



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ**  
**ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ**  
**ΣΤΟΝ ΟΡΜΟΝΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ»**

**ΦΩΤΕΙΝΟΣ-ΙΩΑΝΝΗΣ ΔΗΜΗΤΡΑΚΟΠΟΥΛΟΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ-ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΑΣΠΑΣΙΑ ΤΣΕΖΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, Επιβλέπουσα**  
**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΔΗΜΑΣ, ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ, Μέλος**  
**ΒΑΡΒΑΡΑ ΤΡΑΧΑΝΑ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, Μέλος**

**ΛΑΡΙΣΑ, 2020**



**UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES  
FACULTY OF MEDICINE**



**POSTGRADUATE MASTER PROGRAM  
“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”**

**MASTER’S THESIS  
« EPIGENETICS AND ENDOCRINE RESISTANCE  
IN ER+ BREAST CANCER»**

**FOTEINOS-IOANNIS DIMITRAKOPOULOS**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με τα λιγοστά τούτα λόγια θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που συνέβαλαν είτε άμεσα, είτε έμμεσα στην υλοποίηση της ανά χείρας μεταπτυχιακής εργασίας. Πρώτα απ' όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόθερμα την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Ασπασία Τσέζου, η οποία, από την πρώτη στιγμή, μας αγκάλιασε, μας έδωσε την ευκαιρία να παρακολουθήσουμε τον συγκεκριμένο κύκλο Μεταπτυχιακών Σπουδών και μας στήριξε ουσιαστικά για την ευόδωση των στόχων μας. Τα ουσιαστικά της σχόλια και οι διορθώσεις της συνέδραμαν επίσης τα μάλα στην βελτίωση της μεταπτυχιακής μας εργασίας. Της είμαι υπόχρεος.

Επίσης, οφείλω θερμές ευχαριστίες και προς τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής κ. Κ. Δήμα και κ. Β. Τραχανά για την συμβολή τους, όπως επίσης και για τις πολύτιμες γνώσεις που μας μετέδωσαν, μετά των υπολοίπων διδασκόντων, κατά τη διάρκεια των διαλέξεων.

Θα ήθελα επίσης να μνημονεύσω και να ευχαριστήσω τον αείμνηστο Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών Ιωάννη Βαράκη, ο οποίος με απέραντη αγάπη, διδασκαλικό ζήλο και απεριόριστο ενθουσιασμό με μύησε στο μαγικό κόσμο της Μοριακής Βιολογίας και της Βιολογίας του καρκίνου, υποστήριξε ακαταπαύστως τις επιστημονικές μου αναζητήσεις και αφιέρωσε ατελείωτες ώρες στην προσωπική μου κατάρτιση και παιδαγωγία καταδεικνύοντας το μεγαλείο του ανδρός. Ως αντίδωρο, του αφιερώνω τούτη τη μικρή εργασία κατά τη συγγραφή της οποίας ανεχώρησε εκ των προσκαίρων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους αιμνήστους γονείς μου που εκδαπάνησαν εαυτούς εις την παιδαγωγία μου και την ευήθη σύζυγό μου Αναστασία Κοττόρου για την αφειδώλευτη υποστήριξη, την υπομονή και την συνεχή συμπαράστασή της καθόλη τη διάρκεια του συγκεκριμένου κύκλου σπουδών, τον οποίο διαβήκαμε μαζί, αλλά και καθόλη τη διάρκεια της κοινή μας πορείας. Δίχως εκείνη δεν θα είχε ξεκινήσει και δεν θα είχε περαιωθεί ο,τιδήποτε.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Παρά τις εντυπωσιακές εξελίξεις κατά τη διάρκεια των τριών τελευταίων δεκαετιών, ο καρκίνος του μαστού (ΚΜ) συνεχίζει να αποτελεί τον συχνότερο τύπο καρκίνου και μία από τις συχνότερες αιτίες θανάτου από καρκίνο στον γυναικείο πληθυσμό. Η θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενών με ορμονοεξαρτώμενο ΚΜ αποτελεί πολύ συχνά μία πρόκληση, καθώς η de novo ή η επίκτητη αντίσταση στερεί σημαντικό ποσοστό των ασθενών από το κλινικό όφελος που θα είχε από την καλά ανεκτή ενδοκρινική θεραπεία.

Η ανάπτυξη αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία εμπλέκει ένα πλήθος μοριακών μηχανισμών μεταξύ των οποίων η τροποποίηση των οδών σηματοδότησης των οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων, η ενεργοποίηση παράλληλων μονοπατιών υποδοχέων τυροσινικής κινάσης, η μεταβολή ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, η ενεργοποίηση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, καθώς επίσης και η μεταβολή της λειτουργίας των βλαστικών κυττάρων. Εκτός των προηγουμένων, τα τελευταία χρόνια, ένας διαρκώς αυξανόμενος αριθμός μελετών υποστηρίζουν τον κομβικό ρόλο των επιγενετικών αλλαγών τόσο στην έναρξη και εξέλιξη του ΚΜ, όσο και στην ανάπτυξη της αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία. Οι αλλαγές αυτές αφορούν διαφοροποιήσεις στη μεθυλίωση του DNA, σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών καθώς επίσης και σε αλλαγές στα ncRNAs.

Ειδικότερα, η ευαισθησία του ΚΜ στην ενδοκρινική θεραπεία έχει σχετισθεί με την μεθυλίωση του DNA σε διάφορα γονίδια, όπως επίσης και στους ενισχυτές των γονιδίων που ρυθμίζονται από τα οιστρογόνα. Ένας ακόμη επιγενετικός μηχανισμός, που επηρεάζει την έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα και τη σχετιζόμενη με αυτόν αντίσταση, είναι οι τροποποιήσεις των ιστονών, ενώ μεταλλάξεις ή πολυμορφισμοί των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα που εμπλέκονται στην επιγενετική ρύθμιση συχνά έχουν επίσης ενοχοποιηθεί. Τα δεδομένα υποστηρίζουν επίσης το ρόλο των ncRNAs, όχι μόνο στην παθογένεια και την ανάπτυξη του ΚΜ, αλλά και στην ανάπτυξη αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία. Είναι επιτακτική συνεπώς η διεξαγωγή περισσότερων μελετών που θα αποσαφηνίσουν το ρόλο και την κλινική σημασία των επιγενετικών αλλαγών στην αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία.

**Λέξεις- Κλειδιά: καρκίνος μαστού, επιγενετική, ενδοκρινική θεραπεία, αντίσταση, ορμονοεξαρτώμενος**

## ABSTRACT

Despite the enormous advances during the last three decades, breast cancer (BC) continues to be the most frequent type of cancer as well as one of the most frequent cancer-related causes of death in women. Therapeutic management of patients with hormone receptor-positive BC becomes very often a challenge, since de novo or acquired resistance deprives a significant percentage of the patients from the clinical benefit of well tolerated hormone therapy.

Resistance to endocrine therapy implicates a number of molecular mechanisms, including changes in hormone receptor signaling, activation of parallel signaling pathways, modifications of cell cycle regulators, activation of different transcription factor as well as changes in the activity of stem cells. In addition, a growing number of studies supports the pivotal role of epigenetic changes not only in the initiation and progression of breast cancer, but also in the resistance to the endocrine therapy. These changes refer to differences in DNA methylation, histone post-translational modifications as well as to alterations in ncRNAs.

Sensitivity of BC to endocrine therapy has been associated with DNA methylation of specific genes as well as enhancers of genes regulated from estrogens. An additional epigenetic mechanism, which influences estrogen receptor expression and the relevant resistance are histone modifications. Mutations or polymorphisms of genes coding enzymes, which participates in the epigenetic regulation, have also been implicated. Current data also support the role of ncRNAs not only in the pathogenesis and progression of BC, but also in the development of resistance to endocrine therapy.

In conclusion, further studies are needed to shed light on the role and clinical significance of epigenetic changes in the endocrine therapy resistance.

**Key words: breast cancer, epigenetics, endocrine therapy, resistance, hormone-dependent**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>8</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....</b>	<b>9</b>
1. Καρκίνος μαστού.....	9
1.1 Επιδημιολογία του καρκίνου μαστού.....	9
1.2 Μοριακή κατηγοριοποίηση του καρκίνου μαστού.....	11
1.3 Παθογένεια του καρκίνου μαστού.....	13
1.4 Οι ορμόνες του φύλου και ο καρκίνος του μαστού.....	16
1.4.1 Οιστρογόνα και υποδοχέας οιστρογόνων στον καρκίνο μαστού.....	21
1.4.2 Προγεστερόνη και υποδοχέας προγεστερόνης στον καρκίνο μαστού.....	23
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 .....</b>	<b>24</b>
2. Θεραπεία του καρκίνου μαστού.....	24
2.1 Ορμονική θεραπεία-κατηγορίες φαρμάκων.....	24
2.1.1 Εκλεκτικοί Τροποποιητές των Υποδοχέων των Οιστρογόνων (SERMS).....	24
2.1.2 Εκλεκτικοί τροποποιητές των υποδοχέων των οιστρογόνων με αμιγή ανταγωνιστική δράση (Selective Estrogen Receptor Downregulators, SERDs).....	25
2.1.3 Αναστολείς της αρωματάσης (AIs).....	26
2.2 Θεραπεία του ορμονοεξαρτώμενου πρώιμου καρκίνου του μαστού.....	28
2.3 Θεραπεία του προχωρημένου καρκίνου του μαστού.....	30
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....</b>	<b>31</b>
3. Αντίσταση στην ορμονοθεραπεία του καρκίνου του μαστού.....	31
3.1 Μηχανισμοί αντίστασης στην ορμονοθεραπεία του καρκίνου του μαστού.....	32
3.2 Μειορρύθμιση του υποδοχέα οιστρογόνων.....	32
3.3 Μεταλλάξεις του υποδοχέα των οιστρογόνων.....	32
3.4 Υποδοχείς προγεστερόνης.....	34
3.5 Υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (receptor tyrosine kinase-RTK) .....	34
3.6 Ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου.....	40
3.7 Μεταγραφικοί παράγοντες.....	42

3.8 Παράγοντας επαγόμενος από την υποξία (HIF) .....	51
3.9 Αρχέγονα καρκινικά κύτταρα (stem cells) .....	52
3.10 Οξειδωτικό stress.....	54
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 .....</b>	<b>56</b>
4. Επιγενετική και αντίσταση στην ορμονοθεραπεία.....	56
4.1 Εισαγωγή στην επιγενετική του καρκίνου του μαστού .....	56
4.1.1 Μεθυλίωση του DNA.....	59
4.1.2 Τροποποιήσεις ιστονών.....	63
4.1.3 Μη κωδικά μόρια RNA.....	68
4.2 Επιγενετικοί μηχανισμοί και αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία.....	72
 <b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>81</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>83</b>

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του μαστού (ΚΜ) αποτελεί παγκοσμίως τον συχνότερο τύπο καρκίνου και μία από τις συχνότερες αιτίες θανάτου από καρκίνο στον γυναικείο πληθυσμό<sup>1</sup>. Αν και η πρόωμη (μη-μεταστατική) μορφή της νόσου είναι ιάσιμη σε ποσοστό 70-80% των ασθενών, η παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων καθιστά την νόσο μη ιάσιμη, παρά την δραματική αύξηση των θεραπευτικών επιλογών τις τελευταίες δεκαετίες<sup>2</sup>.

Η εντατική ερευνητική προσπάθεια τα τελευταία χρόνια έχει αποκαλύψει τον ετερογενή χαρακτήρα της νόσου σε μοριακό επίπεδο και έχει φωτίσει πτυχές της παθογένειας της νόσου. Μέχρι στιγμής, τα σημαντικότερα ανοσοϊστοχημικά και μοριακά χαρακτηριστικά, που εν πολλοίς καθορίζουν και την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας, είναι η έκφραση των υποδοχέων των οιστρογόνων (estrogen receptor-ERs) και της προγεστερόνης (progesterone receptor-PRs) καθώς επίσης και η έκφραση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2)<sup>3</sup>. Στα προηγούμενα, πιο πρόσφατα, προστέθηκαν και οι μεταλλάξεις των γονιδίων *BRCA1* (BRCA1 DNA Repair Associated) και *BRCA2* (BRCA2 DNA Repair Associated), δύο γονιδίων που σχετίζονται με την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA<sup>4</sup>.

Η σύγχρονη θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού στηρίζεται αφενός μεν στο κλινικό στάδιο της νόσου, όπως επίσης και στα επιμέρους ανοσοϊστοχημικά και μοριακά χαρακτηριστικά της νόσου<sup>2</sup>. Ο πρώτος πυλώνας στη θεραπεία του ΚΜ παραμένει ο τοπικοπεριοχικός έλεγχος της νόσου μέσω της χειρουργικής εξαίρεσης και της εφαρμογής ακτινοθεραπείας. Τον δεύτερο πυλώνα αποτελεί η συστηματική χορήγηση διαφόρων αντινεοπλασματικών σκευασμάτων, η επιλογή των οποίων βασίζεται στα ιδιαίτερα ιστολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά της νόσου<sup>5</sup>.

Ο ρόλος της συστηματικής θεραπείας είναι σημαντικός τόσο για την πρόωμη νόσο, αλλά κυρίως για την μεταστατική νόσο. Στις συστηματικές θεραπείες για τον ΚΜ συμπεριλαμβάνονται, εκτός της κλασικής χημειοθεραπείας, η ενδοκρινική θεραπεία για την ορμονοεξαρτώμενη νόσο, οι στοχεύοντες παράγοντες έναντι του HER2 για τις ασθενείς με HER2 θετική νόσο, διάφορα ανοσοθεραπευτικά καθώς επίσης και ένας ταχύτατα διευρυνόμενος αριθμός μοριακών στοχευόντων παραγόντων<sup>4</sup>. Παρά την αλματώδη πρόοδο στον τομέα της θεραπευτικής του ΚΜ τις τελευταίες τρεις δεκαετίες,



η τελική κλινική έκβαση των ασθενών με ΚΜ καθορίζεται από την ανάπτυξη αντοχής στις χορηγούμενες θεραπείες <sup>6</sup>.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

### **1. Καρκίνος μαστού**

#### **1.1 Επιδημιολογία του καρκίνου μαστού**

Ο ΚΜ αποτελεί τη συχνότερη κακοήθεια στο γυναικείο πληθυσμό σε παγκόσμιο επίπεδο. Το 2018, εκτιμάται πως 2,1 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις γυναικών με καρκίνο του μαστού διαγνώστηκαν και 626.679 γυναίκες απεβίωσαν από την ίδια ασθένεια <sup>7</sup>. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση των 28 κρατών μελών, το 2018, ο ΚΜ ήταν ο συχνότερος τύπος καρκίνου στις γυναίκες, με επίπτωση 28,2% και θνητότητα 16,2% <sup>8</sup>. Ομοίως, στις Ηνωμένες Πολιτείες, εκτιμάται ότι για το έτος 2020 ο ΚΜ θα παραμείνει η συχνότερη κακοήθεια στον γυναικείο πληθυσμό (30% του συνόλου των κακοηθειών) και η δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο, μετά τις κακοήθειες των πνευμόνων, με 42.170 νέους θανάτους, που αντιστοιχούν στο 15% του συνόλου των σχετιζόμενων με τον καρκίνο θανάτων <sup>9</sup>.

Ένα εξαιρετικά ανησυχητικό επιδημιολογικό στοιχείο είναι η παρατηρούμενη σταθερή αύξηση της επίπτωσης του ΚΜ κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών. Σε παγκόσμιο επίπεδο, παρατηρήθηκε ετήσια αύξηση της παγκόσμιας επίπτωσης του ΚΜ κατά 3,1%, με αποτέλεσμα, οι 641.000 νέες περιπτώσεις που είχαν καταγραφεί το 1980 να ξεπεράσουν το 1,6 εκατομμύρια το 2010 <sup>10</sup>. Παρά τις διαφοροποιήσεις ανάλογα με τη γεωγραφική κατανομή και τη μελέτη, φαίνεται πως αυτή η αυξητική τάση αφορά τόσο τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (ΗΠΑ) <sup>11</sup> και τη Δυτική Ευρώπη, όσο και την Ασία <sup>12</sup>. Στις ΗΠΑ παρατηρήθηκε δραματική αύξηση της επίπτωσης κατά 30% μεταξύ των ετών 1975 και 2010 <sup>13</sup>, ενώ τα τελευταία 5 έτη φαίνεται πως η ετήσια αύξηση είναι 0,3% ανά έτος <sup>11</sup>. Σχεδόν παρόμοια πορεία ακολουθούν οι χώρες της Ευρώπης με την αύξηση της επίπτωσης μετά το 2010 να είναι μικρή <sup>14</sup>. Ομοίως, σε Ασιατικούς πληθυσμούς, όπως αυτός της Σανγκάης, έχει παρατηρηθεί, κατά τη διάρκεια των τελευταίων 40 ετών, ετήσια αύξηση της επίπτωσης κατά 2,9% και της θνητότητας κατά 0,87% <sup>15</sup>. Δυστυχώς, αυτή η αυξητική τάση φαίνεται πως θα συνεχισθεί αφενός μεν λόγω της αύξησης του παγκόσμιου πληθυσμού, αφετέρου δε της γήρανσης που παρατηρείται ειδικά στις δυτικές κοινωνίες <sup>2</sup>.

Η επίπτωση του ΚΜ χαρακτηρίζεται από διακύμανση σε σχέση με τη γεωγραφική κατανομή και τα επιμέρους κοινωνικο-οικονομικά χαρακτηριστικά κάθε χώρας και κάθε γεωγραφικής περιοχής. Η μεγαλύτερη επίπτωση παρατηρείται σε γεωγραφικές περιοχές με υψηλό εισόδημα (92 περιπτώσεις/ 100.000 κατοίκους στη Βόρεια Αμερική), ενώ η χαμηλότερη επίπτωση εντοπίζεται σε περιοχές με χαμηλά οικονομικά χαρακτηριστικά <sup>12,16</sup>. Η ευρεία αυτή διαφοροποίηση του προτύπου επίπτωσης αντανακλά τόσο τη διαφορά στην έκθεση σε παράγοντες κινδύνου, όσο και τη δυνατότητα πρόσβασης σε μαστογραφικούς ελέγχους, που αποτελεί το κύριο μέσο ανίχνευσης του ΚΜ. Η διαφορά στην πρόσβαση σε μέσα και δομές υγείας εξηγεί επιπλέον και τη διαφορετική έκβαση που έχουν ασθενείς χωρών με υψηλό ακαθάριστο εθνικό προϊόν (ΑΕΠ) συγκριτικά με τις ασθενείς χωρών με χαμηλό ή μέσο ΑΕΠ. Στις χώρες με υψηλό ΑΕΠ, η διάγνωση επιτυγχάνεται νωρίτερα, εξασφαλίζοντας ευνοϊκότερη έκβαση των ασθενών σε σχέση με τις ασθενείς των χωρών με χαμηλό ΑΕΠ <sup>17</sup>.

Η ηλικία εμφάνισης του ΚΜ φαίνεται πως επίσης σχετίζεται με τη φυλετική καταγωγή των ασθενών και την χώρα προέλευσης. Έχει δειχθεί πως ο ΚΜ παρουσιάζεται πολύ πρωιμότερα σε γυναίκες ασιατικής καταγωγής (συνήθως μεταξύ 40 -50 ετών) σε αντίθεση με τις ασθενείς των δυτικών κοινωνιών που νοσούν συνήθως την 6<sup>η</sup> δεκαετία της ζωής τους <sup>18,19</sup>. Επιπλέον, οι ασθενείς από αναπτυσσόμενες χώρες διαγιγνώσκονται περίπου 10 έτη νωρίτερα συγκριτικά με τις ασθενείς από αναπτυγμένες χώρες. Το ποσοστό των ασθενών νεώτερων των 35 ετών κυμαίνεται μεταξύ 10% στις αναπτυγμένες χώρες και μέχρι 25% στις αναπτυσσόμενες χώρες της Ασίας <sup>20</sup>.

Η φυλετική καταγωγή φαίνεται πως αντικατοπτρίζεται και στη βιολογία της νόσου καθώς το φυλετικό υπόβαθρο σχετίζεται με συγκεκριμένα βιολογικά χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα, οι αμερικανίδες με αφρικανική καταγωγή εμφανίζουν, συχνότερα από κάθε άλλη εθνική ομάδα, τριπλά αρνητικό ΚΜ, έναν ιδιαίτερα επιθετικό τύπο ΚΜ. Επίσης, η ίδια ομάδα ασθενών διαγιγνώσκεται συχνότερα σε μεταστατικό στάδιο και με υψηλότερη συχνότητα χαμηλά διαφοροποιημένου ή αδιαφοροποίητου ΚΜ <sup>21</sup>. Επιπρόσθετα, το εθνικό υπόβαθρο φαίνεται πως σχετίζεται και με διαφορετικού βαθμού όφελος από τις ιατρικές παρεμβάσεις. Συγκεκριμένα, το όφελος πενταετούς επιβίωσης των γυναικών μη ισπανικής καταγωγής με προχωρημένη νόσο ήταν σαφώς υψηλότερο σε σύγκριση με άλλες φυλετικές ομάδες (19–37% και

16–26% αντίστοιχα) <sup>22,23</sup>. Ωστόσο, οι διαφορές αυτές έχουν πολυπαραγοντικό χαρακτήρα και επηρεάζονται σαφώς από τη γενετική προδιάθεση, τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, τις καθημερινές συνήθειες και τις διατροφικές επιλογές.

Η διαφοροποίηση στην επίπτωση στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές συνοδεύεται από διαφοροποίηση και στη θνητότητα των ασθενών με ΚΜ. Η θνητότητα, όπως και η επίπτωση, έχει στενά σχετισθεί με το οικονομικό επίπεδο, με τις ασθενείς από χώρες με χαμηλό και μέσο εισόδημα, όπως πολλές ασιατικές και υποσαχάρειες χώρες, να παρουσιάζουν μικρότερη επιβίωση, εξαιτίας του προχωρημένου σταδίου της νόσου, όπως επίσης, και των περιορισμένων δυνατοτήτων πρόσβασης σε θεραπεία και σε δομές υγείας <sup>24</sup>. Η θνητότητα επίσης διαφοροποιείται ανάμεσα στους υποτύπους του ΚΜ με τις ασθενείς με HER2 θετική νόσο να έχουν τη χειρότερη επιβίωση, ακολουθούμενη από τις ασθενείς με τριπλά αρνητική νόσο και τις ασθενείς με έκφραση των ER και PR <sup>25</sup>.

## 1.2 Κατηγοριοποίηση του καρκίνου μαστού

Η κατηγοριοποίηση του ΚΜ ιστορικά βασίστηκε στα ιστοπαθολογοανατομικά δεδομένα. Σύμφωνα με αυτή την ταξινόμηση, ο ΚΜ του διακρίνεται σε *in situ* και διηθητικό καρκίνωμα. Το 75% των διηθητικών καρκινωμάτων είναι πορογενή, ενώ το υπόλοιπο 25% περιλαμβάνει άλλους τύπους, όπως το λοβιακό καρκίνωμα, το σωληνώδες, το βλεννώδες και το μεταπλαστικό καρκίνωμα, τα καρκινώματα με μυελοειδή, νευροενδοκρινή και αποκρινή χαρακτηριστικά <sup>26</sup>.

Πιο πρόσφατα, στην κατηγοριοποίηση του ΚΜ καθώς επίσης και στην καθ' ημέρα κλινική πράξη έχουν ενσωματωθεί ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά του καρκινικού κυττάρου, όπως η έκφραση των ER, των PR και του υποδοχέα HER2 <sup>27</sup>. Οι υποδοχείς ER και PR εκφράζονται στο 75% των περιστατικών ΚΜ, η δε εκτίμησή τους γίνεται με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας και όριο θετικότητας το 1% των κυττάρων <sup>28</sup>. Ο έτερος δείκτης, που έχει θεμελιώδη ρόλο τόσο στην παθογένεια της νόσου, όσο και στην αντιμετώπιση του ΚΜ, είναι ο HER2, οποίος υπερεκφράζεται στο 15% των ασθενών, συνηθέστερα λόγω ενίσχυσης του γονιδίου του <sup>29</sup>. Οι HER2 θετικοί όγκοι χαρακτηρίζονται από επιθετική κλινική πορεία σε σύγκριση με τους όγκους που υπερεκφράζουν τους ER και PR, η δε εκτίμησή τους γίνεται με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας και υβριδισμού <sup>30</sup>.

Ακόμη μεγαλύτερη κατανόηση των υποκείμενων μοριακών μηχανισμών και της ετερογένειας του ΚΜ, προήλθε από τη μοριακή κατηγοριοποίηση που βασίστηκε στο μοριακό χαρακτηρισμό του ΚΜ. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, με δεδομένη την ιλιγγιώδη ανάπτυξη στο πεδίο της γενετικής του καρκίνου και των τεχνολογιών υψηλής απόδοσης που έχουν αναπτυχθεί, πλήθος μοριακών δεδομένων έχουν χρησιμοποιηθεί για την μοριακή κατηγοριοποίηση και την ταξινόμηση των ασθενών με ΚΜ <sup>31</sup>. Η ανάλυση δεδομένων γονιδιακής έκφρασης από τις σύγχρονες τεχνολογίες ευρείας κλίμακας έχουν οδηγήσει στην κατηγοριοποίηση του ΚΜ σε 5 εγγενείς κατηγορίες, οι οποίες ονομαστικά είναι: του αυλικού τύπου Α (luminal A), του αυλικού τύπου Β (luminal B), ο υπότυπος με υπερέκφραση του HER2, ο υπότυπος του βασικού τύπου (basal-like) καθώς επίσης και ο αιγινματικός normal-like υπότυπος <sup>32</sup>. Σε σχέση με τα ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά, την έκφραση των υποδοχέων ER, PR και HER2 που παρουσιάστηκε στην προηγούμενη παράγραφο, οι luminal A και B υπότυποι χαρακτηρίζονται από την έκφραση του ER, ενώ οι HER2 θετικοί και οι βασικού τύπου υπότυποι χαρακτηρίζονται από την απουσία της έκφρασης του ER <sup>27</sup>.

Συνολικά, οι luminal A και B υπότυποι χαρακτηρίζονται από προφίλ έκφρασης γονιδίων που προσομοιάζει αυτό των φυσιολογικών αυλικών κυττάρων του μαστού. Επίσης, συμπεριλαμβάνονται και γονίδια που σχετίζονται με την οδό σηματοδότησης του ER <sup>32</sup>. Ο luminal A είναι ο πλέον κοινός μοριακός υπότυπος αντιπροσωπεύοντας το 40-50% των διηθητικών ΚΜ <sup>33</sup>. Πρόκειται ως επί το πλείστον για υψηλής διαφοροποίησης καρκινώματα, με πολύ καλή πρόγνωση σε σχέση με τους άλλους μοριακούς υπότυπους. Οι luminal B τείνουν να έχουν χαμηλότερη διαφοροποίηση και χειρότερη πρόγνωση συγκριτικά με τους luminal A. Επίσης, έχουν χαμηλότερη έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τον ER και υψηλότερη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τους luminal A. Κλινικά, οι ασθενείς με luminal A έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να οφεληθούν από την ορμονική θεραπεία σε σχέση με τους ασθενείς με luminal B <sup>27</sup>.

Ο τρίτος εγγενής υπότυπος, αυτός με την υπερέκφραση του HER2, αποτελεί το 15% των διηθητικών ΚΜ και χαρακτηρίζεται από την υπερέκφραση του υποδοχέα HER2 και των σχετιζόμενων με αυτόν γονιδίων <sup>32</sup>. Οι όγκοι με υπερέκφραση του HER2 συνήθως είναι χαμηλής διαφοροποίησης και χαρακτηρίζονται από απουσία έκφρασης των ER, PR. Κλινικά, εμφανίζουν επιθετική συμπεριφορά και κακή πρόγνωση. Οι νεώτεροι στοχεύοντες παράγοντες έναντι του HER2 έχουν αλλάξει άρδην την κλινική

πορεία αυτών των ασθενών, καθώς, παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά ανταπόκρισης στα αντι-HER2 σκευάσματα <sup>2</sup>.

Ο τέταρτος υπότυπος, αυτός του βασικού τύπου, σχετίζεται με την έκφραση γονιδίων ίδιων με αυτά των βασικών και μυοεπιθηλιακών κυττάρων του μαζικού αδένου <sup>32</sup>. Επίσης, έχουν υπερέκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αλλά απουσία έκφρασης των ER, PR και HER2. Ιστολογικά χαρακτηρίζονται από χαμηλή διαφοροποίηση, με υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού και συνήθως φαινότυπο τριπλά αρνητικού ΚΜ. Σε αντίθεση με τους luminal όγκους, οι ασθενείς με βασικού τύπου καρκινώματα έχουν κακή πρόγνωση και υποτροπιάζουν μέσα στα πρώτα 5 χρόνια μετά την διάγνωση <sup>34</sup>.

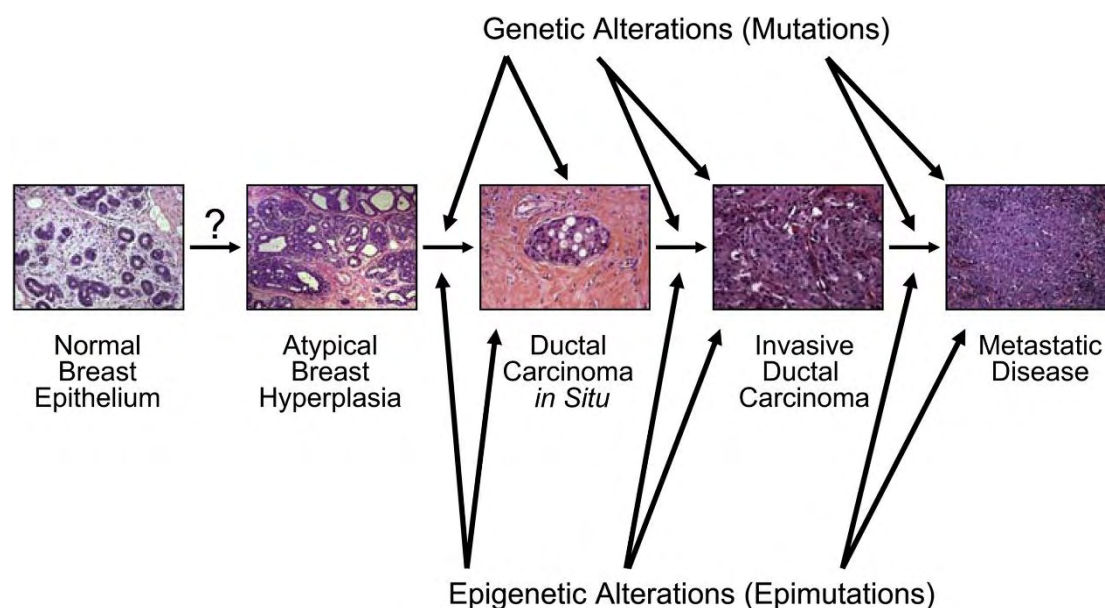
### **1.3 Παθογένεια του καρκίνου μαστού**

Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, ένας ιλιγγιώδης αριθμός μελετών έχει ρίξει φως στην παθογένεια και την παθοφυσιολογία του ΚΜ και έχει αλλάξει δραματικά τον τρόπο κατανόησης των υποκείμενων, σύνθετων μηχανισμών που ενορχηστρώνουν την έναρξη και εξέλιξη του ΚΜ. Ωστόσο, παρά την έκρηξη των γνώσεών μας σχετικά με τη βιολογία της νόσου, πολλά στοιχεία της νόσου παραμένουν λιγότερο κατανοητά <sup>35</sup>.

Μέχρι τώρα, δύο κυρίως μοντέλα έχουν προταθεί για να εξηγήσουν την παθογένεια και την ετερογένεια της νόσου. Στο πρώτο, το μοντέλο της κλωνικής εξέλιξης, τα κύτταρα που οδηγούν στη δημιουργία του ΚΜ προέρχονται από την πολυσταδιακή διαδικασία άθροισης γενετικών μεταλλαγών και επιγενετικών τροποποιήσεων, που μέσω της κλωνικής επιλογής θα οδηγήσουν σε εκείνα τα κύτταρα με το απαραίτητο δυναμικό για να μπορέσουν να επιβιώσουν και να εξελιχθούν αναπτύσσοντας την κακοήθεια <sup>36</sup>. Στο δεύτερο μοντέλο ανάπτυξης του ΚΜ, τον πρωτεύοντα ρόλο διαδραματίζουν τα πολυδύναμα καρκινικά κύτταρα (cancer stem cell), τα οποία είναι εκείνα που ξεκινούν την καρκινική εξαλλαγή και συντηρούν την εξέλιξη του όγκου <sup>37</sup>. Η πραγματικότητα όμως φαίνεται πως είναι πιο σύνθετη και ενδεχομένως συνδυάζει τα ανωτέρω, καθώς τα πολυδύναμα καρκινικά κύτταρα μπορούν να εξελιχθούν ακολουθώντας ένα κλωνικό πρότυπο ανάπτυξης <sup>2</sup>.

Σε μορφολογικό και παθολογοανατομικό επίπεδο, η πορεία προς την ανάπτυξη του ΚΜ χαρακτηρίζεται από ένα συνεχές πρότυπο μορφολογικών αλλαγών, ξεκινώντας από τους φυσιολογικούς αδένες μέχρι την εμφάνιση του καρκινικού

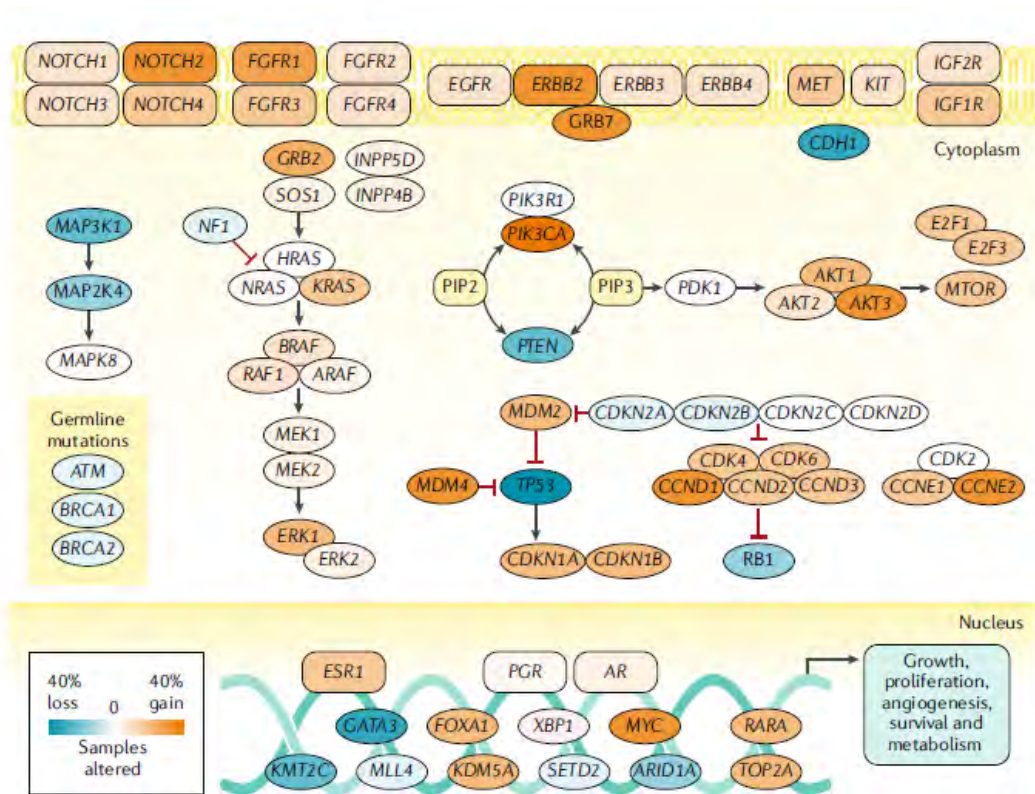
κυττάρου και στη συνέχεια του διηθητικού και μεταστατικού καρκίνου, που αντικατοπτρίζουν αντίστοιχες γενετικές και επιγενετικές αλλαγές (Εικόνα. 1) <sup>38</sup>.



**Εικόνα 1.** Ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Ο καρκίνος του μαστού αναπτύσσεται από επιθηλιακά κύτταρα τα οποία οδηγούν σε άτυπες υπερπλασίες και δυσπλασία, *in situ* καρκίνωμα και τελικά διηθητικό καρκίνωμα. Πολλαπλές μοριακές αλλαγές λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας περιλαμβάνοντας πολλές γενετικές και επιγενετικές αλλαγές. Τροποποιημένο από τους Rivenbark et al. <sup>38</sup>

Σχετικά με την παθογένεια του ΚΜ, μεγάλος όγκος δεδομένων υποστηρίζουν πως ο ΚΜ αναπτύσσεται και εξελίσσεται μέσω δύο διακριτών οδών/μονοπατιών, που σχετίζονται κυρίως με την έκφραση των ER <sup>2</sup>. Το πρώτο μονοπάτι χαρακτηρίζεται από υψηλού βαθμού διαφοροποίηση (low- grade-like pathway), όπως επίσης και από διπλοειδή ή σχεδόν διπλοειδή καρυότυπο, από ενίσχυση της χρωμοσωμικής περιοχής 1q, απώλεια του 16q, σπάνια πολλαπλασιασμό του 17q12 και από χαρακτηριστική «υπογραφή» γονιδιακής έκφρασης που σχετίζεται με τον ER φαινότυπο. Σε αυτή την ομάδα ανήκουν οι ασθενείς με μοριακό υπότυπο luminal A, καθώς επίσης και μέρος της ομάδας των ασθενών με luminal B ΚΜ <sup>39</sup>.

Η δεύτερη οδός/μονοπάτι χαρακτηρίζεται από χαμηλή διαφοροποίηση, απώλεια της χρωμοσωμικής περιοχής 13q, ενίσχυση του 11q13, πολλαπλασιασμό της χρωμοσωμικής περιοχής 17q12, που περιλαμβάνει το γονίδιο *HER2*, καθώς επίσης και από «υπογραφή» έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό <sup>39</sup>. Σε αυτή την ομάδα του ΚΜ συγκαταλέγονται οι θετικοί για το ογκογονίδιο *HER2* όγκοι καθώς και οι τριπλά αρνητικοί όγκοι <sup>40</sup>.



**Εικόνα 2.** Μοριακές μεταλλάξεις στον καρκίνο του μαστού. Το πορτοκαλί χρώμα αντιπροσωπεύει γονίδια με ενίσχυση της λειτουργίας τους. Το μπλε χρώμα αντιπροσωπεύει γονίδια με απώλεια της λειτουργίας τους. Τροποποιημένο από Harbeck et al. <sup>2</sup>.

Τα γονίδια που φέρουν συχνότερα αλλαγές στον ΚΜ είναι τα: *TP53* (*Tumor Protein P53*, 41%), *PIK3CA* (*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*, 30%), *MYC* (*MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor*, 20%), *PTEN* (*Phosphatase And Tensin Homolog*, 16%), *CCND1* (*Cyclin D1*, 16%), *ERBB2* (*Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2*, 13%), *FGFR1* (*Fibroblast Growth Factor Receptor 1*, 11%) και *GATA3* (*GATA Binding Protein 3*, 10%) (Εικόνα. 2) <sup>41</sup>. Τα προϊόντα αυτών των γονιδίων κωδικοποιούν πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και είτε τον καταστέλλουν, όπως π.χ. η πρωτεΐνη p53, είτε τον ενεργοποιούν, όπως π.χ. η κυκλίνη D1 <sup>2</sup>.

