein, and Y.J. Kang, *Metallothionein inhibits peroxynitrite-induced DNA and lipoprotein damage*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(50): p. 38957-38960.
232. Bagchi, D., et al., *Protective effects of zinc salts on TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation, glutathione depletion, DNA damage and peritoneal macrophage activation in mice*. General Pharmacology: The Vascular System, 1998. **30**(1): p. 43-50.
233. Burke, J.P. and M.R. Fenton, *Effect of a zinc-deficient diet on lipid peroxidation in liver and tumor subcellular membranes*. Experimental Biology and Medicine, 1985. **179**(2): p. 187-191.
234. Virgili, F., et al., *Intestinal damage induced by zinc deficiency is associated with enhanced CuZn superoxide dismutase activity in rats: effect of dexamethasone or thyroxine treatment*. Free Radical Biology and Medicine, 1999. **26**(9): p. 1194-1201.
235. Golub, M.S., et al., *Studies of marginal zinc deprivation in rhesus monkeys: infant behavior*. The American journal of clinical nutrition, 1985. **42**(6): p. 1229-1239.
236. Hainaut, P. and J. Milner, *A structural role for metal ions in the "wild-type" conformation of the tumor suppressor protein p53*. Cancer research, 1993. **53**(8): p. 1739-1742.
237. Ho, E. and B.N. Ames, *Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFκB, and API DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(26): p. 16770-16775.
238. Barbieri, D., et al., *Inhibition of apoptosis by zinc: a reappraisal*. Biochemical and biophysical research communications, 1992. **187**(3): p. 1256-1261.
239. Fukamachi, Y., et al., *Zinc suppresses apoptosis of U937 cells induced by hydrogen peroxide through an increase of the Bcl-2/Bax ratio*. Biochemical and biophysical research communications, 1998. **246**(2): p. 364-369.
240. Perry, D.K., et al., *Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3 a novel target for zinc in the inhibition of apoptosis*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(30): p. 18530-18533.
241. Kagara, N., et al., *Zinc and its transporter ZIP10 are involved in invasive behavior of breast cancer cells*. Cancer Science, 2007. **98**(5): p. 692-697.
242. Carter, J.E., et al., *Involvement of redox events in caspase activation in zinc-depleted airway epithelial cells*. Biochemical and biophysical research communications, 2002. **297**(4): p. 1062-1070.

243. Ho, E., C. Courtemanche, and B.N. Ames, *Zinc deficiency induces oxidative DNA damage and increases p53 expression in human lung fibroblasts*. The Journal of nutrition, 2003. **133**(8): p. 2543-2548.
244. Henry, J.B. and J.P. AuBuchon, *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. Archives of Pathology and Laboratory Medicine, 1997. **121**(9): p. 1016.
245. Eide, D.J., *The oxidative stress of zinc deficiency*. Metallomics, 2011. **3**(11): p. 1124-1129.
246. Oteiza, P.I., M.S. Clegg, and C.L. Keen, *Short-term zinc deficiency affects nuclear factor- κ B nuclear binding activity in rat testes*. The Journal of nutrition, 2001. **131**(1): p. 21-26.
247. Adler, A.L., et al., *Serum Zinc Levels in Patients with Basal-Cell Carcinoma*. The Journal of dermatologic surgery and oncology, 1981. **7**(11): p. 911-914.
248. Marklund, S.L., et al., *Copper-and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues*. Cancer Research, 1982. **42**(5): p. 1955-1961.
249. Westman, N.G. and S.L. Marklund, *Copper-and zinc-containing superoxide dismutase and manganese-containing superoxide dismutase in human tissues and human malignant tumors*. Cancer research, 1981. **41**(7): p. 2962-2966.
250. Zangger, K., et al., *Nitric oxide selectively releases metals from the amino-terminal domain of metallothioneins: potential role at inflammatory sites*. The FASEB Journal, 2001. **15**(7): p. 1303-1305.
251. Theocharis, S., et al., *Metallothionein expression in human neoplasia*. Histopathology, 2004. **45**(2): p. 103-118.
252. Oteiza, P.I., et al., *Zinc deficiency induces oxidative stress and AP-1 activation in 3T3 cells*. Free Radical Biology and Medicine, 2000. **28**(7): p. 1091-1099.
253. Hashemi, M., et al., *Cytotoxic effects of intra and extracellular zinc chelation on human breast cancer cells*. European Journal of Pharmacology, 2007. **557**(1): p. 9-19.
254. DeWys, W. and W. Pories, *Inhibition of a spectrum of animal tumors by dietary zinc deficiency*. Journal of the National Cancer Institute, 1972. **48**(2): p. 375-381.
255. DeWys, W., et al., *Inhibition of Walker 256 carcinosarcoma growth by dietary zinc deficiency*. Experimental Biology and Medicine, 1970. **135**(1): p. 17-22.