Οι luminal A όγκοι έχουν αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων στο γονίδιο *PIK3CA* (49%), ενώ η αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων στο γονίδιο *TP53* χαρακτηρίζει κυρίως τα βασικού τύπου καρκινώματα (84%). Μελέτες γονιδιακής έκφρασης έχει ταυτοποιήσει 6 διαφορετικές ομάδες τριπλά αρνητικών όγκων, οδηγώντας στην κατηγοριοποίηση κατά Lehman (Lehman's classification).

Ονομαστικά οι 6 αυτές υποομάδες είναι η: βασικού τύπου 1 (BL1), βασικού τύπου 2 (BL2), μεσεγγυματοειδούς τύπου (M), μεσεγγυματοειδούς/βλαστικού τύπου (MSL), ανοσοτροποποιητικού τύπου (IM) και η υποομάδα των λοβιακών με υπερέκφραση του ανδρογονικού υποδοχέα (LAR). Η κάθε μία εκ των προαναφερομένων υποομάδων χαρακτηρίζεται από την παρουσία κάποιων συγκεκριμένων μεταλλάξεων. Ο υπότυπος BL1 έχει αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων του γονιδίου TP53 (92%), όπως και μεταλλάξεις των γονιδίων που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* και *RBI*)<sup>42</sup>. Η κατηγοριοποίηση σε 6 υποκατηγορίες έχει εσχάτως αναδιαμορφωθεί σε 4 υποτύπους: BL1 (ανοσοενεργοποιητικό), BL2 (ανοσοκατασταλτικό), M (που περιλαμβάνει τα περισσότερα από τα MSL) και LAR<sup>43</sup>.

Επιγενετικές αλλαγές συμβάλλουν επίσης στην ανάπτυξη και εξέλιξη του ΚΜ. Στον ΚΜ, τα γονίδια μπορεί να είναι είτε καθολικά υπομεθυλιωμένα, οδηγώντας στη επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης των ογκογονιδίων και στην χρωμοσωματική αστάθεια, είτε, λιγότερο συχνά, εστιακά υπερμεθυλιωμένα σε συγκεκριμένες γονιδιωματικές περιοχές που με τη σειρά τους θα οδηγήσουν σε γονιδιακή αποσιώπηση, γενετική αστάθεια λόγω της αποσιώπησης των γονιδίων που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA. Μεταξύ των επιγενετικών τροποποιήσεων συγκαταλέγονται οι αλλαγές των ιστονών που επιφέρουν αναδιαμόρφωση του νουκλεοσώματος, αναδιάταξη στη δομή της χρωματίνης, και τέλος γονιδιακή αποσιώπηση<sup>44</sup>. Ο ρόλος των επιγενετικών αλλαγών στον ΚΜ θα συζητηθεί αναλυτικότερα στη συνέχεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

#### **1.4 Οι ορμόνες του φύλου και ο καρκίνος του μαστού**

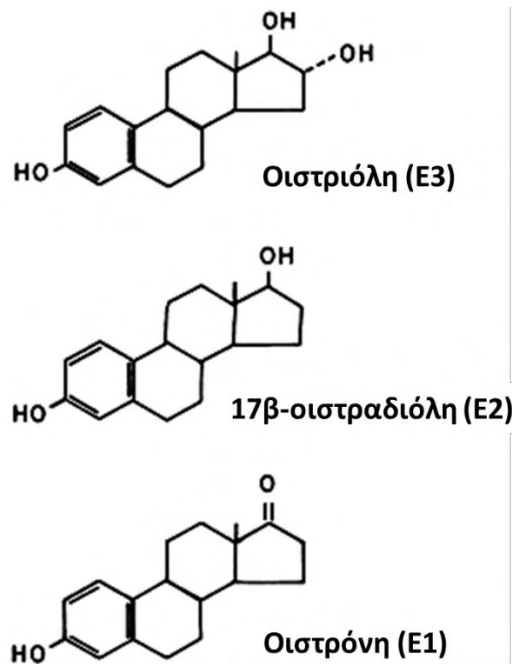
Ο κομβικός ρόλος των ορμονών του φύλου (οιστρογόνων και προγεστερόνης) στην ανάπτυξη και εξέλιξη του ΚΜ έχει τεκμηριωθεί με πλήθος μελετών εδώ και πολλές δεκαετίες. Έχει δειχθεί πως τα επίπεδα των ενδογενών ορμονών του φύλου σχετίζονται στενά με τον κίνδυνο ανάπτυξης ΚΜ τόσο στις προεμμηνόπαυσιακές όσο και στις μετεμμηνόπαυσιακές γυναίκες<sup>45,46</sup>. Φυσιολογικά, τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη συντονίζουν από κοινού την λειτουργία όλων των οργάνων του αναπαραγωγικού συστήματος, μεταξύ αυτών των ωοθηκών, της μήτρας και των μαστών<sup>47</sup>.



Η σημασία των οιστρογόνων για την ανάπτυξη του ΚΜ έχει αναγνωριστεί από τα τέλη του 19ου αιώνα, όταν και παρατηρήθηκε ότι το ένα τρίτο των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών με μεταστατικό ΚΜ, που υπεβλήθησαν σε ωοθηκεκτομή, παρουσίασε ύφεση της νόσου <sup>48</sup>. Στα μέσα του 20<sup>ου</sup> αιώνα, οι Jensen και Jacobson, χρησιμοποιώντας ραδιοσημασμένα με τρίτιο οιστρογόνα, έδειξαν πως τα οιστρογόνα συγκεντρώνονται σε συγκεκριμένους ιστούς κι όργανα μεταξύ των οποίων και οι μαστοί <sup>49</sup>. Σχεδόν τριάντα χρόνια αργότερα, επετεύχθη η κλωνοποίηση του πρώτου υποδοχέα οιστρογόνων, ο οποίος σήμερα είναι γνωστός σαν ERα <sup>50-53</sup>. Δέκα έτη αργότερα, ένας δεύτερος υποδοχέας (ERβ) των οιστρογόνων απομονώθηκε <sup>54,55</sup>.

Τα οιστρογόνα ρυθμίζουν έναν ευρύ φάσμα φυσιολογικών λειτουργιών στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως είναι ο εμμηνορυσιακός κύκλος, η αναπαραγωγή, η ρύθμιση της πυκνότητας του οστίτη ιστού, η λειτουργία του ανθρώπινου εγκεφάλου καθώς επίσης και η ρύθμιση των επιπέδων χοληστερόλης <sup>56</sup>. Εκτός του σημαίνοντος ρόλου των οιστρογόνων στη ρύθμιση πολλών και σημαντικών λειτουργιών του ανθρώπινου οργανισμού, υψηλοί τίτλοι οιστρογόνων έχουν σχετισθεί με αυξημένη επίπτωση διαφόρων τύπου καρκίνου, μεταξύ των οποίων κυρίως του ΚΜ και του καρκίνου του ενδομητρίου <sup>57</sup>.

Η κυριότερη ενδοκυττάρια μορφή οιστρογόνων είναι η 17β-οιστραδιόλη (E2). Άλλοι τύποι οιστρογόνων είναι η οιστρόνη (E1) και η οιστριόλη (E3) (Εικόνα 3). Στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες οι οιστρόνη και οιστριόλη εκκρίνονται κυρίως από τις ωοθήκες κατά τον εμμηνορυσιακό κύκλο, δευτερευόντως δε από τον λιπώδη ιστό και από τα επινεφρίδια. Επίσης, κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, παράγονται αυξημένοι τίτλοι οιστριόλης από τον πλακούντα <sup>58</sup>.



**Εικόνα 3.** Η χημική δομή της οιστριόλης, 17β-οιστραδιόλης και οιστρώνης. Βασισμένο στο <sup>59</sup>.

Η παραγωγή των οιστρογόνων από τις ωοθήκες ρυθμίζεται από τη λειτουργία του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες. Η πρόσθια υπόφυση, σε απάντηση στην GnRH (peptide gonadotropin-releasing hormone) εκκρίνει την ωχρινοτρόπο (luteinizing hormone (LH)) και την ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη (follicle-stimulating hormone (FSH)). Η LH ευοδώνει την παραγωγή των ανδρογόνων, ενώ η FSH προάγει την έκφραση της αρωματάσης, η οποία καταλύει το τελικό στάδιο της βιοσύνθεσης των οιστρογόνων, που περιλαμβάνει την αρωματοποίηση των ανδρογόνων προς οιστρογόνα. Κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιορρηξίας, η E2 αυξάνει από 8 έως 10 φορές. Τα υψηλά επίπεδα οιστρογόνων με τη σειρά τους, μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης (negative feedback) μειώνουν την παραγωγή των οιστρογόνων και την έκκριση των GnRH, LH, και FSH <sup>60</sup>.

Ο κύριος ρυθμιστής της βιοσύνθεσης των οιστρογόνων στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες είναι το ένζυμο αρωματάσης, το οποίο εκφράζεται στον λιπώδη ιστό, τις ωοθήκες, τον πλακούντα, τα οστά, το δέρμα και τον εγκέφαλο <sup>56</sup>. Μετά την εμμηνόπαυση, η σύνθεση των οιστρογόνων στις ωοθήκες είναι πολύ περιορισμένη και το μεγαλύτερο μέρος των κυκλοφορούντων οιστρογόνων προέρχονται από την αρωματοποίηση των ανδρογόνων. Συνεπώς, για τις υπέρβαρες, μετεμμηνοπαυσιακές

γυναίκες, ο λιπώδης ιστός είναι η κύρια πηγή οιστρογόνων, ενώ για τις μη παχύσαρκες η διαδικασία αυτή είναι λιγότερο σημαντική <sup>61</sup>.

Αν και η αρωματάση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των επιπέδων οιστρογόνων τόσο για τις προεμμηνοπαυσιακές, όσο και για τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, οι ασθενείς αυτές δεν απαντούν με τον ίδιο τρόπο στους αναστολείς αρωματάσης (AIs). Στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες είναι λειτουργικός, τα δε επίπεδα των οιστρογόνων αλλάζουν δραματικά κατά τον εμμηνορυσιακό κύκλο. Αυτό έχει ως συνέπεια η αποτελεσματικότητα των AIs να υπερκεράζεται από αύξηση της βιοσύνθεσης των οιστρογόνων κατά τον εμμηνορυσιακό κύκλο. Συνεπώς, οι αναστολείς των οιστρογόνων, χωρίς τη χρήση LHRH αναλόγων, είναι περισσότερο αποτελεσματικοί στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες στις οποίες ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες δεν διατηρεί τη λειτουργία του <sup>62</sup>.

Τα οιστρογόνα εξασκούν τις βιολογικές τους δράσεις μέσω της σύνδεσης τους με τους ERα και ERβ, που εντοπίζονται στον πυρήνα και κωδικοποιούνται από τα γονίδια *ESR1* (*Estrogen Receptor 1*) και *ESR2* (*Estrogen Receptor 2*). Οι ER ενεργοποιούνται από την πρόσδεση του συνδέτη και δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντας. Οι υποδοχείς ERα και ERβ εκφράζονται σε πολλούς ιστούς, μεταξύ των οποίων η μήτρα, οι ωοθήκες, ο μαζικός αδένας, ο προστάτης, ο πνεύμονας και ο εγκέφαλος. Η έκφραση και ο υπότυπος των ER είναι οι κύριοι παράγοντες που καθορίζουν και την ιστοειδική ανταπόκριση στα οιστρογόνα <sup>63,64</sup>.

Οι υποδοχείς ERα και ERβ είναι μέλη της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων των ορμονών. Περιέχουν χαρακτηριστικές δομές και ξεχωριστά λειτουργικά τμήματα και έχουν υψηλού βαθμού ομολογία (~96%) στις περιοχές πρόσδεσης του DNA (DNA-binding domains, DBDs) και μέτρια (53%) ομολογία στην αλληλουχία των περιοχών πρόσδεσης του συνδέτη (ligand-binding domains, LBDs). Η πιο σημαντική διαφορά μεταξύ του ERα και του ERβ καθορίζεται από την πρωτεϊνική περιοχή AF-1 (transcription activation function), η οποία δεν σχετίζεται με την πρόσδεση των ορμονών και εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο <sup>65</sup>.

Η πρόσδεση των οιστρογόνων στον υποδοχέα των οιστρογόνων επάγει δομικές αλλαγές που οδηγεί σε διμερισμό του και αλληλεπίδραση με τους συνενεργοποιητές τους. Σε κάποιες περιπτώσεις, ο ενεργοποιημένος υποδοχέας προσδένεται άμεσα με ειδικές αλληλουχίες στους υποκινητές των γονιδίων στόχων που καλούνται EREs

(estrogen response elements), οδηγώντας σε μεταγραφική ενεργοποίηση αυτών των γονιδίων. Εναλλακτικά, το σύμπλεγμα οιστρογόνων-υποδοχέα οιστρογόνων έμμεσα ενεργοποιεί την μεταγραφή μέσω της αλληλεπίδρασης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως η AP1 (activator protein 1), SP1 (specificity protein 1), NF-κB (nuclear factor-κB), CREB (cAMP response element-binding protein), RUNX1 (runt-related transcription factor 1), p53 και STAT5 (signal transduction and activator of transcription 5) <sup>66-69</sup>. Η αλληλεπίδραση του ER με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες δυνητικά προσδίδει στα οιστρογόνα ρυθμιστικό ρόλο ακόμη και για γονίδια που δεν διαθέτουν EREs στον υποκινητή τους. Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας που εξηγεί τον ιστοειδικό χαρακτήρα των οιστρογόνων είναι και η σχετική έκφραση των ERα έναντι των ERβ σε κάθε κυτταρικό τύπο <sup>63</sup>. Γενετικές αλλαγές και φαρμακολογικές παρεμβάσεις στους ERα και ERβ έχουν δείξει πως έχουν αντίθετες επιδράσεις στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση <sup>70-73</sup>.

Το σύμπλεγμα οιστρογόνων-ER ασκεί τον πλήρη μεταγραφικό του ρόλο με την επιστράτευση μίας ποικιλίας μεταγραφικών συν-ρυθμιστών, τροποποιώντας τη δομή της χρωματίνης ή αλληλεπιδρώντας με τη γενική μεταγραφική μηχανή. Περισσότερες από 300 πρωτεΐνες έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρούν με ένα ή περισσότερα από τα μέλη της της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων και οι περισσότερες εξ' αυτών διαντιδρούν και με τους ER <sup>74,75</sup>. Η οικογένεια των πρωτεϊνών SRCs (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src), στην οποία συμπεριλαμβάνονται τρεις ομόλογες πρωτεΐνες (SRC-1, SRC-2 και SRC-3) περιλαμβάνει τους καλύτερα μελετημένους και χαρακτηρισμένους συν-ρυθμιστές του ER. Οι πρωτεΐνες SRCs διαμορφώνουν ένα περιβάλλον που ευοδώνει τη μεταγραφή μέσω άμεσης ή/και έμμεσης προσέλευσης συνενεργοποιητών, που μπορούν να οδηγήσουν σε αναδιαμόρφωση (remodeling) της χρωματίνης μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών. Επιπλέον, οι SRC πρωτεΐνες διατηρούν ασθενή εγγενή δράση ακετυλοτρανσεφεράσης των ιστονών (histone acetyltransferase-HAT) και μεσολαβούν την ενεργοποίηση της μεταγραφής μέσω άμεσης ακετυλίωσης καταλοίπων λυσίνης είτε σε μόρια ιστονών, είτε σε άλλους συν-ρυθμιστές <sup>76,77</sup>. Οι τρεις SRCs άμεσα αλληλεπιδρούν με τον ER και επιστρατεύουν διάφορους συμπαράγοντες που ρυθμίζουν την μεταγραφική δραστηριότητα του συμπλόκου ER-μεταγραφικής συσκευής <sup>78</sup>.

Οι ERs όπως επίσης και οι συν-ρυθμιστές υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες επηρεάζουν τη σταθερότητα, την υποκυττάρια εντόπιση, την

μεταγραφική ενεργότητα και την ευαισθησία στη δράση των οιστρογόνων. Περίπου 22 θέσεις της ERα υπόκεινται σε διάφορες τροποποιήσεις, συμπεριλαμβανομένων της φωσφορυλίωσης, μεθυλίωσης, ακετυλίωσης, σουμυλίωσης και ουβικουϊτίνωσης<sup>79</sup>. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση του ER από διάφορες κινάσες, όπως η MAPK (mitogen-activated protein kinase) και η PKA (protein kinase A), ενεργοποιούν την μεταγραφική δραστηριότητα του ER<sup>80,81</sup>. Επίσης, η ακετυλίωση του ER από την HAT p300 ρυθμίζει την μεταγραφική δραστηριότητα του ER και την ευαισθησία στην έκθεση σε οιστρογόνα<sup>82</sup>. Απεναντίας, η ουβικουϊτίνωση του ER οδηγεί στην αποδόμησή του κι έτσι στη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του<sup>83</sup>.

#### 1.4.1 Οιστρογόνα και υποδοχέας οιστρογόνων στον καρκίνο μαστού

Σχετικά με το ρόλο οιστρογόνων στην παθογένεια του ΚΜ, αρκετοί μηχανισμοί έχουν μέχρι τώρα περιγραφεί. Μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονται ο πολλαπλασιασμός (amplification) των συνενεργοποιητών του ER, η καταστολή της έκφρασης των συγκαταστολέων, η υπερέκφραση των πρωτεϊνών που μεσολαβούν την προσέλκυση των συνενεργοποιητών του ER, μεταλλάξεις του ER που επιτρέπουν την ενεργοποίηση του υποδοχέα με χαμηλότερους τίτλους οιστρογόνων και η εντόπιση του ER στην κυτταροπλασματική μεμβράνη με συνεπακόλουθο την ενεργοποίηση του καταρράκτη της ενδοκυττάριας σηματοδότησης<sup>48</sup>.

Το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του ER καθορίζεται από την ισορροπία συνενεργοποιητών και συγκαταστολέων. Η υπερέκφραση των συνενεργοποιητών αποτελεί έναν σημαντικό μηχανισμό για την εξαρτώμενη από τον ER ανάπτυξη και πρόοδο του ΚΜ. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο *AIB1* (*amplified in breast cancer-1*), το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 20q και υπερεκφράζεται στο 64% των ΚΜ<sup>84</sup>. Η πρωτεΐνη AIB1 συνδέεται άμεσα με τον ER λειτουργώντας ως συνενεργοποιητής, είναι δε ο μόνος συνενεργοποιητής που έχει συσχετιστεί με τον ΚΜ. Η πρωτεΐνη AIB1 σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση και με αντίσταση στην ταμοξιφαίνη<sup>84</sup>.

Όπως σημειώθηκε παραπάνω, ένας ακόμη μηχανισμός που έχει προταθεί σχετίζεται με την απώλεια της έκφρασης των συγκαταστολέων. Τα επίπεδα του καταστολέα της ενεργότητας του ER (REA) ποικίλουν στον ΚΜ, η δε έκφρασή του σχετίζεται ευθέως με τα επίπεδα του ER<sup>85,86</sup>. Υψηλά επίπεδα έκφρασης των REA και

ER έχουν σχετισθεί με καλή πρόγνωση, ενώ χαμηλή έκφραση του REA με πτωχή πρόγνωση <sup>85,86</sup>. Σε μοντέλο μύος, έχειδειχθεί ότι η αναστολή του REA οδηγεί σε αυξημένο πολλαπλασιασμό του μαζικού αδένου, ένα εύρημα που επιβεβαιώνει ότι το REA είναι αναγκαία για τον περιορισμό της δράσης του ER <sup>87</sup>.

Ένας ακόμη μηχανισμός που επηρεάζει τη λειτουργία του ER είναι και η υπερέκφραση πρωτεϊνών οι οποίες σε αυξημένη συγκέντρωση αποκτούν την ικανότητα να προσδένονται στον ER. Μία τέτοια πρωτεΐνη είναι η κυκλίνη D1, η οποία λειτουργεί ως ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου <sup>48</sup>. Η κυκλίνη D1 υπερεκφράζεται στο 35% των ΚΜ, η δε έκφραση της κυκλίνης D1 σχετίζεται με την έκφραση του ER. Εκτός του ρυθμιστικού ρόλου στον κυτταρικό κύκλο, η κυκλίνη D1 επηρεάζει την λειτουργία πολλών μεταγραφικών παραγόντων μεταξύ των οποίων και ο ER <sup>88</sup>. Με την πρόσδεση στον ER η κυκλίνη D1 ευοδώνει την προσέλκυση των συνενεργοποιητών ακόμη κι όταν απουσιάζουν τα οιστρογόνα <sup>89</sup>.

Επίσης, σημαντικός είναι και ο ρόλος των μεταλλάξεων του ER και πιο συχνά του ERα. Η σωματική μετάλλαξη K303R έχει ανιχνευθεί στο 34% των υπερπλαστικών αλλοιώσεων του μαστού και στην πλειοψηφία των πρωτοπαθών καρκινωμάτων του μαστού <sup>90</sup>. Πρόσφατα, η αλληλούχιση του DNA έχει δείξει πως ενεργοποιούσες μεταλλάξεις στην περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη του ERα υπάρχουν περίπου στο 40% των υποτροπιάζόντων ορμονοθετικών ΚΜ <sup>91</sup>. Η παρουσία αυτών των μεταλλάξεων έχει συνδεθεί με την συνεχή ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού ακόμη και με χαμηλά επίπεδα οιστρογόνων <sup>92</sup>, καθώς επίσης και μειωμένη αποτελεσματικότητα των αναστολέων της αρωματάσης και κάποιων ανταγωνιστών του ER όπως η ταμοξιφαίνη <sup>93</sup>.

Εκτός των προαναφερομένων μηχανισμών, οι ER μπορούν να μεσολαβούν την πρόοδο του καρκίνου μέσω της σχέσης με υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, όπως ο EGFR (epidermal growth factor receptor), ο HER2 και IGFR-1 (insulin growth factor receptor-1), οι οποίοι ενεργοποιούν τον ER ακόμη και με την παρουσία πολύ χαμηλών επιπέδων οιστρογόνων <sup>94</sup>. Αυτός ο μηχανισμός φαίνεται να ενεργοποιεί τις οδούς μεταγωγής σήματος των MAP κινασών και του ERK (mitogen-activated protein kinase 1), επηρεάζοντας τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων <sup>94</sup>. Ο μηχανισμός αυτός είναι σημαντικός επίσης και για την αντίσταση στην ορμονική θεραπεία με αντι-οιστρογόνα <sup>95</sup>.

#### 1.4.2 Προγεστερόνη και υποδοχέας προγεστερόνης στον καρκίνο μαστού

Εκτός των οιστρογόνων και η προγεστερόνη έχει ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη του ΚΜ. Η παραγωγή της προγεστερόνης δεν είναι σταθερή κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου, με τα υψηλότερα επίπεδα να παρατηρούνται κατά την ωχρινική φάση του κύκλου. Σημαντικά υψηλότερα όμως είναι τα επίπεδα προγεστερόνης στο περιφερικό αίμα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης με την κορύφωση να παρατηρείται στο 3 τρίμηνο <sup>96</sup>.

Η προγεστερόνη, όπως και οι άλλες στεροειδείς ορμόνες, εξασκεί τη δράση της μέσω της πρόσδεσής της στον υποδοχέα της προγεστερόνης (PR), ο οποίος μεταγράφεται από το αντίστοιχο γονίδιο του υποδοχέα της προγεστερόνης (PGR). Μέχρι τώρα, δύο ισομορφές του PR έχουν περιγραφεί, η PR-A και η PR-B. Η μεταγραφή του PR μεσολαβείται από τον ER <sup>97</sup>.

Αν και ο ρόλος της προγεστερόνης στην ανάπτυξη και εξέλιξη του ΚΜ δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί και η σχέση αυτή δεν υποστηρίζεται απόλυτα από επιδημιολογικές μελέτες, ωστόσο, δεδομένα από προκλινικά μοντέλα υποστηρίζουν τον ρόλο της στην παθογένεια του ΚΜ <sup>96</sup>. Τα ισχυρότερα δεδομένα σχετικά με τον αιτιοπαθογενετικό ρόλο των προγεσταγόνων στον ΚΜ προέρχονται από την χρήση συγκεκριμένων συνθετικών αναλόγων της προγεστερόνης (προγεστίνες) στα πλαίσια ορμονικής υποκατάστασης, η οποία συνδέθηκε με αύξηση του κινδύνου για την ανάπτυξη ΚΜ <sup>98,99</sup>.

Η προγεστερόνη φαίνεται πως προάγει το σχηματισμό προνεοπλασματικών αλλοιώσεων, πυροδοτώντας τον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων του μαστού μέσω παρακρινικών μηχανισμών <sup>100</sup>. Όπως και τα οιστρογόνα έτσι και η προγεστερόνη μπορούν να επάγουν φυσιολογικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό <sup>101</sup>, η δε έκφρασή τους είναι αξιοσημείωτα αυξημένη σε προκαρκινωματώδη και καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα <sup>102</sup>. Πλήθος δεδομένων υποστηρίζουν την διεπικοινωνία ER και PR. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται ότι ο PR άμεσα ή έμμεσα επηρεάζει την μεταγραφική δραστηριότητα του ER και την δράση των οιστρογόνων <sup>103</sup>. Σε αντίθεση με τα ανωτέρω, η χορήγηση αγωνιστών του PR σε ασθενείς με ER θετικό ΚΜ έχει οδηγήσει σε κλινικό όφελος υποσημειώνοντας τον σύνθετο και διττό ρόλο της προγεστερόνης στον ΚΜ <sup>104</sup>. Η παρατήρηση αυτή έχει οδηγήσει και στην πρόταση του συνδυασμού των αγωνιστών του PR με τους αναστολείς της αρωματάσης <sup>47</sup>.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### 2. Θεραπεία του καρκίνου μαστού

Η θεραπευτική αντιμετώπιση του ΚΜ εξαρτάται από το στάδιο της νόσου κατά τη διάγνωση καθώς επίσης και από τη συν-νοσηρότητα και την κλινική κατάσταση της ασθενούς. Παραδοσιακά, η θεραπευτική του ΚΜ στηριζόταν σε τρεις πυλώνες: την χειρουργική εξαίρεση, την ακτινοθεραπεία και τη χημειοθεραπεία. Τις τελευταίες όμως δεκαετίες η καλύτερη κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών, οι νεότεροι στοχεύοντες παράγοντες, οι νεώτερες χειρουργικές και ακτινοθεραπευτικές τεχνικές, καθώς επίσης και η εκτεταμένη κλινική έρευνα που έχει γίνει στον ΚΜ έχει μεταμορφώσει ριζικά τον τρόπο αλλά και την διαδοχή των θεραπευτικών μέσων<sup>2</sup>. Για παράδειγμα, τα τελευταία χρόνια μεγάλος αριθμός μελετών υποστηρίζουν ισχυρά τον ρόλο της προεγχειρητικής θεραπείας ακόμη και σε χειρουργήσιμους όγκους του μαστού<sup>105</sup>. Κατά την ανάπτυξη της παρούσας ενότητας θα επικεντρωθούμε στην αντιμετώπιση του ορμονοεξαρτώμενου ΚΜ που αποτελεί και αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

#### 2.1 Ορμονική θεραπεία-κατηγορίες φαρμάκων

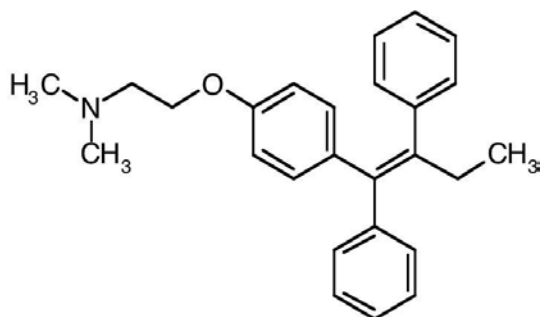
Ο ER θετικός ΚΜ αποτελεί το 75% του συνόλου των ΚΜ και δεδομένου του σημαντικού ρόλου του οιστρογονικού υποδοχέα και των οιστρογόνων στην παθογένεια της νόσου έχει οδηγήσει στη φαρμακευτική τροποποίηση του εν λόγω μονοπατιού με σημαντικά κλινικά αποτελέσματα<sup>32,106</sup>. Με βάση τον μηχανισμό δράσης, οι κύριες κατηγορίες φαρμακευτικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο την ορμονικής θεραπείας του ER θετικού ΚΜ είναι οι εκλεκτικοί τροποποιητές του οιστρογονικού υποδοχέα (selective estrogen receptor modulators-SERMs) και οι εκλεκτικοί τροποποιητές των υποδοχέων των οιστρογόνων με αμιγή ανταγωνιστική δράση (Selective Estrogen Receptor Downregulators, SERDs), που δρουν κυρίως ανταγωνιστικά στον ER, καθώς επίσης και οι αναστολείς της αρωματάσης (aromatase inhibitors - AIs) που μειώνουν την παραγωγή των οιστρογόνων<sup>107</sup>

##### 2.1.1 Εκλεκτικοί Τροποποιητές των Υποδοχέων των Οιστρογόνων (SERMS)

Οι SERMs είναι μια κατηγορία φαρμακευτικών ενώσεων που έχουν σχεδιαστεί για να ανταγωνίζονται τα οιστρογόνα και να τροποποιούν τη λειτουργία του ER, τροποποιώντας τους συμπαράγοντες με τους οποίους αλληλεπιδρά<sup>108</sup>. Το αποτέλεσμα της τροποποίησης του ER από την κατηγορία αυτών των ουσιών έχει ένα ιστοειδικό



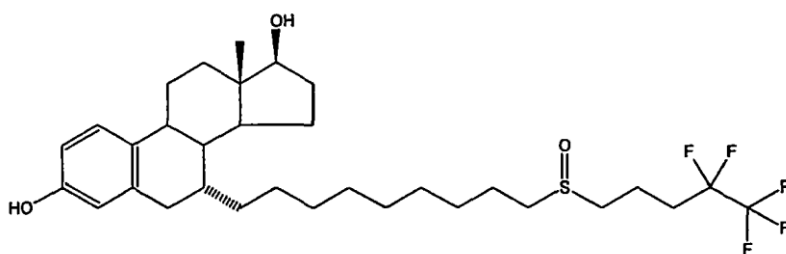
χαρακτήρα. Για παράδειγμα, η ταμοξιφαίνη (Εικόνα 4) που είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη SERM, είναι τεκμηριωμένο πως έχει ανταγωνιστική και ογκοκατασταλτική δράση στον μαζικό αδένα, ενώ μπορεί να έχει αγωνιστική ή μερικώς αγωνιστική δράση στη μήτρα, τα οστά και την καρδιά <sup>109</sup>.



**Εικόνα 4.** Χημική δομή της ταμοξιφαίνης. Από <sup>110</sup>.

Η ταμοξιφαίνη, η οποία ανακαλύφθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1960, είναι ο κύριος εκπρόσωπος της κατηγορίας αυτής <sup>111</sup>. Πρόκειται για έναν μη στεροειδικό SERM, ο οποίος χρησιμοποιείται για την θεραπεία τόσο του πρώιμου όσο και του προχωρημένου ΚΜ. Παρά τον σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση του ΚΜ, η χορήγησή της έχει συνδεθεί με την αύξηση του καρκίνου του ενδομητρίου από 2 έως 7 φορές <sup>112</sup>. Αυτή, όπως κι άλλες παρενέργειες, αποδίδονται στην μεικτή δράση με ανταγωνιστικές και αγωνιστικές ιδιότητες στους διάφορους ιστούς <sup>113</sup>. Εκτός της ταμοξιφαίνης κι άλλες SERMs έχουν μελετηθεί και μελετώνται μεταξύ των οποίων η ραλοξιφαίνη, η τορεμιφαίνη και άλλοι <sup>106</sup>.

### 2.1.2 Εκλεκτικοί τροποποιητές των υποδοχέων των οιστρογόνων με αμιγή ανταγωνιστική δράση (Selective Estrogen Receptor Downregulators, SERDs)



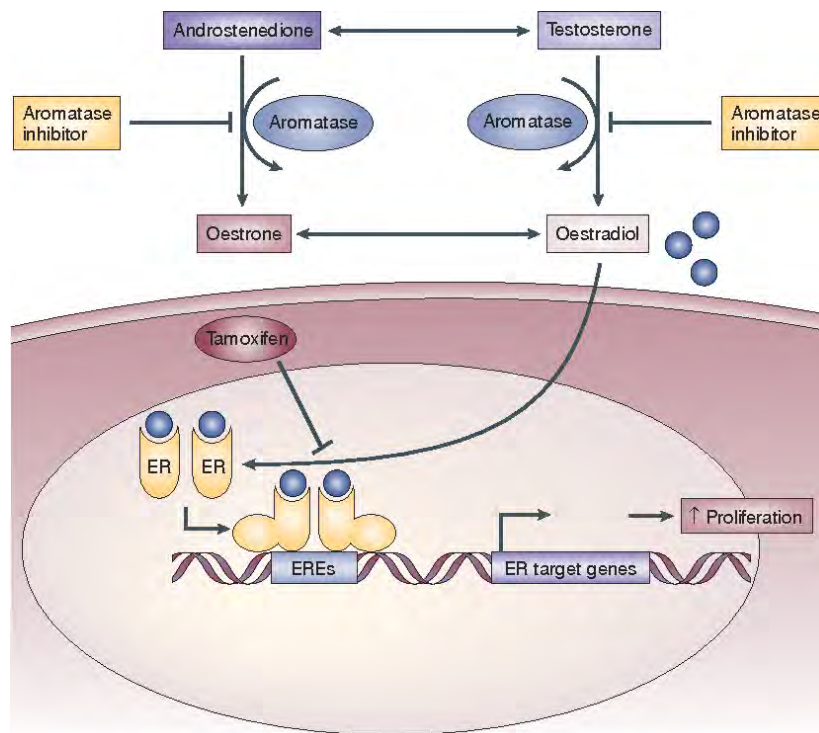
**fulvestrant**

**Εικόνα 5.** Χημική δομή της fulvestrant. Τροποποιημένο από <sup>114</sup>.

Οι SERDs είναι μία νεώτερη κατηγορία αντι-οιστρογόνων που είναι σχεδιασμένοι να προσδένονται στον ER αποσταθεροποιώντας τον και οδηγώντας τον σε αποδόμηση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση του διμερισμού του ER και την μη ενεργοποίηση της οδού μεταγωγής σήματος των οιστρογόνων <sup>115</sup>. Η fulvestrant είναι ο πρώτος γνήσιος ανταγωνιστής των οιστρογόνων, η οποία στερείται τις αγωνιστικές δράσεις των SERMs σε ιστούς που εκφράζουν τον ER (Εικόνα 5) <sup>116</sup>. Η απουσία αγωνιστικών ιδιοτήτων έχει αποδοθεί στον ξεχωριστό μηχανισμό δράσης της, μέσω του οποίου παρεμποδίζεται ο διμερισμός του ER και η ενεργοποίηση του μονοπατιού μεταγωγής σήματος <sup>117</sup>. Ο ιδιαίτερος μηχανισμός δράσης της θεωρείται επίσης υπεύθυνος και για την δραστικότητα που εμφανίζει σε ασθενείς με ΚΜ που έχουν αναπτύξει αντοχή στην ταμοξιφαίνη <sup>118</sup>. Η κλινική σπουδαιότητα της fulvestrant στην αντιμετώπιση των ασθενών με προχωρημένο ΚΜ έχει επιβεβαιωθεί με πλήθος μελετών, η δε θέση στον σύγχρονο θεραπευτικό αλγόριθμο διαρκώς αναβαθμίζεται <sup>119</sup>.

### **2.1.3 Αναστολείς της αρωματάσης (AIs)**

Η τρίτη κατηγορία φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο ορμονοθεραπείας του ΚΜ είναι οι AIs. Οι AIs διαφοροποιούνται ως προς τον μηχανισμό δράσης τους συγκριτικά με τους SERMs και SERDs (Εικόνα 6). Η δράση των AIs βασίζεται στη μείωση της ενδογενούς παραγωγής των οιστρογόνων μέσω της αναστολής του ενζύμου αρωματάση που διαδραματίζει, όπως περιγράψαμε ανωτέρω, κομβικό ρόλο κατά τη διαδικασία βιοσύνθεσης των οιστρογόνων (Εικόνα 6) <sup>120</sup>.



**Εικόνα 6.** Μηχανισμός δράσης των αναστολέων αρωματάσης συγκριτικά με την ταμοξιφαίνη. Οι αναστολείς αρωματάσης αναστέλουν την λειτουργία του ενζύμου αρωματάσης εμποδίζοντας την μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα. Αντιθέτως, η ταμοξιφαίνη εμποδίζει τον διμερισμό του υποδοχέα οιστρογόνων καθώς επίσης και στην πρόσδεση στις ειδικές αλληλουχίες πρόσδεσης στο DNA (ERE –estrogen response elements) <sup>121</sup>.

Με βάση την μοριακή δομή, οι AIs κατηγοριοποιούνται στους τύπου I ή στεροειδείς και στους τύπου II ή μη στεροειδείς. Η εξεμεστάνη (exemestane), που αποτελεί τον γνωστότερο AI τύπου I, προσδέεται μη αντιστρεπτά στο ένζυμο της αρωματάσης, προκαλώντας την απενεργοποίηση και αποδόμησή της. Στους τύπου II AI συμπεριλαμβάνονται η αναστροζόλη και η λετροζόλη, που επίσης αναστέλλουν τη λειτουργία της αρωματάσης, μειώνοντας τα επίπεδα των παραγόμενων οιστρογόνων <sup>120</sup>.

Οι AIs αποτελούν την πλέον συχνά χρησιμοποιούμενη πρώτη γραμμής ορμονική θεραπεία των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών με ER/PR θετικό ΚΜ, ενώ η χορήγησή τους σε συνδυασμό με ωθητική καταστολή προτείνεται και για προεμμηνοπαυσιακές ασθενείς <sup>122</sup>. Σημαντικός είναι ο ρόλος των AIs και για την πρόληψη της νόσου στην οποία χορηγούνται ως επικουρική θεραπεία <sup>122</sup>.

## 2.2 Θεραπεία του ορμονοεξαρτώμενου πρώιμου καρκίνου του μαστού

Ο ακρογωνιαίος λίθος στην αντιμετώπιση του πρώιμου ΚΜ είναι η χειρουργική αφαίρεση. Οι γυναίκες με πρώιμο ΚΜ που η νόσος τους κρίνεται χειρουργήσιμη συνήθως αντιμετωπίζονται αρχικά με χειρουργική εξαίρεση της νεοπλασίας. Παραδοσιακά η μαστεκτομή ήταν η επέμβαση εκλογής, ωστόσο, τις τελευταίες δεκαετίες πιο συντηρητικές επεμβάσεις, όπως η τμηματεκτομή και η ογκεκτομή, αποτελούν τον πρώτιστο χειρουργικό στόχο <sup>123</sup>. Η χειρουργική εκτομή του όγκου μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε δεύτερο χρόνο ακολουθώντας την αρχική χορήγηση συστηματικής θεραπείας ανάλογα με το μέγεθος του όγκου, την αναλογία όγκου προς το μέγεθος του μαστού, την βιολογία της νόσου, τη συν-νοσηρότητα καθώς επίσης και την επιθυμία του ασθενούς <sup>124</sup>. Η μαστεκτομή πλέον επιλέγεται στην περίπτωση που μία συντηρητική επέμβαση δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί για ογκολογικούς λόγους. Γενικά, σε νέες γυναίκες οι συντηρητικές επεμβάσεις συνοδευόμενες από ακτινοθεραπεία αποφέρουν ισοδύναμα με τη μαστεκτομή αποτελέσματα από πλευράς επιβίωσης <sup>125</sup>.

Επίσης, τις τελευταίες δεκαετίες, λιγότερο επεμβατικές επιλογές έχουν καθιερωθεί και για την αντιμετώπιση της νόσου στην μασχαλιαία χώρα, με τη βιοψία του λεμφαδένα φρουρού να αποτελεί τον επιθυμητό στόχο σε σχέση με τον μασχαλιαίο λεμφαδενικό καθαρισμό. Η βιοψία του φρουρού λεμφαδένα συνοδεύεται από σαφώς χαμηλότερο ποσοστό επιπλοκών και νοσηρότητας σε σχέση με τον μασχαλιαίο λεμφαδενικό καθαρισμό καθώς επίσης και από άριστα ποσοστά μακροπρόθεσμου τοπικοπεριοχικού ελέγχου της νόσου <sup>126,127</sup>.

Ένας παράγοντας που συνετέλεσε στην πραγματοποίηση λιγότερο επεμβατικών επεμβάσεων για την αντιμετώπιση του ΚΜ ήταν και οι σύγχρονες μέθοδοι ακτινοθεραπείας. Έχει δειχθεί με πλήθος μελετών ότι η μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία αυξάνει το διάστημα ελεύθερο νόσου καθώς επίσης και την συνολική επιβίωση ασθενών με πρώιμο ΚΜ και διηθημένους λεμφαδένες που θα υποβληθούν σε συντηρητική επέμβαση <sup>128,129</sup>. Έχει υπολογισθεί πως η μείωση που επιφέρει η μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία στον τοπικό έλεγχο της νόσου είναι περίπου 75% <sup>130</sup>. Σημαντικός είναι επίσης ο ρόλος της ακτινοθεραπείας για τον έλεγχο της νόσου στην περιοχή της μασχάλης, όπως επίσης σε ορισμένες περιπτώσεις και για την αποφυγή του μασχαλιαίου λεμφαδενικού καθαρισμού <sup>131</sup>.

Ο τρίτος πυλώνας για την επιτυχή αντιμετώπιση του πρώιμου ΚΜ είναι η συστηματική θεραπεία, στην οποία συμπεριλαμβάνεται η χημειοθεραπεία, η ορμονοθεραπεία και οι στοχευτικοί παράγοντες. Η πλειοψηφία των γυναικών με πρώιμο ΚΜ θα χρειασθεί να υποβληθεί σε κάποιου είδους συστηματική θεραπεία σε κάποια φάση της θεραπείας τους. Η συστηματική θεραπεία μπορεί να χορηγηθεί πριν το χειρουργείο (νεοεπικουρική) όπως σημειώθηκε ανωτέρω. Επίσης, εξαιρετικά σημαντικός είναι ο ρόλος της συστηματικής θεραπείας ως επικουρικής θεραπείας μετά τη χειρουργική επέμβαση στην περίπτωση που τα ιδιαίτερα παθολογοανατομικά, βιοχημικά και μοριακά δεδομένα της νόσου υποδεικνύουν αυξημένη πιθανότητα υποτροπής της νόσου <sup>2</sup>. Η επικουρική ορμονοθεραπεία και χημειοθεραπεία μειώνουν τον κίνδυνο υποτροπής κατά ένα τρίτο η κάθε μία <sup>132,133</sup>.

Η επιλογή της κατάλληλης επικουρικής θεραπείας εξαρτάται από τα επιμέρους χαρακτηριστικά της νόσου. Στον luminal πρώιμο ΚΜ, στον οποίο έχουμε εστίασει, η επικουρική ορμονοθεραπεία για τουλάχιστον 5 έτη μετά το χειρουργείο έχει απόλυτη ένδειξη και τεκμηριωμένη αποτελεσματικότητα σε πλήθος μελετών. Για τις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες η ταμοξιφαίνη αποτελεί την πρώτη επιλογή, ενώ στις ασθενείς υψηλού κινδύνου για υποτροπή της νόσου έχει δειχθεί πως, μετά την επικουρική χημειοθεραπεία, η προσθήκη στην ταμοξιφαίνη ωθηθικής καταστολής με ανάλογα γοναδοτροπινών (GnRH ανάλογα), τα οποία αναστέλουν την παραγωγή των ορμονών του φύλου, αυξάνει το διάστημα ελεύθερο νόσου και την συνολική επιβίωση <sup>134</sup>. Ομοίως, ο συνδυασμός ενός αναστολέα αρωματάσης με GnRH ανάλογα επίσης αυξάνει το διάστημα ελεύθερο υποτροπής σε σύγκριση με την ταμοξιφαίνη και τον συνδυασμό της με GnRH ανάλογα, ωστόσο συνοδεύεται από αυξημένη τοξικότητα. Αντιθέτως, ο συνδυασμός ταμοξιφαίνης με GnRH ανάλογα φαίνεται ότι επιτυγχάνει μεγαλύτερη συνολική επιβίωση <sup>135</sup>.

Στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με πρώιμο ΚΜ, η χορήγηση ταμοξιφαίνης και ενός αναστολέα της αρωματάσης, συνήθως διαδοχικά, αποτελούν την βέλτιστη επιλογή. Η χορήγηση του αναστολέα αρωματάσης μειώνει την θνητότητα από ΚΜ κατά περίπου 15% στα πέντε πρώτα έτη σε σύγκριση με την χορήγηση ταμοξιφαίνης <sup>136</sup>.

Σχετικά πρόσφατες μελέτες έχουν επίσης δείξει πως η επέκταση της επικουρικής ορμονοθεραπείας για περισσότερο από 5 χρόνια (10 ή ακόμη και 15 έτη) βελτιώνει την κλινική έκβαση των ασθενών <sup>137</sup>. Επίσης, η προσθήκη επικουρικής χημειοθεραπείας

επιπρόσθετα της ορμονοθεραπείας εξαρτάται από τον κίνδυνο υποτροπής. Αν ο κίνδυνος υποτροπής είναι μεγαλύτερος από 10% στα 10 έτη, τότε η χημειοθεραπεία έχει ρόλο στην αντιμετώπιση αυτών των ασθενών <sup>2</sup>.

### **2.3 Θεραπεία του προχωρημένου καρκίνου του μαστού**

Στην ομάδα αυτή των ασθενών συγκαταλέγονται ασθενείς με μη χειρουργήσιμο τοπικά προχωρημένο ΚΜ καθώς επίσης και ασθενείς με απομακρυσμένες μεταστάσεις. Καθώς η νόσος αυτής της ομάδας των ασθενών είναι μη ιάσιμη, ο κύριος στόχος της θεραπείας είναι η επιμήκυνση της επιβίωσης και η ανακούφιση των συμπτωμάτων. Ο κεντρικός άξονας στη θεραπεία αυτών των ασθενών είναι οι συστηματικές θεραπείες, ενώ οι χειρουργικές επεμβάσεις και η ακτινοθεραπεία χρησιμοποιούνται κατά περίπτωση για να βελτιώσουν την ποιότητα ζωής των ασθενών <sup>2</sup>.

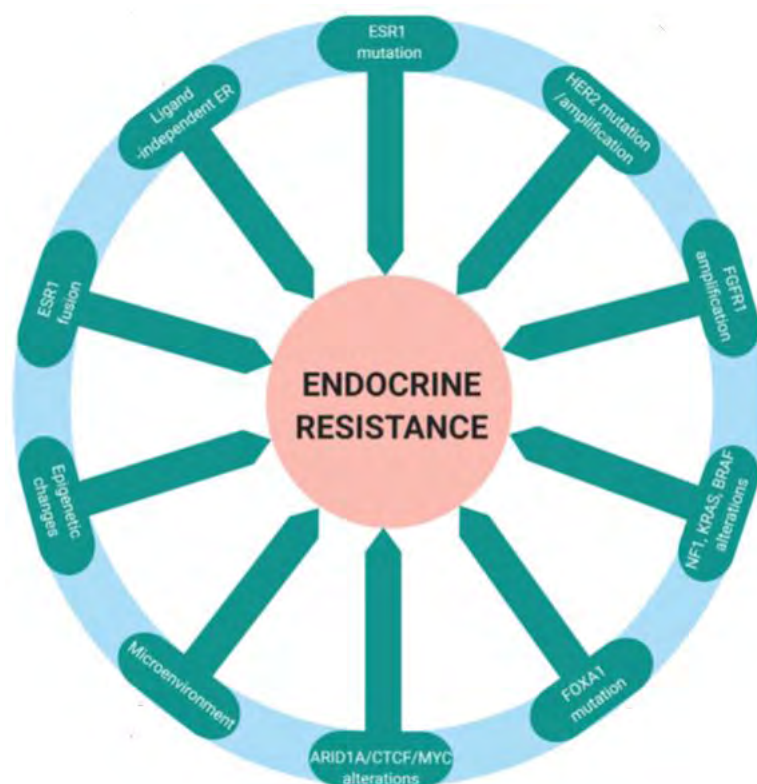
Για τους ασθενείς με έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων, η χορήγηση ορμονοθεραπείας αποτελεί την πρώτη επιλογή. Η χορήγηση της θα πρέπει να συνεχίζεται για αρκετές γραμμές μέχρι να αναπτυχθεί αντίσταση. Εξαίρεση στην στρατηγική αυτή αποτελεί η ταχεία πρόοδος της νόσου και η σπλαχνική κρίση με δυσλειτουργία σημαντικών οργάνων <sup>138,139</sup>. Για τις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες η ωοθηκική καταστολή είναι απαραίτητη σε συνδυασμό με ταμοξιφαίνη ή κάποιον αναστολέα της αρωματάσης ή τον παράγοντα fulvestrant <sup>138,139</sup>. Στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, στην πρώτη γραμμή χορηγείται αναστολέας αρωματάσης, fulvestrant ή ταμοξιφαίνη ανάλογα με τη θεραπεία που είχε χορηγηθεί ως επικουρική καθώς και το χρονικό διάστημα που έχει μεσολαβήσει μέχρι την υποτροπή της νόσου <sup>138,139</sup>.

Νεώτερα φάρμακα που έχουν ενταχθεί στην κλινική πράξη για να υπερκεραστεί η αντίσταση στην ορμονοθεραπεία είναι οι αναστολείς (palbociclib, ribociclib και abemaciclib) της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 4/6 (CDK 4/6) και οι αναστολείς του mTOR (mammalian target of rapamycin). Έχει δείχθει πως οι αναστολείς της CDK 4/6 αυξάνουν σημαντικά το διάστημα μέχρι την πρόοδο της νόσου καθώς επίσης πρώιμα αποτελέσματα δείχνουν πως αυξάνουν και την συνολική επιβίωση <sup>139</sup>.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### 3. Αντίσταση στην ορμονοθεραπεία του καρκίνου του μαστού

Αν και η πλειοψηφία των ασθενών με ΚΜ ωφελούνται από την ενδοκρινική θεραπεία, ένα σημαντικό ποσοστό που φτάνει το 30% των ασθενών αναπτύσσει αντίσταση που περιορίζει την αποτελεσματικότητά της και δημιουργεί σοβαρά θεραπευτικά ερωτήματα <sup>140</sup>. Η ανάπτυξη της αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία είναι μία βαθμιαία και πολυσταδιακή διαδικασία στην οποία εμπλέκονται πολλοί κυτταρικοί, μοριακοί και ανοσολογικοί μηχανισμοί (Εικόνα 7). Παρά τη βαθύτερη κατανόηση των υποκείμενων παθοφυσιολογικών διεργασιών, η αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία παραμένει ένα βιολογικό φαινόμενο του οποίου πολλά επιμέρους στοιχεία είναι λιγότερο κατανοητά και αποσαφηνισμένα <sup>141</sup>.



**Εικόνα 7.** Μηχανισμοί αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία. Τροποποιημένο από <sup>142</sup>.

Η αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία διακρίνεται σε εγγενή (de novo) ή επίκτητη ανάλογα με το διάστημα που μεσολαβεί από την έναρξη της ενδοκρινικής θεραπείας μέχρι την ανάπτυξη της αντίστασης σε αυτή <sup>142</sup>. Η παρουσία της αντίστασης,

και μάλιστα της επίκτητης, στην ενδοκρινική θεραπεία φαίνεται πως είναι το τελικό αποτέλεσμα πολλών επιμέρους μηχανισμών, οι οποίοι συνοπτικά εκτίθενται κατωτέρω<sup>143</sup>.

### **3.1 Μηχανισμοί αντίστασης στην ορμονοθεραπεία του καρκίνου του μαστού**

Η de novo αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία χαρακτηρίζεται συχνά από απώλεια έκφρασης του ERα και από μεταλλάξεις του γονιδίου του ER, όπως απαλοιφές και σημειακές μεταλλάξεις. Επίσης, ασθενείς που φέρουν μη ενεργά αλληλόμορφα του κυτοχρώματος P4502D6 (CYP2D6) δεν μπορούν να μεταβολίσουν την ταμοξιφαίνη στον ενεργό μεταβολίτη της, την ενδοξιφαίνη, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν αντίσταση στην ταμοξιφαίνη<sup>144</sup>. Στην επίκτητη αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία, οι μηχανισμοί που εμπλέκονται φαίνεται πως είναι περισσότεροι<sup>143</sup>.

### **3.2 Μειορρύθμιση του υποδοχέα οιστρογόνων**

Ένας από τους μηχανισμούς επίκτητης αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία που έχει προταθεί είναι η μειορρύθμιση της έκφρασης του ER. Είναι δεδομένο πως η ενδοκρινική θεραπεία είναι αποτελεσματική μόνο στους ER θετικούς (ER+) όγκους και επομένως, η έκφραση των ER έχει προβλεπτική αξία, ενώ η απουσία της έκφρασής τους σχετίζεται με de novo αντίσταση στην ορμονοθεραπεία<sup>141</sup>. Ωστόσο, η εικαζόμενη μείωση της έκφρασης του ER δεν έχει επιβεβαιωθεί στο 25% περίπου των περιπτώσεων με επίκτητη αντίσταση στην ταμοξιφαίνη. Επίσης, το 20% των ασθενών που αναπτύσσει αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία θα απαντήσει σε επόμενης γραμμής ορμονική θεραπεία με AI ή SERM, γεγονός που υποδηλώνει την ενεργό παρουσία της οδού σηματοδότησης του ER στην ομάδα αυτών των ασθενών<sup>145,146</sup>.

### **3.3 Μεταλλάξεις του υποδοχέα των οιστρογόνων**

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου του ER έχουν επίσης ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία. Αν και μεταλλάξεις του ER δεν έχουν ανιχνευθεί σε πρωτοπαθείς KM, οι Fuqua και συν. έχουν δείξει πως ένα αλληλόμορφο του ERα, στο οποίο λυσίνη αντικαθιστά την αργινίνη στη θέση 303 λόγω μίας αλλαγής βάσης A σε G, υπάρχει στο ένα τρίτο των υπερπλαστικών αλλοιώσεων του μαστού<sup>90</sup>. Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων του ERα που έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς με ER+ KM που υπεβλήθησαν σε θεραπεία με ταμοξιφαίνη εντοπίζονται στην γενετική περιοχή LBD (Ligand Binding Domain) και οδηγούν σε συνεχή ενεργοποίηση του ER<sup>147-150</sup>. Επίσης, στην κυτταρική σειρά MCF7 (κυτταρική σειρά KM, ανθεκτική στην



ταμοξιφαίνη) έχει εντοπισθεί μία σημειακή μετάλλαξη που οδηγεί σε αλλαγή στην LBD περιοχή και σε ελαττωματικό σύμπλοκο ER-ERE<sup>147,151</sup>. Επιπρόσθετα, μία πρόσφατη μελέτη ταυτοποίησε «hot spot» μεταλλάξεις στην LBD περιοχή του γονιδίου *ER*, όπως οι Tyr537Ser, Tyr537Asn και Asp538Gly (Y537S, Y537N, D538G), οι οποίες ευνοούν εκείνη τη στερεοδιαμόρφωση του ERα, η οποία επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων ανεξάρτητα από την παρουσία των οιστρογόνων, προάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία<sup>150</sup>. Ομοίως, η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης όλου του γονιδιώματος σε ER+/HER-2 αρνητικές γυναίκες ασθενείς με ΚΜ απεκάλυψε μεταλλάξεις στην περιοχή LBD του γονιδίου *ERα*<sup>152</sup>. Οι μεταλλάξεις του *ERα* απαντώνται στο 25–30% περίπου των ασθενών με ΚΜ μεταστατικού σταδίου, που αντιμετωπίζονται με AIs<sup>153</sup>. Οι κυριότερες μεταλλάξεις στην ομάδα αυτών των ασθενών είναι οι D538G, Y537S, Y537N, Y537C και E380Q. Σε πρόσφατη μελέτη έχει δειχθεί πως η μετάλλαξη D538G οδηγεί σε συνεχή μεταγραφική ενεργότητα τον ER, με αποτέλεσμα αύξηση του πολλαπλασιασμού και επαγωγή της αντίστασης στην ταμοξιφαίνη<sup>148</sup>.

Μία επίσης σημαντική σημειακή μετάλλαξη του ER είναι η A908G, η οποία έχει δειχθεί ότι οδηγεί σε αυξημένη απάντηση στην οιστραδιόλη καθώς επίσης έχει συσχετισθεί και με τον διηθητικό ΚΜ<sup>154</sup>. Επίσης, οι Ellis και συν. έχουν ταυτοποιήσει ένα γονίδιο σύντηξης μεταξύ ERα/YAP1 (Yes1 Associated Transcriptional Regulator), το οποίο έχει σχετισθεί με την ανάπτυξη ενδοκρινικής αντίστασης στον ΚΜ<sup>155</sup>. Η κλινική σημασία των μεταλλάξεων του *ER* έχει αναδυθεί από την αξιολόγησή τους σε πληθυσμούς των κλινικών μελετών. Οι μεταλλάξεις D538G, Y537S, E380Q, Y537N και Y537C του γονιδίου *ERα* έχουν μελετηθεί στους ασθενείς κλινικών δοκιμών μεταξύ των οποίων οι BOLERO-2, SoFEA και PALOMA-3<sup>156,157</sup>. Τα ευρήματα από αυτές τις μελέτες υποστηρίζουν την αξία των εν λόγω μεταλλάξεων ως βιοδεικτών για την ανάπτυξη αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία σε ασθενείς με ΚΜ<sup>158</sup>.

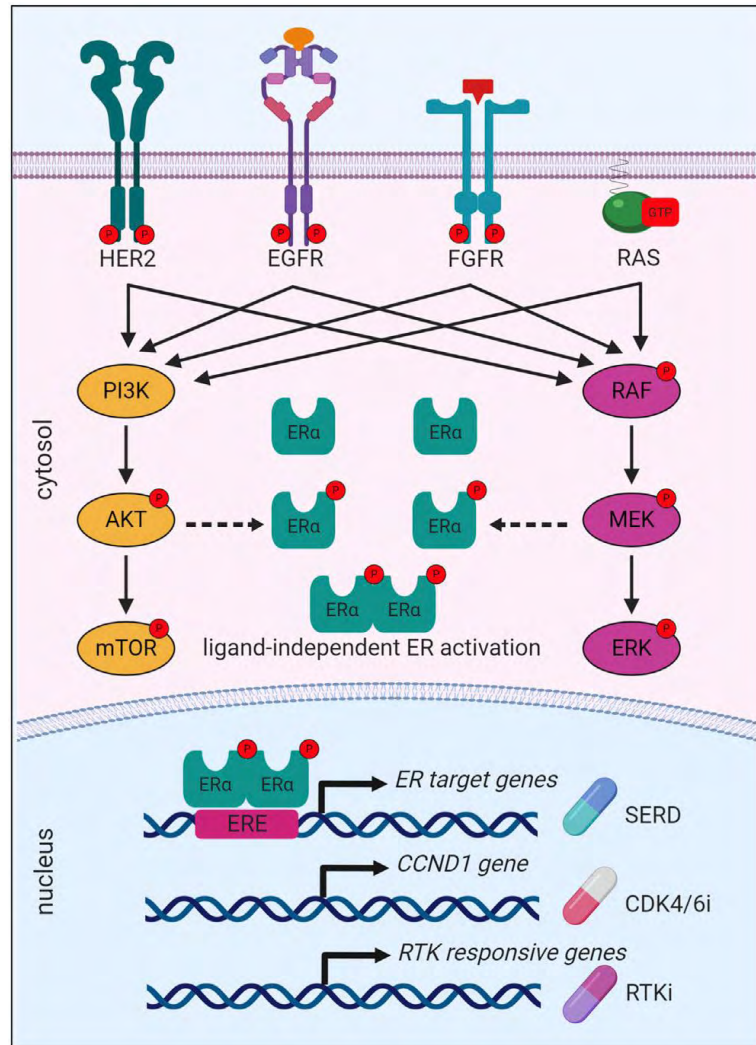
Με δεδομένη τη σημασία των μεταλλάξεων αυτών για την ανταπόκριση στην ενδοκρινική θεραπεία, μία σειρά νέων φαρμακευτικών παραγόντων, κυρίως της κατηγορίας των SERDs, έχουν αναπτυχθεί και δοκιμάζονται στην κλινική πράξη<sup>141</sup>. Επίσης, η απουσία των μεταλλάξεων στον πρωτοπαθή όγκο και η σύνδεσή τους με την ανάπτυξη της ενδοκρινικής αντίστασης είναι χαρακτηριστικά που υποστηρίζουν την υποψηφιότητά τους ως προβλεπτικών και προγνωστικών βιοδεικτών<sup>141</sup>.

### 3.4 Υποδοχείς προγεστερόνης

Όπως σημειώθηκε ανωτέρω, ο PR διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον ΚΜ και αποτελεί τον στόχο πολλών θεραπευτικών παρεμβάσεων, όπως είναι οι εκλεκτικοί τροποποιητές του υποδοχέα της προγεστερόνης (selective progesterone receptor modulators - SPRM) <sup>159</sup>. Μετά την πρόσδεση της προγεστερόνης στον υποδοχέα της, τον διμερισμό του τελευταίου, την μετακίνηση στον πυρήνα και την πρόσδεσή του στα στοιχεία απάντησης στην προγεστερόνη (progesterone response elements-PRE) στις περιοχές του υποκινητή/ενισχυτή των γονιδίων στόχων, επέρχεται τροποποίηση της μεταγραφής τους, είτε αυξάνοντας, είτε μειώνοντας την έκφραση τους. Εκτός της πρόσδεσης στα PREs, ο PR δύναται να συνδιαμορφώσει σύμπλοκα με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως είναι οι AP1 (Activator protein 1) και SP1 (Sp1 Transcription Factor), γεγονός που επιτρέπει τη ρύθμιση των γονιδίων που στερούνται PREs <sup>160</sup>. Η απώλεια της έκφρασης του PR κατά την ενδοκρινική θεραπεία αυξάνει την επιθετικότητα του καρκίνου, μειώνοντας ταυτόχρονα την επιβίωση των ασθενών <sup>161</sup>. Επίσης, η μειορρύθμιση του PR οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του μονοματιού της PI3K (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform) <sup>162</sup>.

### 3.5 Υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (receptor tyrosine kinase-RTK)

Οι RTKs είναι μία οικογένεια υποδοχέων που ενεργοποιούνται μετά την πρόσδεση του αντίστοιχου προσδέτη, οι οποίοι κυρίως είναι αυξητικοί παράγοντες, ορμόνες ή κυτταροκίνες. Οι πιο γνωστοί και σημαντικοί RTK είναι η οικογένεια των υποδοχέων των EGF, οι υποδοχείς του ινσουλινομόρφου αυξητικού παράγοντα 1 (IGF-1R), ο υποδοχέας του ηπατοκυτταρικού αυξητικού παράγοντα (HGFR), οι υποδοχείς του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα, οι υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (PDGFR), οι υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGFR), οι κινάσες του αναπλαστικού λεμφώματος (ALK), το ROS πρωτογονίδιο 1 (ROS1) και η τυροσινική κινάση που ομοιάζει με υποδοχέα (RYK) <sup>141</sup>.



**Εικόνα 8.** Η ενεργοποίηση των HER2, EGFR, FGFR και άλλων RTKs προάγουν την αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία. Η ενεργοποίηση των RTKs (συνήθως λόγω μεταλλάξεων ή ενίσχυσης) οδηγεί σε αύξηση της σηματοδότησης των PI3K και MAPK, οι οποίες επάγουν την φωσφορυλίωση του προάγοντας την ενεργοποίηση του ER χωρίς την παρουσία συνδέτη. Η φωσφορυλίωση του ER προάγει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του ER, η οποία είναι ανεξάρτητη από την παρουσία συνδέτη. Εκτός του ER, οι RTKs ενεργοποιούν άλλους μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι προάγουν την επιβίωση ανεξάρτητα από τον ER. Από <sup>142</sup>.

Αύξηση της έκφρασης κάποιων RTKs έχει παρατηρηθεί σε ΚΜ και έχει σχετισθεί με κακή πρόγνωση <sup>163,164</sup>. Τα κύρια μονοπάτια που έχει βρεθεί ότι ενεργοποιούνται είναι αυτά της πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από τα μιτογόνα (MAPK), των JAK (janus kinase) / STAT (signal transducer and activator of transcription) και της PI3K/AKT (Εικόνα 8). Δεδομένα υποστηρίζουν πως αναστολείς των RTKs μπορούν να αντιστρέψουν την αντίσταση που παρατηρείται κατά τη θεραπεία του μεταστατικού ΚΜ <sup>165</sup>.

## ***EGF/EGFR/ HER2***

Η οικογένεια των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων ErbB περιλαμβάνει τους EGFR (ErbB1/HER1, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3, and ErbB4/HER4). Μετά την ενεργοποίηση ακολουθεί ο διμερισμός και η αυτοφωσφορλίωση των υποδοχέων, οδηγώντας στην ενεργοποίηση των οδών σηματοδότησης των MAPK-ERK και των PI3K-AKT <sup>166</sup>. Τα τέσσερα μέλη της οικογένειας αυτής έχει δείχθει πως εμπλέκονται στον ΚΜ. Έκφραση του HER2 παρατηρείται στο 20–30% των ΚΜ, υπερέκφραση δε του HER3 στο 10% των περιστατικών ΚΜ <sup>167</sup>.

Ο ρόλος της συγκεκριμένης οικογένειας των αυξητικών παραγόντων στην de novo και στην επίκτητη αντίσταση έχει τεκμηριωθεί με μεγάλο αριθμό αναδρομικών μελετών. Δεδομένα από πολλές μελέτες έχουν υποστηρίξει πως οι όγκοι αλλάζουν από HER2 σε ER και αντίστροφα κατά τη διάρκεια των θεραπειών <sup>168,169</sup>. Η εξάρτηση των δύο μονοπατιών υπογραμμίζεται ιδιαίτερα σε ασθενείς με μεταστατικό ΚΜ που έχουν θεραπευτεί με AI ή fulvestrant και έχουν εμφανίσει πρόοδο μετά από trastuzumab ή lapatinib. Έτσι, ο θεραπευτικός συνδυασμός αναστολέων των ER και HER2 έχει δείξει κλινικό όφελος σε ασθενείς με ER-HER2 θετικούς όγκους. Στη μελέτη TAnDEM, οι ασθενείς έλαβαν trastuzumab σε συνδυασμό με αναστροζόλη εμφανίζοντας όφελος στο PFS <sup>170</sup>.

Η αναστολή της ενδοκυττάριας σηματοδότησης έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για το ξεπέραςμα της αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία. Η ταυτόχρονη αναστολή του HER2 και της MAPK σε HER2-θετική και ανθεκτική στην ταμοξιφαίνη MCF7 κυτταρική σειρά έχει οδηγήσει σε αύξηση της δραστηριότητας της ταμοξιφαίνης <sup>171</sup>. Επίσης, η χρήση του lapatinib, ενός διπλού αναστολέα των EGFR και HER2, έχει επιτύχει να επαναφέρει την ευαισθησία στην ενδοκρινική θεραπεία σε HER2+ κυτταρικές σειρές ΚΜ <sup>172</sup>.

Αναστολείς του EGFR έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την αναίρεση της ενδοκρινικής αντίστασης. Ο συνδυασμός ταμοξιφαίνης και του αναστολέα του EGFR gefitinib ωστόσο δεν έδειξε σημαντικό όφελος ως προς το PFS <sup>173</sup>. Αντιθέτως, σε άλλη μελέτη φάσης II, σε ER+ μεταστατικό ΚΜ, ο συνδυασμός της αναστροζόλης με gefitinib έδειξε βελτίωση στο PFS <sup>174</sup>.

Η παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *HER2* έχει δείχθει πως οδηγεί σε αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία σε ένα ποσοστό ασθενών με ER+ μεταστατικό ΚΜ. Έχει

δειχθεί πως μεταλλάξεις του *HER2* (D769Y, L755S και S310Y) ήταν πιο κοινές σε όγκους με επίκτητη ενδοκρινική αντίσταση<sup>175</sup>. Οι μεταλλάξεις στο *HER2* οδηγούν σε ανεξαρτησία από τη δράση της E2 και αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία πρώτης γραμμής στην οποία περιλαμβάνεται ταμοξιφαίνη ή fulvestrant και palbociclib. Στους ίδιους ασθενείς, ο συνδυασμός της ενδοκρινικής θεραπείας με τον αναστολέα των HER peratinib ήταν μία αποτελεσματική θεραπεία<sup>176</sup>. Είναι γνωστό επίσης πως οι μεταλλάξεις του *HER2* είναι πιο κοινές σε ER+ μεταστατικό ΚΜ και πως οι μεταλλάξεις αυτές ευνοούν το διμερισμό με τον HER3 (ERBB3)<sup>177</sup>. Η ίδια μελέτη έχει επίσης δείξει πως απαιτείται η ταυτόχρονη αναστολή HER2 και ER για την θεραπεία ασθενών με ER+ και μεταλλαγμένο HER2<sup>177</sup>.

### **Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R)**

Ο υποδοχέας του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα 1 είναι μία πρωτεΐνη που εκφράζεται ως μία διαμεμβρανική κινάση τυροσίνης και ενεργοποιείται από τις διεγερτικές ορμόνες/συνδέτες (IGF-1, IGF-2), οδηγώντας σε πολλαπλασιασμό και αντι-απόπτωση<sup>178</sup>. Το σύστημα IGF-1 εμπλέκεται στην παθογένεια του ΚΜ<sup>179</sup>. Υπάρχουν επίσης αρκετές ενδείξεις ότι η απορρύθμιση του συστήματος IGF-1 και η ενισχυμένη ενεργοποίηση του IGF-1R εμπλέκονται στην αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία καθώς επίσης ότι οι IGFs παίζουν έναν παρακρινή/αυτοκρινή ρόλο στην προαγωγή της ανάπτυξης του *in situ* όγκου<sup>180</sup>.

Μετά την πρόσδεση του συνδέτη στον υποδοχέα του, τον IGF-1R, ο τελευταίος επάγει την φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων του υποδοχέα της ινσουλίνης -1 και -2 (insulin receptor substrate-1 και -2, IRS1 και IRS2 αντίστοιχα), τα οποία προάγουν την αύξηση του όγκου μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών MAPK/ERK, PI3K/AKT, και JAK/STAT. Αυξημένα επίπεδα του IGF-1 στο πλάσμα, έχουν συσχετιστεί με αυξημένο ΚΜ<sup>181</sup>. Οι γενετικοί πολυμορφισμοί στα γονίδια που κωδικοποιούν τον *IGFI* έχουν αναφερθεί ότι είναι πιθανό να συνεισφέρουν στον αυξημένο κίνδυνο του ΚΜ<sup>182,183</sup>. Η ενεργοποίηση του IGF-1R οδηγεί σε φωσφορυλίωση των MAPK-AKT και ακόλουθη ενεργοποίηση/φωσφορυλίωση του ERα<sup>184</sup>.

Η αλληλοεξάρτηση των IGF-1R και ERα σε πρότυπα μοντέλα ΚΜ είναι καλά μελετημένη και προτείνεται ως ένας μηχανισμός αντίστασης σε αντι-οιστρογόνα<sup>185,186</sup>. Μία μελέτη σε MCF7 κύτταρα, EGFR-θετικά και ανθεκτικά στην ταμοξιφαίνη (TAMR), έδειξε μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνικών επιπέδων IGF-1R, σε σύγκριση

με τα αγρίου τύπου MCF7 κύτταρα. Ωστόσο, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του φωσφορυλιωμένου IGF-IR ήταν ισοδύναμα με τα επίπεδα δύο κυτταρικών σειρών υπό βασικές συνθήκες ανάπτυξης, λόγω αύξησης της έκφρασης του IGF2, ο οποίος ενεργοποίησε και τον IGF-IR και τον EGFR <sup>179</sup>.

Μία μελέτη από τους Creighton et al., αναγνώρισε μία ομάδα γονιδίων, τα οποία, είτε αυξορρυθμίζονταν είτε μειορρυθμίζονταν από τον IGF-1 και τα οποία εκπροσωπούν υπερδραστήρια μονοπάτια σχετιζόμενα ορμονική ανεξαρτησία <sup>187</sup>. Πρακτικά, παρόμοια IGF-1 υπογραφή, ανάλογη με αυτή προέκυψε στα MCF7 κύτταρα, παρατηρήθηκε και σε κλινικά δείγματα ΚΜ. Οι όγκοι που παρουσίαζαν αυτή την IGF-1 υπογραφή σχετίστηκαν με κακή πρόγνωση και κακή έκβαση. Σε μία άλλη μελέτη, ασθενείς με όγκους ανθεκτικούς στην ταμοξιφαίνη και με υψηλότερη έκφραση IGF1 και ERα, ανέπτυξαν αντίσταση στην ταμοξιφαίνη μετά από μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, ενώ οι ανθεκτικοί στην ταμοξιφαίνη όγκοι είχαν χαμηλότερη έκφραση IGF1 και ERα, σε σχέση με όγκους ευαίσθητους στην ταμοξιφαίνη <sup>188</sup>. Μία ξεχωριστή μελέτη κατέδειξε ένα ρόλο για τη συνδυασμένη ανατολή των IGF-1R και του υποδοχέα της ινσουλίνης (InsR), ενώ ο διπλός αναστολέας τυροσινικής κινάσης OSI-906 (αναστολέας του InsR και του IGF-1R) σε συνδυασμό με fulvestrant ανέστειλε την αύξηση των ορμονο-ανεξάρτητων όγκων, σε σύγκριση με τη δράση του κάθε φαρμάκου ξεχωριστά <sup>189</sup>.

Οι ειδικοί αναστολείς για τον IGF-1R (όπως οι AG1024 και AEW541) ή ένα αντίσωμα έναντι του IGF2, ανέστειλε τη βασική φωσφορυλίωση των IGF-1R, c-SRC (proto-oncogene c-Src), AKT και EGFR, και μείωσε σημαντικά τη βασική ανάπτυξη των ανθεκτικών στην ταμοξιφαίνη κυττάρων. Είναι ενδιαφέρον ότι ο αναστολέας AEW541 ανέστειλε επίσης τη διεγερτική δράση της ινσουλίνης και του IGF2 σε ανθεκτικά στην ταμοξιφαίνη κύτταρα <sup>190</sup>.

### **Οδός σηματοδότησης του FGFR**

Η πρόσδεση των συνδετών FGF (Fibroblast Growth Factor) στον υποδοχέα FGFR προάγει τον διμερισμό του υποδοχέα και την ενεργοποίησή του με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση στη συνέχεια των οδών PI3K/AKT, RAS/RAF/MEK1/2-ERK, φωσφολιπάσης Cg (PLCg), και STATs (Signal Transducer And Activator Of Transcription) <sup>191</sup>. Η ενίσχυση των γονιδίων που βρίσκονται στη χρωμοσωματική περιοχή 11q12-14, η οποία περιλαμβάνει τον *FGFR1* και τους συνδέτες 3, 4 και 19 του

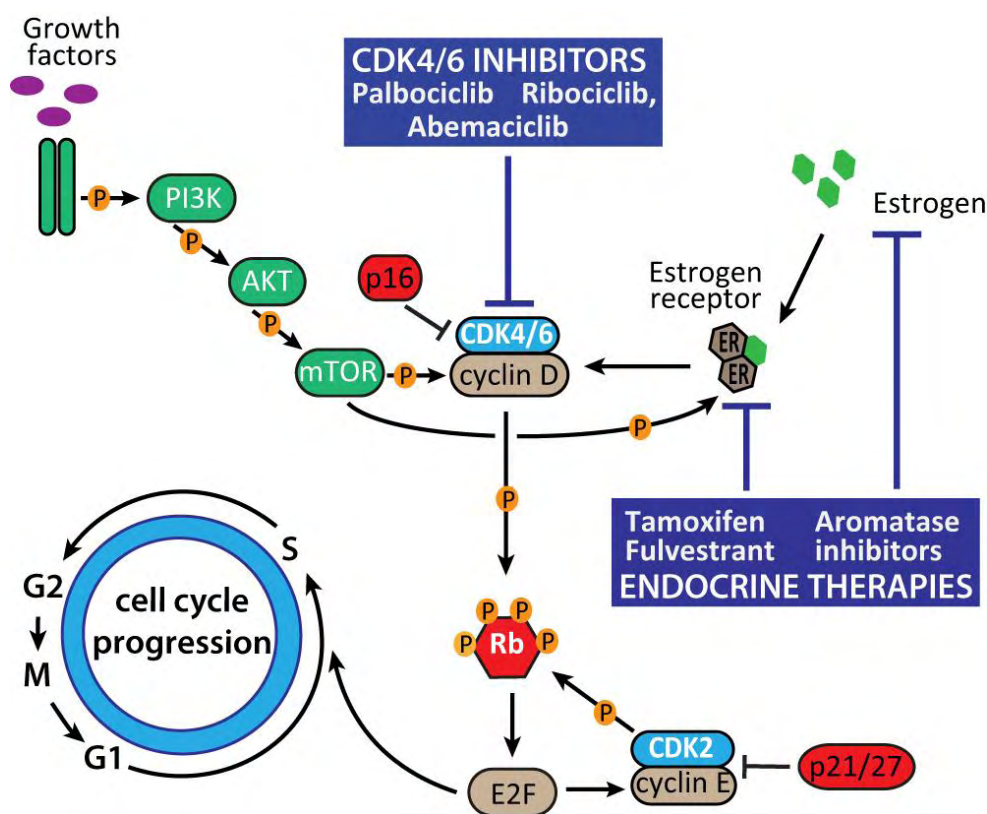
FGF, έχει παρατηρηθεί σε ποσοστό πάνω από 10% των ασθενών με ΚΜ<sup>191,192</sup>. Το ένα τρίτο των ασθενών με όγκους με ενισχυμένο το *FRFR1* παρουσίαζαν επίσης ενίσχυση των ογκογονιδίων όπως τα *CCND1*(*Cyclin D1*), *FGF3*, *FGF4* και *FGF19*<sup>193,194</sup>. Η έκφραση και η σηματοδότηση μέσω του FGFR1 είναι απαραίτητη για την επιβίωση των κυτταρικών σειρών ΚΜ που έχουν υπερέκφραση του FGFR1<sup>195</sup>. Εκτός από την ενίσχυση γονιδίων, έχουν παρατηρηθεί επίσης σε ασθενείς με ΚΜ αυξημένη έκφραση του συνδέτη και μεταλλάξεις στους υποδοχείς<sup>196</sup>. Η απορρύθμιση της σηματοδότησης FGF/FGFR και ο ρόλος της στη διαδικασία της καρκινογένεσης έχει λίγο κατανοηθεί, παρόλο που οι ενδείξεις δείχνουν ότι η ανώμαλη σηματοδότηση του FGFR1 μεσολαβεί την αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία μέσω των μονοπατιών PI3K και MAPK<sup>197</sup>. Ένα μικρό μόριο αναστολέας, το donitininib (TKI258), οδήγησε σε αντικαρκινική δράση στις κυτταρικές σειρές ΚΜ MDA-MB-134 και SUM52, που είχαν ενισχυμένα τα *FRFR1* και *FGFR2*<sup>198</sup>. Είναι ενδιαφέρον ότι οι κυτταρικές σειρές MDA-MB-134 και SUM44 ήταν ανθεκτικές στη θεραπεία με ταμοξιφαίνη<sup>197</sup>.