256. Fenton, M.R., et al., *Effect of a zinc-deficient diet on the growth of an IgM-secreting plasmacytoma (TEPC-183)*. Journal of the National Cancer Institute, 1980. **65**(6): p. 1271-1272.
257. Mills, B., et al., *A specific dietary zinc requirement for the growth of Walker 256/MI tumor in the rat*. The American journal of clinical nutrition, 1981. **34**(9): p. 1661-1669.
258. Mills, B.J., W.L. Broghamer, and P.J.H.A.D. LINDEMAN, *Inhibition of Tumor Growth by Zinc Depletion of Rats*. J. Nutr, 1984. **114**: p. 746-752.
259. Minkel, D.T., et al., *Zinc deficiency and growth of Ehrlich ascites tumor*. Cancer research, 1979. **39**(7 Part 1): p. 2451-2456.
260. Haase, H. and D. Beyersmann, *Uptake and intracellular distribution of labile and total Zn (II) in C6 rat glioma cells investigated with fluorescent probes and atomic absorption*. Biometals, 1999. **12**(3): p. 247-254.
261. Lichten, L.A. and R.J. Cousins, *Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation*. Annual review of nutrition, 2009. **29**: p. 153-176.
262. Taylor, K.M. and R.I. Nicholson, *The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2003. **1611**(1): p. 16-30.
263. Palmiter, R.D. and L. Huang, *Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers*. Pflügers Archiv, 2004. **447**(5): p. 744-751.
264. Eide, D.J., *The SLC39 family of metal ion transporters*. Pflügers Archiv, 2004. **447**(5): p. 796-800.
265. Gaither, L.A. and D.J. Eide, *Eukaryotic zinc transporters and their regulation*, in *Zinc Biochemistry, Physiology, and Homeostasis*. 2001, Springer. p. 65-84.
266. Liuzzi, J.P. and R.J. Cousins, *Mammalian zinc transporters*. Annu. Rev. Nutr., 2004. **24**: p. 151-172.
267. Taylor, K., et al., *Structure-function analysis of a novel member of the LIV-1 subfamily of zinc transporters, ZIP14*. FEBS letters, 2005. **579**(2): p. 427-432.
268. Weaver, B.P., et al., *Novel zinc-responsive post-transcriptional mechanisms reciprocally regulate expression of the mouse Slc39a4 and Slc39a5 zinc transporters (Zip4 and Zip5)*. Biological chemistry, 2007. **388**(12): p. 1301-1312.
269. Dufner-Beattie, J., et al., *The adaptive response to dietary zinc in mice involves the differential cellular localization and zinc regulation of the zinc transporters ZIP4 and ZIP5*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(47): p. 49082-49090.

270. Vallee, B. and D. Auld, *Zinc metallochemistry in biochemistry*. Exs, 1995. **73**: p. 259.
271. Stennard, F.A., et al., *Characterisation of six additional human metallothionein genes*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1994. **1218**(3): p. 357-365.
272. Quaife, C.J., et al., *Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia*. *Biochemistry*, 1994. **33**(23): p. 7250-7259.
273. Palmiter, R.D., et al., *MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992. **89**(14): p. 6333-6337.
274. Mididoddi, S., et al., *Isoform-specific expression of metallothionein mRNA in the developing and adult human kidney*. *Toxicology letters*, 1996. **85**(1): p. 17-27.
275. Cavigelli, M., J. Kägi, and P.E. Hunziker, *Cell- and inducer-specific accretion of human isometallothioneins*. *Biochemical Journal*, 1993. **292**(2): p. 551-554.
276. Jahroudi, N., et al., *Cell-type specific and differential regulation of the human metallothionein genes. Correlation with DNA methylation and chromatin structure*. *Journal of Biological Chemistry*, 1990. **265**(11): p. 6506-6511.
277. Kaegi, J.H. and A. Schaeffer, *Biochemistry of metallothionein*. *Biochemistry*, 1988. **27**(23): p. 8509-8515.
278. Jayasurya, A., et al., *Proliferative potential in nasopharyngeal carcinoma: correlations with metallothionein expression and tissue zinc levels*. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(10): p. 1809-1812.
279. Cherian, M., et al., *Biosynthesis and metabolism of metallothionein in rat during perinatal development*, in *Metallothionein II*. 1987, Springer. p. 499-505.
280. Vallee, B.L. and D.S. Auld, *Cocatalytic zinc motifs in enzyme catalysis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993. **90**(7): p. 2715-2718.
281. Zeng, J., et al., *Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc finger containing factor Spl*. *FEBS letters*, 1991. **279**(2): p. 310-312.
282. Jacob, C., W. Maret, and B.L. Vallee, *Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998. **95**(7): p. 3489-3494.