Οι ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *FGFR* έχουν βρεθεί να έχουν ογκογόνο δυναμικό και να υποκινούν την αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία<sup>199,200</sup>. Η ενίσχυση του *FGFR1* έχει σχετιστεί με κακή επιβίωση σε ER+ ΚΜ<sup>201</sup>. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η ενίσχυση του *FGFR* έχουν σχετιστεί με κακή πρόγνωση και αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία στον HR+ ΚΜ<sup>201-203</sup>.

Λόγω του ρόλου της σηματοδότησης του FGF/FGFR στην αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία, οι αναστολείς FGFR αποτελούν μία αιτιολογημένη θεραπευτική στρατηγική. Οι FGFR TKIs προσφέρουν μία από τις καλύτερες προσεγγίσεις στη στόχευση ER+/HER2-αρνητικών/FGFR ενισχυμένων όγκων, ενώ κάποιοι από αυτούς είναι σε αρχική φάση κλινικών δοκιμών. Κάποιοι από τους pan-FGFR αναστολείς είναι οι BGJ398 (infigratinib), JNJ-42756493, Debio1347, TAS-120, AZD4547, ARQ087, και BAY1163877<sup>204</sup>. Ο ρόλος του BGJ398 έχει ήδη εκτιμηθεί και οι αρχικές αναφορές δείχνουν ότι έχει έναν πολλά υποσχόμενο ρόλο στην αντιμετώπιση του ΚΜ<sup>205</sup>. Ο AZD4547 είναι ένα επίσης υποσχόμενο αντικαρκινικό φάρμακο σε συνδυασμό με έναν AI (anastrozole/letrozole) βασισμένοι στην κλινική μελέτη RADICAL (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01791985)<sup>206</sup>. Ένας άλλος μη εκλεκτικός TKI, το lucitanib (E-3810) δοκιμάζεται σε κλινική δοκιμή φάσης II (FINESSE: ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02053636) ως μονοθεραπεία σε ER+, FGFR1-ενισχυμένο/FGFR1-μη ενισχυμένο μεταστατικό καρκίνο μαστού<sup>207</sup>.



### 3.6 Ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου



**Εικόνα 9.** Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου σε ER+ καρκίνο του μαστού. Μονοπάτια-κλειδιά που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο σε ER+ καρκίνο μαστού και οι στόχοι της θεραπευτικής παρέμβασης. Από <sup>208</sup>.

Η ευαισθησία του ΚΜ στην ενδοκρινική θεραπεία επηρεάζεται τόσο θετικά όσο και αρνητικά από τη λειτουργία των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου <sup>209</sup>. Έχει δειχθεί πως θετικοί ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, όπως οι πρωτεΐνες c-MYC, κυκλίνη E1 και κυκλίνη D, συμβάλλουν στην ανάπτυξη της αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία, ενεργοποιώντας τις CDKs (Εικόνα 9) <sup>210,211</sup>. Επίσης, έχει δειχθεί πως η υπερέκφραση του c-MYC συμβάλλει στην αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία, τροποποιώντας την έκφραση του CDKN1 (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A) <sup>211,212</sup>. Επιπλέον, η μειορρύθμιση ή η απώλεια λειτουργίας των p21 και p27 (CDKN1A and CDKN1B), οι οποίοι είναι δύο αναστολείς του σημείου ελέγχου



G1 του κυτταρικού κύκλου, έχει σχετισθεί με την αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία<sup>213,214</sup>. Επίσης, ο ER φαίνεται πως έχει σημαντικό ρόλο στις περιπτώσεις εκείνες που απουσιάζει η E2 για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι Miller και συν. έχουν δείξει πως ο ERα διατηρεί μεταγραφική δραστηριότητα, η οποία εξαρτάται από το σύμπλοκο CDK4/E2F (E2F Transcription Factor), παρά την αντι-οιστρογονική θεραπεία<sup>215</sup>. Οι ίδιοι ερευνητές έδειξαν πως η CDK4, ένας ενεργοποιητής του E2F, λειτουργεί ως τροποποιητής για τον ανεξάρτητο από την E2 κυτταρικό πολλαπλασιασμό του ΚΜ, καθώς επίσης και ότι η αναστολή της CDK4 οδηγεί στην αναστολή της αύξησης των ER θετικών κυτταρικών σειρών απουσία της E2<sup>215</sup>.

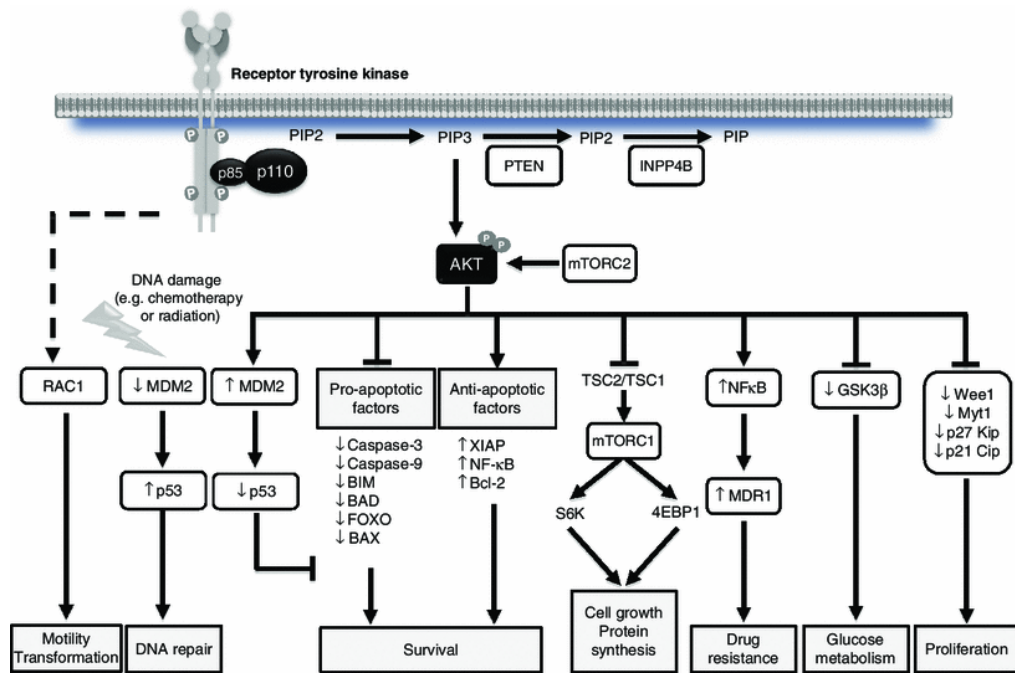
Σημαντικό επίσης ρόλο για τον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών επιθηλιακών όπως επίσης και των καρκινικών κυττάρων διαδραματίζει η οδός του συμπλέγματος κυκλίνη D-CDK4/6-INK4 (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A)-ρετινοβλαστώματος (Rb). Οι CDKs είναι θεμελιώδους σημασίας κυκλινο-εξαρτώμενοι προαγωγοί του κυτταρικού κύκλου, της κυτταρικής διαίρεσης και συνεπώς και του καρκίνου. Η σπουδαιότητά τους για τον κυτταρικό κύκλο είναι καλά μελετημένη με τις περισσότερες να αφορούν κυκλίνες των σημείων G0 (quiescence), G1-phase (πριν την σύνθεση του DNA), G1/S-phase, φάση S (σύνθεση του DNA) και φάση M (κυτταρική διαίρεση/cell division)<sup>216</sup>. Τέσσερις διαφορετικές CDKs έχουν περιγραφεί (CDK1, 2, 4, and 6), οι οποίες εξαρτώνται από τις κυκλίνες D (D1, D2, D3)<sup>217-219</sup>. Η σύνθεση του DNA συμβαίνει κατά τη διάρκεια της φάσης S του κυτταρικού κύκλου κατά την οποία το σύμπλεγμα κυκλίνη D1-CDK4/6 καταλύει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος, οδηγώντας στην αντιγραφή του DNA. Η κυκλίνη D1 ενεργοποιεί την CDK4/6 που είναι σημαντική για την διαμεσολαβούμενη από την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στο σημείο ελέγχου G1/S<sup>220,221</sup>. Σε μελέτη που βασίστηκε στα δεδομένα του δικτύου TCGA, η κυκλίνη D1 βρέθηκε

πολλαπλασιασμένη στο 58% των luminal B KM, με το 25% να έχει ενίσχυση στην CDK4. Ωστόσο, η κυκλίνη D1 βρέθηκε ενισχυμένη μόνο στο 29% των luminal A όγκων με μόλις το 14% να εμφανίζει ενίσχυση του CDK4 <sup>222</sup>. Σε άλλη μελέτη, luminal B KM ανθεκτικοί στην ορμονική θεραπεία βρέθηκε να έχουν μοναδική γονιδιακή υπογραφή που σχετιζόταν με απώλεια της εν λόγω πρωτεΐνης <sup>223</sup>. Η μεταγραφική αλυσίδα E2F4 καταστέλλεται μετά την αναστολή της CD4/6 σε ορμονοανεξάρτητη ER+ κυτταρικές σειρές KM όπως επίσης και σε ER+ ασθενείς με KM <sup>224</sup>. Η αναστολή της κυκλίνης D1 και της CDK4/6 αποτελούν νεότερες στρατηγικές για το ξεπέραςμα της ενδοκρινικής αντίστασης του KM, ενώ η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του FGFR έχει πρόσφατα ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη αντίστασης στον συνδυασμό αντιοιστρογόνων και αναστολέων της CDK 4/6 <sup>225</sup>.

### **3.7 Μεταγραφικοί παράγοντες**

#### ***PI3K/AKT/mTOR***

Η οδός μεταγωγής σήματος PI3K/AKT είναι αυτή που κυρίως ενεργοποιείται από τους RTKs, και η οποία φωσφορυλιώνει αρκετούς στόχους συμπεριλαμβανομένων των NF-κB, IKK, p27, FOXO1, GSK-3b, MDM2 και mTOR (Εικόνα 10). Ο τελευταίος είναι ο καλύτερα μελετημένος στόχος της οδού μεταγωγής σήματος της AKT <sup>226</sup>. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο PTEN (phosphatase and tensin homolog) είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής του mTOR μονοπατιού (Εικόνα 10) <sup>227</sup>. Η μειορρύθμιση της έκφρασης του PTEN μπορεί να επιτευχθεί μέσω πολλών μηχανισμών συμπεριλαμβανομένων μεταλλάξεων, απώλεια της ετεροζυγωτίας, μεθυλίωση, υπερέκφραση ρυθμιστικών microRNA, αστάθεια της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης του mTOR <sup>228</sup>.



**Εικόνα 10.** Η οδός μεταγωγής σήματος PI3K/AKT/mTOR και ο ρόλος της στον καρκίνο. Ο ενεργοποιημένος RTK προσελκύει την p85 που οδηγεί σε ενεργοποίηση της υπομονάδας p110 του PI3K. Η ενεργοποιημένη PI3K φωσφορυλιώνει την μεμβρανική PIP2, προσελκύοντας την PDK1 και την AKT. Η AKT ενεργοποιείται από την PDK/PIP3 και ρυθμίζει τη φωσφορυλίωση των τελεστικών μορίων που βρίσκονται κατωφερικά όπως επίσης και πολλαπλές κυτταρικές διαδικασίες όπως η επιβίωση, η πρωτεϊνική σύνθεση, ο πολλαπλασιασμός, ο μεταβολισμός της γλυκόζης και η αντίσταση στα φάρμακα. Το μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR είναι επίσης συνδεδεμένο με τις απαντήσεις του κυττάρου σε καταστάσεις stress που προκαλούνται από παράγοντες όπως η χημειοθεραπεία και η ακτινοβολία και μεσολαβούνται από τη λειτουργία της p53. Έκθεση των κυττάρων σε βλάβες του DNA οδηγεί σε μείωση των ενδοκυττάρων επιπέδων MDM2, η οποία οδηγεί σε αύξηση και σταθεροποίηση των επιπέδων του p53 με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA. GSK3β: glycogen synthase kinase-3β, MDM2: murine double minute 2, MDR1: multidrug resistance protein-1, mTOR: mammalian target of rapamycin, NF-κB: nuclear factor-κB, PDK1: phosphoinositide-dependent kinase 1, PIP2: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP3: phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate, PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase, PTEN: phosphatase and tensin homolog, TSC: tuberous sclerosis complex. Από <sup>226</sup>.

Η αλληλεπίδραση PI3K/AKT και E2 στον ΚΜ έχει καλά τεκμηριωθεί με πλήθος μελετών. Η ενεργοποιημένη AKT μπορεί να φωσφορυλιώσει τον ERα στη σερίνη -167 στην περιοχή AF-1 αυξάνοντας την εξαρτώμενη από τον ERα μεταγραφή γονιδίων<sup>184</sup>. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K στον ΚΜ έχει σχετισθεί με μειωμένα επίπεδα του ERα και την ανάπτυξη αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία<sup>229</sup>. Η σηματοδότηση μέσω του GPER (G Protein-Coupled Estrogen Receptor) είναι ένας ακόμη τρόπος που χρησιμοποιείται από την ενεργοποιημένη από την E2 PI3K (p110a subunit), η οποία οδηγεί στην απενεργοποίηση του FOXO3a, προάγοντας την πρόοδο του ΚΜ<sup>230</sup>. Ανταγωνιστές της GPER σε συνδυασμό με SERM/SERD μπορεί να λειτουργήσει ως μία αποτελεσματική θεραπεία σε GPER θετικούς/ER+ BC<sup>230</sup>. Επίσης, η αλληλεπίδραση των οδών μεταγωγής σήματος PI3K και ER και η σημασία τους για την ανάπτυξη αντίστασης στην αντι-οιστρογονική θεραπεία έχει μελετηθεί και καταδειχθεί με πλήθος μελετών προτείνοντας ταυτόχρονα πως ο συνδυασμός ενός αναστολέα της PI3K με έναν καταστολέα της ERα είναι πιο αποτελεσματικός σε σύγκριση με την μονοθεραπεία<sup>231</sup>. Έτσι, η συνεχής ενεργοποίηση του μονοπατιού του FGFR οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα ERα και συνεπακόλουθη αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία. Αντιθέτως, η αναστολή των εν λόγω μονοπατιών επάγει την ευαισθητοποίηση στην ενδοκρινική θεραπεία<sup>231</sup>. Δύο ακόμη πρωτεΐνες με σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι της PI3K είναι οι mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) και mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 1)<sup>232</sup>. Μετά την αναστολή της mTORC1, το σύμπλεγμα του mTORC2 οδηγεί σε ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης της PI3K<sup>233</sup>.

Κλινικές μελέτες έχουν αξιολογήσει και επιβεβαιώσει τη σχέση της ενεργοποίησης της PI3K με την de novo ή την επαγόμενη ενδοκρινική αντίσταση. Από την άλλη πλευρά, αναστολείς του μονοπατιού της PI3K έχουν μελετηθεί συνδυαζόμενοι με

ενδοκρινική θεραπεία σε αρκετά μεγάλο αριθμό μελετών. Οι Baselga και συν. έχουν δείξει πως η θεραπεία με λετροζόλη σε συνδυασμό με τον αναστολέα του mTOR επιτυγχάνει βελτίωση των κλινικών ανταποκρίσεων ως νεοεπικουρική θεραπεία σε ασθενείς με ER+ ΚΜ<sup>234</sup>. Σε μία άλλη μελέτη φάσης III (BOLERO-2), ο συνδυασμός everolimus και εξεμεστάνης σε ασθενείς με προχωρημένο ή μεταστατικό ER+ ΚΜ αύξησε το PFS σε σύγκριση με την μονοθεραπεία με εξεμεστάνη<sup>235</sup>.

### ***Οι πρωτεΐνες PARP***

Οι PARPs (Poly (ADP-ribose) polymerase) είναι μία οικογένεια πυρηνικών πρωτεϊνών που διαδραματίζουν σημαίνοντα ρόλο στην αναγνώριση και στην επισκευή βλαβών του DNA<sup>236,237</sup>. Οι πρωτεΐνες PARP, όπως και οι BRCA1 και BRCA2, δρουν επισκευάζοντας το DNA και συνεπώς οι αναστολείς της PARP διαταράσσουν τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς, αυξάνοντας ταυτόχρονα τη γονιδιωματική αστάθεια<sup>238,239</sup>. Στην λειτουργία τους αυτή βασίζεται και το φαινόμενο του συνεργατικού κυτταρικού θανάτου (synthetic lethality) που προκαλείται από την αναστολή της PARP σε συνδυασμό με την παρουσία μεταλλάξεων των BRCA1/2 που οδηγούν στην αναστολή της επιδιόρθωσης του DNA με αποτέλεσμα τον θάνατο/απόπτωση του κυττάρου<sup>240,241</sup>.

Σε ασθενείς με ER+/HER-2-αρνητικό μεταστατικό ΚΜ και με γαμετικές μεταλλάξεις των γονιδίων *BRCA 1/2*, οι οποίοι έχουν λάβει ενδοκρινική θεραπεία, η χορήγηση του αναστολέα της PARP olaparib συνοδεύτηκε από όφελος συνολικής επιβίωσης στους ασθενείς που δεν είχαν λάβει προηγούμενη χημειοθεραπεία<sup>242</sup>. Ο δεύτερος εγκεκριμένος αναστολέας της PARP, talazoparib, στην μελέτη EMBRACA, έδειξε όφελος στο διάστημα ελεύθερο νόσου σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ΚΜ που έφεραν γαμετικές μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA 1/2*<sup>243</sup>.

### ***Το μονοπάτι των MAPK/ERK***

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού RAS/RAF/MEK1/2-ERK οδηγεί σε φωσφορυλίωση του ERα στη σερίνη 118, ευοδώνοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό<sup>244,245</sup>. Η οδός RAS/MAPK/ERK αυξάνει επίσης την ευαισθησία του ERα σε χαμηλές συγκεντρώσεις του E2, όπως για παράδειγμα μετά την μακροχρόνια ενδοκρινική θεραπεία, συντελώντας με αυτόν τον τρόπο στη αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία<sup>246</sup>. Κύτταρα KM, ανθεκτικά στην ταμοξιφαίνη, έχουν αυξημένα επίπεδα MAPK και ERα<sup>247</sup>. Οι McGlynn και συν. έχουν αποδείξει τη στενή σχέση μεταξύ αυξημένης έκφρασης της ενεργοποιημένης RAF-1, pRAF (ser338), MAPK και του αυξημένου κινδύνου υποτροπής μετά τη θεραπεία με ταμοξιφαίνη<sup>248</sup>. Επίσης, η ενεργοποίηση του ERα προκαλείται από τη φωσφορυλίωση από την MAPK<sup>249</sup>. Η αναστολή του μονοπατιού των MAPK/ERK οδηγεί σε υπερέκφραση του ERα και σε επακόλουθη επανευαισθητοποίηση<sup>250</sup>. Σε άλλη μελέτη έχει δειχθεί πως η αντίσταση στην ταμοξιφαίνη μεσολαβείται από την καταστολή του CDK10 (Cyclin Dependent Kinase 10) μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού MAPK/ERK1/2 με αποτέλεσμα την ανεξαρτησία της σηματοδότησης από τον ERα<sup>251</sup>.

Σημασία για την αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία έχει επίσης η μεταγραφική πρωτεΐνη NF1 (Neurofibromin 1), η οποία χαρακτηρίζεται από ογκοκατασταλτική δράση<sup>252</sup>. Η NF1, που είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού RAS, σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο KM<sup>253,254</sup>. Η απουσία έκφρασης του NF1 στην κυτταρική σειρά KM MDA-MB-231, η οποία χαρακτηρίζεται από επιθετικότητα και αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία, έχει σχετισθεί με αυξημένη ενεργότητα των MAPK και RAS<sup>255</sup>. Μεταλλάξεις στο NF1 έχουν ταυτοποιηθεί σε όλους του τύπους KM<sup>222,252,256</sup>. Επίσης, έχει δημοσιευθεί πως η αποσιώπηση του NF1 στην κυτταρική σειρά MCF7 οδηγεί σε αντίσταση στην ταμοξιφαίνη<sup>257</sup>. Πρόσφατα, έχει επίσης δειχθεί

πως μεταλλάξεις των γονιδίων NF1, HER2 και ERα που αποκτήθηκαν μετά την ενδοκρινική θεραπεία διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στην ανάπτυξη αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία <sup>258</sup>.

Δεδομένου του γεγονότος ότι το μονοπάτι RAS/RAF ενεργοποιείται τόσο από το HER2 (gain of function), όσο και από το NF1 (loss-of function), περαιτέρω ανάλυση των μεταβολών πριν και μετά από την ενδοκρινική θεραπεία ανέδειξε μεταλλάξεις στα γονίδια KRAS, HRAS, BRAF και MAP2K1 (MEK1). Ογκογόνες μεταλλάξεις ήταν παρούσες σε περισσότερα από ένα μόρια της οδού μεταγωγής σήματος RAS/RAF σε ασθενείς με HR+/HER2-αρνητική νόσο μετά την ενδοκρινική θεραπεία οι οποίοι δεν έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο ERα <sup>259</sup>. Επιπρόσθετα, η αναστολή του μονοπατιού RAS/RAF με τον αναστολέα της ERK SCH772984 έχει επιτύχει την επανευαισθητοποίηση της κυτταρικής σειράς MCF7 στην fulvestrant <sup>258</sup>. Η παρουσία σωματικών μεταλλάξεων που μεταβάλλουν το πλαίσιο ανάγνωσης της NF1 έχουν αρνητική επίδραση στην πρόγνωση των ασθενών <sup>260</sup>. Επίσης, μία πρόσφατη μελέτη έδειξε αυξημένο αριθμό μεταλλάξεων στο γονίδιο του *NF1* στον μεταστατικό διηθητικό λοβιακό ΚΜ, εμπλέκοντας τον NF1 στην αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία <sup>261</sup>. Συνεπώς, το μονοπάτι RAS/RAF σε συνδυασμό με τον NF1 εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση του ERα με τους RTKs, ενώ ταυτόχρονα σχετίζεται με την αντίσταση στη θεραπεία με ταμοξιφαίνη <sup>249</sup>.

### ***Η κινάση c-SRC***

Η πρωτεΐνη c-SRC έχει δράση τυροσινικής κινάσης και σχετίζεται με την εξέλιξη πολλών τύπων καρκίνου, μεταξύ των οποίων και τον ΚΜ <sup>262</sup>. Η SRC-1 λειτουργεί ως κύριος ρυθμιστής, συνδιαμορφώνοντας συμπλέγματα με τους AP1, NF-κB, p300/CBP καθώς και άλλους συνενεργοποιητές, για να ενεργοποιήσουν τους ER και PR <sup>263,264</sup>. Επίσης, η SRC-1 αλληλεπιδρά με τους παράγοντες NCOA3 (nuclear receptor

coactivator 3), ETS2 (ETS proto-oncogene 2, transcription factor) και TLX1 (T Cell Leukemia Homeobox 1), συνδέοντάς τους με τον KM και την αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία <sup>265,266</sup>. Η ενεργοποίηση και η αυξορρύθμιση της SRC έχει συνδεθεί με την επίκτητη αντίσταση στην ταμοξифαίνη σε ER+ κυτταρικές σειρές <sup>267</sup>. Επίσης, η SRC εμπλέκεται σε πολλά άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια συμπεριλαμβανομένων αυτών των ER και HER2/EGFR <sup>268</sup>. Πιθανότατα, τα αυξημένα επίπεδα των c-SRC οφείλονται σε υπερέκφραση αυξητικών παραγόντων <sup>269,270</sup>. Επιπλέον, η c-SRC εμπλέκεται σε πολλά ογκογόνα σηματοδοτικά μονοπάτια, μεταξύ των οποίων εκείνων που σχετίζονται με την αύξηση, τη διήθηση και την ανάπτυξη <sup>271,272</sup>.

Η αλληλεπίδραση ER και SRC είναι καλά τεκμηριωμένη και διευκολύνει το σχηματισμό συμπλόκων με μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων είναι οι PI3K, FAK, PELP και MNAR που οδηγούν στην ενεργοποίηση της pAKT και της pMAPK αποδεικνύοντας το ρόλο της c-SRC στην ενδοκρινική αντίσταση <sup>272-277</sup>. Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι οι υποδοχείς EGFR και IGF-1R σχηματίζουν σύμπλεγμα με τους ERα και SRC, υποστηρίζοντας την ενδοκρινική αντίσταση του KM <sup>278</sup>. Επιπλέον, η c-SRC φωσφορυλιώνει τον ER και ρυθμίζει την εντόπιση του ER <sup>279,280</sup>. Η θεραπεία με ταμοξифαίνη έχει δείξει πως αυξάνει την ενεργότητα της c-SRC με αποτέλεσμα την προαγωγή της διήθησης και της κινητικότητας του KM <sup>267</sup>. Επιπλέον, δεδομένου ότι η c-SRC είναι σημαντική για την ανάπτυξη της αντίστασης στην ταμοξифαίνη, η αναστολή της δύναται να αντιστρέψει την εν λόγω αντίσταση <sup>281</sup>.

### ***Οι μεταγραφικοί παράγοντες STATs***

Τα μέλη της οικογένειας STAT (STAT1-4, STAT5a, STAT5b και STAT6) αντιπροσωπεύουν μία οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την επιβίωση και την απόπτωση.



Όλα τα μέλη της οικογένειας έχειδειχθεί ότι εκφράζονται σε κυτταρικές σειρές ΚΜ, αλλά μόνο οι STATs 1, 3, 5a και 5b έχουν επιβεβαιωμένη έκφραση σε ιστούς ασθενών με ΚΜ<sup>282,283</sup>. Επιπλέον, έχειδειχθεί πως τα μονοπάτια των STAT3 και STAT5 έχουν σημασία για την ενδοκρινική αντίσταση. Η ενεργοποίηση των μονοπατιών των STAT3 και STAT5 είναι καθοδικά των EGFR και c-SRC, τα οποία υπερεκφράζονται σε ανθεκτικούς στην ταμοξιφαίνη ασθενείς. Η SRC-1 επίσης αλληλεπιδρά με τις STAT1, STAT3, STAT5 και STAT6. Οι STAT3 και STAT5 θεωρούνται ογκοπροαγωγοί μεταγραφικοί παράγοντες, ενώ η STAT1 είναι ένας ογκοκατασταλτικός παράγοντας<sup>263,284-286</sup>. Έχειδειχθεί ότι η θεραπεία με ταμοξιφαίνη ER+ καρκινικών κυττάρων μαστού, οδηγεί σε μειωμένη φωσφορυλίωση του STAT3, υπογραμμίζοντας την σχέση μεταξύ της ευαισθησίας στην ταμοξιφαίνη και της μειωμένης ενεργότητας της STAT3<sup>287</sup>. Οι Yamashita και συν. έχουνδείξει ότι ο STAT5 είναι ένας ισχυρός προγνωστικός δείκτης για τον ER+ ΚΜ, με τους ασθενείς με STAT5 θετική νόσο να έχουν καλύτερη επιβίωση και αυξημένη πιθανότητα απάντησης στην ενδοκρινική θεραπεία<sup>288</sup>. Πρόσφατα, αυξημένη σηματοδότηση από τον STAT1 επίσης σχετίστηκε με την ενδοκρινική αντίσταση προτείνοντας την στόχευση του STAT1 ως πιθανή μελλοντική επιλογή<sup>289,290</sup>.

### ***Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ***

Ο NF-κΒ είναι μία οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων στην οποία συμπεριλαμβάνονται 5 μέλη (RelA/p65, RelB, cRel, NF-κΒ1/p50, and NF-κΒ2/p52), που παίζουν κομβικό ρόλο στην κυτταρική ομοιόσταση<sup>291</sup>. Η ενεργοποίηση του NF-κΒ στα προγονικά καρκινικά κύτταρα διαμορφώνει ένα μικροπεριβάλλον κατάλληλο για την επιβίωση των προγονικών κυττάρων, όπως επίσης, διευκολύνει την διηθητικότητα και το μεταστατικό δυναμικό. Προς αυτή την κατεύθυνση έχει βρεθεί πως ο NF-κΒ και ο CXCR4 (C-X-C Motif Chemokine Receptor 4) συντηρούν τα

ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των προγονικών κυττάρων («stemness») και συνάμα προάγουν την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων <sup>292</sup>. Αυξημένη έκφραση των p50/NF-κB1, p52/NF-κB2 και c-Rel έχει διαπιστωθεί στους όγκους του μαστού σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς <sup>293</sup>. Επίσης, η ενεργοποίηση του NF-κB έχει επίσης διαπιστωθεί στα ορμονοανθεκτικά κύτταρα του ΚΜ, όπως επίσης και η υπερέκφραση της RelA/p65 <sup>294</sup>. Μία άλλη μελέτη έχει δείξει πως η αναστολή του NF-κB με τη χρήση της parthenolide οδήγησε σε επανευαισθητοποίηση των ανθεκτικών MCF7 κυττάρων στην ταμοξιφαίνη <sup>295</sup>.

Διάδοροι φλεγμονώδεις παράγοντες οδηγούν στη ενδοκρινική αντίσταση μέσω της δράσης κινασών που ρυθμίζουν τον ERα άμεσα ή μέσω συμπλεγμάτων του ERα με την RelA/p65, τα οποία προσδένονται σε αλληλουχίες ERE στους ενισχυτές, με αποτέλεσμα είτε την αύξηση είτε την μείωση των αντίστοιχων γονιδίων <sup>296</sup>. Επιπρόσθετα, ο NF-κB έχει συνδεθεί και με την αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία <sup>297</sup>. Οι Gionet και συν. έχουν δείξει πως ο NF-κB1/p50 προσδένεται με τον ERα σε ERE, ωστόσο, αναστέλλοντας τον NF-κB αυξάνει η έκφραση των γονιδίων που εξαρτώνται από την E2 <sup>298</sup>.

Άλλη μελέτη έχει δείξει πως NF-κB επάγει την πρόοδο του καρκίνου ενεργοποιώντας τις IL-6 και IL-8 <sup>299,300</sup>. Έχει επίσης δημοσιευθεί πως ο FOXA1 (Forkhead Box A1) οδηγεί σε μειορρύθμιση της IL6 επηρεάζοντας την πρόσδεση του NF-κB στον υποκινητή της IL-6. Επίσης, μειωμένη έκφραση του FOXA1 επάγει τα «stemnes» χαρακτηριστικά στα ανθεκτικά στην ταμοξιφαίνη κύτταρα μέσω της επιλεκτικής πρόσδεσης του NF-κB στον υποκινητή της IL-6 και στην αύξηση της έκφρασης της IL-6 <sup>301</sup>.

### ***Η κινάση LMTK3***

Η LMTK3 (Lemur tyrosine kinase 3) είναι μία πρωτεϊνική κινάση σερίνης-θρεονίνης-τυροσίνης, η οποία έχει εμπλακεί σε πολλούς τύπους καρκίνου. Η υπερέκφραση και οι πολυμορφισμοί του συγκεκριμένου γονιδίου έχει βρεθεί πως μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κατάλληλους βιοδείκτες για την πρόοδο του καρκίνου<sup>302,303</sup>. Η LMTK3 εκφράζεται τόσο σε ER+ όσο και ER- ΚΜ, ενώ έχει βρεθεί πως έχει και ρυθμιστικό ρόλο στον ERα<sup>304</sup>. Επίσης, έχει επιβεβαιωθεί πως η LMTK3 διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην ενδοκρινική αντίσταση στον ΚΜ<sup>305</sup>.

### **3.8 Παράγοντας επαγόμενος από την υποξία (HIF)**

Η ενδοογκική μερική πίεση οξυγόνου (O<sub>2</sub>) είναι ένας σημαντικός δείκτης για την ανάπτυξη μεταστάσεων<sup>306</sup>. Στον ΚΜ, η υποξία προκαλείται από την ανεπαρκή επίπεδα οξυγόνου λόγω της απόστασης από τα τροφοφόρα αγγεία, επάγοντας τον κύριο παράγοντα που σχετίζεται με την υποξία που καλείται HIF (hypoxia-inducible factors). Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων HIF περιλαμβάνει 3 μέλη, τους HIF1, HIF2 και HIF3, κάθενα εκ των οποίων απαρτίζεται από μία οξυγονο-εξαρτώμενη α υποομάδα και μία μόνιμα εκφραζόμενη β υπομονάδα<sup>307</sup>.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει πως οι HIF1α και ERα μοιράζονται πολλά κοινά γονίδια στόχους καθώς επίσης πως το γονίδιο HIF1α ρυθμίζεται από τον ERα<sup>308</sup>. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός πως αυξημένα επίπεδα του HIF1α έχουν συνδεθεί με την αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία σε ER+ καρκινικά κύτταρα<sup>308</sup>. Ένα από τα κοινά γονίδια στόχοι, τόσο του ERα, όσο και του HIF1α, είναι αυτό της πρωτεΐνης KDM4B (Lysine Demethylase 4B), η οποία είναι μία απομεθυλάση των H3K9me<sub>3</sub>/me<sub>2</sub>, H3K36me<sub>2</sub>/me<sub>3</sub> και H1.4K26me<sub>2</sub>/me<sub>3</sub> ιστονών<sup>308</sup>. Έχει δειχθεί ότι οι KDM4A και KDM4B συναδιαμορφώνουν ένα σύμπλεγμα με τον ERα ρυθμίζοντας την

έκφραση των γονιδίων στόχων<sup>309</sup>. Η KDM4C, ένα ακόμη μέλος της οικογένειας των απομεθυλασών των ιστονών KDM4, προάγει τον πολλαπλασιασμό, όπως επίσης και τη μετάσταση του ΚΜ, δρώντας ως μεταγραφικός ενεργοποιητής του<sup>310</sup>. Επίσης, ο HIF1a προάγει την αγγειογένεση, τροποποιώντας την έκφραση του γονιδίου στόχου VEGF, με αποτέλεσμα την προώθηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την μετάσταση του ΚΜ. Η υποξία είναι ο κύριος ρυθμιστής της έκφρασης του VEGF καθώς είναι μεταγραφικός στόχος τόσο του HIF1a, όσο και του HIF2a<sup>311</sup>. Επιπλέον, δεδομένα από προκλινικές και κλινικές μελέτες εμπλέκουν τον HIF1a στην αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία. Οι Jia και συν. έχουν δείξει πως η επαγωγή της έκφρασης του HIF1a στην κυτταρική σειρά MCF7 οδηγεί στην ανάπτυξη αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία, η δε στόχευσή του επαναφέρει την ευαισθησία στην ενδοκρινική θεραπεία<sup>312</sup>. Ομοίως, οι Yang και συν. έδειξαν πως η διαμόλυνση καρκινικών κυττάρων ERα+ ΚΜ με HIF1a αυξάνει την αντίσταση στην ταμοξιφαίνη και την fulvestrant<sup>308</sup>.

### **3.9 Αρχέγονα καρκινικά κύτταρα (stem cells)**

Οι όγκοι προέρχονται από τα αρχέγονα καρκινικά κύτταρα, τα οποία είναι εκείνα που καθορίζουν και την ικανότητα του καρκίνου να πολλαπλασιάζεται και να μεθίστανται. Επίσης, τα κύτταρα αυτά είναι υπεύθυνα για τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του καρκίνου, όπως είναι η αυτοανανέωση, ο πολλαπλασιασμός, η εξέλιξη, η μετανάστευση και η μετάσταση. Επίσης, έχουν συσχετισθεί με κακή πρόγνωση και αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία.

Μία πρόσφατη μελέτη αναγνώρισε τον FOXA1 ως έναν κυρίαρχο παράγοντα για τη λειτουργία του ERα στον ΚΜ<sup>313-315</sup>. Η επαγωγή του FOXA1 προκαλεί έναν καταρράκτη γεγονότων, με κυρίαρχο την επαγωγή της IL-8 από τον FOXA1 που εκφράζουν οι ER+ όγκοι, που οδηγούν στην αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία<sup>315</sup>. Σε μία άλλη μελέτη, αναγνωρίστηκε ο FOXM1 (Forkhead Box M1) στα ανθεκτικά στην ενδοκρινική θεραπεία κύτταρα να προσδένεται ισχυρά στο DNA του ERα, συμβάλλοντας στην ενδοκρινική αντίσταση<sup>316</sup>. Επιπλέον, ο RUNX1 (RUNX Family

Transcription Factor 1) έχει αναγνωρισθεί ως ένας καταστολέας της «stemness» του ΚΜ, καταστέλλοντας την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα ZEB1 (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1) <sup>317</sup>. Ο RUNX2 είναι ένας ακόμη παράγοντας που σχετίζεται με την «stemness» του ΚΜ, ενώ ταυτόχρονα φαίνεται πως αλληλεπιδρά στενά με τον ERα, μεσολαβώντας την επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή και συμμετέχοντας στην αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία <sup>316</sup>. Επίσης, σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των βλαστικών καρκινικών κυττάρων έχουν ο παράγοντας NOTCH και η σηματοδότηση του Hedgehog (Hh).

### **Οι υποδοχείς NOTCH**

Οι 4 διαμεμβρανικοί υποδοχείς NOTCH (NOTCH 1–4), αλληλεπιδρούν με πολλαπλούς συνδέτες (Delta-like 1, Delta-like 3, Delta-like 4, Jagged 1 και Jagged 2), με αποτέλεσμα την αποκοπή της ενδοκυττάριας περιοχής από τη γ-σεκρετάση. Η ενδοκυττάρια περιοχή μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου προσδένεται με ενεργοποιητές προκειμένου να ρυθμίσει τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων, παίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία <sup>318</sup>.

Η σηματοδότηση του NOTCH έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του ανθρώπινου μαστού και στη ρύθμιση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, όπως επίσης και στο *in situ* και στο διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μαστού <sup>319,320</sup>. Μία άλλη μελέτη διερεύνησε το ρόλο του NOTCH1 στην αναστολή της εξέλιξης του όγκου στον ΚΜ, όπου η αναστολή του NOTCH1 είχε ως αποτέλεσμα την υποστροφή του όγκου και μείωση της πιθανότητας υποτροπής σε ποσοστό περίπου 67% των όγκων που μελετήθηκαν <sup>321</sup>. Πρόσφατα, έχει δειχθεί ότι το μονοπάτι NOTCH είναι υπερενεργοποιημένο στα ανθεκτικά κύτταρα ΚΜ <sup>322</sup>. Προηγουμένως, είχε δειχθεί ότι η E2 αναστέλλει την ενεργότητα του NOTCH επηρεάζοντας την κυτταρική εντόπιση του υποδοχέα NOTCH και ότι η ταμοξιφαίνη και η ραλοξιφαίνη αναστέλλει αυτή τη δράση, ενεργοποιώντας έτσι το μονοπάτι NOTCH. Η αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού NOTCH με αναστολείς γ-σεκρετάσης ήταν πιο αποτελεσματική όταν χρησιμοποιήθηκε ταμοξιφαίνη <sup>323</sup>. Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι το Nicastrin, μία απαραίτητη υπομονάδα της γ-σεκρετάσης, και ο NOTCH4 είναι μόρια κλειδιά που εμπλέκονται στην αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία και ότι ο καταστολέας της γ-σεκρετάσης PF03084014 και τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του Nicastrin μπορούν πιθανώς να αντιστρέψουν και να επανευαισθητοποιήσουν τα κύτταρα καρκίνου μαστού που είναι ανθεκτικά στην ενδοκρινική θεραπεία <sup>324</sup>.

Με τα STAT3 και STAT5 να είναι συνεχώς ενεργοποιημένα στους καρκίνους, έχουν βρεθεί επίσης ότι το ένα αντιτάσσεται τις φυσιολογικές δράσεις του άλλου με διαφορετικά αποτελέσματα <sup>325,326</sup>. Τον σημαντικό ρόλο της ενεργοποίησης του μονοπατιού STAT3 από το NOTCH στην αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία επιβεβαιώθηκε σε ένα μοντέλο MCF7 κυττάρων ανθεκτικών στην ενδοκρινική θεραπεία (TAMR-MCF7 κύτταρα), όπου παρατηρήθηκε συνεχής ενεργοποίηση του STAT3 και η αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του NOTCH από έναν αναστολέα NOTCH, το DAPT, οδήγησε σε ακόλουθη μείωση των επιπέδων ενεργοποιημένου STAT3 <sup>327</sup>.

### **Σηματοδότηση Hedgehog (Hh)**

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog (Hh) έχει μελετηθεί εκτενώς στο παρελθόν, ως ένα απαραίτητο μονοπάτι για την έναρξη, την εξέλιξη και τη μετάσταση των καρκίνων, αν και πιο πρόσφατα, το μονοπάτι αυτό έχει μπει στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος λόγω του ρόλου του στα βλαστικών κυττάρων του καρκίνου μαστού <sup>328</sup>. Το μονοπάτι αυτό είναι κυρίως ενεργοποιημένο σε όγκους ανθεκτικούς στην ταμοξιφαίνη και ενεργοποιείται από το μονοπάτι PI3K/AKT <sup>329</sup>. Μία πρόσφατη μελέτη προτείνει τη συνδυασμένη θεραπεία στόχευσης του μονοπατιού PI3K/AKT και του μονοπατιού Hh για την αντιμετώπιση του ανθεκτικού στην ενδοκρινική θεραπεία καρκίνου μαστού <sup>330</sup>. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog ρυθμίζεται από τον υποδοχέα E2 related receptor b και επηρεάζει τους στόχους που βρίσκονται καθοδικά <sup>331</sup>.

### **3.10 Οξειδωτικό stress**

Το οξειδωτικό stress προκαλείται από την ανισορροπία στο ισοζύγιο των ενεργών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) προς τις αντιοξειδωτικές ουσίες του κυττάρου. Ο ρόλος του οξειδωτικού stress στην ενδοκρινική θεραπεία είναι πολύ λίγο κατανοητός και μελετημένος, ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις που υποστηρίζουν μία τέτοια σχέση.

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία εντοπίζονται σε κάθε κύτταρο, μεταβολίζονται σε μαλονδιαλδεϋδη (MDA) από τις ROS, ενώ τα νουκλεϊκά οξέα (DNA) που στοχεύονται από τις ROS μεταβολίζονται σε 8-οξο-7, 8-διϋδρο-2'-

δεοξυγουανοσίνη (8-oxodG) <sup>332,333</sup>. Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε την πιθανότητα χρήσης διαφορετικών συγκεντρώσεων της 8-oxodG των ούρων ως δείκτη για τον πρώιμο ΚΜ <sup>334</sup>, ενώ άλλοι ερευνητές τεκμηρίωσαν τη σχέση των επιπέδων 8-oxodG του ορού με το πορογενές ΚΜ <sup>335</sup>.

Νεώτερα δεδομένα υποστηρίζουν επίσης τη σχέση της E2 με την παραγωγή των ROS. Οι Fan και συν. απέδειξαν ότι η E2 οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής των ROS και αυξορρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στο οξειδωτικό stress όπως π.χ. η HMOX1 (hemeoxygenase 1). Παρατηρήθηκε επίσης από την ίδια ομάδα πως η φωσφορυλιωμένη c-SRC σχετίζεται με το οξειδωτικό stress που επάγεται από την E2 <sup>336</sup>.

Στον luminal B ΚΜ έχει επίσης διαπιστωθεί πως η απώλεια των πρωτεϊνών sirtuin, και συγκεκριμένα της SIRT3, προάγει ογκογόνους φαινοτύπους λόγω άτυπης ρύθμισης της ακετυλίωσης των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την έκθεση των κυττάρων στο οξειδωτικό stress. Επιπλέον, η απώλεια της SIRT3 σχετίστηκε με την ανάπτυξη αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία στον ίδιο υπότυπο ΚΜ, συνδέοντας έτσι το οξειδωτικό stress με την αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία <sup>337</sup>.

Λιγιστά δεδομένα υποστηρίζουν επίσης και την άμεση σχέση της ενδοκρινικής θεραπείας με το οξειδωτικό stress. Πιο συγκεκριμένα, η ταμοξιφαίνη έχει δείχθει πως συσσωρεύεται στους όγκους και οδηγεί στην αύξηση του οξειδωτικού stress. Αυτή η δράση οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης NRF2 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor-2), η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί το αντιοξειδωτικό στοιχείο απόκρισης (anti-oxidant response element, ARE). Έχει προταθεί πως τόσο τα επίπεδα NRF2, όσο και αυτά του ARE θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε ασθενείς με ΚΜ που λαμβάνουν ταμοξιφαίνη ως βιοδείκτες του οξειδωτικού stress, όπως επίσης ως δείκτες της αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία <sup>338</sup>.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### 4. Επιγενετική και αντίσταση στην ορμονοθεραπεία

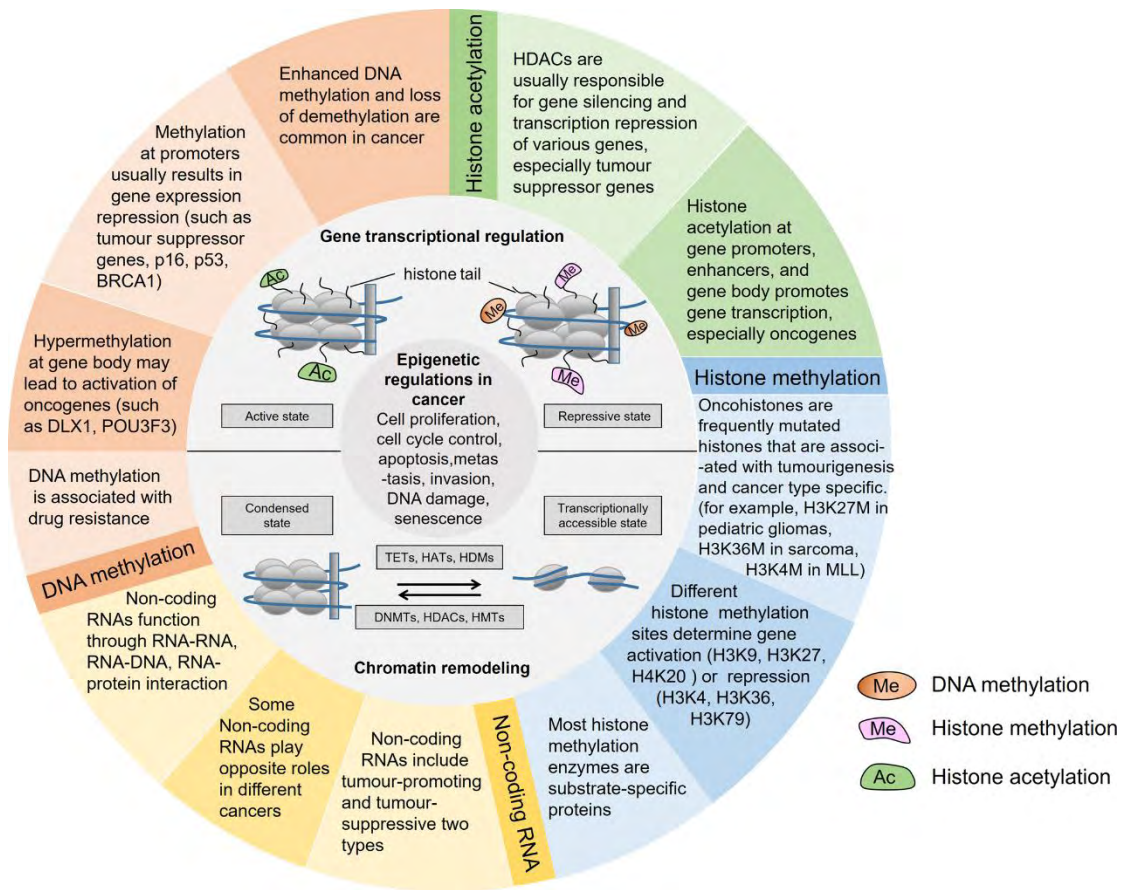
#### 4.1 Εισαγωγή στην επιγενετική του καρκίνου του μαστού

Παράλληλα με την γονιδιωματική εξέλιξη του καρκίνου, διάφοροι επιγενετικοί μηχανισμοί αυξάνουν επίσης την κυτταρική ετερογένεια του καρκίνου, πολλαπλασιάζοντας ταυτόχρονα την πιθανότητα της ύπαρξης κλώνων που έχουν αναπτύξει αντίσταση στη θεραπεία. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και εξέλιξης του καρκίνου αποτελούν ένα ευρύ και σύνθετο πεδίο διαδικασιών που περιγράφονται με τον όρο επιγενετικός επαναπρογραμματισμός (epigenetic reprogramming)<sup>339</sup>.

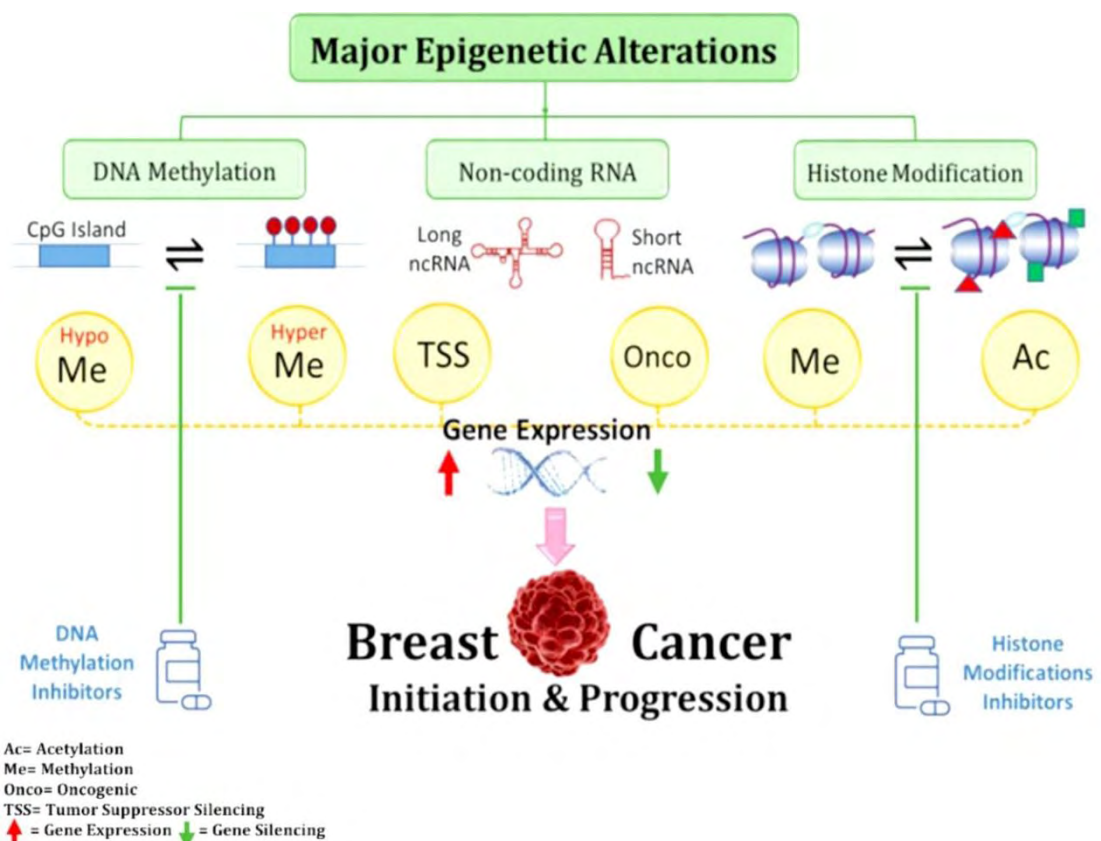
Οι αλλαγές των επιγενετικών χαρακτηριστικών ρυθμίζουν και επηρεάζουν πολλές κυτταρικές λειτουργίες, μεταξύ των οποίων ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η διήθηση και η γήρανση (Εικόνα 11). Ο σημαντικός ρόλος των επιγενετικών αλλαγών στον καρκίνο επιτυγχάνεται μέσω μεθυλίωσης του DNA και τροποποιήσεων των ιστονών, αλλαγές που αμφότερες οδηγούν σε αναδιαμόρφωση (remodeling) της χρωματίνης, όπως επίσης και μέσω των δράσεων των μη κωδικών μορίων RNA (non coding RNA- ncRNAs). Οι αντιστρεπτές αυτές μεταβολές στην γονιδιακή έκφραση ευοδώνονται από τη λειτουργία ενζύμων και σχετικών πρωτεϊνών. Στην ομάδα αυτή συγκαταλέγονται οι DNA μεθυλοτρασφεράσες (DNA methyltransferases-DNMTs), οι πρωτεΐνες TET (ten-eleven translocation enzymes), οι ακετυλάσες των ιστονών (histone acetylases-HATs), οι αποκετυλάσες των ιστονών (histone deacetylases-HDACs), οι μεθυλοτρασφεράσες των ιστονών (histone methyltransferases-HMTs), οι απομεθυλάσες των ιστονών (histone-demethylating enzymes-HDMs) καθώς και άλλες

340





Εικόνα 11. Επιγενετικές αλλαγές στον καρκίνο. MLL, biphenotypic (mixed lineage) leukemia. Από <sup>340</sup>



**Εικόνα 12.** Οι τρεις κύριες κατηγορίες επιγενετικών αλλαγών στον καρκίνο του μαστού που προάγουν την καρκινογένεση και την ανάπτυξη του όγκου. Οι τροποποιήσεις στη μεθυλίωση του DNA, των ιστονών και τα μη κωδικά μόρια RNA επηρεάζουν τη λειτουργία των ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Τροποποιημένο από <sup>341</sup>.

Διάφοροι επιγενετικοί μηχανισμοί έχουν περιγραφεί και μελετηθεί, οι οποίοι εμπλέκονται στην έναρξη και εξέλιξη του ΚΜ (Εικόνα 12). Στα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης λαμβάνουν χώρα αλλαγές τόσο στη δομή της χρωματίνης μέσω χημικών μεταβολών του μορίου του DNA (methyl CpG, 5-hydroxymethylcytosine, 5hmC), όπως επίσης, και μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών που συνδέονται με το DNA και καλούνται ιστόνες <sup>342</sup>.

Οι αλλαγές αυτές τροποποιούν την κυτταρική πλαστικότητα και ευνοούν τον ογκογόνο επαναπρογραμματισμό των πρόδρομων κυττάρων του καρκίνου, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της αυτοανανεωτικής τους ιδιότητας. Σε μεταγενέστερα στάδια της ανάπτυξης του καρκίνου, επιπρόσθετες επιγενετικές αλλαγές σε συνδυασμό με μεταλλάξεις και τα σήματα του μικροπεριβάλλοντος τροποποιούν τον φαινότυπο του καρκινικού κυττάρου μεταβάλλοντας συνάμα και το μεταστατικό δυναμικό του όγκου <sup>343–346</sup>.

Τα τελευταία χρόνια, εκτός των κλασικών επιγενετικών αλλαγών, ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών έχουν αναδείξει τον τροποποιητικό επιγενετικό ρόλο των μη κωδικών μορίων RNA (non-coding RNAs-ncRNAs), ιδιαίτερα των μικρών μη κωδικών μορίων RNA (miRNAs, microRNAs) και των μακρών μη κωδικών μορίων RNA (long non-coding RNAs- lncRNAs) <sup>347</sup>. Όπως συμβαίνει και με τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, τα ncRNAs επιδέχονται ρύθμιση σε μεταγραφικό επίπεδο, ωστόσο, έχουν την χαρακτηριστική ιδιότητα να ρυθμίζουν με τη σειρά τους την γονιδιακή έκφραση των μορίων στόχων. Το γεγονός αυτό επιτρέπει στα ncRNAs να

ρυθμίζουν ταυτόχρονα τη λειτουργία πολλών γονιδίων, η δε απορρυθμισή τους έχει δειχθεί πως επηρεάζει κάθε «ορόσημο» του καρκίνου από τη διαδικασία καρκινογένεσης μέχρι την διήθηση και την μετάσταση σε απομακρυσμένα όργανα <sup>348</sup>.

#### 4.1.1 Μεθυλίωση του DNA

Στους ευκαρυώτες, η μεθυλίωση του DNA πραγματοποιείται κυρίως στις κυτοσίνες που βρίσκονται σε δινουκλεοτίδια κυτοσίνης-γουανίνης (cytosine-phosphate-guanine-CpG) με την προσθήκη μίας μεθυλομάδας (CH<sub>3</sub>) στον 5<sup>ο</sup> άνθρακα του πυριμιδινικού δακτυλίου της κυτοσίνης. Αυτή η αλλαγή έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό της 5-μεθυλοκυτοσίνης (5-methylcytosine/5-me-C) <sup>349</sup>. Η αντίδραση καταλύεται από μία οικογένεια ενζύμων που λέγονται DNA-μεθυλοτρανσφεράσες (DNA methyltransferases, DNMTs), οι οποίες μεσολαβούν τη μεταφορά μίας μεθυλομάδας από μία ένωση, όπως η S-αδενοσυλμεθειονίνη, η οποία λειτουργεί σαν δότης <sup>350</sup>.

Μέχρι τώρα 5 διαφορετικές DNMTs (DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B και DNMT3L) έχουν περιγραφεί <sup>351</sup>. Εξ αυτών, μόνο η DNMT1 διατηρεί το ημιμεθυλωμένο πρότυπο του DNA κατά την αντιγραφή του και συνεπώς η δράση της είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του προτύπου μεθυλίωσης από το πατρικό μόριο DNA στο θυγατρικό. Αντιθέτως, οι DNMT3A και B είναι γνωστές ως de novo μεθυλοτρανσφεράσες και μεθυλιώνουν μόρια μη μεθυλωμένου DNA <sup>352</sup>. Από την άλλη, η DNMT2 είναι μία RNA μεθυλοτρανσφεράση, η οποία μεθυλιώνει πολλά μόρια tRNAs <sup>353</sup>. Σε αντίθεση με όλες τις άλλες DNMTs, η DNMT3L στερείται καταλυτικής περιοχής, μπορεί όμως να αλληλεπιδρούν με τις DNMT3A και DNMT3B για να βελτιώσουν την καταλυτική δραστηριότητα των τελευταίων και να αυξήσουν την de novo μεθυλίωση <sup>354</sup>. Στα θηλαστικά, η μεθυλίωση του DNA κυρίως επιτελείται από τις

DNMT1, DNMT3A και DNMT3B, οι οποίες και εντοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου <sup>351</sup>.

Η μεθυλίωση του DNA τυπικά συμβαίνει σχεδόν αποκλειστικά στις κυτοσίνες των δινουκλεοτιδίων CpG, τα δε περισσότερα εξ αυτών (>70%) είναι τυπικά μεθυλιωμένα <sup>355</sup>. Μεγάλη σημασία για τη μεθυλίωση του DNA έχουν περιοχές που είναι πλούσιες σε επαναλήψεις CG και οι οποίες καλούνται ως «νησίδες CpG». Περίπου το 70% των υποκινητών των γονιδίων περιέχει νησίδες CpG, η μεθυλίωση των οποίων έχει σχετισθεί με την μεταγραφική ενεργότητα των γονιδίων <sup>356</sup>. Η πλειοψηφία των «νησίδων CpG» στους υποκινητές των γονιδίων είναι μη μεθυλιωμένες σε φυσιολογικούς ιστούς. Αντίθετως, στον καρκίνο κάποια γονίδια, όπως π.χ. τα ογκοκατασταλτικά, μπορεί να υποστούν μεθυλίωση με αποτέλεσμα την μεταγραφική τους αποσιώπηση <sup>357</sup>.

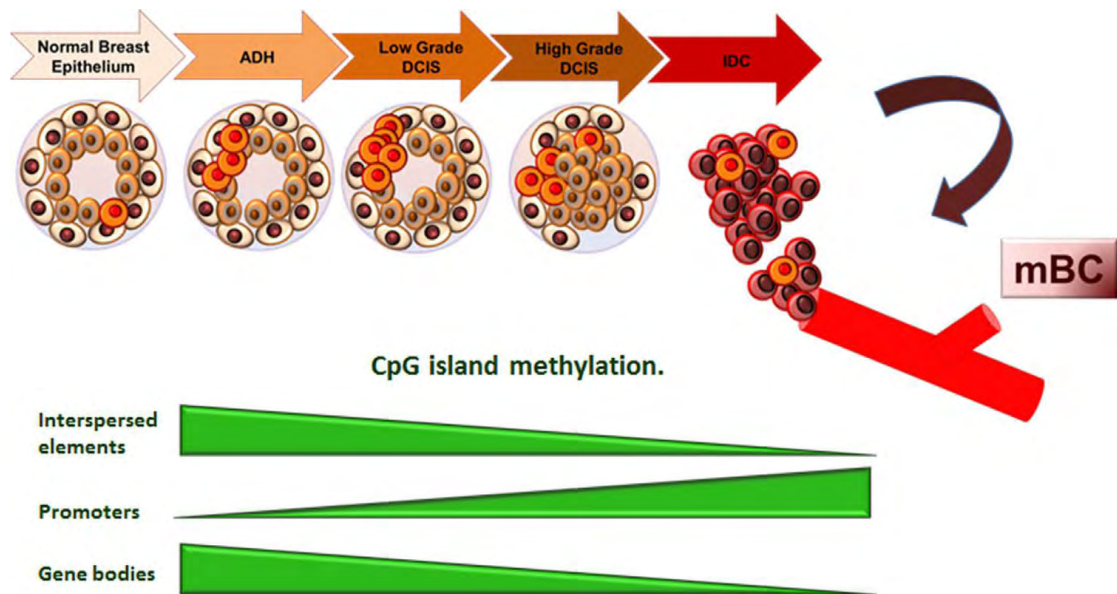
Πιο συγκεκριμένα, στον ΚΜ, η υπερμεθυλίωση σε υποκινητές έχει περιγραφεί σε περισσότερα από 100 γονίδια <sup>358</sup>. Πολλά από τα γονίδια αυτά είναι σημαντικά για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (π.χ. *CCND2*, *CDKN2A*), την επιδιόρθωση του DNA (π.χ. *BRCA1*, *GSTP1*), την απόπτωση (π.χ. *BCL2*, *DAPK*), τη διήθηση και τη μετάσταση (π.χ. *RASSF1A*, *RARβ*, *TWIST*, *HIN1*), τη ρύθμιση της μεταγραφής (π.χ. *HOXA5*), την προσκόλληση (π.χ. *CDH1*) και την ορμονοεξαρτώμενη σηματοδότηση (*ERα*, *ERβ* και *THRβ*). Αντίθετα, αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό του ΚΜ η υπομεθυλίωση σε όλο το εύρος του γονιδιώματος, συχνά δε απαντάται σε περιοχές τμηματικών διπλασιασμών <sup>359</sup>. Επιπλέον, η παρουσία υπομεθυλιωμένων γονιδίων σε πρωτοπαθείς ΚΜ έχει επιβεβαιωθεί με πλήθος μελετών, μεταξύ δε των γονιδίων συμπεριλαμβάνονται τα *IL10* <sup>360</sup>, *MDR1* <sup>361</sup>, *FEN1* <sup>362</sup>, *NAT1* <sup>363</sup>, *CDH3* <sup>364</sup>, *urokinase* <sup>365</sup>, *synuclein* <sup>366</sup>, *JAGGED1* και *NOTCH1* <sup>367</sup>.

Με βάση την τρέχουσα αντίληψη, ο επιγενετικός επαναπρογραμματισμός στον ΚΜ αντιπροσωπεύει ένα θεμελιώδες βήμα στην διαδικασία της καρκινογένεσης και της κλωνικής εξέλιξης του όγκου, τροφοδοτώντας συνάμα την ετερογένεια της νόσου (Εικόνα 13)<sup>368</sup>. Χρησιμοποιώντας τεχνολογίες μικροσυστοιχιών για την μελέτη των υποκινητών σε όλο το γονιδίωμα, οι Helou και συν. αξιολόγησαν την μεθυλίωση του DNA σε ALDEFLUOR-θετικά βλαστικά κύτταρα ΚΜ (breast cancer stem cells-bCSCs) και σε μη bCSCs, βρίσκοντας ότι τα bCSCs έχουν ένα ξεχωριστό πρότυπο μεθυλίωσης του DNA με την οδό σηματοδότησης του TGFβ (Transforming Growth Factor Beta) να είναι ένας κομβικός ρυθμιστής της διαφοροποίησής τους<sup>369</sup>. Ενδιαφέρουσα είναι επίσης η παρατήρηση από την ανάλυση λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος ασθενών με ΚΜ και υγιών δοτών, σύμφωνα με την οποία το πρότυπο μεθυλίωσης του DNA στις CpG νησίδες λειτουργικών υποκινητών σε όλο το επιγονιδίωμα σχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΜ, ενώ η μεθυλίωση του DNA εκτός των υποκινητών σχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΜ, υποδηλώνοντας πως συγκεκριμένα επιγενετικά χαρακτηριστικά εμπλέκονται στην ανάπτυξη του ΚΜ<sup>370</sup>.

Αποτελέσματα μελετών σε μεμονωμένα γονίδια υποστηρίζουν επίσης το σημαντικό ρόλο των επιγενετικών αλλαγών στον ΚΜ. Πιο συγκεκριμένα, οι Hoque και συν., εξετάζοντας 9 γονίδια σε ταυτόχρονες προ-διηθητικές αλλοιώσεις, διηθητικούς πορογενείς ΚΜ (IDC) και φυσιολογικούς μαζικούς αδένες, απέδειξαν αλλαγή των προτύπων μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων *APC* (*Adenomatosis Polyposis Coli*), *CDH1* (*E-Cadherin 1*) και *CTNNB1* (*Catenin Beta 1*) στις παθολογικές αλλοιώσεις σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς<sup>371</sup>. Σε άλλη μελέτη, η ανάλυση των *RARβ2* (*retinoic acid receptor β2*), *RASSF1A* (*Ras Association Domain Family Member 1*), *MINT17* (*Methylated-IN-Tumour 17*) και *MINT13* (*Methylated-IN-Tumour*

13) στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του ΚΜ, έδειξε πως η υπερμεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων *RARβ2* και *RASSF1A* αποτελεί ένα πρώιμο επιγενετικό γεγονός στον ΚΜ που αντικατοπτρίζει και το κακόηθες δυναμικό τους<sup>372</sup>. Επίσης, οι van Hoesel και συν. έδειξαν πως το γονίδιο *LINE1* (*long interspersed nucleotide element-1*) είναι υπερμεθυλιωμένο στους καλοήθεις όγκους, αλλά καθίσταται υπομεθυλιωμένο στο DCIS και στα διηθητικά καρκινώματα<sup>373</sup>.

Περισσότερα δεδομένα σχετικά με το ρόλο των επιγενετικών αλλαγών στην ανάπτυξη του ΚΜ προέκυψαν πρόσφατα από την μελέτη των Teschendorff και συν., σύμφωνα με την οποία οι αλλαγές των προτύπων μεθυλίωσης αφορά συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια μεταξύ των οποίων το μονοπάτι WNT, που σχετίζεται με τη διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων, όπως επίσης και το μονοπάτι του FGF. Στην ίδια μελέτη δείχθηκε πως οι επιγενετικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης επηρεάζουν κυρίως περιοχές πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στη διατήρηση της δομής της χρωματίνης, όπως είναι οι EZH (Enhancer of zeste homolog 2), SUZ12 (Polycomb protein SUZ12), RBBP5 (Retinoblastoma-binding protein 5), CTCF (Transcriptional repressor CTCF) και RAD21 (Double-strand-break repair protein rad21 homolog)<sup>374</sup>.

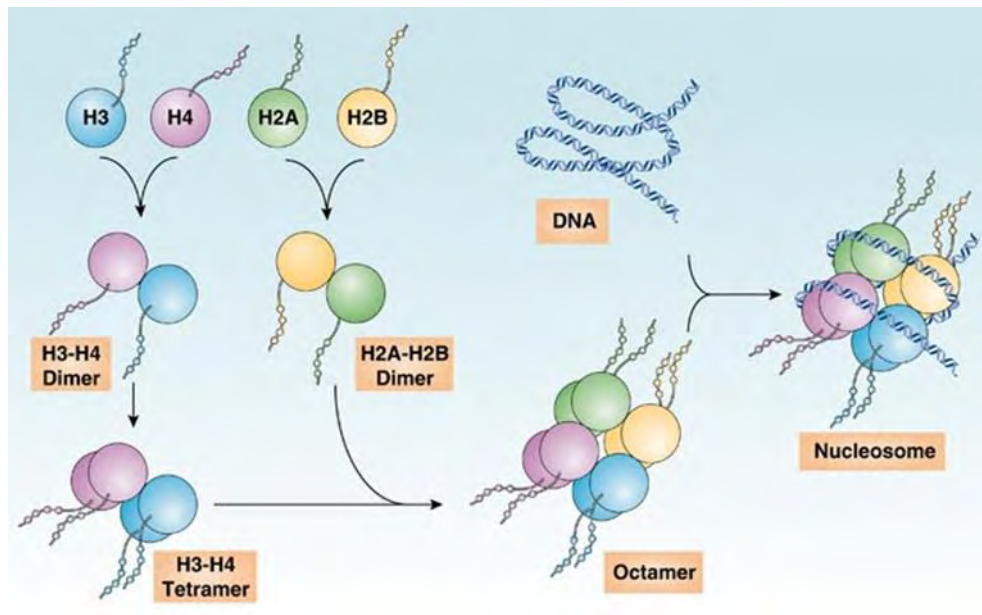


**Εικόνα 13.** Ο ρόλος της μεθυλίωσης του DNA στα CpG νησίδια στην ανάπτυξη του καρκίνου μαστού. Ο περισσότερο κοινός τύπος ΚΜ είναι το διηθητικό καρκίνωμα μαστού (invasive ductal carcinoma-IDC). Κατά την εξέλιξη από τις προκαρκινικές και μη διηθητικές αλλοιώσεις (Atypical Ductal Hyperplasia, ADH) ή τα μη διηθητικά in situ καρκινώματα (DCIS) στις διηθητικές και μεταστατικές μορφές της νόσου, ο επιγενετικός επαναπρογραμματισμός οδηγεί σε αύξηση της μεθυλίωσης στις νησίδες CpG των υποκινητών, απομεθυλίωση των γονιδιακών σωμάτων και των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Τροποποιημένο από <sup>375</sup>.

#### 4.1.2 Τροποποιήσεις ιστονών

Οι ιστόνες είναι πυρηνικές πρωτεΐνες στενά συνδεδεμένες με το DNA. Είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τη διαμόρφωση της δομής της χρωματίνης όπως επίσης και για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται οι ιστόνες H1, H2A, H2B, H3 και H4. Η H1 και η ομόλογή της H5 εμπλέκονται σε ανώτερης τάξης δομές της χρωματίνης, ενώ οι υπόλοιπες διαμορφώνουν τα νουκλεοσώματα (Εικόνα 14) <sup>376</sup>.





**Εικόνα 14.** Οι ιστόνες και η δομή του νουκλεοσώματος. Τροποποιημένο από <sup>377</sup>.

Ένας σημαντικός μηχανισμός για την επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (post-translational modifications) των ιστονών. Οι τροποποιήσεις αυτές επηρεάζουν τη δομή των ιστονών, τροποποιώντας ταυτόχρονα την αλληλεπίδρασή τους με το DNA. Οι αλλαγές αυτές επιφέρουν αναδιαμορφώσεις και των νουκλεοσωμάτων, με αποτέλεσμα περιοχές πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στο DNA να αναδεικνύονται ή να αποκρύπτονται <sup>378</sup>. Συνολικά, 60 διαφορετικές τροποποιήσεις των ιστονών έχουν μέχρι τώρα ταυτοποιηθεί <sup>379</sup>. Μεταξύ των πλέον γνωστών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων είναι η ακετυλίωση της λυσίνης 9 της ιστόνης 3 (H3K9Ac), η οποία έχει συνδεθεί με το «άνοιγμα» της χρωματίνης <sup>380,381</sup>. Αντιθέτως, η μεθυλίωση των ιστονών μπορεί να οδηγήσει είτε σε «άνοιγμα», είτε σε «κλείσιμο» περιοχών της χρωματίνης ανάλογα με το συγκεκριμένο αμινοξύ που υφίσταται την αλλαγή. Για παράδειγμα, μόνο- ή τριμεθυλίωση της λυσίνης 4 της ιστόνης H3 (H3K4me3) και τριμεθυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη 36 (H3K36me3) έχουν σχετισθεί με ανοικτή

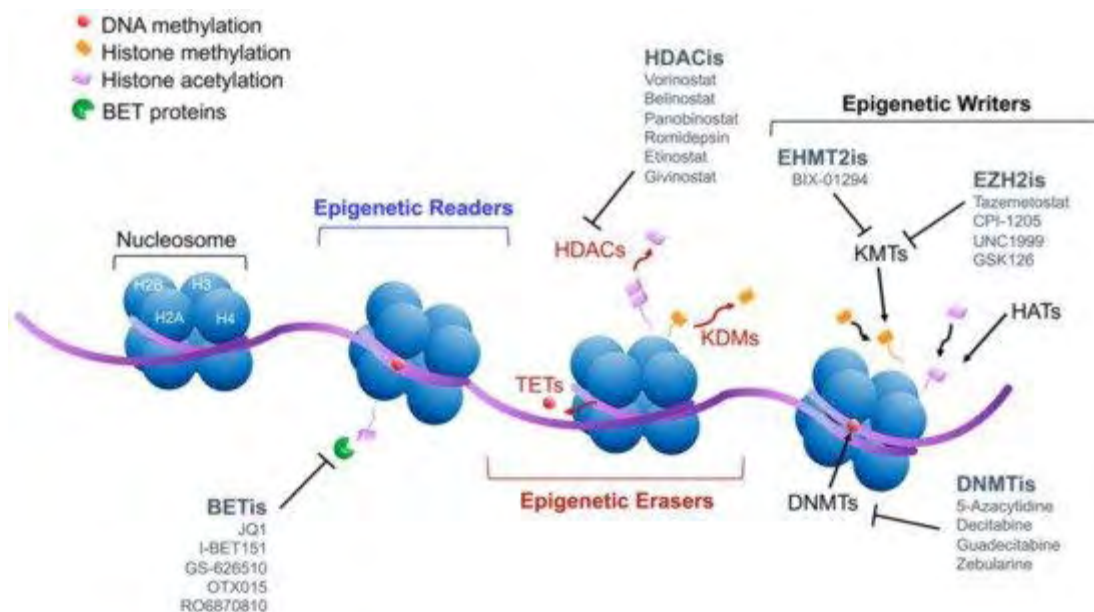


χρωματίνη<sup>380-382</sup>. Αντιθέτως, η τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 και 27 στην ιστόνη H3 (H3K9me3 και H3K27me3, αντίστοιχα) έχει συνδεθεί με περισσότερο συμπαγή μορφή χρωματίνης που οδηγεί σε καταστολή των γονιδίων στόχων<sup>383</sup>.

Μελέτες των τροποποιήσεων των ιστονών σε όλο το γονιδίωμα έχουν δείξει πως ο συνδυασμός διαφόρων αλλαγών προσφέρει μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για την κατάσταση του κυττάρου και της νόσου<sup>368,384</sup>. Η γνώση αυτή έχει οδηγήσει στην υπόθεση σχετικά με τον «κώδικα των ιστονών», σύμφωνα με τον οποίο οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών είναι ένας μηχανισμός που επηρεάζει τις λειτουργίες της χρωματίνης<sup>385</sup>.

Η σημασία των τροποποιήσεων των ιστονών για τον ΚΜ έχει καλά τεκμηριωθεί και με πολλές *in vitro* μελέτες. Οι Zhou και συν., χρησιμοποιώντας ένα κυτταρικό μοντέλο καρκινικής εξαλλαγής, έδειξαν πως, αφενός μεν, υπάρχει μείωση των H3K9me2 και H3K9me3, αφετέρου δε, πως η απομεθυλάση KDM3A (Lysine-specific demethylase 3A) είναι υπεύθυνη για τη μείωση της H3K9me2<sup>386</sup>. Σε άλλη μελέτη, οι Messier και συν. έχουν δείξει πως η H3K4ac έχει αυξημένη έκφραση στις καρκινικές σειρές MCF και MDA-MB-2317 σε σύγκριση με την MCF-10A, που μιμείται το φυσιολογικό επιθήλιο, υπογραμμίζοντας τον ρόλο της H3K4ac στη διαδικασία της καρκινικής εξαλλαγής. Αντιθέτως, η αύξηση της H3K4me3 στους υποκινητές σε όλο το γονιδίωμα παρατηρήθηκε αρχικά στην τριπλά αρνητική κυτταρική σειρά MDA-MB-231, συνδέοντας την παρουσία της με το μεταστατικό δυναμικό<sup>387</sup>. Επίσης, στην σειρά MCF-7 έχει παρατηρηθεί αύξηση της ακετυλίωσης στους υποκινητές, με την H3K4ac να παίζει σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι του ER. Επιπλέον, στην MDA-MB-231 έχει δειχθεί αύξηση της H3K4me3 και σε συνδυασμό με την H3K4ac έχει συνδεθεί με τη διαδικασία της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής (epithelial-mesenchymal transition, EMT)<sup>387</sup>. Πρόσφατα, η ενεργοποιός H3K4me3 και η κατασταλτική

H3K27me3 συγκρίθηκαν μεταξύ της κυτταρικής σειράς HMECs (Human Mammary Epithelial Cells) και 3 σειρών KM (luminal -ZR-75-1, HER2 θετική SK-BR-3 και τριπλά αρνητική/basal MDA-MB-436). Ενώ το πρότυπο των H3K4me3 ήταν παρόμοιο μεταξύ της φυσιολογικής και των καρκινικών κυτταρικών σειρών, το πρότυπο των H3K27me3 διέφερε σημαντικά μεταξύ των κυτταρικών σειρών, με συγκεκριμένα μονοπάτια σηματοδότησης να είναι κατασταλμένα στις καρκινικές σειρές <sup>388</sup>. Αν και ο ρόλος των ιστονών στον KM έχει μελετηθεί εκτενώς, η σημασία της ιστόνης H1 στον KM είναι λιγότερο καλά διευκρινισμένη. Έχει δειχθεί πως η ισομορφή H1.2 απουσιάζει από τα σημεία εκκίνησης της μεταγραφής των κατασταλμένων γονιδίων, όπως επίσης και πως υποκινητές πλούσιοι σε H1.2 σχετίζονται με κατασταλμένα γονίδια <sup>389</sup>. Επίσης, η φωσφορύλιωση της H1 μεταβάλλεται σε απάντηση της E2 και σχετίζεται με την επιθετικότητα του όγκου <sup>390</sup>.