283. Cano-Gauci, D.F. and B. Sarkar, *Reversible zinc exchange between metallothionein and the estrogen receptor zinc finger*. FEBS letters, 1996. **386**(1): p. 1-4.
284. Abdel-Mageed, A.B. and K.C. Agrawal, *Activation of nuclear factor κ B: potential role in metallothionein-mediated mitogenic response*. Cancer research, 1998. **58**(11): p. 2335-2338.
285. Meplan, C., M.-J. Richard, and P. Hainaut, *Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells*. Oncogene, 2000. **19**(46): p. 5227-5236.
286. Cho, Y., et al., *Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations*. SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-, 1994: p. 346-346.
287. Zeng, J., B.L. Vallee, and J. Kägi, *Zinc transfer from transcription factor IIIA fingers to thionein clusters*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(22): p. 9984-9988.
288. Verhaegh, G.W., et al., *Modulation of p53 protein conformation and DNA-binding activity by intracellular chelation of zinc*. Molecular carcinogenesis, 1998. **21**(3): p. 205-214.
289. Deng, D., et al., *Metallothionein and apoptosis in primary human hepatocellular carcinoma and metastatic adenocarcinoma*. Histopathology, 1998. **32**(4): p. 340-347.
290. Otsuka, F., et al., *PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A PROTEIN THAT BINDS TO METAL-RESPONSIVE ELEMENTS OF THE HUMAN METALLOTHIONEIN II(A) GENE*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(38): p. 23700-23707.
291. Smirnova, I.V., et al., *Zinc and cadmium can promote rapid nuclear translocation of metal response element-binding transcription factor-1*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(13): p. 9377-9384.
292. John, E., et al., *Zinc in innate and adaptive tumor immunity*. Journal of translational medicine, 2010. **8**(1): p. 1.
293. Prasad, A.S. and O. Kucuk, *Zinc in cancer prevention*. Cancer and Metastasis Reviews, 2002. **21**(3-4): p. 291-295.
294. Costello, L.C. and R.B. Franklin, *The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: connecting the dots*. Molecular Cancer, 2006. **5**(1): p. 1.

295. Tashiro, H., et al., *Variation in the distribution of trace elements in hepatoma*. Biological Trace Element Research, 2003. **95**(1): p. 49-63.
296. Leone, N., et al., *Zinc, copper, and magnesium and risks for all-cause, cancer, and cardiovascular mortality*. Epidemiology, 2006. **17**(3): p. 308-314.
297. Chakravarty, P., A. Ghosh, and J. Chowdhury, *Zinc in human malignancies*. Neoplasma, 1986. **33**(1): p. 85.
298. Gupta, S., S. Singh, and V. Shukla, *Copper, zinc, and Cu/Zn ratio in carcinoma of the gallbladder*. Journal of Surgical Oncology, 2005. **91**(3): p. 204-208.
299. Margalioth, E.J., J.G. Schenker, and M. Chevion, *Copper and zinc levels in normal and malignant tissues*. Cancer, 1983. **52**(5): p. 868-872.
300. Mulay, I.L., et al., *Trace-metal analysis of cancerous and non-cancerous human tissues*. Journal of the National Cancer Institute, 1971. **47**(1): p. 1-13.
301. Newberne, M., T.F. Schrage, and S. Broitman, *Esophageal carcinogenesis in the rat: zinc deficiency and alcohol effects on tumor induction*. Pathobiology, 1997. **65**(1): p. 39-45.
302. Schwartz, M.K., *Role of trace elements in cancer*. Cancer Research, 1975. **35**(11 Part 2): p. 3481-3487.
303. Samet, J.M., et al., *Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 1998. **275**(3): p. L551-L558.
304. Wu, W., et al., *Activation of the EGF receptor signaling pathway in human airway epithelial cells exposed to metals*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 1999. **277**(5): p. L924-L931.
305. Kim, S., et al., *Extracellular zinc activates p70 S6 kinase through the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(34): p. 25979-25984.
306. Ostrakhovitch, E.A., et al., *Copper ions strongly activate the phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway independent of the generation of reactive oxygen species*. Archives of biochemistry and biophysics, 2002. **397**(2): p. 232-239.
307. Zhai, Q., et al., *Copper induces apoptosis in BA/F3 β cells: Bax, reactive oxygen species, and NF κ B are involved*. Journal of cellular physiology, 2000. **184**(2): p. 161-170.