**Εικόνα 15.** Μηχανισμοί επιγενετικής ρύθμισης και φαρμακολογικής στόχευσης. Σχηματική αναπαράσταση του νουκλεοσώματος και των κυριότερων μηχανισμών τροποποιήσεων των ιστονών συμπεριλαμβανομένων της μεθυλίωσης του DNA και των τροποποιήσεων των ιστονών. Από <sup>391</sup>.

Τρεις ομάδες ενζύμων έχουν εμπλακεί στην τροποποίηση των ιστονών (Εικόνα 15). Στην μία συγκαταλέγονται εκείνα τα ένζυμα που επιφέρουν τροποποιήσεις, όπως οι ακετυλοτρασφεράσες των ιστονών (histone acetyltransferases-HAT) και καλούνται «Writers». Στην δεύτερη ομάδα, τους «Erasers», συμπεριλαμβάνονται τροποποιητές, όπως οι αποακετυλάσες των ιστονών (histone deacetylases -HDAC) που αφαιρούν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Τέλος, στην τρίτη ομάδα ενζύμων συγκαταλέγονται οι «Readers», οι οποίοι αναγνωρίζουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που ήδη υπάρχουν στη χρωματίνη <sup>392,393</sup>. Η ακετυλίωση των ιστονών από τις HAT αλλάζει το φορτίο από θετικό σε αρνητικό, αλλαγή που μειώνει και την αλληλεπίδραση με το αρνητικά φορτισμένο DNA. Αυτές οι αλλαγές, που μπορούν να αναστραφούν από τις HDACs, αυξάνουν την προσβασιμότητα, ευοδώνοντας την μεταγραφή από την μεταγραφική μηχανή <sup>394</sup>.

Οι πληροφορίες σχετικά με το ρόλο των «writers» και των «readers» στον KM είναι σχετικά περιορισμένες. Η ακετυλοτρασφεράση hMOF (human males absent on the first), η οποία είναι υπεύθυνη για την αλλαγή H4K20, έχει βρεθεί σημαντικά μειωμένη στον KM [58]. Αντιθέτως, η «eraser» πρωτεΐνη LSD1 (Lysine specific histone demethylase 1) έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται σε ER αρνητικούς KM και να σχετίζεται με αυξημένη επιθετικότητα της νόσου. Αντιθέτως, η μείωση της έκφρασης της LSD1 έχει οδηγήσει σε αναστολή της αύξησης σε *in vitro* πειράματα <sup>395</sup>. Μία επίσης ενδιαφέρουσα παρατήρηση προέκυψε από την έκτοπη έκφραση σε κυτταρικές σειρές KM των H4K20me3 μεθυλοτρασφερασών των ιστονών SUV420H1 και SUV420H2, η οποία ήταν ικανή να καταστείλει την κυτταρική διήθηση <sup>396</sup>. Επίσης, η υψηλότερη έκφραση της HDAC1 έχει σχετισθεί με την έκφραση των ορμονικών υποδοχέων <sup>397</sup>. Επιπρόσθετα, οι Muller και συν. βρήκαν ότι η έκφραση των HDAC2 και HDAC3 ήταν υψηλότερη σε πτωχά διαφοροποιημένους και χωρίς ορμονικούς

υποδοχείς όγκους, ενώ η HDAC2 σχετίστηκε με την υπερέκφραση των υποδοχέων HER2<sup>398</sup>.

#### 4.1.3 Μη κωδικά μόρια RNA

Ανάλογα με το μέγεθός τους, τα μη κωδικά RNA (non-coding RNAs-ncRNAs) κατηγοριοποιούνται σε δύο κατηγορίες: τα μικρά ncRNAs, μεγέθους έως 200 νουκλεοτίδια, και τα μεγάλα ncRNAs (lncRNAs), μεγέθους από 200 βάσεις έως 100.000 βάσεις. Εναλλακτικά, τα ncRNAs διακρίνονται ανάλογα με τη λειτουργία τους σε ριβοσωματικά RNAs (rRNAs), μεταφορικά RNAs (tRNAs), μικρά πυρηνικά RNAs (snRNAs) και μικρά πυρηνιακά RNAs (snoRNAs), τα οποία εκφράζονται συνεχώς, όπως επίσης και στα ρυθμιστικά μόρια RNA, όπως τα μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (siRNAs), τα piRNAs (piwi-associated RNAs), τα miRNA (microRNAs) και τα lncRNAs<sup>399-402</sup>.

Τα ncRNAs θεωρούνται επιγενετικοί ρυθμιστές, δεδομένου ότι επιγενετικοί τροποποιητές που επιτελούν την επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, όπως οι DNMTs, οι HDACs, και η οικογένεια των polycomb πρωτεϊνών έχουν βρεθεί πειραματικά ότι λειτουργούν ως στόχοι για τα miRNAs ή είναι συμπαράγοντες των lncRNAs<sup>403</sup>. Από την άλλη πλευρά, εφόσον οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα μόρια αυτά ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση δεν επηρεάζουν την αλληλουχία του DNA, ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης από τα ncRNAs μπορεί να θεωρηθεί επιγενετικό φαινόμενο αυτό καθαυτό, του οποίου οι αποκλίσεις από τη φυσιολογική λειτουργία έχουν σοβαρές επιπτώσεις και επηρεάζουν κάθε βήμα της καρκινογένεσης.

Εστιάζοντας στον καρκίνο, τα miRNAs και τα lncRNAs δρουν ως ογκογονίδια ή ως ογκοκατασταλτικά γονίδια, καθώς μπορεί να αυξορρυθμίζονται ή να

μειορρυθμίζονται. Σχετικά με αυτό, ενώ μία καθολική μειορρύθμιση των miRNAs έχει παρατηρηθεί στους όγκους σε σχέση με τους υγιείς ιστούς, η πλειονότητα των lncRNAs φαίνεται να αυξορρυθμίζονται λόγω της χαμηλής έκφρασής τους υπό φυσιολογικές συνθήκες <sup>403,404</sup>.

Αξιοσημείωτη είναι επίσης η δυσλειτουργία των ncRNAs στον ΚΜ. Σε ανάλυση δημοσιευμένων δεδομένων αλληλούχισης μεθυλώματος στον ΚΜ από τους Li και συν., βρέθηκε αξιοσημείωτη διαταραχή στη μεθυλίωση των υποκινητών των ncRNAs σε σχέση με τους υποκινητές γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, με τα διαγονιδιακά ncRNAs να αποτελούν την πλειονότητα των ncRNAs με αυξημένη μεθυλίωση <sup>405</sup>. Επιπλέον, διακρίθηκαν πέντε πρότυπα μεθυλίωσης υποκινητών ncRNAs, τόσο για εκείνους τους υποκινητές που έχουν CpG νησίδες, όπου η μεθυλίωση δεν παρατηρείται μόνο στις CpG νησίδες, αλλά και σε γειτονικές περιοχές των CpG νησίδων, όσο και σε υποκινητές που δεν έχουν CpG νησίδες. Η ταυτόχρονη μελέτη και των δεδομένων έκφρασης επιβεβαίωσε τη σχέση της μεθυλίωσης υποκινητών των ncRNA με τις αντίστοιχες μεταγραφικές αλλαγές, οι οποίες είναι με τη σειρά τους λειτουργικά υπεύθυνες για την απορρύθμιση σημαντικών διακυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAPK <sup>405</sup>.

Τα miRNAs είναι μικρά ncRNAs μεγέθους 18–25 νουκλεοτιδίων, πολύ συντηρημένα, τα οποία επάγουν την αναστολή της μετάφρασης ή την αποδόμηση των mRNAs που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, μέσω ατελούς ταιριάσματος βάσεων σε συμπληρωματικές περιοχές των mRNA στόχων (miRNA Response Elements- MREs) <sup>375</sup>. Ο ΚΜ είναι από τους πρώτους καρκίνους στον οποίο έχει αναφερθεί απορρύθμιση των miRNAs μετά από ανάλυση μικροσυστοιχιών και σύγκριση 76 καρκινικών και 10 φυσιολογικών ιστών μαστού <sup>406</sup>. Σε μελέτη των Iorio και συν. αναγνωρίστηκε μία υπογραφή 29 miRNAs με διαφορετική έκφραση με την οποία διαχωρίζονταν τα

καρκινικά από τα φυσιολογικά δείγματα <sup>406</sup>. Ανάμεσα σε αυτά, κάποια αυξορρυθμίζονταν (π.χ. miR-21 και miR-155), ενώ άλλα μειορρυθμίζονταν (π.χ. miR-10b και miR-145) στον ΚΜ, προτείνοντας ότι κάθε miRNA παίζει διαφορετικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του ΚΜ. Αργότερα, δημοσιεύθηκαν και άλλες υπογραφές με 46 miRNAs από τους De Rinaldis και συν., περιλαμβάνοντας 13 miRNAs με υψηλή έκφραση στο βασικού τύπου καρκίνο μαστού, 23 miRNAs με υψηλή έκφραση στον luminal τύπο (Α ή Β), 6 miRNAs με υπερέκφραση στον normal-like υπότυπο και 4 miRNAs με υπερέκφραση στον HER2 θετικό ΚΜ, όπως επίσης και άλλες υπογραφές με miRNAs που μπορούσαν να κατηγοριοποιήσουν περαιτέρω του υπότυπους καρκίνου μαστού <sup>407-409</sup>.

Τα lncRNAs αποτελούν τη μεγαλύτερη οικογένεια μη κωδικοποιών μεταγράφων και περιλαμβάνουν τα long intergenic ncRNAs (lincRNAs), enhancer ncRNAs (eRNAs), τα natural antisense transcripts (NATs) και άλλα <sup>401,402</sup>. Οι μηχανισμοί με τους οποίους λειτουργούν στους όγκους είναι διαφορετικοί, ωστόσο είναι πολύ καλά ενορχηστρωμένοι <sup>410</sup>. Όπως και τα mRNAs που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, τα lncRNAs μεταγράφονται συχνά από την RNA πολυμεράση II και υφίστανται μετα-μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, ωστόσο, φαίνεται να μην μεταφράζονται τα ίδια <sup>411</sup>. Σε σύγκριση με τα miRNAs, των οποίων η μοριακή στόχευση βασίζεται στην ειδικότητα της αλληλουχίας τους για τις περιοχές-στόχους των mRNAs, τα lncRNAs μπορούν να διπλώνονται σε πολύπλοκες δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές, προκειμένου να εξυπηρετήσουν τη λειτουργία τους και να αλληλεπιδράσουν με διαφορετικούς τύπους μορίων, π.χ. DNA, RNA και πρωτεΐνες, συμμετέχοντας έτσι σε πολλαπλά ρυθμιστικά δίκτυα, όπως η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, το εναλλακτικό μάτισμα, η μεταγραφική και μετα-μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων και η μοριακή δέσμευση των miRNAs <sup>412</sup>.

Όπως και τα miRNAs, τα lncRNAs έχουν βρεθεί να εκφράζονται διαφορετικά ανάμεσα στον φυσιολογικό μαστό και τον ΚΜ, ενισχύοντας τον ρόλο τους στην έναρξη και εξέλιξη του ΚΜ<sup>413</sup>. Το HOTAIR (HOX antisense intergenic RNA) ήταν το πρώτο lncRNA που βρέθηκε να είναι απορρυθμισμένο στον ΚΜ με τους πρωτοπαθείς όγκους να εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα σχέση με τον παρακείμενο ιστό<sup>414</sup>. Είναι αξιοσημείωτο επίσης ότι το HOTAIR έχει εμπλακεί στη μεταγραφική ρύθμιση του *HOXD10* (*Homeobox D10*), έναν γνωστό στόχο του miR-10b, ο οποίος προάγει τη μετάσταση στον ΚΜ<sup>415</sup>. Πιο συγκεκριμένα, το HOTAIR εμπλέκεται στην αλλαγή της δομής της χρωματίνης, προκαλώντας αυξημένη πληρότητα των υποκινητών των γονιδίων που αναστέλλουν την εξέλιξη του ΚΜ, όπως το *HOXD10* από το κατασταλτικό σύμπλεγμα Polycomb-2<sup>414,416</sup>.

Ομοίως, έχει παρατηρηθεί αυξορρύθμιση του *MALAT1* (*metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1*) στον πρωτοπαθή ΚΜ, τα δε επίπεδα έκφρασής του αυξάνονται ακόμα περισσότερο στις αντίστοιχες μεταστάσεις<sup>417</sup>. Τα ευρήματα αυτής της μελέτης προτείνουν ότι το MALAT1 αποτελεί μία μεταγραφική σκαλωσιά ματίσματος, η οποία συνεργάζεται με προ-ογκογόνα γονίδια μεταγραφής και ματίσματος, όπως οι ιντεγκρίνες, οι πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας και τα γονίδια που εμπλέκονται στη μετανάστευση και τη μετάσταση κατά την εξέλιξη του όγκου<sup>375</sup>. Είναι ενδιαφέρον, ότι η έκφραση εναλλακτικών μεταγράφων του MALAT1 διαφοροποιείται σε σχέση με αυτή του πλήρους μήκους μεταγράφου, έχοντας ταυτόχρονα και προγνωστική αξία για το διάστημα ελεύθερου μετάστασης (MFS). Η παρατήρηση αυτή υπογραμμίζει επίσης την πολυπλοκότητα των μηχανισμών μέσω των οποίων τα lncRNAs ρυθμίζουν αλλαγές στον φαινότυπο του όγκου<sup>418</sup>.

## 4.2 Επιγενετικοί μηχανισμοί και αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία

### *Μεθυλίωση του DNA*

Η αλληλεπίδραση του ER και των επιγενετικών τροποποιήσεων θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για την ανάπτυξη αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία. Σχεδόν προ δεκαετίας, οι Magnani και συν. έδειξαν πως η ανάπτυξη της αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία του ΚΜ συνδέεται και με τον επιγενετικό επαναπρογραμματισμό που λαμβάνει χώρα σε όλο το εύρος του γονιδιώματος <sup>419</sup>.

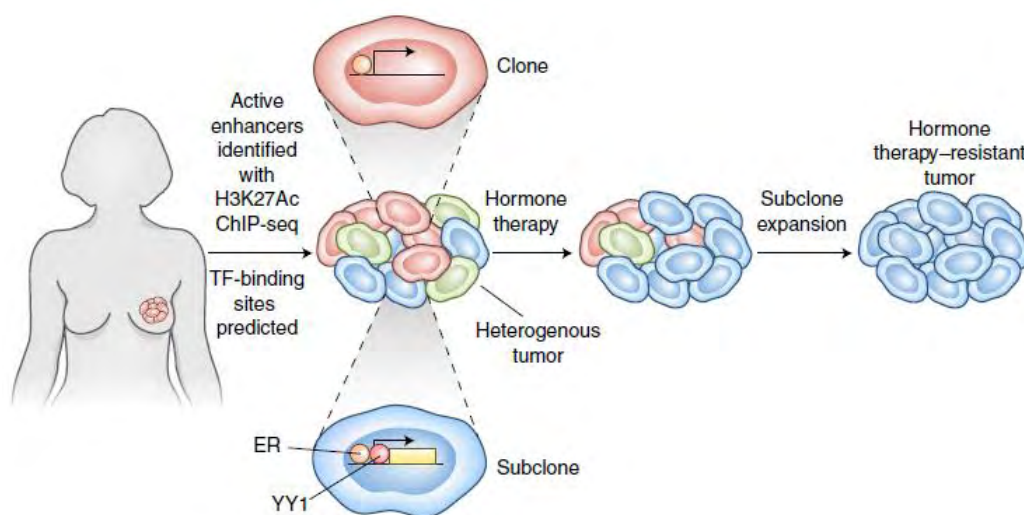
Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του ER και των γονιδίων στόχων του είναι η ρύθμιση της έκφρασής τους μέσω εναλλαγών μεθυλίωσης/απομεθυλίωσης δινοκλεοτιδίων CpG <sup>420</sup>. Έτσι, για παράδειγμα, η απουσία της έκφρασης του ERα σε ένα μικρό ποσοστό των ασθενών με ΚΜ οφείλεται σε αυξημένη μεθυλίωση CpG περιοχών <sup>421,422</sup>. Επίσης, οι Soleimani και συν. έχουν πρόσφατα ανακοινώσει πως η μεθυλίωση συγκεκριμένων CpGs είναι ισχυρά σχετιζόμενη με την επιβίωση ER θετικών ασθενών με ΚΜ όπως επίσης και με την αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία <sup>423</sup>.

Μία ακόμη ενδιαφέρουσα παρατήρηση σχετικά με την ανάπτυξη αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία προέκυψε από την εργασία των Ye και συν., σύμφωνα με την οποία η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα SALL2 (Spalt-like transcription factor 2) μειώνεται σημαντικά κατά την ανάπτυξη αντίστασης, με αποτέλεσμα τη μειορρύθμιση του ERα και του PTEN και ενεργοποίηση του μονοπατιού AKT/mTOR, γεγονότα που οδηγούν σε ανεξάρτητη από την E2 αύξηση και ταυτόχρονα ανάπτυξη αντίστασης. Αντιθέτως, η χορήγηση αναστολέων των μεθυλοτρανσφερασών επέτυχε την επαναφορά της έκφρασης της SALL2 και την επανευαισθητοποίηση στην ενδοκρινική θεραπεία <sup>424</sup>.



Επιπλέον, οι Zhang και συν., χρησιμοποιώντας δεδομένα από το πρόγραμμα TCGA (The Cancer Genome Atlas), κατέληξαν στο συμπέρασμα πως 502 από τις 135,418 γονιδιωματικές περιοχές διέφεραν ως προς την μεθυλίωση μεταξύ ασθενών με ευαίσθητη νόσο στην ενδοκρινική θεραπεία και ασθενών με αντίσταση. Περαιτέρω ανάλυση κατέληξε στο συμπέρασμα πως οι εν λόγω περιοχές αφορούσαν γονίδια που εμπλέκονται στην οργανογένεση και την ανάπτυξη όπως επίσης και στις διακυτταρικές συνδέσεις <sup>425</sup>.

Η ευαισθησία του ΚΜ στην ενδοκρινική θεραπεία έχει σχετισθεί και με την μεθυλίωση του DNA στους ενισχυτές γονιδίων που ρυθμίζονται από τα οιστρογόνα. Πιο συγκεκριμένα, οι Stone και συν. έχουν δείξει πως οι ενισχυτές που ρυθμίζονται από τα οιστρογόνα σε κύτταρα ΚΜ με αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία είναι υπερμεθυλιωμένοι και σχετίζονται με μειωμένη πρόσδεση του ER και μειωμένη έκφραση κομβικών ρυθμιστικών μορίων στο μονοπάτι του ER <sup>426</sup>.



**Εικόνα 16.** Σχέση των ενεργών ενισχυτών με την ετερογένεια και την ανάπτυξη αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία στον ΚΜ. Τροποποιημένο από <sup>427</sup>.

Επίσης, οι Patten και συν. προσδιόρισαν τους ενεργούς ενισχυτές σε κύτταρα ΚΜ προσδιορίζοντας με ChIP-seq (chromatin immunoprecipitation sequencing) την

παρουσία του H3K27ac στους ενισχυτές σε όλο το γονιδίωμα (Εικόνα 16). Οι ενεργοί ενισχυτές σχετίστηκαν με την ετερογένεια του όγκου και με την ανάπτυξη της αντίστασης. Πιο συγκεκριμένα, οι ίδιοι ερευνητές έδειξαν σε ER+ ΚΜ πως η ενδοκρινική θεραπεία οδηγεί σε κλωνική επιλογή και αντίσταση, «επιλέγοντας» εκείνα τα κύτταρα στα οποία προσδεδεμένοι στους ενεργούς ενισχυτές βρίσκονται οι μεταγραφικοί παράγοντες YY1 (Yin And Yang 1 Protein) και ER <sup>428</sup>.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει επίσης η παρατήρηση των Achinger-Kawecka και συν. σύμφωνα με την οποία η τρισδιάστατη δομή της χρωματίνης σε ER θετικά, ανθεκτικά καρκινικά κύτταρα μεταβάλλεται, διαταράσσοντας την τοπολογία και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων περιοχών της χρωματίνης. Η απώλεια των τρισδιάστατων αλληλεπιδράσεων της χρωματίνης σχετίστηκε επίσης με την υπερμεθυλίωση του ER και την απώλεια της πρόσδεσης του ER στα γονίδια στόχους <sup>429</sup>.

Επίσης, οι Pathiraja και συν. έχουν ανιχνεύσει μεταβολές στο βαθμό μεθυλίωσης (υπερ- και υπο-μεθυλίωση) σε όλο το μήκος του DNA, με την υπερμεθυλίωση να επικρατεί στα αναπτυξιακά γονίδια. Ιδιαίτερο ρόλο στην ανάπτυξη αντίστασης στους AIs φαίνεται πως διαδραματίζει και η καταστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης HOXC10 (Homeobox protein Hox-C10) μέσω προσέλκυσης της EZH2 και αύξησης της H3K27me3. Τα μειωμένα επίπεδα της HOXC10 φαίνεται πως οδηγούν σε μειωμένη απόπτωση και ανάπτυξη φαινοτύπου αντίστασης έναντι της ενδοκρινικής θεραπείας <sup>430</sup>.

### **Τροποποιήσεις ιστονών**

Ένας ακόμη επιγενετικός μηχανισμός που επηρεάζει την έκφραση του ER και τη σχετιζόμενη με αυτόν ενδοκρινική αντίσταση είναι η αποακετυλίωση των ιστονών. Η

τελευταία μπορεί να μειώσει την έκφραση του ER, συμπυκνώνοντας τη δομή του νουκλεοσώματος και της χρωματίνης<sup>422</sup>. Η επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής προήλθε από μελέτη των Yang και συν., οι οποίοι έδειξαν πως αναστολή της HDAC οδηγεί στην επαναφορά της μεταγραφής του γονιδίου του ER σε κυτταρικές σειρές KM στις οποίες δεν υπήρχε έκφραση του εν λόγω υποδοχέα<sup>431</sup>.

Βασισμένοι σε αυτά τα δεδομένα, έχει μελετηθεί ο συνδυασμός των αναστολέων των HDAC (HDACi) και των DNMT1, δείχνοντας ότι ο συγκεκριμένος συνδυασμός, εμποδίζοντας τις επιγενετικές αλλαγές που περιγράψαμε παραπάνω, μπορεί να επαναφέρει την ευαισθησία έναντι των SERMs σε κυτταρικές σειρές KM στις οποίες δεν εκφράζεται ο ER<sup>432</sup>. Πιο συγκεκριμένα, σε κλινική μελέτη φάσης II, οι Munster και συν. έδειξαν πως ο συνδυασμός HDACi (vorinostat) και ταμοξιφαίνης σε ασθενείς με μεταστατικό KM, ανθεκτικό στην ορμονική θεραπεία, είχε ποσοστό αντικειμενικών ανταποκρίσεων (ORR) 19% και ποσοστό κλινικού οφέλους 40%, καταδεικνύοντας πως ο συνδυασμός είναι αποτελεσματικός στο να υπερνικήσει την αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία σε μία ομάδα των ασθενών<sup>433</sup>. Σε μία ακόμη μελέτη φάσης II, στην οποία εντάχθηκαν ασθενείς με ER θετική νόσο που υποτροπίασαν ή ανέπτυξαν μεταστάσεις μετά από θεραπεία με AI, ο συνδυασμός της εξεμεστάνης με τον entinostat (ένας HDACi) συνοδεύτηκε από όφελος επιβίωσης τόσο σε επίπεδο PFS όσο και σε OS<sup>434</sup>. Ο αναστολέας της HDAC entinostat φαίνεται πως συντελεί στην αναστροφή της αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία, η δε θέση της στην αντιμετώπιση των ασθενών με KM αναμένεται να αποσαφηνισθεί οριστικά από μελέτες που είναι ήδη σε εξέλιξη (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02820961).

Ένας ακόμη μηχανισμός που φαίνεται πως επηρεάζει την επιγενετική ρύθμιση και συνάμα σχετίζεται τόσο με την παθογένεια της νόσου, όσο και με την αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία, είναι αυτός που αφορά μεταλλάξεις ή πολυμορφισμούς γονιδίων

που κωδικοποιούν τα ένζυμα που εμπλέκονται στην επιγενετική ρύθμιση. Συγκεκριμένα, σωματικές μεταλλάξεις σε γονίδια των μεθυλοτρασφερασών των ιστονών όπως τα *KMT2B*, *KMT2D*, *KMT2E* και των απομεθυλασών των ιστονών όπως τα *KDM4A*, *KDM5B*, *KDM5C*, *KDM6A* έχουν παρατηρηθεί ιδίως στους luminal υποτύπους του ΚΜ <sup>435</sup>. Επίσης, οι Yamamoto και συν. έχουν δείξει πως υπάρχει υπερέκφραση και ενίσχυση της *KDM5B* σε luminal ΚΜ. Η *KDM5B* παρουσιάζει εκλεκτική πρόσδεση σε υποκινητές και ενισχυτές γονιδίων που εκφράζονται σε luminal κύτταρα <sup>436</sup>. Ασθενείς με ER+ όγκους και αυξημένη ενεργότητα *KDM5B* είχαν μικρότερη επιβίωση με την χορήγηση ενδοκρινικής θεραπείας <sup>437</sup>.

Ένα άλλο ένζυμο που έχει μελετηθεί σε σχέση με την ανάπτυξη αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία είναι η H3K4 μεθυλοτρασφεράση *KMT2C*. Μεταλλάξεις απαλοιφής ή απώλειας λειτουργίας της *KMT2C* ανευρίσκονται συχνά στον ER+ ΚΜ, η δε παρουσία τους έχει σχετισθεί με την μειωμένη απάντηση στους AIs <sup>438</sup>.

Προ έτους, οι Jiang και συν. έδειξαν πως η συγχορήγηση εξεμεστάνης και tucidinostat, ενός νέου εκλεκτικού αναστολέα της αποακετυλάσης των ιστονών, σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με ER θετικό ΚΜ που είχαν εμφανίσει επιδείνωση της νόσου στην ενδοκρινική θεραπεία, βελτίωσε το PFS, υποδηλώνοντας το ρόλο των επιγενετικών μηχανισμών στην ανάπτυξη της αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία <sup>439</sup>.

Οι Wu και συν. έχουν επίσης αποδείξει πως τον κομβικό ρόλο στην αντίσταση του ΚΜ στη ταμοξιφαίνη διαδραματίζει η μεθυλοτρασφεράση των ιστονών *EZH2*, η οποία προκαλεί αποσιώπηση της έκφρασης του συμπαραγόντα του ERα *GREB1* (Growth regulation by estrogen in breast cancer 1) μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή του. Επίσης, έχει δειχθεί σε ανθεκτικά στην ορμονοθεραπεία κύτταρα πως η καταστολή της έκφρασης του GRE

B1 σχετίζεται αρνητικά με την ευαισθησία στην ενδοκρινική θεραπεία, προκαλώντας αλλαγή της εντόπισης στη χρωματίνη των συμπαραγόντων του ERα με αποτέλεσμα την μετατροπή της αντι-οιστρογόνου δράσεως σε αγωνιστική <sup>440</sup>.

Η αντίσταση στους AIs έχει συνδεθεί επίσης και με την υπερέκφραση συγκεκριμένων αλληλομόρφων των ιστονών. Συγκεκριμένα, το αλληλόμορφο HIST1H2BE, το οποίο είναι υπομεθυλιωμένο έχει υψηλότερη έκφραση στις κυτταρικές σειρές που έχουν αντίσταση σε σύγκριση με τις ευαίσθητες <sup>441</sup>.

### ncRNAs

Εκτός της συμμετοχής των ncRNAs στην παθογένεια και την ανάπτυξη του ΚΜ, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν τη συμμετοχή τους και στην αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία. Συγκεκριμένα, η έκφραση του miR-221/222 έχει θετικά σχετισθεί με την αντίσταση στην ταμοξιφαίνη στην κυτταρική σειρά MCF-7, πιθανώς μέσω της στόχευσης του mRNA του γονιδίου *CDKN1B* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*) <sup>442</sup>. Επίσης, σε μελέτη των Wei και συν. δημοσιεύθηκε πως το miR-221/222 ενδεχομένως να μεταφέρεται και να επάγει την αντίσταση μέσω εξωσωμάτων <sup>443</sup>. Επίσης, ρόλο στην αντίσταση στην ταμοξιφαίνη φαίνεται πως έχει και το miR-21, το οποίο βρέθηκε σε *in vitro* μελέτες ER+ ΚΜ πως ενεργοποιείται από το παράγωγο της ταμοξιφαίνης την 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) <sup>444</sup>.

Ένας ακόμη μηχανισμός μέσω του οποίου τα miRNAs εμπλέκονται στην αντίσταση στην ταμοξιφαίνη είναι η τροποποίηση της έκφρασης του ERα. Η μεταβολή της έκφρασης του ERα έχει δειχθεί πως μπορεί να επιτευχθεί με τη δράση πολλών miRNAs που στοχεύουν τον ERα, όπως είναι τα miR-221/222, miR-18a, miR-19a/b, και miR-22, τα οποία μπορούν ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν και ως προβλεπτικοί δείκτες για την απάντηση στην ταμοξιφαίνη σε ασθενείς με ER+ ΚΜ <sup>445,446,418,447</sup>.

Ενδιαφέρουσα είναι επίσης η παρατήρηση πως κύτταρα MCF-7 που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Beclin1 εμφανίζουν συνεντόπιση Beclin1 και ERα μετά από έκθεση στην οιστραδιόλη, εμφανίζοντας μειωμένη ευαισθησία στα παράγωγα της ταμοξιφαίνης raloxifene και 4-OHT<sup>448</sup>.

Εκτός της ταμοξιφαίνης, τα miRNAs φαίνεται πως συμμετέχουν και στην αντίσταση στην fulvestrant. Οι Zhou και συν. έχουν πρόσφατα δείξει, χρησιμοποιώντας κυτταρική σειρά MCF-7, πως τα miRNAs που συμμετέχουν στην αντίσταση στη fulvestrant είναι διαφορετικά από εκείνα που συμμετέχουν στην αντίσταση στην ταμοξιφαίνη<sup>449</sup>. Ωστόσο, ορισμένα, όπως τα miR-21 και miR-221/222, η έκφραση των οποίων επάγεται από την fulvestrant, προσφέρουν αντίσταση και στα δύο είδη ενδοκρινικής θεραπείας μέσω της στόχευσης των γονιδίων στόχων, όπως είναι το *PTEN*<sup>450,451</sup>.

Όπως σημειώσαμε παραπάνω, το miR-221/222 αυξορρυθμίζεται τόσο από την ταμοξιφαίνη όσο και από την fulvestrant, αν και σε μεγαλύτερο βαθμό από την τελευταία<sup>452</sup>. Όπως και στην ταμοξιφαίνη έτσι και στη fulvestrant, μικροκυτίδια των ινοβλαστών που σχετίζονται με τον καρκίνο (cancer-associated fibroblasts-CAFs) και ήταν πλούσια σε miR-221/222 μετέφεραν την αντίσταση σε μη καρκινικά κύτταρα με τρόπο που σχετιζόταν με την IL-6<sup>453</sup>. Επιπλέον, το miR-221/222 προάγει την αντίσταση στην fulvestrant μέσω αναστολής τόσο του ERα, όσο και του CDKN1B (p27Kip1). Στην πρώτη περίπτωση, η αναστολή του ERα, οδηγεί στην ενεργοποίηση των οδών σηματοδότησης της WNT/β-catenin καθώς κι άλλων RTKs<sup>452,454</sup>. Είναι επίσης γνωστό πως η έκφραση των πρωτεϊνών CTNNB1, LRP6 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 6) και WNT11 (Protein Wnt-11), που εμπλέκονται στο μονοπάτι της Wnt/β-catenin, αυξορρυθμίζεται σε κύτταρα MCF-7 ανθεκτικά στην fulvestrant, πιθανώς μέσω υπομεθυλίωσης των υποκινητών τους<sup>454</sup>. Η συμμετοχή του

miR-221/222 στην ανάπτυξη αντίστασης στην fulvestrant έχει συνδεθεί επίσης με την προαγωγή κι άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών όπως είναι αυτά των TGFβ, Notch, Jak-STAT, MAPK και p53 <sup>452</sup>.

Όπως με την ταμοξιφαίνη και την fulvestrant, έτσι και με την αντίσταση έναντι των AIs, τα miRNAs φαίνεται πως συμμετέχουν, ωστόσο, τα δεδομένα είναι πολύ περιορισμένα <sup>455</sup>. Χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχία miRNA και κυτταρικές σειρές MCF-7 ανθεκτικές στη λετροζόλη και την αναστροζόλη, οι Vilquin και συν. ανέφεραν πως οι miRNA υπογραφές στα ανθεκτικά κύτταρα σχετίστηκαν με τη ρύθμιση συγκεκριμένων μονοπατιών, όπως είναι αυτό των MAPK, των εστιακών συνδέσεων, της ινσουλίνης, του ErbB και του mTOR που συγκλίνουν όλα στη ρύθμιση της AKT <sup>456</sup>. Στην ίδια μελέτη, τα miR-125b, miR-205 και miR-30a βρέθηκε να έχουν αυξημένη έκφραση, σε αντίθεση με το miR-424, το οποίο ήταν μειωμένο. Το ενδιαφέρον ήταν πως οι αλλαγές στα miR-125b, miR-205 και miR-424 μπορούσαν να επάγουν την αντίσταση στην λετροζόλη και την αναστροζόλη, όπως και τον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων, ερμηνεύοντας τον επιθετικό χαρακτήρα των ανθεκτικών κυττάρων, καθώς επίσης και να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR <sup>456</sup>. Κλινικά ενδιαφέροντα είναι η παρατήρηση πως η υπερέκφραση του miR-125b έχει σχετισθεί με μειωμένο διάστημα ελεύθερο υποτροπής σε ασθενείς με ER+ KM <sup>456</sup>.

Επιπλέον, η ενεργοποίηση των HER2, MAPK και AKT στα ER+ και ανθεκτικά στις AI κύτταρα KM έχει δειχθεί πως οδηγεί στην αυξορρύθμιση του miR-21 και στη μειορρύθμιση του στόχου του, του PDCD4 (Programmed Cell Death 4) <sup>457</sup>. Η μειωμένη έκφραση του PDCD4 στους ασθενείς με ER+ KM έχει ισχυρά σχετισθεί με μειωμένη διαφοροποίηση και μικρό DFS. Από την άλλη πλευρά, η στόχευση του miR-21 που ρυθμίζει άμεσα το PDCD4, οδήγησε σε μείωση του πολλαπλασιασμού MCF-7 που ήταν ανθεκτικά στην λετροζόλη <sup>457</sup>.

Μία οδός σηματοδότησης που επηρεάζεται από miRNAs και προάγει την αντίσταση στους AIs είναι αυτή της TGFβ. Πιο συγκεκριμένα, ο TGFβRI έχει βρεθεί ότι αποτελεί άμεσο στόχο του miR-128a, που υπερεκφράζεται στα MCF-7 κύτταρα που είναι ανθεκτικά στη λετροζόλη <sup>458</sup>. Αν και ο TGFβ επάγει την αύξηση στα ευαίσθητα στην λετροζόλη κύτταρα, στα ανθεκτικά κύτταρα δεν επιφέρει κάποια αλλαγή, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως η ρύθμιση του TGFβRI από το miR-128 καθορίζει και τις διαφορετικές απαντήσεις στον TGFβ. Επιπλέον, έχει βρεθεί πως η καταστολή του miR-128a αναστέλλει τον TGFβRI στα ανθεκτικά στη λετροζόλη κύτταρα με αποτέλεσμα την αναστολή της αύξησης μετά την έκθεση στον TGFβ <sup>458</sup>.



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ανάπτυξη αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα κλινικά προβλήματα στην αντιμετώπιση του ER+ ΚΜ αν λάβουμε μάλιστα υπόψη μας πως ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών που θα υποβληθούν σε ενδοκρινική θεραπεία στο πλαίσιο είτε επικουρικής, είτε συστηματικής θεραπείας για μεταστατική νόσο θα αναπτύξει de novo ή επίκτητη αντίσταση. Αν και τα τελευταία χρόνια, νέοι φαρμακευτικοί παράγοντες έχουν προστεθεί στη θεραπευτική φαρέτρα, ωστόσο, η ανάπτυξη αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία παραμένει μία εξαιρετικά δύσκολη κλινική πρόκληση.

Το φαινόμενο της ανάπτυξης αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία εμπλέκει ένα πλήθος μοριακών μηχανισμών, που άλλοι εξ αυτών είναι περισσότερο και άλλοι λιγότερο κατανοητοί και μελετημένοι. Μέχρι τώρα, παράγοντες που επηρεάζουν την οδό σηματοδότησης των ER και PR, η ενεργοποίηση παράλληλων μονοπατιών υποδοχέων τυροσινικής κινάσης, οι ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες, η τροποποίηση της δραστηριότητας των βλαστικών κυττάρων είναι μερικοί μόνο από τους μηχανισμούς εκείνους που έχουν προταθεί για την ερμηνεία του φαινομένου της αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία.

Εκτός των παραπάνω μοριακών αλλαγών, τα τελευταία χρόνια, ένας διαρκώς αυξανόμενος αριθμός δεδομένων υποστηρίζουν τον σημαντικό ρόλο των επιγενετικών αλλαγών τόσο στην καρκινογένεση, όσο και στην ανάπτυξη της αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία του ΚΜ. Οι αλλαγές αυτές αφορούν διαφοροποιήσεις στη μεθυλίωση του DNA, σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών καθώς επίσης και σε αλλαγές στα ncRNAs. Οι αλλαγές αυτές έχει δειχθεί πως συμβάλλουν στην ετερογένεια της νόσου, τροποποιούν την κυτταρική πλαστικότητα και ευνοούν τον ογκογόνο επαναπρογραμματισμό των καρκινικών κυττάρων, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της αυτοανανεωτικής τους ιδιότητας και την αύξηση του μεταστατικού τους δυναμικού.

Από την παρουσίαση των δεδομένων στην παρούσα διπλωματική εργασία καθίσταται φανερό πως οι επιγενετικές αλλαγές είναι από τους σημαντικότερους παράγοντες για την ανάπτυξη αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία. Ειδικότερα, η ευαισθησία του ΚΜ στην ενδοκρινική θεραπεία έχει σχετισθεί με την μεθυλίωση του DNA σε διάφορα γονίδια, όπως επίσης και στους ενισχυτές των γονιδίων που ρυθμίζονται από τα οιστρογόνα. Ένας ακόμη επιγενετικός μηχανισμός που επηρεάζει

την έκφραση του ER και τη σχετιζόμενη με αυτόν ενδοκρινική αντίσταση είναι η τροποποίηση των ιστονών, ενώ μεταλλάξεις ή πολυμορφισμοί των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα που εμπλέκονται στην επιγενετική ρύθμιση συχνά έχουν επίσης ενοχοποιηθεί για την αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία. Αν και πιο περιορισμένα, τα δεδομένα υποστηρίζουν επίσης το ρόλο των ncRNAs όχι μόνο στην παθογένεια και την ανάπτυξη του ΚΜ, αλλά και στην ανάπτυξη αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία.