308. Narayanan, V.S., C.A. Fitch, and C.W. Levenson, *Tumor suppressor protein p53 mRNA and subcellular localization are altered by changes in cellular copper in human Hep G2 cells*. The Journal of nutrition, 2001. **131**(5): p. 1427-1432.
309. Liang, J.-Y., et al., *Inhibitory effect of zinc on human prostatic carcinoma cell growth*. The Prostate, 1999. **40**(3): p. 200.
310. Hansson, A., *Extracellular zinc ions induces mitogen-activated protein kinase activity and protein tyrosine phosphorylation in bombesin-sensitive Swiss 3T3 fibroblasts*. Archives of biochemistry and biophysics, 1996. **328**(2): p. 233-238.
311. Ho, Y., et al., *Selective inhibition of mitogen-activated protein kinase phosphatases by zinc accounts for extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent oxidative neuronal cell death*. Molecular pharmacology, 2008. **74**(4): p. 1141-1151.
312. Bourdeau, A., N. Dubé, and M.L. Tremblay, *Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP*. Current opinion in cell biology, 2005. **17**(2): p. 203-209.
313. Wu, W., et al., *Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on tyrosine 845 is required for zinc-induced Ras activation*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(27): p. 24252-24257.
314. Krężel, A. and W. Maret, *Thionein/metallothionein control Zn (II) availability and the activity of enzymes*. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2008. **13**(3): p. 401-409.
315. Michieli, P., et al., *Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway*. Cancer Research, 1994. **54**(13): p. 3391-3395.
316. Sionov, R.V. and Y. Haupt, *The cellular response to p53: the decision between life and death*. Oncogene, 1999. **18**(45): p. 6145-6157.
317. Oren, M., *Decision making by p53: life, death and cancer*. Cell Death & Differentiation, 2003. **10**(4): p. 431-442.
318. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(8): p. 594-604.
319. Stewart, Z.A. and J.A. Pietenpol, *p53 Signaling and cell cycle checkpoints*. Chemical research in toxicology, 2001. **14**(3): p. 243-263.
320. Ostrakhovitch, E.A. and M.G. Cherian, *Differential regulation of signal transduction pathways in wild type and mutated p53 breast cancer epithelial cells by copper and zinc*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004. **423**(2): p. 351-361.

321. Flieger, D., G. Riethmüller, and H. Ziegler-Heitbrock, *Zn²⁺ inhibits both tumor necrosis factor-mediated DNA fragmentation and cytolysis*. International journal of cancer, 1989. **44**(2): p. 315-319.
322. Telford, W.G. and P.J. Fraker, *Preferential induction of apoptosis in mouse CD4⁺ CD8⁺ $\alpha\beta$ TCR^{lo}CD3^{elo} thymocytes by zinc*. Journal of cellular physiology, 1995. **164**(2): p. 259-270.
323. Kondoh, M., et al., *Requirement of caspase and p38MAPK activation in zinc-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells*. European Journal of Biochemistry, 2002. **269**(24): p. 6204-6211.
324. Wätjen, W., et al., *Induction of apoptosis in mammalian cells by cadmium and zinc*. Environmental Health Perspectives, 2002. **110**(Suppl 5): p. 865.
325. Provinciali, M., et al., *Reactive oxygen species modulate Zn²⁺-induced apoptosis in cancer cells*. Free Radical Biology and Medicine, 2002. **32**(5): p. 431-445.
326. Gumulec, J., et al., *Insight to physiology and pathology of zinc (II) ions and their actions in breast and prostate carcinoma*. Current medicinal chemistry, 2011. **18**(33): p. 5041-5051.
327. Ostrakhovitch, E.A. and M.G. Cherian, *Role of p53 and reactive oxygen species in apoptotic response to copper and zinc in epithelial breast cancer cells*. Apoptosis, 2005. **10**(1): p. 111-121.
328. Ho, E., *Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2004. **15**(10): p. 572-578.
329. Schrauzer, G., *Anticarcinogenic effects of selenium*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2000. **57**(13-14): p. 1864-1873.
330. Whitfield, J., et al., *The regulation of cell proliferation by calcium and cyclic AMP*. Molecular and Cellular Biochemistry, 1979. **27**(3): p. 155-179.
331. Kiremidjian-Schumacher, L., et al., *Supplementation with selenium augments the functions of natural killer and lymphokine-activated killer cells*. Biological Trace Element Research, 1996. **52**(3): p. 227-239.
332. Yücel, I., et al., *Serum copper and zinc levels and copper/zinc ratio in patients with breast cancer*. Biological Trace Element Research, 1994. **40**(1): p. 31.
333. Piccinini, L., et al., *A case-control study on selenium, zinc, and copper in plasma and hair of subjects affected by breast and lung cancer*. Biological Trace Element Research, 1996. **51**(1): p. 23-30.

334. Garland, M., et al., *Toenail trace element levels and breast cancer: a prospective study*. American journal of epidemiology, 1996. **144**(7): p. 653-660.
335. Gupta, S.K., et al., *Serum trace elements and Cu/Zn ratio in breast cancer patients*. Journal of Surgical Oncology, 1991. **46**(3): p. 178-181.
336. Cavallo, F., et al., *Zinc and copper in breast cancer. A joint study in northern Italy and southern France*. Cancer, 1991. **67**(3): p. 738-745.
337. Adzersen, K.-H., et al., *Raw and cooked vegetables, fruits, selected micronutrients, and breast cancer risk: a case-control study in Germany*. Nutrition and cancer, 2003. **46**(2): p. 131-137.
338. Gerber, M., et al., *Antioxidants in female breast cancer patients*. Cancer Investigation, 1991. **9**(4): p. 421-428.
339. Levi, F., et al., *Dietary intake of selected micronutrients and breast-cancer risk*. International Journal of Cancer, 2001. **91**(2): p. 260-263.
340. Nandi, S., R.C. Guzman, and J. Yang, *Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(9): p. 3650-3657.
341. Woo, W. and Z. Xu, *Body zinc distribution profile during N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in rats at various levels of dietary zinc intake*. Biological trace element research, 2002. **87**(1-3): p. 157-169.
342. Lee, R., et al., *Zinc accumulation in N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary tumors is accompanied by an altered expression of ZnT-1 and metallothionein*. Experimental Biology and Medicine, 2003. **228**(6): p. 689-696.
343. Lee, S., et al., *Low zinc intake suppressed N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in Sprague–Dawley rats*. Carcinogenesis, 2004. **25**(10): p. 1879-1885.
344. TÎMÂR, J., et al., *Oral administration of a trace element preparation and zinc inhibit liver metastasis of 3LL-HH murine tumor cells*. International Journal of Molecular Medicine, 1998. **2**: p. 105-108.
345. Schwarte, A.E., et al., *Trace elements in normal and malignant human breast tissue*. Surgery, 1974. **76**(2): p. 325-329.
346. Rizk, S.L. and H.H. Sky-Peck, *Comparison between concentrations of trace elements in normal and neoplastic human breast tissue*. Cancer Research, 1984. **44**(11): p. 5390-5394.

347. Geraki, K., M. Farquharson, and D. Bradley, *Concentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue: a synchrotron XRF study*. *Physics in medicine and biology*, 2002. **47**(13): p. 2327.
348. Geraki, K., M. Farquharson, and D. Bradley, *X-ray fluorescence and energy dispersive X-ray diffraction for the characterisation of breast tissue*. *Radiation Physics and Chemistry*, 2004. **71**(3): p. 969-970.
349. Santoliquido, P., H. Southwick, and J. Olwin, *Trace metal levels in cancer of the breast*. *Surgery, gynecology & obstetrics*, 1976. **142**(1): p. 65-70.
350. Cui, Y., et al., *Levels of Zinc, Selenium, Calcium, and Iron in Benign Breast Tissue and Risk of Subsequent Breast Cancer*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2007. **16**(8): p. 1682-1685.
351. Tupper, R., R. Watts, and A. Wormald, *The incorporation of ⁶⁵Zn in mammary tumours and some other tissues of mice after injection of the isotope*. *Biochemical Journal*, 1955. **59**(2): p. 264.
352. Müller, W. and R. Iffland, *Studies on metals in meningiomas by atomic absorption spectrometry*. *Acta neuropathologica*, 1981. **55**(1): p. 53-58.
353. Roguljić, A., et al., *Iron, copper, and zinc liver tissue levels in patients with malignant lymphomas*. *Cancer*, 1980. **46**(3): p. 565-569.
354. Collecchi, P., F. Cafiero, and C. Vecchio, *Erythrocyte, plasma and serum levels of zinc and copper in normal subjects and in patients with rectal cancer*. *Medical Science Research*, 1987. **15**(17): p. 1073-1074.
355. Sengas, J.B., et al., *Zinc and copper in cancer of the larynx*. *MEDICAL SCIENCE RESEARCH-BIOCHEMISTRY*, 1987. **15**(13-14): p. 793-794.
356. Aldor, Y., et al., *Zinc and copper levels in plasma, erythrocytes, and whole blood in cancer patients*. *Klinische Wochenschrift*, 1982. **60**(7): p. 375-377.
357. Smith, J.C., J.T. Holbrook, and D.E. Danford, *Analysis and evaluation of zinc and copper in human plasma and serum*. *Journal of the American College of Nutrition*, 1985. **4**(6): p. 627-638.
358. Oyama, T., et al., *A case-case study comparing the usefulness of serum trace elements (Cu, Zn and Se) and tumor markers (CEA, SCC and SLX) in non-small cell lung cancer patients*. *Anticancer research*, 2002. **23**(1B): p. 605-612.
359. Oyama, T., et al., *Efficiency of serum copper/zinc ratio for differential diagnosis of patients with and without lung cancer*. *Biological trace element research*, 1994. **42**(2): p. 115-127.