Είναι βέβαιο πως η καλύτερη κατανόηση της βιολογίας της νόσου και κυρίως των υποκείμενων μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία θα επιτρέψει την επιτυχέστερη στόχευση και συνάμα την αποτελεσματικότερη θεραπευτική παρέμβαση, που θα οδηγήσει σε βελτίωση της κλινικής έκβασης των ασθενών με ορμονοεξαρτώμενο ΚΜ.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Momenimovahed, Z. & Salehiniya, H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer: Targets and Therapy* vol. 11 151–164 (2019).
2. Harbeck, N. *et al.* Breast cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **5**, 1–31 (2019).
3. Dai, X., Xiang, L., Li, T. & Bai, Z. Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. *Journal of Cancer* vol. 7 1281–1294 (2016).
4. Lurie, R. H. *et al.* *NCCN Guidelines Version 5.2020 Breast Cancer.* (2020).
5. Cardoso, F., Kataja, V. & Tjan-heijnen, V. *Breast cancer - Essentials for Clinicians.* (2019).
6. Hanker, A. B., Sudhan, D. R. & Arteaga, C. L. Overcoming Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Cancer Cell* vol. 37 496–513 (2020).
7. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
8. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European Journal of Cancer* vol. 103 356–387 (2018).
9. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2020. *CA. Cancer J. Clin.* **70**, 7–30 (2020).
10. Bray, F. *et al.* Cancer Incidence in Five Continents: Inclusion criteria, highlights from Volume X and the global status of cancer registration. *Int. J. Cancer* **137**, 2060–2071 (2015).
11. DeSantis, C. E. *et al.* Breast cancer statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* **69**, 438–451 (2019).
12. Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M. & Jemal, A. Global cancer incidence and mortality rates and trends - An update. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* vol. 25 16–27 (2016).
13. Narod, S. A., Iqbal, J. & Miller, A. B. Why have breast cancer mortality rates declined? *J. Cancer Policy* **5**, 8–17 (2015).
14. DeSantis, C. E. *et al.* International variation in female breast cancer incidence and mortality rates. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **24**, 1495–1506 (2015).
15. Huang, Z. *et al.* Breast cancer incidence and mortality: Trends over 40 years among women in Shanghai, China. *Ann. Oncol.* **27**, 1129–1134 (2016).
16. Ginsburg, O. *et al.* The global burden of women’s cancers: a grand challenge in global health. *The Lancet* vol. 389 847–860 (2017).
17. Allemani, C. *et al.* Global surveillance of cancer survival 1995-2009: Analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet* **385**, 977–1010 (2015).

18. Leong, S. P. L. *et al.* Is Breast cancer the same disease in Asian and Western countries? *World J. Surg.* **34**, 2308–2324 (2010).
19. Li, C. I., Malone, K. E. & Daling, J. R. Differences in breast cancer hormone receptor status and histology by race and ethnicity among women 50 years of age and older. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **11**, 601–607 (2002).
20. Agarwal, G., Pradeep, P. V., Aggarwal, V., Yip, C. H. & Cheung, P. S. Y. Spectrum of breast cancer in Asian women. *World J. Surg.* **31**, 1031–1040 (2007).
21. Kohler, B. A. *et al.* Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **107**, 36–38 (2015).
22. DeSantis, C. E. *et al.* Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. *CA. Cancer J. Clin.* **66**, 31–42 (2016).
23. DeSantis, C. E., Ma, J., Goding Sauer, A., Newman, L. A. & Jemal, A. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state. *CA. Cancer J. Clin.* **67**, 439–448 (2017).
24. Hu, K. *et al.* Global patterns and trends in the breast cancer incidence and mortality according to sociodemographic indices: An observational study based on the global burden of diseases. *BMJ Open* **9**, 28461 (2019).
25. Ren, J. X., Gong, Y., Ling, H., Hu, X. & Shao, Z. M. Racial/ethnic differences in the outcomes of patients with metastatic breast cancer: contributions of demographic, socioeconomic, tumor and metastatic characteristics. *Breast Cancer Res. Treat.* **173**, 225–237 (2019).
26. Vuong, D., Simpson, P. T., Green, B., Cummings, M. C. & Lakhani, S. R. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Archiv* vol. 465 1–14 (2014).
27. Tsang, J. Y. S. & Tse, G. M. Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances in Anatomic Pathology* vol. 27 27–35 (2020).
28. Hammond, M. E. H. *et al.* American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* vol. 28 2784–2795 (2010).
29. Slamon, D. J. *et al.* Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science (80-. )*. **235**, 182–191 (1987).
30. Wolff, A. C. *et al.* Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American society of clinical oncology/ college of American pathologists clinical practice guideline focused update. *J. Clin. Oncol.* **36**, 2105–2122 (2018).
31. Rakha, E. A. & Green, A. R. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. *Pathology* **49**, 111–119 (2017).
32. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).

33. Voduc, K. D. *et al.* Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1684–1691 (2010).
34. Badve, S. *et al.* Basal-like and triple-negative breast cancers: A critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology* vol. 24 157–167 (2011).
35. Feng, Y. *et al.* Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes and Diseases* vol. 5 77–106 (2018).
36. Greaves, M. & Maley, C. C. Clonal evolution in cancer. *Nature* vol. 481 306–313 (2012).
37. Vermeulen, L., Sprick, M. R., Kemper, K., Stassi, G. & Medema, J. P. Cancer stem cells - Old concepts, new insights. *Cell Death and Differentiation* vol. 15 947–958 (2008).
38. Rivenbark, A. G., O'Connor, S. M. & Coleman, W. B. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: Challenges for personalized medicine. *American Journal of Pathology* vol. 183 1113–1124 (2013).
39. Ellis, M. J. *et al.* Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature* **486**, 353–360 (2012).
40. Lopez-Garcia, M. A., Geyer, F. C., Lacroix-Triki, M., Marchió, C. & Reis-Filho, J. S. Breast cancer precursors revisited: Molecular features and progression pathways. *Histopathology* vol. 57 171–192 (2010).
41. Nik-Zainal, S. *et al.* Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature* **534**, 47–54 (2016).
42. Bareche, Y. *et al.* Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. *Ann. Oncol.* **29**, 895–902 (2018).
43. Lehmann, B. D. *et al.* Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One* **11**, e0157368 (2016).
44. Ediriweera, M. K., Tennekoon, K. H. & Samarakoon, S. R. Emerging role of histone deacetylase inhibitors as anti-breast-cancer agents. *Drug Discovery Today* vol. 24 685–702 (2019).
45. The Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. Endogenous Sex Hormones and Breast Cancer in Postmenopausal Women: Reanalysis of Nine Prospective Studies. *J Natl Cancer Inst* **94**, 606–616 (2002).
46. A. Heather Eliassen, Stacey A. Missmer, Shelley S. Tworoger, Donna Spiegelman, Robert L. Barbieri, Mitch Dowsett, S. E. H. Endogenous Steroid Hormone Concentrations and Risk of Breast Cancer Among Premenopausal Women | JNCI: Journal of the National Cancer Institute | Oxford Academic. *NCI J. Natl. Cancer Institute*, **98**, 1406–1415 (2006).
47. Carroll, J. S., Hickey, T. E., Tarulli, G. A., Williams, M. & Tilley, W. D. Deciphering the divergent roles of progestogens in breast cancer. *Nature*

- Reviews Cancer* vol. 17 54–64 (2017).
48. Germain, D. Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* vol. 40 473–484 (2011).
  49. JENSEN, E. V. On the mechanism of estrogen action. *Perspect. Biol. Med.* **6**, 47–59 (1962).
  50. Walter, P. *et al.* Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 7889–7893 (1985).
  51. Greene, G. L. *et al.* Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science (80-. )*. **231**, 1150–1154 (1986).
  52. Greene, G. L. & Press, M. F. Structure and dynamics of the estrogen receptor. *J. Steroid Biochem.* **24**, 1–7 (1986).
  53. Green, S., Kumar, V., Krust, A., Walter, P. & Chambon, P. Structural and functional domains of the estrogen receptor. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**, 751–758 (1986).
  54. Tremblay, G. B. *et al.* Cloning, Chromosomal Localization, and Functional Analysis of the Murine Estrogen Receptor  $\beta$ . *Mol. Endocrinol.* **11**, 353–365 (1997).
  55. Mosselman, S., Polman, J. & Dijkema, R. ER $\beta$ : Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* **392**, 49–53 (1996).
  56. Liang, J. & Shang, Y. Estrogen and Cancer. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 225–240 (2013).
  57. Eliassen, A. H. & Hankinson, S. E. Endogenous hormone levels and risk of breast, endometrial and ovarian cancers: Prospective studies. *Adv. Exp. Med. Biol.* **630**, 148–165 (2008).
  58. Auchus, M. L. & Auchus, R. J. *Human steroid biosynthesis for the oncologist. Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* vol. 60 /pmc/articles/PMC3653186/?report=abstract (2012).
  59. Watson, C. S., Jeng, Y. & Kochukov, M. Y. Nongenomic actions of estradiol compared with estrone and estriol in pituitary tumor cell signaling and proliferation. *FASEB J.* **22**, 3328–3336 (2008).
  60. Miller, W. L. & Auchus, R. J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr. Rev.* **32**, 81–151 (2011).
  61. Cleary, M. P. & Grossmann, M. E. Minireview: Obesity and breast cancer: The estrogen connection. *Endocrinology* vol. 150 2537–2542 (2009).
  62. Pistelli, M., Della Mora, A., Ballatore, Z. & Berardi, R. Aromatase inhibitors in premenopausal women with breast cancer: The state of the art and future prospects. *Current Oncology* vol. 25 e168–e175 (2018).
  63. Thomas, C. & Gustafsson, J. Å. The different roles of ER subtypes in cancer

- biology and therapy. *Nature Reviews Cancer* vol. 11 597–608 (2011).
64. Nilsson, S., Koehler, K. F. & Gustafsson, J. Å. Development of subtype-selective oestrogen receptor-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 10 778–792 (2011).
  65. Kuiper, G. G. J. M., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. & Gustafsson, J. Å. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 5925–5930 (1996).
  66. Musgrove, E. A. & Sutherland, R. L. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nature Reviews Cancer* vol. 9 631–643 (2009).
  67. Leong, H., Riby, J. E., Firestone, G. L. & Bjeldanes, L. F. Potent Ligand-Independent Estrogen Receptor Activation by 3,3'-Diindolylmethane Is Mediated by Cross Talk between the Protein Kinase A and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways. *Mol. Endocrinol.* **18**, 291–302 (2004).
  68. Stender, J. D. *et al.* Genome-Wide Analysis of Estrogen Receptor  $\alpha$  DNA Binding and Tethering Mechanisms Identifies Runx1 as a Novel Tethering Factor in Receptor-Mediated Transcriptional Activation. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 3943–3955 (2010).
  69. Jerry, D. J., Dunphy, K. A. & Hagen, M. J. Estrogens, regulation of p53 and breast cancer risk: A balancing act. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 67 1017–1023 (2010).
  70. Dupont, S. *et al.* Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and  $\beta$  (ER $\beta$ ) on mouse reproductive phenotypes. *Development* **127**, 4277–4291 (2000).
  71. Förster, C. *et al.* Involvement of estrogen receptor  $\beta$  in terminal differentiation of mammary gland epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 15578–15583 (2002).
  72. Imamov, O., Lopatkin, N. A. & Gustafsson, J. A. Estrogen receptor  $\beta$  in prostate cancer [5]. *New England Journal of Medicine* vol. 351 2773–2774 (2004).
  73. Antal, M. C., Krust, A., Chambon, P. & Mark, M. Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ER $\beta$ -null mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 2433–2438 (2008).
  74. Heldring, N. *et al.* Estrogen receptors: How do they signal and what are their targets. *Physiological Reviews* vol. 87 905–931 (2007).
  75. Jordan, V. C. & O'Malley, B. W. Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* vol. 25 5815–5824 (2007).
  76. Chen, H. *et al.* Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* **90**, 569–580 (1997).
  77. Spencer, T. E. *et al.* Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* **389**, 194–198 (1997).

78. Liang, J., Zhang, H., Zhang, Y., Zhang, Y. & Shang, Y. GAS, a new glutamate-rich protein, interacts differentially with SRCs and is involved in oestrogen receptor function. *EMBO Rep.* **10**, 51–57 (2009).
79. Le Romancer, M. *et al.* Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr. Rev.* **32**, 597–622 (2011).
80. Bunone, G., Briand, P. A., Miksicek, R. J. & Picard, D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J.* **15**, 2174–2183 (1996).
81. Tsai, H. W., Katzenellenbogen, J. A., Katzenellenbogen, B. S. & Shupnik, M. A. Protein kinase A activation of estrogen receptor  $\alpha$  transcription does not require proteasome activity and protects the receptor from ligand-mediated degradation. *Endocrinology* **145**, 2730–2738 (2004).
82. Wang, C. *et al.* Direct Acetylation of the Estrogen Receptor  $\alpha$  Hinge Region by p300 Regulates Transactivation and Hormone Sensitivity. *J. Biol. Chem.* **276**, 18375–18383 (2001).
83. Berry, N. B., Fan, M. & Nephew, K. P. Estrogen receptor- $\alpha$  hinge-region lysines 302 and 303 regulate receptor degradation by the proteasome. *Mol. Endocrinol.* **22**, 1535–1551 (2008).
84. Anzick, S. L. *et al.* AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* (80-. ). **277**, 965–968 (1997).
85. Murphy, L. C. *et al.* Altered expression of estrogen receptor coregulators during human breast tumorigenesis. *Cancer Res.* **60**, 6266–6271 (2000).
86. Montano, M. M. *et al.* An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6947–6952 (1999).
87. Mussi, P. *et al.* Haploinsufficiency of the corepressor of estrogen receptor activity (REA) enhances estrogen receptor function in the mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16716–16721 (2006).
88. Neuman, E. *et al.* Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5338–5347 (1997).
89. Zwijssen, R. M. L. *et al.* CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* **88**, 405–415 (1997).
90. Fuqua, S. A. *et al.* A hypersensitive estrogen receptor- $\alpha$  mutation in premalignant breast lesions. *Cancer Res.* **60**, 4026–9 (2000).
91. Spoerke, J. M. *et al.* Heterogeneity and clinical significance of ESR1 mutations in ER-positive metastatic breast cancer patients receiving fulvestrant. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
92. Jeselsohn, R. *et al.* Emergence of constitutively active estrogen receptor- $\alpha$  mutations in pretreated advanced estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **20**, 1757–1767 (2014).
93. Katzenellenbogen, J. A., Mayne, C. G., Katzenellenbogen, B. S., Greene, G. L. & Chandralapaty, S. Structural underpinnings of oestrogen receptor mutations



- in endocrine therapy resistance. *Nature Reviews Cancer* vol. 18 377–388 (2018).
94. Levin, E. R. & Pietras, R. J. Estrogen receptors outside the nucleus in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **108**, 351–361 (2008).
  95. Kunisue, H. *et al.* Anti-HER2 antibody enhances the growth inhibitory effect of anti-oestrogen on breast cancer cells expressing both oestrogen receptors and HER2. *Br. J. Cancer* **82**, 46–51 (2000).
  96. Trabert, B., Sherman, M. E., Kannan, N. & Stanczyk, F. Z. Progesterone and Breast Cancer. *Endocr. Rev.* **41**, 320–344 (2020).
  97. Edwards, D. P. REGULATION OF SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS BY ESTROGEN AND PROGESTERONE. *Annu. Rev. Physiol.* **67**, 335–376 (2005).
  98. Banks, E. *et al.* Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* **362**, 419–427 (2003).
  99. Chlebowski, R. T. *et al.* Influence of Estrogen Plus Progestin on Breast Cancer and Mammography in Healthy Postmenopausal Women: The Women’s Health Initiative Randomized Trial. *J. Am. Med. Assoc.* **289**, 3243–3253 (2003).
  100. Obr, A. E. & Edwards, D. P. The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* **357**, 4–17 (2012).
  101. Stingl, J. Estrogen and Progesterone in Normal Mammary Gland Development and in Cancer. *Horm. Cancer* **2**, 85–90 (2011).
  102. Quong, J. *et al.* Age-dependent changes in breast cancer hormone receptors and oxidant stress markers. *Breast Cancer Res. Treat.* **76**, 221–236 (2002).
  103. Mohammed, H. *et al.* Progesterone receptor modulates ER $\alpha$  action in breast cancer. *Nature* **523**, 313–317 (2015).
  104. Bines, J. *et al.* Activity of megestrol acetate in postmenopausal women with advanced breast cancer after nonsteroidal aromatase inhibitor failure: A phase ii trial. *Ann. Oncol.* **25**, 831–836 (2014).
  105. Selli, C. & Sims, A. H. Neoadjuvant Therapy for Breast Cancer as a Model for Translational Research. *Breast Cancer Basic Clin. Res.* **13**, 117822341982907 (2019).
  106. Patel, H. K. & Bihani, T. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment. *Pharmacology and Therapeutics* vol. 186 1–24 (2018).
  107. Razavi, P. *et al.* The Genomic Landscape of Endocrine-Resistant Advanced Breast Cancers. *Cancer Cell* **34**, 427–438.e6 (2018).
  108. Nilsson, S. & Koehler, K. F. Oestrogen receptors and selective oestrogen receptor modulators: Molecular and cellular pharmacology. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **96**, 15–25 (2005).
  109. Jordan, V. C. Tamoxifen: Catalyst for the change to targeted therapy. *Eur. J.*

- Cancer* **44**, 30–38 (2008).
110. Claro de Souza, M., Marotta-Oliveira, S. S., Rocha, N. H. S., Eloy, J. O. & Marchetti, J. M. Development of a Method to Evaluate the Release Profile of Tamoxifen from Pegylated Hybrid Micelles. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **38**, 1223–1229 (2015).
  111. Harper, M. J. & Walpole, A. L. A new derivative of triphenylethylene: effect on implantation and mode of action in rats. *J. Reprod. Fertil.* **13**, 101–119 (1967).
  112. Davies, C. *et al.* Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet* **381**, 805–816 (2013).
  113. Gottardis, M. M., Robinson, S. P., Satyaswaroop, P. G. & Jordan, V. C. Contrasting Actions of Tamoxifen on Endometrial and Breast Tumor Growth in the Athymic Mouse. *Cancer Res.* **48**, 812–815 (1988).
  114. Brazier, E. J. *et al.* Fulvestrant: From the laboratory to commercial-scale manufacture. *Org. Process Res. Dev.* **14**, 544–552 (2010).
  115. McDonnell, D. P., Wardell, S. E. & Norris, J. D. Oral Selective Estrogen Receptor Downregulators (SERDs), a Breakthrough Endocrine Therapy for Breast Cancer. *J. Med. Chem.* **58**, 4883–4887 (2015).
  116. Wakeling, A. E. & Bowler, J. Novel antioestrogens without partial agonist activity. *J. Steroid Biochem.* **31**, 645–653 (1988).
  117. Chen, D., Pace, P. E., Coombes, R. C. & Ali, S. Phosphorylation of Human Estrogen Receptor  $\alpha$  by Protein Kinase A Regulates Dimerization. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1002–1015 (1999).
  118. Howell, A., DeFriend, D. J., Blamey, R. W., Robertson, J. F. & Walton, P. Response to a specific antioestrogen (ICI 182780) in tamoxifen-resistant breast cancer. *Lancet* **345**, 29–30 (1995).
  119. Li, J., Wang, Z. & Shao, Z. Fulvestrant in the treatment of hormone receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer: A review. *Cancer Med.* **8**, 1943–1957 (2019).
  120. Hamadeh, I. S., Patel, J. N., Rusin, S. & Tan, A. R. Personalizing aromatase inhibitor therapy in patients with breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* **70**, 47–55 (2018).
  121. Johnston, S. R. D. & Dowsett, M. Aromatase inhibitors for breast cancer: Lessons from the laboratory. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 821–831 (2003).
  122. Cardoso, F. *et al.* Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **30**, 1194–1220 (2019).
  123. McLaughlin, S. A. Surgical Management of the Breast. Breast Conservation Therapy and Mastectomy. *Surg. Clin. North Am.* **93**, 411–428 (2013).
  124. Margenthaler, J. A. & Ollila, D. W. Breast Conservation Therapy Versus Mastectomy: Shared Decision-Making Strategies and Overcoming Decisional Conflicts in Your Patients. *Ann. Surg. Oncol.* **23**, 3133–3137 (2016).

125. Vila, J., Gandini, S. & Gentilini, O. Overall survival according to type of surgery in young ( $\leq 40$  years) early breast cancer patients: A systematic meta-analysis comparing breast-conserving surgery versus mastectomy. *Breast* **24**, 175–181 (2015).
126. Veronesi, U. *et al.* A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **349**, 546–553 (2003).
127. Giuliano, A. E. *et al.* Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: Long-term follow-up from the American college of surgeons oncology group (Alliance) ACOSOG Z0011 randomized t. *Ann. Surg.* **264**, 413–419 (2016).
128. Darby, S. *et al.* Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: Meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials. *Lancet* **378**, 1707–1716 (2011).
129. McGale, P. *et al.* Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: Meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *Lancet* **383**, 2127–2135 (2014).
130. Bartelink, H. *et al.* Whole-breast irradiation with or without a boost for patients treated with breast-conserving surgery for early breast cancer: 20-year follow-up of a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **16**, 47–56 (2015).
131. Whelan, T. J. *et al.* Regional nodal irradiation in early-stage breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **373**, 307–316 (2015).
132. Albain, K. *et al.* Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: Meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *Lancet* **379**, 432–444 (2012).
133. Abe, O. *et al.* Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: Patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* **378**, 771–784 (2011).
134. Francis, P. A. *et al.* Tailoring Adjuvant Endocrine Therapy for Premenopausal Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **379**, 122–137 (2018).
135. Gnant, M. *et al.* Zoledronic acid combined with adjuvant endocrine therapy of tamoxifen versus anastrozol plus ovarian function suppression in premenopausal early breast cancer: Final analysis of the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group Trial 12. *Ann. Oncol.* **26**, 313–320 (2015).
136. Bradley, R. *et al.* Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: Patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet* **386**, 1341–1352 (2015).
137. Gray, R. *et al.* Increasing the dose intensity of chemotherapy by more frequent administration or sequential scheduling: a patient-level meta-analysis of 37 298 women with early breast cancer in 26 randomised trials. *Lancet* **393**, 1440–1452 (2019).

138. Rugo, H. S. *et al.* Endocrine therapy for hormone receptor-positive metastatic breast cancer: American society of clinical oncology guideline. *J. Clin. Oncol.* **34**, 3069–3103 (2016).
139. Cardoso, F. *et al.* 4th ESO–ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4). *Ann. Oncol.* **29**, 1634–1657 (2018).
140. Haque, M. M. & Desai, K. V. Pathways to Endocrine Therapy Resistance in Breast Cancer. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **10**, 573 (2019).
141. Rani, A., Stebbing, J., Giamas, G. & Murphy, J. Endocrine resistance in hormone receptor positive breast cancer—from mechanism to therapy. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **10**, 245 (2019).
142. Hanker, A. B., Sudhan, D. R. & Arteaga, C. L. Overcoming Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Cancer Cell* **37**, 496–513 (2020).
143. Zhao, M. B. R. Mechanisms and therapeutic advances in the management of endocrine-resistant breast cancer. *World J. Clin. Oncol.* **5**, 248 (2014).
144. Hoskins, J. M., Carey, L. A. & McLeod, H. L. CYP2D6 and tamoxifen: DNA matters in breast cancer. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 576–586 (2009).
145. Johnston, S. R. D. *et al.* Changes in Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and pS2 Expression in Tamoxifen-resistant Human Breast Cancer. *Cancer Res.* **55**, 3331–3338 (1995).
146. Gutierrez, M. C. *et al.* Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: Relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Clin. Oncol.* **23**, 2469–2476 (2005).
147. Jeselsohn, R. *et al.* Emergence of constitutively active estrogen receptor- $\alpha$  mutations in pretreated advanced estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **20**, 1757–1767 (2014).
148. Merenbakh-Lamin, K. *et al.* D538G mutation in estrogen receptor- $\alpha$ : A novel mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Cancer Res.* **73**, 6856–6864 (2013).
149. Robinson, D. R. *et al.* Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat. Genet.* **45**, 1446–1451 (2013).
150. Toy, W. *et al.* ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat. Genet.* **45**, 1439–1445 (2013).
151. Fuqua, S. A. W., Allred, D. C. & Auchus, R. J. Expression of estrogen receptor variants. *J. Cell. Biochem.* **53**, 194–197 (1993).
152. Giltneane, J. M. *et al.* Genomic profiling of ER+ breast cancers after short-term estrogen suppression reveals alterations associated with endocrine resistance. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
153. Jeselsohn, R., Buchwalter, G., De Angelis, C., Brown, M. & Schiff, R. ESR1 mutations—a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **12**, 573–583 (2015).
154. Fuqua, S. A. W. *et al.* A Hypersensitive Estrogen Receptor- $\alpha$  Mutation in

- Premalignant breast Lesions1. *Cancer Res.* **60**, 4026–4029 (2000).
155. Li, S. *et al.* Endocrine-Therapy-Resistant ESR1 Variants Revealed by Genomic Characterization of Breast-Cancer-Derived Xenografts. *Cell Rep.* **4**, 1116–1130 (2013).
  156. Chandarlapaty, S. *et al.* Prevalence of ESR1 Mutations in Cell-Free DNA and Outcomes in Metastatic Breast Cancer: A Secondary Analysis of the BOLERO-2 Clinical Trial. *JAMA Oncol.* **2**, 1310–1315 (2016).
  157. Fribbens, C. *et al.* Plasma ESR1 Mutations and the treatment of estrogen receptor-Positive advanced breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **34**, 2961–2968 (2016).
  158. Takeshita, T. *et al.* Clinical significance of monitoring ESR1 mutations in circulating cell-free DNA in estrogen receptor positive breast cancer patients. *Oncotarget* **7**, 32504–32518 (2016).
  159. Brisken, C. Progesterone signalling in breast cancer: A neglected hormone coming into the limelight. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 385–396 (2013).
  160. Faivre, E. J., Daniel, A. R., Hillard, C. J. & Lange, C. A. Progesterone Receptor Rapid Signaling Mediates Serine 345 Phosphorylation and Tethering to Specificity Protein 1 Transcription Factors. *Mol. Endocrinol.* **22**, 823–837 (2008).
  161. Branković-Magić, M., Janković, R., Nešković-Konstantinović, Z. & Nikolić-Vukosavljević, D. Progesterone receptor status of breast cancer metastases. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **128**, 55–60 (2002).
  162. Arpino, G. *et al.* Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: Association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 1254–1261 (2005).
  163. Tomiguchi, M. *et al.* Fibroblast growth factor receptor-1 protein expression is associated with prognosis in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor-2-negative primary breast cancer. *Cancer Sci.* **107**, 491–498 (2016).
  164. Templeton, A. J. *et al.* Prognostic relevance of receptor tyrosine kinase expression in breast cancer: A meta-analysis. *Cancer Treat. Rev.* **40**, 1048–1055 (2014).
  165. He, M. & Wei, M. J. Reversing multidrug resistance by tyrosine kinase inhibitors. *Chin. J. Cancer* **31**, 126–133 (2012).
  166. Linggi, B. & Carpenter, G. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol.* **16**, 649–656 (2006).
  167. Sørli, T. Molecular portraits of breast cancer: Tumour subtypes as distinct disease entities. *Eur. J. Cancer* **40**, 2667–2675 (2004).
  168. Creighton, C. J. *et al.* Development of resistance to targeted therapies transforms the clinically associated molecular profile subtype of breast tumor xenografts. *Cancer Res.* **68**, 7493–7501 (2008).
  169. Gutierrez, M. C. *et al.* Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer:

- Relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Clin. Oncol.* **23**, 2469–2476 (2005).
170. Kaufman, B. *et al.* Trastuzumab plus anastrozole versus anastrozole alone for the treatment of postmenopausal women with human epidermal growth factor receptor 2-positive, hormone receptor-positive metastatic breast cancer: Results from the randomized phase III TAnDEM study. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5529–5537 (2009).
  171. Kurokawa, H. *et al.* Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer Res.* **60**, 5887–5894 (2000).
  172. Leary, A. F. *et al.* Lapatinib restores hormone sensitivity with differential effects on estrogen receptor signaling in cell models of human epidermal growth factor receptor 2-negative breast cancer with acquired endocrine resistance. *Clin. Cancer Res.* **16**, 1486–1497 (2010).
  173. Osborne, C. K. *et al.* Gefitinib or placebo in combination with tamoxifen in patients with hormone receptor-positive metastatic breast cancer: A randomized phase II study. *Clin. Cancer Res.* **17**, 1147–1159 (2011).
  174. Cristofanilli, M. *et al.* Phase II, randomized trial to compare anastrozole combined with gefitinib or placebo in postmenopausal women with hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **16**, 1904–1914 (2010).
  175. Razavi, P. *et al.* The Genomic Landscape of Endocrine-Resistant Advanced Breast Cancers. *Cancer Cell* **34**, 427-438.e6 (2018).
  176. Nayar, U. *et al.* Acquired HER2 mutations in ER + metastatic breast cancer confer resistance to estrogen receptor-directed therapies. *Nat. Genet.* **51**, 207–216 (2019).
  177. Croessmann, S. *et al.* Combined blockade of activating ERBB2 mutations and ER results in synthetic lethality of ERp/HER2 mutant breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **25**, 277–289 (2019).
  178. Kurmasheva, R. T. & Houghton, P. J. IGF-I mediated survival pathways in normal and malignant cells. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1766**, 1–22 (2006).
  179. Knowlden, J. M., Hutcheson, I. R., Barrow, D., Gee, J. M. W. & Nicholson, R. I. Insulin-like growth factor-I receptor signaling in tamoxifen-resistant breast cancer: A supporting role to the epidermal growth factor receptor. *Endocrinology* **146**, 4609–4618 (2005).
  180. Wiseman, L. R. *et al.* Type I IGF receptor and acquired tamoxifen resistance in oestrogen-responsive human breast cancer cells. *Eur. J. Cancer* **29**, 2256–2264 (1993).
  181. Hankinson, S. E. *et al.* Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* **351**, 1393–1396 (1998).
  182. Wagner, K. *et al.* Polymorphisms in the IGF-1 and IGFBP3 promoter and the risk of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **92**, 133–140 (2005).

183. Yu, H. *et al.* Polymorphic CA repeats in the IGF-I gene and breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **70**, 117–122 (2001).
184. Campbell, R. A. *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor  $\alpha$ : A new model for anti-estrogen resistance. *J. Biol. Chem.* **276**, 9817–9824 (2001).
185. Bartella, V., De Marco, P., Malaguarnera, R., Belfiore, A. & Maggiolini, M. New advances on the functional cross-talk between insulin-like growth factor-I and estrogen signaling in cancer. *Cell. Signal.* **24**, 1515–1521 (2012).
186. Lee, A. V., Weng, C. N., Jackson, J. G. & Yee, D. Activation of estrogen receptor-mediated gene transcription by IGF-I in human breast cancer cells. *J. Endocrinol.* **152**, 39–47 (1997).
187. Creighton, C. J. *et al.* Insulin-like growth factor-I activates gene transcription programs strongly associated with poor breast cancer prognosis. *J. Clin. Oncol.* **26**, 4078–4085 (2008).
188. Chong, K. Y. M., Subramanian, A., Sharma, A. & Mokbel, K. Measuring IGF-1, ER- $\alpha$  and EGFR expression can predict tamoxifen-resistance in ER-positive breast cancer. *Anticancer Res.* **31**, 23–32 (2011).
189. Fox, E. M. *et al.* A kinome-wide screen identifies the insulin/IGF-I receptor pathway as a mechanism of escape from hormone dependence in breast cancer. *Cancer Res.* **71**, 6773–6784 (2011).
190. Fagan, D. H., Uselman, R. R., Sachdev, D. & Yee, D. Acquired resistance to tamoxifen is associated with loss of the type I insulin-like growth factor receptor: Implications for breast cancer treatment. *Cancer Res.* **72**, 3372–3380 (2012).
191. Turner, N. & Grose, R. Fibroblast growth factor signalling: From development to cancer. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 116–129 (2010).
192. Formisano, L. *et al.* Association of FGFR1 with ER $\alpha$  maintains ligand-independent ER transcription and mediates resistance to estrogen deprivation in ER+ breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **23**, 6138–6151 (2017).
193. Kwek, S. S. *et al.* Co-amplified genes at 8p12 and 11q13 in breast tumors cooperate with two major pathways in oncogenesis. *Oncogene* **28**, 1892–1903 (2009).
194. Dienstmann, R. *et al.* Genomic aberrations in the FGFR pathway: Opportunities for targeted therapies in solid tumors. *Ann. Oncol.* **25**, 552–563 (2014).
195. Reis-Filho, J. S. *et al.* FGFR1 emerges as a potential therapeutic target for lobular breast carcinomas. *Clin. Cancer Res.* **12**, 6652–6662 (2006).
196. Dey, N., Williams, C., Leyland-Jones, B. & De, P. Mutation matters in precision medicine: A future to believe in. *Cancer Treat. Rev.* **55**, 136–149 (2017).
197. Turner, N. *et al.* FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res.* **70**, 2085–2094 (2010).

198. André, F. *et al.* Targeting FGFR with dovitinib (TKI258): Preclinical and clinical data in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **19**, 3693–3702 (2013).
199. Sobhani, N. *et al.* Current Status of Fibroblast Growth Factor Receptor-Targeted Therapies in Breast Cancer. *Cells* **7**, 76 (2018).
200. Helsten, T. *et al.* The FGFR landscape in cancer: Analysis of 4,853 tumors by next-generation sequencing. *Clin. Cancer Res.* **22**, 259–267 (2016).
201. Elsheikh, S. E. *et al.* FGFR1 amplification in breast carcinomas: A chromogenic in situ hybridisation analysis. *Breast Cancer Res.* **9**, R23 (2007).
202. Drago, J. Z. *et al.* FGFR gene amplification and response to endocrine therapy in metastatic hormone receptor positive (HR+) breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **35**, 1013–1013 (2017).
203. Racca, F. E. *et al.* Prognostic and therapeutic implications of fibroblast growth factor receptors (FGFRs) 1 and 2 gene amplifications in patients (pts) with advanced breast cancer (ABC). *J. Clin. Oncol.* **34**, 537–537 (2016).
204. Perez-Garcia, J., Muñoz-Couselo, E., Soberino, J., Racca, F. & Cortes, J. Targeting FGFR pathway in breast cancer. *Breast* **37**, 126–133 (2018).
205. Sahores, A. *et al.* Targeting FGFR with BGJ398 in Breast Cancer: Effect on Tumor Growth and Metastasis. *Curr. Cancer Drug Targets* **18**, 979–987 (2018).
206. Seckl, M. *et al.* RADICAL trial: A phase Ib/IIa study to assess the safety and efficacy of AZD4547 in combination with either anastrozole or letrozole in ER positive breast cancer patients progressing on these aromatase inhibitors (AIs). *J. Clin. Oncol.* **35**, 1059–1059 (2017).
207. Musolino, A. *et al.* Phase II, randomized, placebo-controlled study of dovitinib in combination with fulvestrant in postmenopausal patients with HR+, HER2-breast cancer that had progressed during or after prior endocrine therapy. *Breast Cancer Res.* **19**, 18 (2017).
208. Portman, N. *et al.* Overcoming CDK4/6 inhibitor resistance in ER-positive breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **26**, R15–R30 (2019).
209. Musgrove, E. A. & Sutherland, R. L. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 631–643 (2009).
210. Span, P. N., Tjan-Heijnen, V. C. G., Manders, P., Beex, L. V. A. M. & Sweep, C. G. J. Cyclin-E is a strong predictor of endocrine therapy failure in human breast cancer. *Oncogene* **22**, 4898–4904 (2003).
211. Butt, A. J., McNeil, C. M., Musgrove, E. A. & Sutherland, R. L. Downstream targets of growth factor and oestrogen signalling and endocrine resistance: The potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E. in *Endocrine-Related Cancer* vol. 12 S47–S59 (BioScientifica, 2005).
212. Mukherjee, S. & Conrad, S. E. C-Myc suppresses p21WAF1/CIP1 expression during estrogen signaling and antiestrogen resistance in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 17617–17625 (2005).
213. Chu, I. M., Hengst, L. & Slingerland, J. M. The Cdk inhibitor p27 in human



- cancer: Prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 253–267 (2008).
214. Pérez-Tenorio, G. *et al.* Cytoplasmic p21WAF1/CIP1 correlates with Akt activation and poor response to tamoxifen in breast cancer. *Int. J. Oncol.* **28**, 1031–1042 (2006).
  215. Miller, T. W. *et al.* ER $\alpha$ -dependent E2F transcription can mediate resistance to estrogen deprivation in human breast cancer. *Cancer Discov.* **1**, 338–351 (2011).
  216. Caldon, C. E., Daly, R. J., Sutherland, R. L. & Musgrove, E. A. Cell cycle control in breast cancer cells. *J. Cell. Biochem.* **97**, 261–274 (2006).
  217. Sherr, C. J. & Roberts, J. M. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **18**, 2699–2711 (2004).
  218. Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J. M. & Pagano, M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2612–2624 (1995).
  219. Ferguson, R. L. & Maller, J. L. Centrosomal Localization of Cyclin E-Cdk2 Is Required for Initiation of DNA Synthesis. *Curr. Biol.* **20**, 856–860 (2010).
  220. Polychronis, A. *et al.* Preoperative gefitinib versus gefitinib and anastrozole in postmenopausal patients with oestrogen-receptor positive and epidermal-growth-factor-receptor-positive primary breast cancer: A double-blind placebo-controlled phase II randomised trial. *Lancet Oncol.* **6**, 383–391 (2005).
  221. Lukas, J., Bartkova, J. & Bartek, J. Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G1 checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6917–6925 (1996).
  222. Koboldt, D. C. *et al.* Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61–70 (2012).
  223. Thangavel, C. *et al.* Therapeutically activating RB: Reestablishing cell cycle control in endocrine therapy-resistant breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **18**, 333–345 (2011).
  224. Guerrero-Zotano, A. L. *et al.* ER $\beta$  Breast cancers resistant to prolonged neoadjuvant letrozole exhibit an e2f4 transcriptional program sensitive to cdk4/6 inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **24**, 2517–2529 (2018).
  225. Formisano, L. *et al.* Abstract 1008: Gain-of-function kinase library screen identifies FGFR1 amplification as a mechanism of resistance to antiestrogens and CDK4/6 inhibitors in ER+ breast cancer. in *Cancer Research* vol. 77 1008–1008 (American Association for Cancer Research (AACR), 2017).
  226. Burris, H. A. Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: Focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **71**, 829–842 (2013).
  227. Gonzalez-Angulo, A. M. & Blumenschein, G. R. Defining biomarkers to predict sensitivity to PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* **39**, 313–320 (2013).