360. Hunter, D. and R. Van Dam, *Biochemical indicators of dietary intake*, in *Nutritional epidemiology*, W. WC, Editor. 2012, Oxford University Press: New York. p. 150-212.
361. Gibson, R., *Assessment of trace-element status*. 1990, Oxford University Press, New York. p. 511-576.
362. Pires, L.V., et al., *Analysis of plasma and erythrocyte zinc levels in premenopausal women with breast cancer*. *Nutr Hosp*, 2011. **26**(2): p. 293-297.
363. Percudani, M., et al., *Hydroxyproline and zinc excretion in patients with neoplastic breast disease*. *International surgery*, 1980. **66**(3): p. 233-236.
364. Garofalo, J.A., et al., *Serum zinc, copper, and the Cu/Zn ratio in patients with benign and malignant breast lesions*. *Cancer*, 1980. **46**(12): p. 2682-2685.
365. Taylor, K., *LIV-1 Breast Cancer Protein Belongs to New Family of Histidine-Rich Membrane Proteins with Potential to Control Intracellular Zn²⁺ Homeostasis*. *IUBMB life*, 2000. **49**(4): p. 249-253.
366. Taylor, K.M., *A distinct role in breast cancer for two LIV-1 family zinc transporters*. *Biochemical Society Transactions*, 2008. **36**(6): p. 1247-1251.
367. Lopez, V., F. Foolad, and S.L. Kelleher, *ZnT2-overexpression represses the cytotoxic effects of zinc hyper-accumulation in malignant metallothionein-null T47D breast tumor cells*. *Cancer letters*, 2011. **304**(1): p. 41-51.
368. Schneider, J., et al., *Identification and meta-analysis of a small gene expression signature for the diagnosis of estrogen receptor status in invasive ductal breast cancer*. *International journal of cancer*, 2006. **119**(12): p. 2974-2979.
369. Tozlu, S., et al., *Identification of novel genes that co-cluster with estrogen receptor alpha in breast tumor biopsy specimens, using a large-scale real-time reverse transcription-PCR approach*. *Endocrine-related cancer*, 2006. **13**(4): p. 1109-1120.
370. McClelland, R.A., et al., *Oestrogen-regulated genes in breast cancer: association of pLIV1 with response to endocrine therapy*. *British journal of cancer*, 1998. **77**(10): p. 1653.
371. Taylor, K.M., et al., *Structure–function analysis of LIV-1, the breast cancer-associated protein that belongs to a new subfamily of zinc transporters*. *Biochemical Journal*, 2003. **375**(1): p. 51-59.
372. Manning, D., et al., *The role of four oestrogen-responsive genes, pLIV1, pS2, pSYD3 and pSYD8, in predicting responsiveness to endocrine therapy in primary breast cancer*. *European Journal of Cancer*, 1993. **29**(10): p. 1462-1468.

373. Manning, D., et al., *Oestrogen-regulated genes in breast cancer: association of pLIV1 with lymph node involvement*. European Journal of Cancer, 1994. **30**(5): p. 675-678.
374. Cano, A., et al., *The transcription factor snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nature cell biology, 2000. **2**(2): p. 76-83.
375. Zhou, B.P. and M.-C. Hung, *Wnt, hedgehog, and snail: sister pathways that control by GSK-3beta and beta-Trcp in the regulation of metastasis*. Cell Cycle, 2005. **4**(6): p. 772-776.
376. Kambe, T., et al., *Overview of mammalian zinc transporters*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2004. **61**(1): p. 49-68.
377. Kasper, G., et al., *Expression levels of the putative zinc transporter LIV-1 are associated with a better outcome of breast cancer patients*. International Journal of Cancer, 2005. **117**(6): p. 961-973.
378. Schmid, K., et al., *Presence and possible significance of immunocytochemically demonstrable metallothionein over-expression in primary invasive ductal carcinoma of the breast*. Virchows Archiv A, 1993. **422**(2): p. 153-159.
379. Fresno, M., et al., *Localization of metallothionein in breast carcinomas. An immunohistochemical study*. Virchows Archiv A, 1993. **423**(3): p. 215-219.
380. Goulding, H., et al., *Metallothionein expression in human breast cancer*. British journal of cancer, 1995. **72**(4): p. 968.
381. Surowiak, P., et al., *Elevated metallothionein (MT) expression in invasive ductal breast cancers predicts tamoxifen resistance*. 2005.
382. Petros, W.P., et al., *Associations between drug metabolism genotype, chemotherapy pharmacokinetics, and overall survival in patients with breast cancer*. Journal of clinical oncology, 2005. **23**(25): p. 6117-6125.
383. Cherian, M.G., et al., *Contemporary issues in toxicology: role of metallothionein in carcinogenesis*. Toxicology and applied pharmacology, 1994. **126**(1): p. 1-5.
384. Theocharis, S., A. Margeli, and A. Koutselinis, *Metallothionein: a multifunctional protein from toxicity to cancer*. The International journal of biological markers, 2002. **18**(3): p. 162-169.
385. Yap, X., et al., *Over-expression of metallothionein predicts chemoresistance in breast cancer*. The Journal of pathology, 2009. **217**(4): p. 563-570.

386. Jin, R., et al., *Metallothionein 1F mRNA expression correlates with histological grade in breast carcinoma*. Breast cancer research and treatment, 2001. **66**(3): p. 265-272.
387. Bakka, A., et al., *Resistance against cis-dichlorodiammineplatinum in cultured cells with a high content of metallothionein*. Toxicology and applied pharmacology, 1981. **61**(2): p. 215-226.
388. Satoh, M., et al., *Modulation of resistance to anticancer drugs by inhibition of metallothionein synthesis*. Cancer research, 1994. **54**(20): p. 5255-5257.
389. Bier, B., et al., *Immunohistochemical demonstration of metallothionein in normal human breast tissue and benign and malignant breast lesions*. Breast cancer research and treatment, 1994. **30**(3): p. 213-221.
390. Domingo, J.L., et al., *ACUTE ZINC INTOXICATION - COMPARISON OF THE ANTIDOTAL EFFICACY OF SEVERAL CHELATING-AGENTS*. Veterinary and Human Toxicology, 1988. **30**(3): p. 224-228.
391. Masarik, M., et al., *Monitoring of the prostate tumour cells redox state and real-time proliferation by novel biophysical techniques and fluorescent staining*. Integrative Biology, 2012. **4**(6): p. 672-684.
392. Kizek, R., L. Trnkova, and E. Palecek, *Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(20): p. 4801-4807.
393. Ellman, G.L., *TISSUE SULFHYDRYL GROUPS*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1959. **82**(1): p. 70-77.
394. Woo, W. and Z.M. Xu, *Body zinc distribution profile during N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in rats at various levels of dietary zinc intake*. Biological Trace Element Research, 2002. **87**(1-3): p. 157-169.
395. Franklin, R.B. and L.C. Costello, *Zinc as an anti-tumor agent in prostate cancer and in other cancers*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2007. **463**(2): p. 211-217.
396. Hou, G., et al., *Comparison of lowering copper levels with tetrathiomolybdate and zinc on mouse tumor and doxorubicin models*. Translational Research, 2006. **148**(6): p. 309-314.
397. Silva, M.P., et al., *Role of Ca, Fe, Cu and Zn in breast cancer: study by X-ray fluorescence techniques and immunohistochemical analysis*. X-Ray Spectrometry, 2013. **42**(4): p. 303-311.

398. Uzzo, R.G., et al., *Zinc inhibits nuclear factor-kappa B activation and sensitizes prostate cancer cells to cytotoxic agents*. *Clinical Cancer Research*, 2002. **8**(11): p. 3579-3583.
399. Nakshatri, H., et al., *Constitutive activation of NF-kappa B during progression of breast cancer to hormone-independent growth*. *Molecular and Cellular Biology*, 1997. **17**(7): p. 3629-3639.
400. Franklin, R.B. and L.C. Costello, *The Important Role of the Apoptotic Effects of Zinc in the Development of Cancers*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2009. **106**(5): p. 750-757.
401. Feng, P., et al., *Direct effect of zinc on mitochondrial apoptogenesis in prostate cells*. *Prostate*, 2002. **52**(4): p. 311-318.
402. Jones, P.A. and P.W. Laird, *Cancer epigenetics comes of age*. *Nature Genetics*, 1999. **21**(2): p. 163-167.
403. Ushijima, T. and E. Okochi-Takada, *Aberrant methylations in cancer cells: Where do they come from?* *Cancer Science*, 2005. **96**(4): p. 206-211.
404. Wallwork, J.C. and J.A. Duerre, *EFFECT OF ZINC-DEFICIENCY ON METHIONINE METABOLISM, METHYLATION REACTIONS AND PROTEIN-SYNTHESIS IN ISOLATED PERFUSED RAT-LIVER*. *Journal of Nutrition*, 1985. **115**(2): p. 252-262.
405. Marks, P.A. and W.S. Xu, *Histone Deacetylase Inhibitors: Potential in Cancer Therapy*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2009. **107**(4): p. 600-608.
406. Somoza, J.R., et al., *Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases*. *Structure*, 2004. **12**(7): p. 1325-1334.
407. Fatemi, M., et al., *The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA*. *Journal of Molecular Biology*, 2001. **309**(5): p. 1189-1199.
408. Zhou, Q., P. Atadja, and N.E. Davidson, *Histone deacetylase inhibitor LBH589 reactivates silenced estrogen receptor alpha (ER) gene expression without loss of DNA hypermethylation*. *Cancer Biology & Therapy*, 2007. **6**(1): p. 64-69.
409. Fan, L.Z. and M.G. Cherian, *Potential role of p53 on metallothionein induction in human epithelial breast cancer cells*. *British Journal of Cancer*, 2002. **87**(9): p. 1019-1026.