228. Hernandez-Aya, L. F. & Gonzalez-Angulo, A. M. Targeting the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway in Breast Cancer. *Oncologist* **16**, 404–414 (2011).
229. Fox, E. M., Arteaga, C. L. & Miller, T. W. Abrogating endocrine resistance by targeting ER $\alpha$  and PI3K in breast cancer. *Front. Oncol.* **2**, 145 (2012).
230. Zekas, E. & Prossnitz, E. R. Estrogen-mediated inactivation of FOXO3a by the G protein-coupled estrogen receptor GPER. *BMC Cancer* **15**, 702 (2015).
231. Fu, X., Osborne, C. K. & Schiff, R. Biology and therapeutic potential of PI3K signaling in ER+/HER2-negative breast cancer. *Breast* **22**, S12–S18 (2013).
232. Meric-Bernstam, F. & Gonzalez-Angulo, A. M. Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* **27**, 2278–2287 (2009).
233. Breuleux, M. *et al.* Increased AKT S473 phosphorylation after mTORC1 inhibition is rictor dependent and does not predict tumor cell response to PI3K/mTOR inhibition. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 742–753 (2009).
234. Baselga, J. *et al.* Phase II randomized study of neoadjuvant everolimus plus letrozole compared with placebo plus letrozole in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **27**, 2630–2637 (2009).
235. Baselga, J. *et al.* Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 520–529 (2012).
236. Farmer, H. *et al.* Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**, 917–921 (2005).
237. Bryant, H. E. *et al.* Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* **434**, 913–917 (2005).
238. Rouleau, M., Patel, A., Hendzel, M. J., Kaufmann, S. H. & Poirier, G. G. PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 293–301 (2010).
239. Tutt, A. *et al.* Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: The TNT Trial. *Nat. Med.* **24**, 628–637 (2018).
240. De Felice, F., Tombolini, V., Marampon, F., Musella, A. & Marchetti, C. Defective DNA repair mechanisms in prostate cancer: impact of olaparib. *Drug Des. Devel. Ther.* **Volume11**, 547–552 (2017).
241. Kristeleit, R. *et al.* A phase I–II study of the oral PARP inhibitor rucaparib in patients with germline BRCA1/2-mutated ovarian carcinoma or other solid tumors. *Clin. Cancer Res.* **23**, 4095–4106 (2017).
242. Robson, M. E. *et al.* OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician’s choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.* **30**, 558–566 (2019).
243. Ettl, J. *et al.* Quality of life with talazoparib versus physician’s choice of chemotherapy in patients with advanced breast cancer and germline BRCA1/2 mutation: Patient-reported outcomes from the EMBRACA phase III trial. *Ann. Oncol.* **29**, 1939–1947 (2018).

244. Chen, D. *et al.* Phosphorylation of human estrogen receptor  $\alpha$  at serine 118 by two distinct signal transduction pathways revealed by phosphorylation-specific antisera. *Oncogene* **21**, 4921–4931 (2002).
245. Driggers, P. H. & Segars, J. H. Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. Part II: The role of growth factors and phosphorylation in estrogen signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* **13**, 422–427 (2002).
246. Yue, W. *et al.* Activation of the MAPK Pathway Enhances Sensitivity of MCF-7 Breast Cancer Cells to the Mitogenic Effect of Estradiol. *Endocrinology* **143**, 3221–3229 (2002).
247. Britton, D. J. *et al.* Bidirectional cross talk between ER $\alpha$  and EGFR signalling pathways regulates tamoxifen-resistant growth. *Breast Cancer Res. Treat.* **96**, 131–146 (2006).
248. McGlynn, L. M. *et al.* Ras/Raf-1/MAPK pathway mediates response to tamoxifen but not chemotherapy in breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **15**, 1487–1495 (2009).
249. Shou, J. *et al.* Mechanisms of tamoxifen resistance: Increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 926–935 (2004).
250. Bayliss, J., Hilger, A., Vishnu, P., Diehl, K. & El-Ashry, D. Reversal of the estrogen receptor-negative phenotype in breast cancer and restoration of antiestrogen response. *Clin. Cancer Res.* **13**, 7029–7036 (2007).
251. Iorns, E. *et al.* Identification of CDK10 as an Important Determinant of Resistance to Endocrine Therapy for Breast Cancer. *Cancer Cell* **13**, 91–104 (2008).
252. Wallace, M. D. *et al.* Comparative oncogenomics implicates the neurofibromin 1 gene (NF1) as a breast cancer driver. *Genetics* **192**, 385–396 (2012).
253. Wang, X. *et al.* Breast cancer and other neoplasms in women with neurofibromatosis type 1: A retrospective review of cases in the Detroit metropolitan area. *Am. J. Med. Genet. Part A* **158A**, 3061–3064 (2012).
254. Sharif, S. *et al.* Women with neurofibromatosis 1 are at a moderately increased risk of developing breast cancer and should be considered for early screening. *J. Med. Genet.* **44**, 481–484 (2007).
255. Ogata, H., Sato, H., Takatsuka, J. & De Luca, L. M. Human breast cancer MDA-MB-231 cells fail to express the neurofibromin protein, lack its type I mRNA isoform and show accumulation of P-MAPK and activated Ras. *Cancer Lett.* **172**, 159–164 (2001).
256. Stephens, P. J. *et al.* The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature* **486**, 400–404 (2012).
257. Mendes-Pereira, A. M. *et al.* Genome-wide functional screen identifies a compendium of genes affecting sensitivity to tamoxifen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 2730–2735 (2012).
258. Razavi, P. *et al.* The Genomic Landscape of Endocrine-Resistant Advanced Breast Cancers. *Cancer Cell* **34**, 427–438.e6 (2018).

259. Li, Z. *et al.* Loss of the FAT1 Tumor Suppressor Promotes Resistance to CDK4/6 Inhibitors via the Hippo Pathway. *Cancer Cell* **34**, 893-905.e8 (2018).
260. Griffith, O. L. *et al.* The prognostic effects of somatic mutations in ER-positive breast cancer. *Nat. Commun.* **9**, 1–16 (2018).
261. Sokol, E. S. *et al.* Loss of function of NF1 is a mechanism of acquired resistance to endocrine therapy in lobular breast cancer. *Ann. Oncol.* **30**, 115–123 (2019).
262. Verbeek, B. S. *et al.* c-Src protein expression is increased in human breast cancer. An immunohistochemical and biochemical analysis. *J. Pathol.* **180**, 383–388 (1996).
263. Browne, A. L. *et al.* Network analysis of SRC-1 reveals a novel transcription factor hub which regulates endocrine resistant breast cancer. *Oncogene* **37**, 2008–2021 (2018).
264. Stashi, E., York, B. & O'Malley, B. W. Steroid receptor coactivators: Servants and masters for control of systems metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism* vol. 25 337–347 (2014).
265. McIlroy, M. *et al.* Interaction of developmental transcription factor HOX11 with steroid receptor coactivator SRC-1 mediates resistance to endocrine therapy in breast cancer. *Cancer Res.* **70**, 1585–1594 (2010).
266. Fleming, F. J. *et al.* Expression of SRC-1, AIB1, and PEA3 in HER2 mediated endocrine resistant breast cancer; A predictive role for SRC-1. *J. Clin. Pathol.* **57**, 1069–1074 (2004).
267. Hiscox, S. *et al.* Elevated Src activity promotes cellular invasion and motility in tamoxifen resistant breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **97**, 263–274 (2006).
268. Mayer, E. L. *et al.* A phase 2 trial of dasatinib in patients with advanced HER2-positive and/or hormone receptor-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **17**, 6897–6904 (2011).
269. Finn, R. S. Targeting Src in breast cancer. *Ann. Oncol.* **19**, 1379–1386 (2008).
270. Morgan, L. *et al.* Elevated Src kinase activity attenuates tamoxifen response in vitro and is associated with poor prognosis clinically. *Cancer Biol. Ther.* **8**, (2009).
271. Frame, M. C. Src in cancer: Deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1602**, 114–130 (2002).
272. Kim, L. C., Song, L. & Haura, E. B. Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 587–595 (2009).
273. Le Romancer, M. *et al.* Regulation of Estrogen Rapid Signaling through Arginine Methylation by PRMT1. *Mol. Cell* **31**, 212–221 (2008).
274. Manavathi, B., Acconcia, F., Rayala, S. K. & Kumar, R. An inherent role of microtubule network in the action of nuclear receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 15981–15986 (2006).

275. Vallabhaneni, S. *et al.* Significance of ER-Src axis in hormonal therapy resistance. *Breast Cancer Res. Treat.* **130**, 377–385 (2011).
276. Song, R. X. D., Zhang, Z. & Santen, R. J. Estrogen rapid action via protein complex formation involving ER $\alpha$  and Src. *Trends Endocrinol. Metab.* **16**, 347–353 (2005).
277. Cheskis, B. J. *et al.* MNAR plays an important role in ER $\alpha$  activation of Src/MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. *Steroids* **73**, 901–905 (2008).
278. Tian, M. & Schiemann, W. P. TGF- $\beta$  stimulation of EMT programs elicits non-genomic ER- $\alpha$  activity and anti-estrogen resistance in breast cancer cells. *J. Cancer Metastasis Treat.* **3**, 150 (2017).
279. Ali, S. & Coombes, R. C. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 101–112 (2002).
280. Castoria, G. *et al.* Tyrosine phosphorylation of estradiol receptor by Src regulates its hormone-dependent nuclear export and cell cycle progression in breast cancer cells. *Oncogene* **31**, 4868–4877 (2012).
281. Fan, P., Wang, J., Santen, R. J. & Yue, W. Long-term treatment with tamoxifen facilitates translocation of estrogen receptor  $\alpha$  out of the nucleus and enhances its interaction with EGFR in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.* **67**, 1352–1360 (2007).
282. Rani, A. & Murphy, J. J. STAT5 in Cancer and Immunity. *J. Interf. Cytokine Res.* **36**, 226–237 (2016).
283. Furth, P. A. STAT signaling in different breast cancer sub-types. *Mol. Cell. Endocrinol.* **382**, 612–615 (2014).
284. Litterst, C. M., Kliem, S., Marilley, D. & Pfitzner, E. NCoA-1/SRC-1 Is an Essential Coactivator of STAT5 That Binds to the FDL Motif in the  $\alpha$ -Helical Region of the STAT5 Transactivation Domain. *J. Biol. Chem.* **278**, 45340–45351 (2003).
285. Litterst, C. M. & Pfitzner, E. Transcriptional Activation by STAT6 Requires the Direct Interaction with NCoA-1. *J. Biol. Chem.* **276**, 45713–45721 (2001).
286. Clevenger, C. V. Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *Am. J. Pathol.* **165**, 1449–1460 (2004).
287. Yeh, Y.-T. *et al.* STAT3 ser727 phosphorylation and its association with negative estrogen receptor status in breast infiltrating ductal carcinoma. *Int. J. Cancer* **118**, 2943–2947 (2006).
288. Yamashita, H. *et al.* Stat5 expression predicts response to endocrine therapy and improves survival in estrogen receptor-positive breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **13**, 885–893 (2006).
289. Huang, R. *et al.* Increased STAT1 Signaling in Endocrine-Resistant Breast Cancer. *PLoS One* **9**, e94226 (2014).
290. Silva, C. M. & Shupnik, M. A. Integration of steroid and growth factor pathways in breast cancer: Focus on signal transducers and activators of transcription and their potential role in resistance. *Mol. Endocrinol.* **21**, 1499–

- 1512 (2007).
291. Dimitrakopoulos, F.-I., Kottorou, A., Kalofonou, M. & Kalofonos, H. The Fire Within: NF- $\kappa$ B involvement in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res. canres.3578.2019* (2020) doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-3578.
  292. Helbig, G. *et al.* NF- $\kappa$ B promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J. Biol. Chem.* **278**, 21631–21638 (2003).
  293. Cogswell, P. C., Guttridge, D. C., Funkhouser, W. K. & Baldwin, A. S. Selective activation of NF- $\kappa$ B subunits in human breast cancer: Potential roles for NF- $\kappa$ B2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene* **19**, 1123–1131 (2000).
  294. Yde, C. W., Emdal, K. B., Guerra, B. & Lykkesfeldt, A. E. NF $\kappa$ B signaling is important for growth of antiestrogen resistant breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **135**, 67–78 (2012).
  295. Nehra, R. *et al.* BCL2 and CASP8 regulation by NF- $\kappa$ B differentially affect mitochondrial function and cell fate in antiestrogen-sensitive and -resistant breast cancer cells. *FASEB J.* **24**, 2040–2055 (2010).
  296. Franco, H. L., Nagari, A. & Kraus, W. L. TNF $\alpha$  signaling exposes latent estrogen receptor binding sites to alter the breast cancer cell transcriptome. *Mol. Cell* **58**, 21–34 (2015).
  297. Pratt, M. A. C. *et al.* Estrogen Withdrawal-Induced NF- $\kappa$ B Activity and Bcl-3 Expression in Breast Cancer Cells: Roles in Growth and Hormone Independence. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 6887–6900 (2003).
  298. Gionet, N., Jansson, D., Mader, S. & Pratt, M. A. C. NF- $\kappa$ B and estrogen receptor  $\alpha$  interactions: Differential function in estrogen receptor-negative and -positive hormone-independent breast cancer cells. *J. Cell. Biochem.* **107**, 448–459 (2009).
  299. Ginestier, C. *et al.* CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *J. Clin. Invest.* **120**, 485–497 (2010).
  300. Iliopoulos, D., Hirsch, H. A. & Struhl, K. An Epigenetic Switch Involving NF- $\kappa$ B, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 Links Inflammation to Cell Transformation. *Cell* **139**, 693–706 (2009).
  301. Yamaguchi, N., Nakayama, Y. & Yamaguchi, N. Down-regulation of Forkhead box protein A1 (FOXA1) leads to cancer stem cell-like properties in tamoxifen-resistant breast cancer cells through induction of interleukin-6. *J. Biol. Chem.* **292**, 8136–8148 (2017).
  302. Lu, L., Yuan, X., Zhang, Q., Zhang, H. & Shen, B. LMTK3 knockdown retards cell growth and invasion and promotes apoptosis in thyroid cancer. *Mol. Med. Rep.* **15**, 2015–2022 (2017).
  303. Xu, H. *et al.* An ShRNA Based Genetic Screen Identified Sesn2 as a Potential Tumor Suppressor in Lung Cancer via Suppression of Akt-mTOR-p70S6K Signaling. *PLoS One* **10**, e0124033 (2015).
  304. Giamas, G. *et al.* Kinome screening for regulators of the estrogen receptor identifies LMTK3 as a new therapeutic target in breast cancer. *Nat. Med.* **17**,

- 715–719 (2011).
305. Stebbing, J. *et al.* LMTK3 is implicated in endocrine resistance via multiple signaling pathways. *Oncogene* **32**, 3371–3380 (2013).
  306. Rankin, E. B. & Giaccia, A. J. Hypoxic control of metastasis. *Science (80-. )*. **352**, 175–180 (2016).
  307. D’Ignazio, L., Batie, M. & Rocha, S. Hypoxia and Inflammation in Cancer, Focus on HIF and NF- $\kappa$ B. *Biomedicines* **5**, 21 (2017).
  308. Yang, J. *et al.* Estrogen receptor- $\alpha$  directly regulates the hypoxia-inducible factor 1 pathway associated with antiestrogen response in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 15172–15177 (2015).
  309. Kawazu, M. *et al.* Histone Demethylase JMJD2B Functions as a Co-Factor of Estrogen Receptor in Breast Cancer Proliferation and Mammary Gland Development. *PLoS One* **6**, e17830 (2011).
  310. Luo, W., Chang, R., Zhong, J., Pandey, A. & Semenza, G. L. Histone demethylase JMJD2C is a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 that is required for breast cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E3367–E3376 (2012).
  311. Masoud, G. N. & Li, W. HIF-1 $\alpha$  pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B* **5**, 378–389 (2015).
  312. Jia, X. *et al.* Basal and therapy-driven hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  confers resistance to endocrine therapy in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncotarget* **6**, 8648–8662 (2015).
  313. Toska, E. *et al.* PI3K pathway regulates ER-dependent transcription in breast cancer through the epigenetic regulator KMT2D. *Science (80-. )*. **355**, 1324–1330 (2017).
  314. Carroll, J. S. *et al.* Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell* **122**, 33–43 (2005).
  315. Fu, X. *et al.* FOXA1 overexpression mediates endocrine resistance by altering the ER transcriptome and IL-8 expression in ER-positive breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E6600–E6609 (2016).
  316. Jeselsohn, R. *et al.* Embryonic transcription factor SOX9 drives breast cancer endocrine resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E4482–E4491 (2017).
  317. Hong, D. *et al.* Suppression of breast cancer stem cells and tumor growth by the RUNX1 transcription factor. *Mol. Cancer Res.* **16**, 1952–1964 (2018).
  318. Yun, J. *et al.* Crosstalk between PKC $\alpha$  and Notch-4 in endocrine-resistant breast cancer cells. *Oncogenesis* **2**, e60–e60 (2013).
  319. Dontu, G. *et al.* Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res.* **6**, R605 (2004).
  320. Stylianou, S., Clarke, R. B. & Brennan, K. Aberrant activation of Notch signaling in human breast cancer. *Cancer Res.* **66**, 1517–1525 (2006).

321. Simmons, M. J., Serra, R., Hermance, N. & Kelliher, M. A. NOTCH1 inhibition in vivo results in mammary tumor regression and reduced mammary tumorsphere-forming activity in vitro. *Breast Cancer Res.* **14**, R126 (2012).
322. Magnani, L. *et al.* Genome-wide reprogramming of the chromatin landscape underlies endocrine therapy resistance in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E1490–E1499 (2013).
323. Rizzo, P. *et al.* Cross-talk between notch and the estrogen receptor in breast cancer suggests novel therapeutic approaches. *Cancer Res.* **68**, 5226–5235 (2008).
324. Lombardo, Y. *et al.* Nicastrin and Notch4 drive endocrine therapy resistance and epithelial to mesenchymal transition in MCF7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* **16**, R62 (2014).
325. Yu, H. & Jove, R. The stats of cancer - New molecular targets come of age. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 97–105 (2004).
326. Yang, X. P. *et al.* Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. *Nat. Immunol.* **12**, 247–254 (2011).
327. Bui, Q. T. *et al.* Essential role of Notch4/STAT3 signaling in epithelial–mesenchymal transition of tamoxifen-resistant human breast cancer. *Cancer Lett.* **390**, 115–125 (2017).
328. Ng, J. M. Y. & Curran, T. The Hedgehog’s tale: Developing strategies for targeting cancer. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 493–501 (2011).
329. Clark, A. S., West, K., Streicher, S. & Dennis, P. A. Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 707–717 (2002).
330. Ramaswamy, B. *et al.* Hedgehog signaling is a novel therapeutic target in tamoxifen-resistant breast cancer aberrantly activated by PI3K/AKT pathway. *Cancer Res.* **72**, 5048–5059 (2012).
331. Lu, Y., Li, J., Cheng, J. & Lubahn, D. B. Genes targeted by the Hedgehog-signaling pathway can be regulated by Estrogen related receptor  $\beta$ . *BMC Mol. Biol.* **16**, 19 (2015).
332. Gerber, M. *et al.* Tumor progression and oxidant-antioxidant status. in *Cancer Letters* vol. 114 211–214 (Cancer Lett, 1997).
333. Poulsen, H. E., Prieme, H. & Loft, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *Eur. J. Cancer Prev.* **7**, 9–16 (1998).
334. Guo, C. *et al.* Discriminating patients with early-stage breast cancer from benign lesions by detection of oxidative DNA damage biomarker in urine. *Oncotarget* **8**, 53100–53109 (2017).
335. Sova, H., Jukkola-Vuorinen, A., Puistola, U., Kauppila, S. & Karihtala, P. 8-Hydroxydeoxyguanosine: A new potential independent prognostic factor in breast cancer. *Br. J. Cancer* **102**, 1018–1023 (2010).
336. Fan, P. *et al.* C-Src modulates estrogen-induced stress and apoptosis in



- estrogen-deprived breast cancer cells. *Cancer Res.* **73**, 4510–4520 (2013).
337. Zou, X., Santa-Maria, C. A., O'Brien, J., Gius, D. & Zhu, Y. Manganese Superoxide Dismutase Acetylation and Dysregulation, Due to Loss of SIRT3 Activity, Promote a Luminal B-Like Breast Carcinogenic-Permissive Phenotype. *Antioxid. Redox Signal.* **25**, 326–336 (2016).
338. Bekele, R. T. *et al.* Oxidative stress contributes to the tamoxifen-induced killing of breast cancer cells: Implications for tamoxifen therapy and resistance. *Sci. Rep.* **6**, 1–17 (2016).
339. Dagogo-Jack, I. & Shaw, A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15**, 81–94 (2018).
340. Cheng, Y. *et al.* Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: Mechanisms and advances in clinical trials. *Signal Transduct. Target. Ther.* **4**, 1–39 (2019).
341. Sher, G. *et al.* Epigenetic and breast cancer therapy: Promising diagnostic and therapeutic applications. *Semin. Cancer Biol.* (2020)  
doi:10.1016/j.semcancer.2020.08.009.
342. Hinshelwood, R. A. & Clark, S. J. Breast cancer epigenetics: Normal human mammary epithelial cells as a model system. *J. Mol. Med.* **86**, 1315–1328 (2008).
343. Bloushtain-Qimron, N. *et al.* Cell type-specific DNA methylation patterns in the human breast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 14076–14081 (2008).
344. Maruyama, R. *et al.* Epigenetic regulation of cell type-specific expression patterns in the human mammary epithelium. *PLoS Genet.* **7**, 1001369 (2011).
345. Carrió, M. *et al.* Reprogramming Captures the Genetic and Tumorigenic Properties of Neurofibromatosis Type 1 Plexiform Neurofibromas. *Stem Cell Reports* **12**, 411–426 (2019).
346. El Helou, R. *et al.* Brief Reports: A Distinct DNA Methylation Signature Defines Breast Cancer Stem Cells and Predicts Cancer Outcome. *Stem Cells* **32**, 3031–3036 (2014).
347. Peschansky, V. J. & Wahlestedt, C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics* **9**, 3–12 (2014).
348. Rosenquist, R., Esteller, M. & Plass, C. Introduction: Epigenetics in cancer. *Semin. Cancer Biol.* **51**, iv–v (2018).
349. Veeck, J. & Esteller, M. Breast cancer epigenetics: From DNA methylation to microRNAs. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **15**, 5–17 (2010).
350. Jeltsch & Gowher. Editorial—Role of DNA Methyltransferases in the Epigenome. *Genes (Basel)*. **10**, 574 (2019).
351. Zhang, J., Yang, C., Wu, C., Cui, W. & Wang, L. DNA Methyltransferases in Cancer: Biology, Paradox, Aberrations, and Targeted Therapy. *Cancers (Basel)*. **12**, 2123 (2020).
352. Karsli-Ceppioglu, S. *et al.* Epigenetic mechanisms of breast cancer: An update

- of the current knowledge. *Epigenomics* **6**, 651–664 (2014).
353. Tuorto, F. *et al.* The tRNA methyltransferase Dnmt2 is required for accurate polypeptide synthesis during haematopoiesis. *EMBO J.* **34**, 2350–2362 (2015).
  354. Jurkowska, R. Z. *et al.* Formation of nucleoprotein filaments by mammalian DNA methyltransferase Dnmt3a in complex with regulator Dnmt3L. *Nucleic Acids Res.* **36**, 6656–6663 (2008).
  355. Widschwendter, M. & Jones, P. A. DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene* **21–35**, 5462–5482 (2002).
  356. Deaton, A. M. & Bird, A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* **25**, 1010–1022 (2011).
  357. Sandhu, R., Roll, J. D., Rivenbark, A. G. & Coleman, W. B. Dysregulation of the epigenome in human breast cancer: Contributions of gene-specific dna hypermethylation to breast cancer pathobiology and targeting the breast cancer methylome for improved therapy. *Am. J. Pathol.* **185**, 282–292 (2015).
  358. Jovanovic, J., Rønneberg, J. A., Tost, J. & Kristensen, V. The epigenetics of breast cancer. *Mol. Oncol.* **4**, 242–254 (2010).
  359. Novak, P. *et al.* Agglomerative epigenetic aberrations are a common event in human breast cancer. *Cancer Res.* **68**, 8616–8625 (2008).
  360. Son, K. S. *et al.* Hypomethylation of the interleukin-10 gene in breast cancer tissues. *Breast* **19**, 484–488 (2010).
  361. Sharma, G. *et al.* CpG hypomethylation of MDR1 gene in tumor and serum of invasive ductal breast carcinoma patients. *Clin. Biochem.* **43**, 373–379 (2010).
  362. Singh, P. *et al.* Overexpression and hypomethylation of Flap endonuclease 1 gene in breast and other cancers. *Mol. Cancer Res.* **6**, 1710–1717 (2008).
  363. Lee, P. S. *et al.* Elevated *MAL* expression is accompanied by promoter hypomethylation and platinum resistance in epithelial ovarian cancer. *Int. J. Cancer* **126**, NA-NA (2010).
  364. Paredes, J. *et al.* P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clin. Cancer Res.* **11**, 5869–5877 (2005).
  365. Pakneshan, P., Szyf, M., Farias-Eisner, R. & Rabbani, S. A. Reversal of the hypomethylation status of urokinase (uPA) promoter blocks breast cancer growth and metastasis. *J. Biol. Chem.* **279**, 31735–31744 (2004).
  366. Gupta, A., Godwin, A. K., Vanderveer, L., Lu, A. P. & Liu, J. Hypomethylation of the Synuclein  $\gamma$  gene CpG island promotes its aberrant expression in breast carcinoma and ovarian carcinoma. *Cancer Res.* **63**, 664–673 (2003).
  367. Cao, Y. *et al.* Quantitative DNA hypomethylation of ligand jagged1 and receptor notch1 signifies occurrence and progression of breast carcinoma. *Am. J. Cancer Res.* **5**, 1897–1910 (2015).
  368. Hemberger, M., Dean, W. & Reik, W. Epigenetic dynamics of stem cells and

- cell lineage commitment: Digging Waddington's canal. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 526–537 (2009).
369. El Helou, R. *et al.* Brief reports: A distinct DNA methylation signature defines breast cancer stem cells and predicts cancer outcome. *Stem Cells* **32**, 3031–3036 (2014).
  370. Severi, G. *et al.* Epigenome-wide methylation in DNA from peripheral blood as a marker of risk for breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **148**, 665–673 (2014).
  371. Hoque, M. O. *et al.* Changes in CpG islands promoter methylation patterns during ductal breast carcinoma progression. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **18**, 2694–2700 (2009).
  372. Van Hoesel, A. Q. *et al.* Assessment of DNA methylation status in early stages of breast cancer development. *Br. J. Cancer* **108**, 2033–2038 (2013).
  373. Van Hoesel, A. Q. *et al.* Hypomethylation of LINE-1 in primary tumor has poor prognosis in young breast cancer patients: A retrospective cohort study. *Breast Cancer Res. Treat.* **134**, 1103–1114 (2012).
  374. Teschendorff, A. E. *et al.* DNA methylation outliers in normal breast tissue identify field defects that are enriched in cancer. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
  375. Pasculli, B., Barbano, R. & Parrella, P. Epigenetics of breast cancer: Biology and clinical implication in the era of precision medicine. *Seminars in Cancer Biology* vol. 51 22–35 (2018).
  376. Kornberg, R. D. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science (80-. )*. **184**, 868–871 (1974).
  377. Chen, R., Kang, R., Fan, X. G. & Tang, D. Release and activity of histone in diseases. *Cell Death Dis.* **5**, e1370–e1370 (2014).
  378. Luger, K., Dechassa, M. L. & Tremethick, D. J. New insights into nucleosome and chromatin structure: An ordered state or a disordered affair? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 436–447 (2012).
  379. Tan, M. *et al.* Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* **146**, 1016–1028 (2011).
  380. Heintzman, N. D. *et al.* Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat. Genet.* **39**, 311–318 (2007).
  381. Barski, A. *et al.* High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell* **129**, 823–837 (2007).
  382. Heintzman, N. D. *et al.* Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* **459**, 108–112 (2009).
  383. O'Geen, H. *et al.* Genome-wide analysis of KAP1 binding suggests autoregulation of KRAB-ZNFs. *PLoS Genet.* **3**, 0916–0926 (2007).
  384. Kouzarides, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* **128**, 693–

- 705 (2007).
385. Jenuwein, T. & Allis, C. D. Translating the histone code. *Science* (80-. ). **293**, 1074–1080 (2001).
  386. Zhao, Q. Y. *et al.* Global histone modification profiling reveals the epigenomic dynamics during malignant transformation in a Four-Stage breast cancer model. *Clin. Epigenetics* **8**, (2016).
  387. Messier, T. L. *et al.* Histone H3 lysine 4 acetylation and methylation dynamics define breast cancer subtypes. *Oncotarget* **7**, 5094–5109 (2016).
  388. Chen, X. *et al.* A novel subtype classification and risk of breast cancer by histone modification profiling. *Breast Cancer Res. Treat.* **157**, 267–279 (2016).
  389. Millán-Ariño, L. *et al.* Mapping of six somatic linker histone H1 variants in human breast cancer cells uncovers specific features of H1.2. *Nucleic Acids Res.* **42**, 4474–4493 (2014).
  390. Harshman, S. W. *et al.* Histone H1 phosphorylation in breast cancer. *J. Proteome Res.* **13**, 2453–2467 (2014).
  391. Citron, F. & Fabris, L. Targeting Epigenetic Dependencies in Solid Tumors: Evolutionary Landscape Beyond Germ Layers Origin. *Cancers (Basel)*. **12**, 682 (2020).
  392. Yun, M., Wu, J., Workman, J. L. & Li, B. Readers of histone modifications. *Cell Res.* **21**, 564–578 (2011).
  393. Haberland, M., Montgomery, R. L. & Olson, E. N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: Implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 32–42 (2009).
  394. Kim, H. J. & Bae, S. C. Histone deacetylase inhibitors: Molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am. J. Transl. Res.* **3**, 166–179 (2011).
  395. Lim, S. *et al.* Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology. *Carcinogenesis* **31**, 512–520 (2010).
  396. Yokoyama, Y. *et al.* Loss of histone H4K20 trimethylation predicts poor prognosis in breast cancer and is associated with invasive activity. *Breast Cancer Res.* **16**, (2014).
  397. Zhang, Z. *et al.* Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res. Treat.* **94**, 11–16 (2005).
  398. Müller, B. M. *et al.* Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer - overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. *BMC Cancer* **13**, (2013).
  399. Ling, H., Fabbri, M. & Calin, G. A. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 847–865 (2013).

400. Esteller, M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 861–874 (2011).
401. Dunham, I. *et al.* An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**, 57–74 (2012).
402. Djebali, S. *et al.* Landscape of transcription in human cells. *Nature* **489**, 101–108 (2012).
403. Peschansky, V. J. & Wahlestedt, C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics* **9**, 3–12 (2014).
404. Di Leva, G., Garofalo, M. & Croce, C. M. MicroRNAs in cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **9**, 287–314 (2014).
405. Li, Y. *et al.* Genome-wide DNA methylome analysis reveals epigenetically dysregulated non-coding RNAs in human breast cancer. *Sci. Rep.* **5**, 8790–8790 (2015).
406. Iorio, M. V. *et al.* MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* **65**, 7065–7070 (2005).
407. Fkih M’hamed, I. *et al.* Identification of miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153 as potential triple-negative breast cancer biomarkers. *Cell. Oncol.* **38**, 433–442 (2015).
408. van Schooneveld, E. *et al.* Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. *Breast Cancer Res.* **17**, (2015).
409. De Rinaldis, E. *et al.* Integrated genomic analysis of triple-negative breast cancers reveals novel microRNAs associated with clinical and molecular phenotypes and sheds light on the pathways they control. *BMC Genomics* **14**, 643 (2013).
410. Huarte, M. The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nat. Med.* **21**, 1253–1261 (2015).
411. Guttman, M. & Rinn, J. L. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature* **482**, 339–346 (2012).
412. Cheetham, S. W., Gruhl, F., Mattick, J. S. & Dinger, M. E. Long noncoding RNAs and the genetics of cancer. *Br. J. Cancer* **108**, 2419–2425 (2013).
413. Zhao, W., Luo, J. & Jiao, S. Comprehensive characterization of cancer subtype associated long non-coding RNAs and their clinical implications. *Sci. Rep.* **4**, (2014).
414. Gupta, R. A. *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* **464**, 1071–1076 (2010).
415. Ma, L. Role of miR-10b in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res.* **12**, 210 (2010).
416. Rinn, J. L. *et al.* Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs. *Cell* **129**, 1311–1323 (2007).

417. Arun, G. *et al.* Differentiation of mammary tumors and reduction in metastasis upon Malat1 lncRNA loss. *Genes Dev.* **30**, 34–51 (2016).
418. Meseure, D. *et al.* Prognostic value of a newly identified MALAT1 alternatively spliced transcript in breast cancer. *Br. J. Cancer* **114**, 1395–1404 (2016).
419. Magnani, L. *et al.* Genome-wide reprogramming of the chromatin landscape underlies endocrine therapy resistance in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E1490–E1499 (2013).
420. Kangaspeska, S. *et al.* Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* **452**, 112–115 (2008).
421. Ottaviano, Y. L. *et al.* Methylation of the Estrogen Receptor Gene CpG Island Marks Loss of Estrogen Receptor Expression in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* **54**, 2552–2555 (1994).
422. Yang, X. *et al.* Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)- $\alpha$  by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER- $\alpha$ -negative breast cancer cells. *Cancer Res.* **61**, 7025–7029 (2001).
423. Soleimani, M. *et al.* Candidate methylation sites associated with endocrine therapy resistance in the TCGA ER+/HER2- breast cancer cohort. *bioRxiv* 826198 (2019) doi:10.1101/826198.
424. Ye, L. *et al.* Epigenetic silencing of SALL 2 confers tamoxifen resistance in breast cancer. *EMBO Mol. Med.* **11**, (2019).
425. Zhang, F. & Cui, Y. Dysregulation of DNA methylation patterns may identify patients with breast cancer resistant to endocrine therapy: A predictive classifier based on differentially methylated regions. *Oncol. Lett.* **18**, 1287–1303 (2019).
426. Stone, A. *et al.* DNA methylation of oestrogen-regulated enhancers defines endocrine sensitivity in breast cancer. *Nat. Commun.* **6**, 1–9 (2015).
427. Probert, C. & Curtis, C. A role for chromatin regulatory dynamics in breast cancer evolution. *Nat. Med.* **24**, 1309–1311 (2018).
428. Patten, D. K. *et al.* Enhancer mapping uncovers phenotypic heterogeneity and evolution in patients with luminal breast cancer. *Nat. Med.* **24**, 1469–1480 (2018).
429. Achinger-Kawecka, J. *et al.* Epigenetic reprogramming at estrogen-receptor binding sites alters 3D chromatin landscape in endocrine-resistant breast cancer. *Nat. Commun.* **11**, 1–17 (2020).
430. Pathiraja, T. N. *et al.* Epigenetic reprogramming of HOXC10 in endocrine-resistant breast cancer. *Sci. Transl. Med.* **6**, 229ra41-229ra41 (2014).
431. Yang, X. *et al.* Transcriptional activation of estrogen receptor  $\alpha$  in human breast cancer cells by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res.* **60**, 6890–6894 (2000).
432. Fan, J. *et al.* ER $\alpha$  negative breast cancer cells restore response to endocrine therapy by combination treatment with both HDAC inhibitor and DNMT

- inhibitor. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **134**, 883–890 (2008).
433. Munster, P. N. *et al.* A phase II study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat combined with tamoxifen for the treatment of patients with hormone therapy-resistant breast cancer. *Br. J. Cancer* **104**, 1828–1835 (2011).
  434. Yardley, D. A. *et al.* Randomized phase II, double-blind, placebo-controlled study of exemestane with or without entinostat in postmenopausal women with locally recurrent or metastatic estrogen receptor-positive breast cancer progressing on treatment with a nonsteroidal aromatase. *J. Clin. Oncol.* **31**, 2128–2135 (2013).
  435. Koboldt, D. C. *et al.* Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61–70 (2012).
  436. Yamamoto, S. *et al.* JARID1B is a luminal lineage-driving oncogene in breast cancer. *Cancer Cell* **25**, 762–777 (2014).
  437. Hinohara, K. *et al.* KDM5 Histone Demethylase Activity Links Cellular Transcriptomic Heterogeneity to Therapeutic Resistance. *Cancer Cell* **34**, 939–953.e9 (2018).
  438. Gala, K. *et al.* KMT2C mediates the estrogen dependence of breast cancer through regulation of ER $\alpha$  enhancer function. *Oncogene* **37**, 4692–4710 (2018).
  439. Jiang, Z. *et al.* Tucidinosat plus exemestane for postmenopausal patients with advanced, hormone receptor-positive breast cancer (ACE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **20**, 806–815 (2019).
  440. Wu, Y. *et al.* Tamoxifen resistance in breast cancer is regulated by the EZH2–ER $\alpha$ –GREB1 transcriptional axis. *Cancer Res.* **78**, 671–684 (2018).
  441. Nayak, S. R. *et al.* A Role for Histone H2B Variants in Endocrine-Resistant Breast Cancer. *Horm. Cancer* **6**, 214–224 (2015).
  442. Miller, T. E. *et al.* MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1. *J. Biol. Chem.* **283**, 29897–29903 (2008).
  443. Wei, Y. *et al.* Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **147**, 423–431 (2014).
  444. Wickramasinghe, N. S. *et al.* Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **37**, 2584–2595 (2009).
  445. Pandey, D. P. & Picard, D. miR-22 Inhibits Estrogen Signaling by Directly Targeting the Estrogen Receptor  $\alpha$  mRNA. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 3783–3790 (2009).
  446. Wu, Q. *et al.* Analysis of the miRNA-mRNA-lncRNA networks in ER+ and ER- breast cancer cell lines. *J. Cell. Mol. Med.* **19**, 2874–2887 (2015).
  447. Giuliano, A. E. *et al.* Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA. Cancer J.*

- Clin.* **67**, 290–303 (2017).
448. John, S. *et al.* Regulation of Estrogenic Effects by Beclin 1 in Breast Cancer Cells. *Cancer Res* **68**, 7855–63 (2008).
449. Zhou, Q. *et al.* Differential microRNA profiles between fulvestrant-resistant and tamoxifen-resistant human breast cancer cells. *Anticancer. Drugs* **29**, 539–548 (2018).
450. Chen, Z. *et al.* Down-regulation of programmed cell death 4 (PDCD4) is associated with aromatase inhibitor resistance and a poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **152**, 29–39 (2015).
451. Yu, X. *et al.* Silencing of MicroRNA-21 confers the sensitivity to tamoxifen and fulvestrant by enhancing autophagic cell death through inhibition of the PI3K-AKT-mTOR pathway in breast cancer cells. *Biomed. Pharmacother.* **77**, 37–44 (2016).
452. Rao, X. *et al.* MicroRNA-221/222 confers breast cancer fulvestrant resistance by regulating multiple signaling pathways. *Oncogene* **30**, 1082–1097 (2011).
453. Sansone, P. *et al.* Evolution of cancer stem-like cells in endocrine-resistant metastatic breast cancers is mediated by stromal microvesicles. *Cancer Res.* **77**, 1927–1941 (2017).
454. Fan, M. *et al.* Diverse gene expression and DNA methylation profiles correlate with differential adaptation of breast cancer cells to the antiestrogens tamoxifen and fulvestrant. *Cancer Res.* **66**, 11954–11966 (2006).
455. Howard, E. W. & Yang, X. MicroRNA Regulation in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer and Endocrine Therapy. *Biol. Proced. Online* **20**, 1–19 (2018).
456. Vilquin, P. *et al.* MicroRNA-125b upregulation confers aromatase inhibitor resistance and is a novel marker of poor prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **17**, (2015).
457. Chen, Z. *et al.* Down-regulation of programmed cell death 4 (PDCD4) is associated with aromatase inhibitor resistance and a poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **152**, 29–39 (2015).
458. Masri, S. *et al.* The role of microRNA-128a in regulating TGFbeta signaling in letrozole-resistant breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **124**, 89–99 (2010).