410. Ostrakhovitch, E.A., et al., *P53 mediated regulation of metallothionein transcription in breast cancer cells*. Journal of Cellular Biochemistry, 2007. **102**(6): p. 1571-1583.
411. Shimizu, M., et al., *Effect of glutathione depletion and metallothionein gene expression on arsenic-induced cytotoxicity and c-myc expression in vitro*. Toxicological Sciences, 1998. **45**(2): p. 204-211.
412. Feng, J.-F., et al., *Serum total oxidant/antioxidant status and trace element levels in breast cancer patients*. International Journal of Clinical Oncology, 2012. **17**(6): p. 575-583.
413. Kasapovic, J., et al., *Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages*. Cell Biochemistry and Function, 2008. **26**(6): p. 723-730.
414. Al-Qubaisi, M.S., et al., *Cytotoxicity of nickel zinc ferrite nanoparticles on cancer cells of epithelial origin*. International Journal of Nanomedicine, 2013. **8**: p. 2497-2508.
415. Skrajnowska, D., et al., *The Effect of Zinc- and Copper Sulphate Supplementation on Tumor and Hair Concentrations of Trace Elements (Zn, Cu, Fe, Ca, Mg, P) in Rats with DMBA-Induced Breast Cancer*. Polish Journal of Environmental Studies, 2011. **20**(6): p. 1585-1592.
416. Mills, B.J., et al., *INHIBITION OF TUMOR-GROWTH BY ZINC DEPLETION OF RATS*. Journal of Nutrition, 1984. **114**(4): p. 746-752.
417. Dewys, W., et al., *INHIBITION OF WALKER 256 CARCINOSARCOMA GROWTH BY DIETARY ZINC DEFICIENCY*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1970. **135**(1): p. 17-&.
418. Tang, D.G. and K.V. Honn, *Apoptosis of W256 carcinosarcoma cells of the monocytoid origin induced by NDGA involves lipid peroxidation and depletion of GSH: Role of 12-lipoxygenase in regulating tumor cell survival*. Journal of Cellular Physiology, 1997. **172**(2): p. 155-170.
419. Gardner, H.A., et al., *CHARACTERIZATION OF DIFFERENT CELL SUBPOPULATIONS DERIVED FROM AN EXPERIMENTAL TUMOR-MODEL*. Cancer Investigation, 1988. **6**(2): p. 161-165.
420. Costlow, M.E., R.A. Buschow, and W.L. McGuire, *PROLACTIN RECEPTORS IN AN ESTROGEN RECEPTOR-DEFICIENT MAMMARY-CARCINOMA*. Science, 1974. **184**(4132): p. 85-86.

421. Kau, P., et al., *A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease.* *Bmc Cancer*, 2012. **12**.
422. Drasin, D.J., T.P. Robin, and H.L. Ford, *Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition: examining the functional consequences of plasticity.* *Breast Cancer Research*, 2011. **13**(6).
423. Pulaski, B.A. and S. Ostrand-Rosenberg, *Mouse 4T1 breast tumor model.* *Current protocols in immunology*, 2001: p. 20.2. 1-20.2. 16.
424. Grattan, B.J. and H.C. Freake, *Zinc and Cancer: Implications for LIV-1 in Breast Cancer.* *Nutrients*, 2012. **4**(7): p. 648-675.
425. Ames, B.N., *Micronutrients prevent cancer and delay aging.* *Toxicology Letters*, 1998. **103**: p. 5-18.

Příloha: