Patogenetski mehanizmi hormonske rezistencije stanica raka dojke

Kovačević, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:304821

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Lucija Kovačević

Patogenetski mehanizmi hormonske rezistencije stanica raka dojke

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Lucija Kovačević

Patogenetski mehanizmi hormonske rezistencije stanica raka dojke

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Natalije Dedić Plavetić, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2015./2016.

POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA

AF-1	Od engl. *activation function 1*
AF-2	Od engl. *activation function 2*
AI	Aromatazni inhibitor
AIB1/SRC-3	Od engl. *amplified in breast cancer 1*
Akt	Protein kinaza B
CDK	Kinaze ovisne o ciklinima (od engl. *cyclin-dependent kinases***)**
cfDNA	Izvanstanična cirkulirajuća DNA (od engl. *Cell-free DNA*)
DBD	Regija za vezanje DNA (od engl. *DNA-binding domain*)
DNMT	DNA metiltransferaza-1
E1	Estron
E2	Estradiol
E3	Estriol
ECBI	Od engl. *coregulator binding inhibitor*
EGFR	Receptor za epidermalni čimbenik rasta (od engl. *epidermal growth factor receptor*)
EGF	Epidermalni čimbenik rasta (od engl. *epidermal growth factor*)
ER	Estrogenski receptor
ERE	Element reaktivan na estrogene (od engl. *estrogen response elements*)
FDA	Agencija za hranu i lijekove (od engl. *Food and Drug Administration*)
FGFR1	Receptor za čimbenike rasta fibroblasta 1 (od engl. *fibroblast growth factor receptor 1*)
FOXA1	Od engl. *forkhead box protein A1*
FSH	Folikulostimulirajući hormon
GnRH/LHRH	Hormon koji oslobađa gonadotropine (od engl. *gonadotropin-releasing hormone*)
GPR30	Od engl. *G-protein coupled receptor 30*
HDAC	Histonska deacetilaza
HER2	Receptor za humani epidermalni čimbenika rasta 2 (od engl. *human epidermal growth factor receptor 2*)
HSP	Proteini toplinskog šoka (od engl. *heat-shock proteins*)

IGF-1	Inzulinu sličan čimbenik rasta 1 (od engl. *Insulin-like growth factor 1*)
IGF-1R	Receptor za čimbenika rasta nalik inzulinu tip 1 (od engl. *insulin-like growth factor 1 receptor*)
IRS-1	Od engl. *Insulin receptor substrate 1*
LBD	Regija za vezanje liganda (od engl. *ligand-binding domain*)
LH	Luteinizirajući hormon
lncRNA	Duga nekodirajuća RNA (od engl. *long noncoding RNA*)
MAPK	Mitogenom aktivirana proteinska kinaza (od engl. *mitogen-activated protein kinases*)
miRNA	Mikro RNA
mRNA	Glasnička RNA, (od engl. *messenger RNA*)
mTOR	Od engl. *mammalian target of rapamycin*
N-CoR	Od engl. *nuclear receptor co-repressor*
ncRNA	Nekodirajuća RNA (od engl. *non-coding RNA*)
NLS	Od engl. *nuclear localization signals*
PAX2	Od engl. *paired box 2 gene product*
PFS	vrijeme do progresije bolesti (od engl. *progression free survival*)
PI3K	Fosfatidilinozitol 3-kinaza
PR	Progesteronski receptor
pRb2/p130	Član obitelji tumorsupresorskih proteina uključenih u razvoj retinoblastoma
PTEN	Homolog fosfataze i tenzina (od engl. *phosphatase and tensin homolog*)
RTK	Tirozin kinazni receptor (od engl. *receptor tyrosine kinases*)
SERD	Selektivni snižavatelj estrogenskih receptora (od engl. *selective estrogen receptor down-regulator*)
SERM	Selektivni modulator estrogenskih receptora (od engl. *selective estrogen receptor modulators*)
SHBG	Globulin koji veže spolne hormone (od engl. *sex hormone-binding globulin*)
SMRT	Od engl. *silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors*
Src	Protoonkogenska tirozinska kinaza
TKI	Inhibitori tirozin kinaze (od engl. *tyrosine kinase inhibitors)*
TSC1/2	Kompleks tuberozne skleroze 1/2 (od engl. *tuberous sclerosis complex 1/2)*

Sadržaj

1. Uvod 1
2. Stvaranje estrogena 3
3. Estrogenski receptor 4
4. Signalizacija putem estrogenskog receptora 6
5. Hormonska terapija 9
5.1. Tamoksifen 12
5.2. Aromatazni inhibitori 12
5.3.Fulvestrant 13
6. Rezistencija na hormonsku terapiju 13
7. Mehanizmi hormonske rezistencije stanica karcinoma dojke 14
7.1. Promjene izražaja i funkcije ER 15
7.1.1. Genske alteracije ER 15
7.1.1.1. Amplifikacija *ESR1* 16
7.1.1.2. Prestrukturiranje *ESR1* 17
7.1.1.3. Mutacije krivog smisla 17
7.1.2. Epigenetsko utišavanje *ESR1* 19
7.1.3. Ostali mehanizmi povezani s gubitkom izražaja ER 21
7.1.4. Koregulatori aktivnosti ER 22
7.2. Razmjena informacija između puteva prijenosa signala 23
7.2.1. Aktivacija signalnih puteva receptora za čimbenike rasta 24
7.2.1.1. Pretjeran izražaj HER2 25
7.2.1.2. EGFR signalni put 26
7.2.1.4. FGFR signalni put 28
7.2.2. Hiperaktivacija puta PI3K/Akt/mTOR 28
7.2.3. Hiperaktivacija puta MAPK/ERK 30
7.3. Apoptoza i promjene u regulaciji staničnog ciklusa 30
8. Kliničke implikacije 32
9. Zaključak 35

10. Zahvale 37
11. Literatura 38
12. Životopis 53

SAŽETAK

Lucija Kovačević

PATOGENETSKI MEHANIZMI HORMONSKE REZISTENCIJE STANICA RAKA DOJKE

Rak dojke je najčešće dijagnosticiran maligni tumor u ženskoj populaciji širom svijeta te se predviđa da će se u otprilike jednoj od osam žena u Hrvatskoj, za vrijeme njenog životnog vijeka razviti invazivni karcinom dojke. Receptor za estrogene (ER) izražen je u otprilike 70% novodijagnosticiranih karcinoma dojke i ima važnu ulogu u tumorskom rastu i progresiji. Hormonska terapija predstavlja okosnicu liječenja hormonski ovisnih karcinoma dojke. Usprkos njenoj učinkovitosti, u velikog broja bolesnica, pojavljuje se rezistencija na hormonsko liječenje što predstavlja veliki izazov u odabiru optimalnog načina liječenja. Razumijevanje mehanizama koji doprinose razvoju rezistencije omogućit će razvoj novih i učinkovitijih lijekova. Identificirani su mogući mehanizmi koji dovode do rezistencije na hormonsku terapiju, a često uključuju pojačanu signalizaciju čimbenicima rasta te promjene izražaja i djelovanja estrogenskog receptora. Također, nekoliko studija je istaklo ulogu nekodirajuće RNA (ncRNA) u razvoju rezistencije na hormonsko liječenje. Usprkos ohrabrujućim rezultatima pretkliničkih istraživanja, rezultati kliničkih studija koje su promatrale kombinaciju hormonske terapije s trastuzumabom ili inhibitorima tirozin kinaze (TKI) vrlo su diskutabilni. Kliničke studije koje su se fokusirale na novije lijekove poput mTOR (od engl. mammalian target of rapamycin) inhibitora everolimusa polučile su obećavajuće rezultate. Rezultati randomizirane studije BOLERO-2 koja je evaluirala kombinaciju hormonske terapije i everolimusa u liječenju metastatskih karcinoma dojke s pozitivnim hormonskim receptorima pokazali su značajno produljenje preživljenja do progresije bolesti (PFS, od engl. *progression free survival*) kod pacijentica liječenih kombinacijom oba lijeka u odnosu na one liječene samo hormonskom terapijom. Cilj ovog rada je dati pregled potencijalnih mehanizama uključenih u razvoj rezistencije na hormonsku terapiju stanica karcinoma dojke.

Ključne riječi: hormonska rezistencija, estrogenski receptor, rak dojke

SUMMARY

Lucija Kovačević

PATHOGENIC MECHANISMS OF HORMONE RESISTANCE IN BREAST CANCER CELLS

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer in female population worldwide and it is estimated that approximately one out of every eight Croatian women will develop invasive breast cancer over the course of her lifetime. Estrogen receptor (ER) is expressed in approximately 70% of newly diagnosed breast tumors and has an important role in tumor growth and progression. Endocrine therapy forms the backbone of treatment for hormone-dependent breast cancer. Despite the benefits of endocrine therapy, resistance eventually occurs in a large number of patients and represents important clinical challenge in the management of breast cancer. Understanding the mechanism by which these cancers develop resistance would enable the development of new and effective therapeutics. There are many potential mechanisms of resistance to endocrine therapies which have been identified and they often involve enhanced growth factor signaling and changes in the expression or action of the estrogen receptor. Moreover, a few studies have highlighted the role of noncoding RNA (ncRNA) in the development of endocrine resistance.

Clinical trials investigating the combination of endocrine therapy with trastuzumab or the tyrosine kinase inhibitors (TKIs) have given varied results, despite encouraging preclinical data. More promising results come from clinical studies which have focused on novel agents such as the mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor everolimus. The results from the randomized trial BOLERO-2 evaluating everolimus±endocrine therapy in a selected subgroup of HR-positive metastatic breast cancer patients have demonstrated a significant improvement in progression free survival (PFS) for the combination compared to the endocrine therapy alone. This review serves as an overview of the potential mechanisms involved in the resistance of breast cancer cells to endocrine therapy.

Keywords: hormonal resistance, estrogen receptor, breast cancer

1. Uvod

Karcinom dojke najčešći je maligni tumor kod žena. Predstavlja vodeći uzrok smrti pacijentica oboljelih od malignih bolesti u nerazvijenim zemljama, dok je u razvijenim zemljama na drugom mjestu, odmah iza karcinoma pluća (1). Posljednjih dvadesetak godina u razvijenim zemljama Zapada stopa smrtnosti se kontinuirano smanjuje zahvaljujući ranoj dijagnostici i novim mogućnostima liječenja.

U Hrvatskoj je karcinom dojke 2013. godine prema učestalosti bio na prvom mjestu s ukupnim udjelom od 26% među malignim oboljenjima kod žena, a iste su godine zbog karcinoma dojke umrle 994 bolesnice (2). Hrvatska se svrstava u zemlje s visokom incidencijom karcinoma dojke (3).

U ožujku 2013. godine u St. Gallenu (4) na konferenciji o liječenju ranog raka dojke usvojena je surogatna kliničko-patološka podjela (Tablica 1.) koja se temelji se na imunohistokemijskoj metodi analize tkiva primarnog tumora na izražaj estrogenskih (ER), progesteronskih (PR) i receptora za humani epidermalni čimbenika rasta 2 (HER2, od engl. *epidermal growth factor receptor*) te određivanju proliferacijskog indeksa korištenjem Ki-67 antigena. Podjela uključuje sljedeće podtipove: 1. luminalnom A sličan, 2. luminalnom B sličan (HER2 negativan), 3. luminalnom B sličan (HER2 pozitivan) 4. HER2 pozitivan (neluminalni) te 5. trostruko negativan (duktalni, engl. triple negative). Svrstavanje karcinoma dojke u skupine prema molekularnim klasifikacijama koristi nam pri odabiru terapije i procjeni prognoze.

Tablica 1. Surogatna kliničko-patološka definicija intrinzičkih podtipova karcinoma dojke

PODTIP	IZRAŽAJ ER	IZRAŽAJ PR	IZRAŽAJ HER2	Ki-67
LUMINALNOM A SLIČAN	+	+	-	Nizak
LUMINALNOM B SLIČAN	+	- ili nizak	-	Visok
LUMINALNOM B SLIČAN HER2 POZITIVAN	+	- ili nizak	+	Visok
HER2 POZITIVAN NELUMINALNI	-	-	+	
TROSTRUKO NEGATIVAN	-	-	-	

Smatra se da 70% karcinoma dojke ima pozitivan status ERα (5). Ključan poticaj za njihov razvoj i progresiju, djelovanjem na dvije izomorfe ER, predstavljaju estrogeni.

Hormonska terapija se, zbog toga što onemogućava signalizaciju putem ER, smatra osnovnim terapijskim pristupom kod tih karcinoma.

Iz svega navedenog proizlazi da su bolesnice koje imaju luminalni karcinom dojke, odnosno s tumorom koji ima pozitivan status ERα i/ili PR, kandidati za hormonsku terapiju. Takvi tumori čine ukupno 70% svih karcinoma dojke (5). Velik dio tih tumora pozitivno odgovara na hormonsku terapiju pa će tako od iste profitirati 50% bolesnica čiji tumor je ERα pozitivan, odnosno 70% onih koje imaju izražena oba receptora (6). Slijedom navedenog možemo zaključiti da su luminalni A tumori osjetljiviji na hormonsku terapiju, dok su luminalni B tumori agresivniji te češće rezistentni na terapiju (7,8,9). Lijekovi koji se danas najčešće koriste u hormonskoj terapiji dijele se ovisno o svom mehanizmu djelovanja na selektivne modulatore estrogenskih receptora (SERM, od *engl. selective estrogen receptor modulators*), inhibitore aromataze (AI, od engl. *aromatase inhibitors*) i prave antagoniste estrogenskih receptora odnosno selektivne estrogen receptor snižavatelje (SERD, od engl. *selective estrogen receptor down-regulator*).

Unatoč svim prednostima i učinkovitosti hormonske terapije u liječenju ER pozitivnog karcinoma dojke, kod velikog broja bolesnica, kao glavna prepreka optimalnom liječenju, pojavljuje se rezistencija na hormonsko liječenje (10). U većini slučajeva progresija bolesti događa se za vrijeme trajanja hormonskog liječenja (stečena rezistencija), dok manji broj bolesnica ne odgovara niti na inicijalnu terapiju (*de novo* rezistencija). Kod metastatskih karcinoma 50% bolesnica, unatoč prisutnosti ER, ne odgovara na inicijalnu hormonsku terapiju, a kod svih onih koje su inicijalno odgovarale u dogledno vrijeme nastupit će povrat bolesti (11).

Posljednjih nekoliko godina uloženi su veliki napori kako bi se istražili mehanizmi koji stoje u podlozi razvoja rezistencije na hormonsku terapiju kao i mogućih terapijskih pristupa kojima bi se isti zaobišli. Također, velik dio istraživanja bio je usmjeren na razvoj metoda kojima bi se predvidio rizik razvoja rezistencije u pojedinih bolesnica kako bi im se omogućio optimalniji terapijski pristup. Sve veće znanje o molekularnim mehanizmima koji dovode do endokrine rezistencije dovelo je do razvoja novih obećavajućih strategija liječenja.

2. Stvaranje estrogena

Brojni kemijski spojevi imaju estrogenu aktivnost. Osim različitih estrogena steroidne građe životinjskog podrijetla sintetizirani su i brojni estrogeni nesteroidne građe. Stvaranje estrogena regulirano je osovinom hipotalamus-hipofiza pri čemu hipotalamus lučenjem hormona koji oslobađa gonadotropine (GnRH, LHRH) potiče prednji režanj hipofize na lučenje folikulostimulirajućeg (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH). Ti hormoni djelovanjem na jajnike potiču sintezu estrogena u premenopauzalnih žena. Estrogeni negativnom povratnom spregom djeluju prvenstveno na hipofizu, a nešto manje i na hipotalamus. Estrogeni se stvaraju u gonadama i u nekim ekstragonadalnim organima uz pomoć enzima aromataze. Aromataza pripada superobitelji citokroma P-450 i produkt je gena CYP19 (12). Ekstragonadalna proizvodnja estrogena odvija se kod premenopauzalnih i postmenopauzalnih žena (13). Ona se odvija lokalno, uz pomoć aromataze koja vrši enzimsku konverziju androgena (testosteron, androstendion) u estrogene, u potkožnom masnom tkivu, dojkama, mišićnom tkivu, kosti, endotelu krvnih žila, glatkim mišićnim stanicama aorte te u mozgu (14,15). Estrogeni nastali na taj način prvenstveno djeluju na lokalnoj razini parakrinim ili intrakrinim mehanizmima (15). Premda ukupna količina tako nastalih estrogena može biti mala, visoke koncentracije koje se postižu u tkivu mogu lokalno utjecati na biološke procese. Najveći izvor estrogena kod žena u premenopauzi su jajnici, a estrogeni stvoreni tim putem djeluju kao endokrini čimbenici odnosno kao cirkulirajući hormoni na udaljena ciljna tkiva (15,16). Kod žena u postmenopauzi stvaranje estrogena se ne događa u jajnicima, već se estrogeni stvaraju samo ekstragonadalno pri čemu kao glavni izvor estrogena služi potkožno masno tkivo (16).

Glavni prirodni estrogeni kod žena su estradiol (E2), estron (E1) i estriol (E3) (17). E2 je glavni produkt sinteze estrogena u jajnicima premenopauzalnih žena te je ujedno najpotentniji estrogen (16). E1 se stvara u koži i masnom tkivu iz androstendiona podrijetlom iz nadbubrežne žlijezde te predstavlja glavni oblik estrogena u postmenopauzalnih žena (18). E2 može nastati i redukcijom E1 u ekstragonadalnim tkivima ili direktnom aromatizacijom cirkulirajućeg testosterona (16). Najmanje potentan E3 stvara se u placenti.

Postoje tri izvora estrogena koji služe kao poticaj za rast i razvoj karcinoma dojke (15,18). Estrogeni sintetizirani u jajnicima svojom endokrinom funkcijom dolaze do tkiva

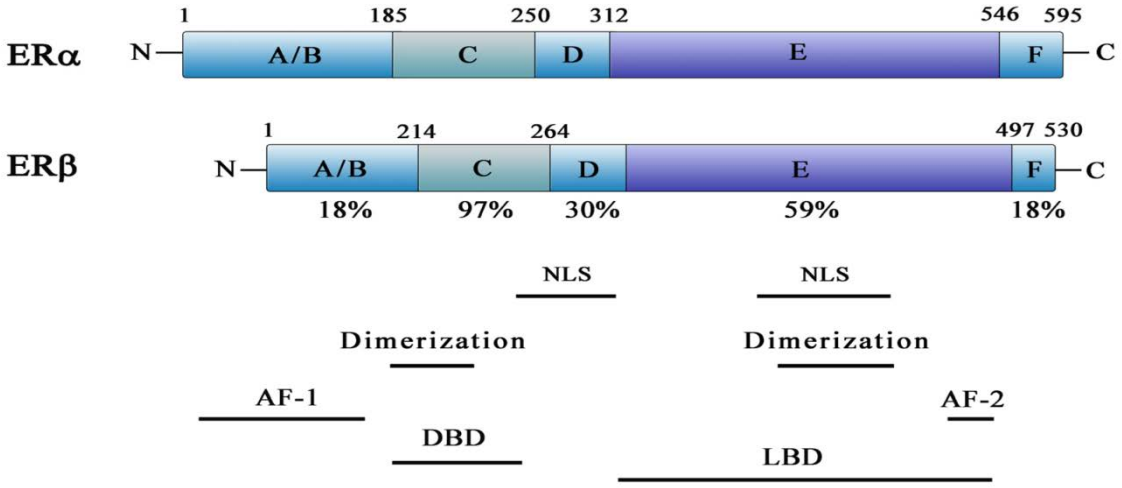
dojke i tu ostvaruju svoj učinak (15). S druge strane ekstragonadalno stvoreni estrogeni također mogu cirkulacijom doći do ciljnih tkiva, pa tako i stanica karcinoma dojke (18). Unutar tumorskog tkiva i okolne strome postoji izražaj enzima aromataze čije se djelovanje ogleda u stvaranju estrogena koji na lokalnoj razini djeluju parakrinim ili intrakrinim mehanizmima (18). Unutar tumorskog tkiva najveći izražaj aromataze nalazi se u fibroblastima (19). Kod postmenopauzalnih žena postoji značajna korelacija između rizika oboljevanja od karcinoma dojke i razine cirkulirajućeg estrogena u plazmi (20). Također, pokazano je da povišen izražaj aromataze, na razini glasničke RNA (mRNA, od engl. *messenger RNA*) i proteina, u kvadranatu dojke u kojem se nalazi tumor možemo objasniti utjecajem čimbenika otpuštenih iz tumorskih stanica koji signalizacijom putem cAMP-a i regulacijom gena za aromatazu utječu na povišenje aktivnosti aromataze u fibroblastima (13).

3. Estrogenski receptor

Članovi superobitelji nuklearnih receptora, kojima pripada i ER, djeluju kao transkripcijski čimbenici (21). Postoje dva glavna oblika u kojima se ER pojavljuje u tkivima, a to su ERα i ERβ. Gen *ESR1* kodira za ERα, a prvi put je sekvenciran iz stanične linije tumora dojke MCF-7 1986. godine (22,23). Iste godine, metodom in situ hibridizacije, otkriveno je da se nalazi na 6. kromosomu (24). U istraživanju Genomic organisation for the human oestrogen receptor gene pokazano je da se ljudski gen za ERα proteže kroz više od 140 kb te da se sastoji od osam egzona odvojenih sa sedam intronskih regija (25). Kuiper i suradnici (26) su 1996. godine otkrili novi oblik ER prisutan kod štakora te su za isti predložili naziv ERβ. Kod ljudi se gen koji kodira za ERβ nalazi na kromosomu 14, a ERβ pokazuje 47% podudarnosti s ERα i to najviše u domeni za vezanje DNA (97% istovjetnih aminokiselina) i liganda (59% istovjetnih aminokiselina) (27-30).

Oba receptora građena su od šest domena nazvanih A-F (Slika 1). N-terminalna odnosno A/B domena sadrži o ligandu neovisnu transaktivacijsku regiju (AF-1, od engl. *activation function 1*), dok se o hormonu ovisna aktivacijska regija (AF-2, od engl. *activation function 2*) nalazi unutar regije za vezanje liganda (LBD, od engl. *ligand-binding domain*) odnosno domene E (28). Domena C, poznatija kao regija za vezanje

DNA (DBD, od engl. *DNA-binding domain*), nalazi se uz domenu A/B te ima važnu ulogu u procesu dimerizacije receptora i vezanju receptora za specifičnu DNA sekvencu (31). Domena D je segment koji odvaja domenu za vezanje DNA i onu za vezanje liganda, a važna je za zadržavanje receptora koji nije u kompleksu s ligandom u jezgri (28,32). Domena E sastoji se od mjesta za dimerizaciju i regije uključene u vezanje liganda te signala za lokalizaciju unutar jezgre (28,33). Kao što je ranije navedeno unutar nje se nalazi i AF-2 koja je odgovorna za o ligandu ovisnu aktivaciju ER. Na C-terminalnom kraju se nalazi F domena koja je važna za aktivaciju transkripcije, djelovanje antiestrogena i koja utječe na opseg aktivnosti kompleksa liganda i estrogenskog receptora (28).



Slika 1. Shematski prikaz funkcionalnih domena ljudskih ERα i ERβ. A/B domena na N terminalnom kraju sadržava AF-1. C domena uključuje regiju za vezanje DNA (DBD) i mjesto za dimerizaciju. Domena D sadržava signal za lokalizaciju unutar jezgre (NLS, od engl. *nuclear localization signals*). E/F domena, smještena na C-terminalnom kraju, sadrži mjesto za vezanje liganda, AF-2, signal za lokalizaciju unutar jezgre i mjesto za dimerizaciju. Prema: García-Becerra (34), str. 110.

ERα se povezuje s inicijacijom i progresijom karcinoma dojke, a za razliku od njega ERβ, unatoč činjenici da njegov izražaj postoji u stanicama karcinoma dojke, u nastanku i progresiji tumora ima još uvijek nerazjašnjenu funkciju (35).

Danas je poznat i receptor za estrogene GPR30 (od engl. G-protein coupled receptor 30) koji pripada obitelji receptora povezanih s G-proteinima (36). Pokazano je da se aktiviran estrogenima GPR30 cijepa u dvije domene Gα i Gβγ te posreduje u transkripcijskoj aktivnosti i brzim odgovorima potaknutim estrogenima (36,37). Gβγ sudjeluje u negenomskoj signalizaciji putem estrogena dovodeći tako do stimulacije aktivnosti signalnog puta receptora za epidermalni čimbenik rasta (EGFR, od engl. *epidermal growth factor receptor*) čime doprinosi razvoju rezistencije na tamoksifen (37).

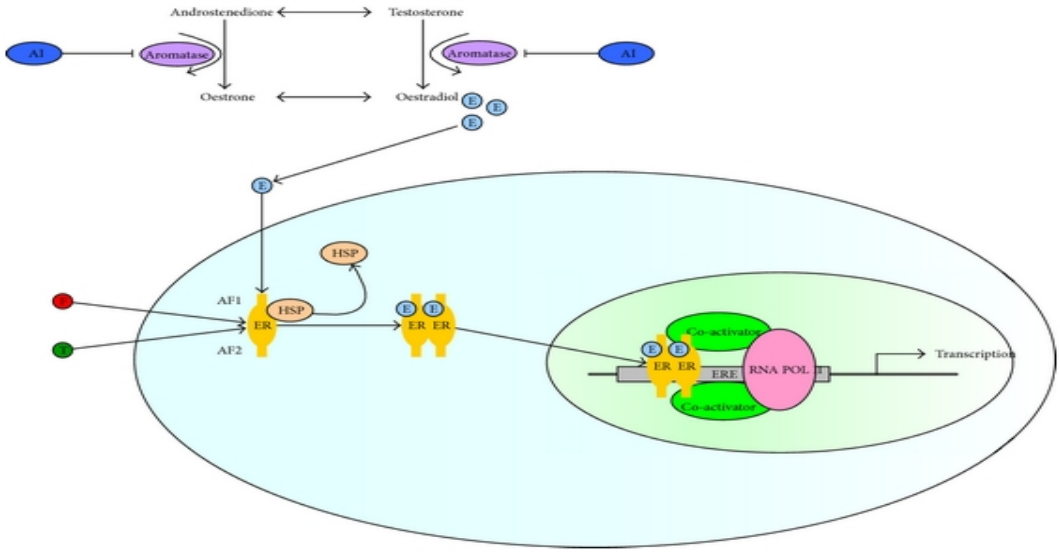
4. Signalizacija putem estrogenskog receptora

Signalizacija putem ER kontrolira mnoge stanične funkcije poput proliferacije, apoptoze i angiogeneze. Iste funkcije stanice karcinoma dojke iskorištavaju kako bi preživjele u nepovoljnom okolišu domaćina, a kao glavni pokretač za rast i progresiju služe im estrogeni.

ERα djeluje u stanici preko dva različita mehanizma signalizacije. Klasičnim genomskim (Slika 2.) i negenomskim signalnim putem. Genomski se u prvome redu odnosi na transkripciju gena posredovanu receptorima u jezgri, dok se negenomski odnosi na aktivaciju različitih signalnih puteva posredovanu receptorima izvan jezgre. Oba puta reguliraju transkripciju gena dovodeći tako do proliferacije, preživljavanja, angiogeneze i invazivnosti što predstavlja ključne karakteristike za razvoj i progresiju tumora (35).

Klasični, genomski signalni put ER je najčešće opisivan, a započinje vezanjem liganda za estrogenski receptor. U odsutnosti liganda ERα s proteinima toplinskog šoka (HSP, od engl. *heat-shock proteins*), koji ga stabiliziraju, čini veliki molekularni kompleks (17,38). Estrogeni aktiviraju ERα sličnim mehanizmima pri čemu je najpotentniji ligand estradiol (E2), a nešto slabiji su estron (E1) i estriol (E3). U krvi i u intersticijskoj tekućini, estrogeni su vezani za α_2-globulin, tj. globulin koji veže spolne hormone (SHBG, od engl. *sex hormone-binding globulin*). Vezani estrogeni ne mogu difundirati u stanice iz čega proizlazi da je fiziološki aktivna samo slobodna frakcija

estrogena zbog čega oni, prije ulaska u stanicu, moraju disocirati od SHBG (17). Budući da su topivi u mastima, estrogeni mogu brzo difuzijom proći kroz staničnu membranu te tako doći do jezgre gdje su smješteni njihovi receptori. Vezanje estrogena za receptore preko LBD dovodi do konformacijske promjene receptora i odvajanja HSP te omogućuje fosforilaciju nekoliko serinskih ostataka na N-terminalnom kraju (17, 39). Slijedom navedenog, receptor se konformacijski mijenja te omogućuje produktivnu interakciju N-terminalne regije s C-terminalnom regijom što dovodi do transkripcijskog sinergizma između AF-1 i AF-2 (40). Te promjene omogućavaju dimerizaciju receptora i vezanje za *cis*-djelujuće sekvence unutar pojačivača ciljanih gena, što rezultira brzom formacijom relativno nestabilnog kompleksa u kojem je ER vezan za specifičan slijed nukleotida u promotorskoj regiji različitih gena tzv. element reaktivan na estrogene (ERE, od engl. *estrogen response elements*) (28,41). Interakcija receptorskog dimera i ERE uključuje, također, i mnoge proteine jezgre, privlači koaktivatore koji stimuliraju transkripciju gena, kao i dijelove transkripcijskog mehanizma (17,42). Koregulatori su proteini koji kroz interakciju s transkripcijskim čimbenicima povećavaju ili smanjuju transkripciju određenih gena. Nekoliko je koregulatora uključeno u patogenezu malignih tumora pri čemu je AIB1 (engl. *amplified in breast cancer 1*, SRC-3) prekomjerno izražen u čak dvije trećine svih karcinoma dojke (43). Pretjeran izražaj gena za AIB1 ima ulogu u razvoju rezistencije na tamoksifen (44). Potpuna agonistička aktivnost zahtjeva aktivaciju obje aktivacijske regije (AF-1 i AF-2) (45).



Slika 2. Prikazano je lokalno stvaranje estrogena enzimatskom konverzijom iz

androgena uz pomoć enzima aromataze te signalizacija putem estrogenskog receptora u stanicama karcinoma dojke. Estrogen (E), receptor za estrogene α (ERα), element reaktivan na estrogene (ERE), proteinima toplinskog stresa (HSP). Prikazane su i najčešće mete djelovanja hormonske terapije: inhibitori aromataze (AI), tamoksifen (T) i fulvestrant (F). Prema: Dixon (13), str. 2.

Poticanje izražaja ciljnog gena u odgovoru na estrogene, kojem prethodi vezanje kompleksa ER i liganda s ERE, može se postići dvama mehanizmima. Direktno vezanje podrazumijeva vezanje molekule ER, za koju je vezan ligand, za ERE te izravno povezivanje s koaktivatorima i kompleksom inicijacije transkripcije (47). Drugi tip vezanja je onaj kod kojeg se kompleks ER i liganda ne veže za DNA, već ulazi u interakciju s drugim transkripcijskim čimbenicima vezanim za DNA kako bi ih stabilizirao ili privukao dodatne kofaktore u kompleks (47). ERα aktiviran estrogenima može vezati druge transkripcijske čimbenike poput Ap-1 i Sp-1, neovisno o vezanju s ERE te može privući koaktivatore kako bi potakao transkripciju dodatnih gena za rast i preživljavanje (48). Jedan od primjera poticanja izražaja ciljnih gena je aktivacija gena za uteroglobin u epitelu endometrija zeca posredovana interakcijom ERα s transkripcijskim čimbenikom Sp-1 (49). Istraživanje koje je provela Caizzi i suradnici (50) pokazalo je da se ERα opsežno veže na genom stanica karcinoma dojke, čak i u odsutnosti estrogena te regulira izražaj stotina gena bitnih za razvojne funkcije. Štoviše, isti doprinosi i transkripcijskoj aktivnosti jer njegova regulacija na niže dovodi do promjena u genskom izražaju i modifikacijama kromatina (50).

Uz ranije navedenu klasičnu genomsku aktivnost, estrogeni mogu također pokrenuti brze negenomske učinke u stanicama karcinoma dojke. Oni su posredovani ER smještenim blizu stanične membrane, unutar kalveola ili drugih domena stanične membrane (34,51). Negenomski put odnosi se na interakciju ER s drugim transkripcijskim čimbenicima pri čemu isti djeluje kao koregulator kako bi modulirao transkripcijsku akivnost na različitim mjestima (35). ER koji je smješten na staničnoj membrani sudjeluje u signalizaciji preko kinaznih kaskada, kalcija i ostalih drugih glasnika kako bi u konačnici mogao utjecati na transkripciju u jezgri (52). ER svojom negenomskom aktivnošću može mijenjati izražaj gena koji su normalno regulirani čimbenicima rasta (52-54). Velik dio stanične signalizacije, uključujući signalne puteve mitogenom aktivirane proteinske kinaze (MAPK, od engl. *mitogen-activated protein*

kinases) i fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K, od engl.phosphatidylinositol-3-kinases) koji podupiru rast i proliferaciju stanice, može biti posredovan s ERα (55).

5. Hormonska terapija

Hormonska terapija karcinoma dojke odnosi se na sistemsko liječenje čiju osnovu čini onemogućavanje interakcije između estrogena i estrogenskog receptora te posljedične aktivacije signalnog puta estrogenskog receptora. Počeci hormonske terapije sežu još od kraja 19. stoljeća kada je Sir George Thomas Beatson objavio da ovariektomija premenopauzalnih žena može uzrokovati regresiju metastatskog karcinoma dojke (28). Hormonska terapija u raku dojke smatra se prvom ciljanom terapijom, a korištena je kao terapija bez poznate mete više od 50 godina prije otkrića estrogenskih receptora (ER) (56). Tridesetih godina 20. stoljeća Lacassagne (57) je u svom radu Hormonal pathogenesis of adenocarcinoma of the breast predložio mogućnost liječenja i prevencije karcinoma dojke antagonistima estrogenskog učinka. Ključan korak za bolje razumijevanje djelovanja estrogena na rast tumora bilo je otkriće estrogenskog receptora 1958. godine (58). Signalni put estrogenskog receptora igra važnu ulogu u razvoju i progresiji karcinoma dojke, stoga njegova inhibicija predstavlja osnovu djelovanja hormonske terapije. Danas endokrina terapija predstavlja najvažniji sistemski modalitet liječenja karcinoma dojke s pozitivnim ER bez obzirana stadij bolesti (59). U 70% novodijagnosticiranih karcinoma dojke postoji izražaj ER pri čemu je njegova prevalencija veća kod bolesnica u menopauzi u odnosu na mlađe (5,11).

Hormonska ovisnost raka dojke povoljan je prognostički čimbenik ne samo zbog mogućnosti primjene hormonske terapije, već i zbog toga što ti tumori posjeduju sljedeća obilježja: dobra histološka diferenciranost, niska razina stanica u S-fazi, kasnija pojava recidiva ili presadnica nakon liječenja lokalne bolesti dojke, indolentan klinički tijek, a presadnice se pojavljuju na mjestima koje je lakše liječiti (3). Glavne prednosti hormonskog liječenja su selektivnost, dobra učinkovitost, dobra podnošljivost, mala toksičnost, očuvana kvaliteta života i niska cijena, a nedostatak je ograničenost primjene samo na hormonski ovisne tumore (3). Stoga hormonska terapija predstavlja osnovu terapijskog pristupa liječenju hormonski ovisnih tumora,

ponajprije raka dojke i raka prostate. Postoje dvije osnovne kategorije hormonske terapije karcinoma dojke: ablativna i aditivna terapija (Tablica 2.) (28).

Tablica 2. Vrste hormonske terapije

Aditivna hormonska terapija	Ablativna hormonska terapija
Sintetski estrogeni	Kirurška: ovariektomija, adrenalektomija,
Androgeni	hipofizektomija
SERM	Zračenje jajnika
SERD	LHRH agonisti
Gestageni	LHRH antagonisti
Antigestageni	Aromatazni inhibitori

Hormonska terapija bolesnica s rakom dojke, odnosno antiestrogeno liječenje temelji se ili na uklanjaju „izvora" estrogena (organa), ili na sprečavanju vezivanja estrogena za unutarstanične ER preko kojih estrogeni djeluju (60). Kod aditivnog hormonskog liječenja postoji stvaranje estrogena, ali je njihov učinak blokiran na staničnom nivou, za razliku od ablativnog hormonskog liječenja gdje je onemogućena proizvodnja estrogena. Postupci uklanjanja „izvora" estrogena mogu biti kirurški s ciljem odstranjenja organa ili endokrinih žlijezda koje stvaraju estrogene ili luče hormone koji stimuliraju stvaranje estrogena: ooforektomija, hipofizektomija i adrenalektomija. U današnje vrijeme uobičajena je tzv. „medikamentozna" ablacija ili terapija, koja se i češće primjenjuje. U tu se svrhu standardno upotrebljavaju ili LHRH agonisti (od engl. *luteinising hormone-releasing hormone agonists*), ili inhibitori enzima aromataze (3,60). Korištenje lijekova koji interferiraju s estrogenima u vezivanju za ER predstavlja drugi pristup antiestrogenog liječenja.

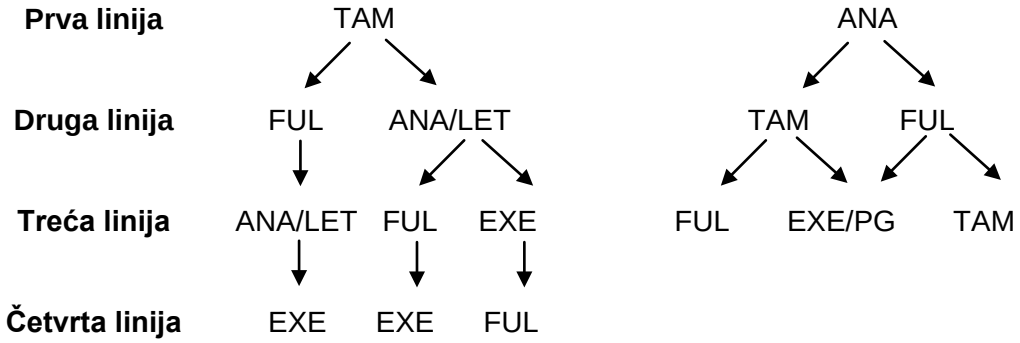
Lijekovi koji se danas najčešće koriste u hormonskoj terapiji dijele se, ovisno o svom mehanizmu djelovanja, na selektivne modulatore estrogenskih receptora (SERM, od engl. *selective estrogen receptor modulators*), aromatazni inhibitori (AI, od engl. *aromatase inhibitors*) i prave antagoniste estrogenskih receptora odnosno selektivne estrogen receptor snižavatelje (SERD, od engl. *selective estrogen receptor down-regulator*). U adjuvantnom liječenju karcinoma dojke koriste se tamoksifen kao predstavnik skupine SERM i aromatazni inhibitori, dok se u liječenju uznapredovalog karcinoma dojke koriste fulvestrant kao predstavnik SERD, tamoksifen i aromatazni inhibitori. Neoadjuvantna hormonska terapija označava sistemsko liječenje

hormonskom terapijom prije operacije u postmenopauzalnih bolesnica s ciljem smanjenja velikih ili inicijalno inoperabilnih tumora (13).

U liječenju hormonski ovisnih tumora većine premenopauzalnih bolesnica u prvoj liniji liječenja lijek izbora je tamoksifen sa ili bez ablativne terapije koja najčešće uključuje LHRH agoniste poput goserelina kako bi se suprimirala produkcija estrogena u jajnicima (62). Rjeđe se koristi laparoskopska ovarijektomija, dočim je zračenje jajnika kao metoda kastracije napušteno u modernoj kliničkoj praksi (3,61,62).

Adjuvantna hormonska terapija u postmenopauzalnih bolesnica usmjerena je na liječenje eventualno prisutnih mikrometastaza, a njena učinkovitost potvrđena je u nekoliko kliničkih studija koje su pokazale visoku korelaciju između liječenja adjuvantnom terapijom i smanjenja rizika povratka bolesti (63). Rezultati nedavne studije pokazali su da sekvencijalna primjena tamoksifena i aromataznog inhibitora letrozola nije učinkovitija od monoterapije letrozolom kao inicijalne terapije u postmenopauzalnih bolesnica (64).

Hormonska se terapija koristi i kod uznapredovalog karcinoma dojke s ciljem produženja života, bilo kao monoterapija ili kao dio sekvencionalnog liječenja prije ili nakon palijativne kemoterapije, s palijativnom radioterapijom i kirurškim liječenjem (65). Predložena shema liječenja nakon liječenja tamoksifenom odnosno anastrozolom kao prvom linijom terapije (Slika 3.) (62).



Slika 3. Predložena shema liječenja nakon liječenja tamoksifenom odnosno anastrozolom kao prvom linijom terapije. TAM, tamoksifen; ANA, anastrozol; LET, letrozol; FUL, fulvestrant; EXE, egzemestan; PG, gestageni. Prema: Robertson (62), str. 703.

5.1. Tamoksifen

Tamoksifen je primjer lijeka koji interferira s etsrogenima u vezivanju za ER. Isti je u kliničkoj je praksi još od 1973. godine te je kao najčešće upotrebljavani lijek u bolesnica s rakom dojke više od 30 godina predstavljao okosnicu liječenja hormonski ovisnih karcinoma dojke (66). Pokazalo se da tamoksifen značajno poboljšava preživljenje i smanjuje rizik povratka bolesti u adjuvantnoj primjeni u početnom stadiju raka dojke (67,68). Postoje istraživanja koja su pokazala učinkovitost profilaktične primjene tamoksifena u žena s visokim rizikom za razvoj raka dojke, ali samo na pojavnost o hormonu ovisnog raka dojke (3).

Tamoksifen je predstavnik skupine SERM koju čine lijekovi čije agonističko odnosno antagonističko djelovanje ovisi o ciljnom tkivu. Vezivanjem tamoksifena za ERα dolazi, kao i pod djelovanjem estrogena, do dimerizacije molekula ERα. U tome molekularnom kompleksu zbog konformacijske promjene nastale njegovim vezanjem, tamoksifen blokira samo jednu domenu (AF2) u funkciji transkripcijske aktivacije, dok je druga domena (AF1) i dalje aktivna (13,60). U ovisnosti o ciljnom tkivu i tamo prisutnim koregulatorima može doći do aktivacije estrogen-ovisnih gena (60). Slijedom navedenog on se smatra kompetitivnim parcijalnim agonistom estrogenskog receptora s antagonističkim djelovanjem na stanice dojke, a agonističkim na stanice uterusa, kost i lipide krvi (3,60). Važniji mehanizmi na kojima se zasniva učinak tamoksifena su inhibicija čimbenika koji potiču rast te poticanje oslobađanja čimbenika koji inhibiraju rast (3). Svojstva tamoksifena kao parcijalnog agonista mogu pridonijeti razvoju rezistencije na hormonsko liječenje tamoksifenom (69).

5.2. Aromatazni inhibitori

Druga velika skupina lijekova za hormonsko liječenje u rutinskoj kliničkoj praksi su aromatazni inhibitori (AI) treće generacije. Inhibitori aromataze putem blokiranja enzima aromataze smanjuju stvaranje estrogena u perifernim tkivima i unutar tumora. Dijele se u dvije skupine, ovisno o njihovoj strukturi i reverzibilnosti učinka, a obuhvaćaju reverzibilne nesteroidne (anastrozol i letrozol) inhibitore i ireverzibilne steroidne inhibitore egzemestan (13). Ireverzibilni inhibitori se vežu za aromatazu kovalentnom vezom te uzrokuju njenu ireverzibilnu inaktivaciju zbog čega se zovu još i aromatazni inaktivatori (3,70). Nadalje, studije koje su uspoređivale učinak anastrozola,

letrozola i egzemestana u adjuvantnom liječenju s učinkom tamoksifena pokazele su da su aromatazni inhibitori učinkovitiji od tamoksifena u sprječavanju povrata bolesti (70,71,72,73).

5.3.Fulvestrant

Fulvestrant je prvi put odobren za kliničku upotrebu 2002. godine. Posjeduje svojstva pravog antagonista estrogenskih receptora, a osim antagonističkog djelovanja na estrogenski receptor on smanjuje izražaj estrogenskog receptora i ubrzava proteosomalnu degradaciju istog. Posljedično se snižava koncentracija molekula ERα (60). Na taj način fulvestrant u potpunosti inhibira djelovanje estrogena kroz molekule ER.

U usporedbi s tamoksifenom fulvestrant ne pokazuje svojstva parcijalnog agonista, zbog toga što je u kompleksu fulvestrant-ER suprimirana aktivnost obje aktivacijske domene (AF-1 i AF-2) te zbog toga nije transkripcijski aktivan (13). *In vitro* se pokazao potentnijim u vezanju za ER (13). Pokusi *in vitro* su pokazali da fulvestrant inhibira proliferaciju i tamoksifen-senzitivnih i tamoksifen-rezistentnih tumorskih stanica, tj. između ta dva lijeka nema tzv. križne rezistencije, a isto je opaženje potvrđeno i na odgovarajućim životinjskim modelima (60). Također, smatra se da ne postoji križna rezistencija između fulvestranta i aromataznih inhibitora (62). Pokazao se učinkovitiji od aromataznih inhibitora u prvoj liniji liječenja postmenopauzalnih bolesnica s uznapredovalim karcinomom dojke (74).

6.Rezistencija na hormonsku terapiju

Unatoč tome što se hormonska terapija pokazala vrlo učinkovitom u liječenju karcinoma dojke, njen učinak je ograničen učestalom pojavom intrinzične (*de novo*) ili stečene rezistencije. *De novo* rezistencija karakterizirana je relapsom bolesti unutar prve dvije godine liječenja adjuvantnom hormonskom terapijom ili progresijom bolesti unutar 6 mjeseci liječenja prvom linijom hormonske terapije za metastatski karcinom dojke (75). Stečena rezistencija karakterizirana je relapsom bolesti za vrijeme trajanja liječenja hormonskom terapijom nakon dvije godine od početka iste, ili relapsom unutar

12 mjeseci nakon završetka hormonskog liječenja, ili progresijom bolesti 6 mjeseci nakon početka hormonske terapije za metastatski karcinom dojke (75).

Skoro 30 - 40% svih karcinoma dojke pokazuju intrinzičnu rezistencijuna endokrinu terapiju pri čemu se to odnosi na 90 - 100% ER negativnih tumora odnosno na 30 - 40% ER pozitivnih tumora (28). Štoviše, većina metastatskih karcinoma dojke nakon početnog odgovora na hormonsku terapiju postane rezistentna na istu što se očituje progresijom bolesti (28,76). Smatra se da se u većine bolesnica s metastatskom bolešću rezistencija razvije unutar 2 do 3 godine od početka liječenja hormonskom terapijom (13). U neoadjuvantnom liječenju rezistencija se očituje progresijom primarne bolesti i to obično povećanjem veličine primarnog tumora, širenjem bolesti u regionalne limfne čvorove ili stvaranjem udaljenih presadnica.

Unatoč ranom otkrivanju tumora u 30% bolesnica karcinomom otkrivenim u ranom stadiju dogodit će se povrat bolesti koji je najčešće metastatske naravi (77). Liječenje metastatske bolesti još uvijek predstavlja izazov u modernoj medicini s gotovo nikakvim šansama za izlječenje. Slijedom navedenog može se uvidjeti važnost boljeg poznavanja mehanizama kojima tumor razvija rezistenciju na endokrinu terapiju te posljedično tome razvoja ciljane terapije kojom bi se vratila osjetljivost na hormonsku terapiju ili blokirali aberantni signalni putevi.

7. Mehanizmi hormonske rezistencije stanica karcinoma dojke

Postoji mnogo mehanizama uključenih u nastanak endokrine rezistencije. Neki od njih uključuju deregulaciju različitih komponenti signalnog puta estrogenskog receptora, promjene u staničnom ciklusu i signalnim molekulama uključenim u preživljavanje stanice te aktivaciju puteva koji omogućuju tumoru dodatni poticaj za prolliferaciju i prežiljavanje. Najvažniji čimbenici u razvoju rezistencije karcinoma dojke na endokrinu terapiju su: promjene signalnog puta ER i njegovih koregulatora; visoka aktivnost odnosno izražaj tirozin kinaznih receptora (RTKs, od engl. *receptor tyrosine kinases*); visoka aktivnost proteina koji reguliraju obrambene mehanizme stanice (Akt, PI3K, mTOR); promjene u aktivnosti proteina koji reguliraju stanični ciklus (Myc, Cyclin D1)

(43,78). Deregulacija tih puteva najčešće proizlazi iz genetskih ili epigenetskih promjena samih tumorskih stanica, a rjeđe je rezultat utjecaja tumorskog mikrookoliša ili mehanizama rezistencije povezanih s domaćinom (43). Svaki od mehanizama rezistencije može djelovati kao samostalan mehanizam ili u kombinaciji s drugim mehanizmima iz čega proizlazi da se mehanizmi rezistencije na hormonsku terapiju međusobno ne isključuju (79).

7.1. Promjene izražaja i funkcije ER

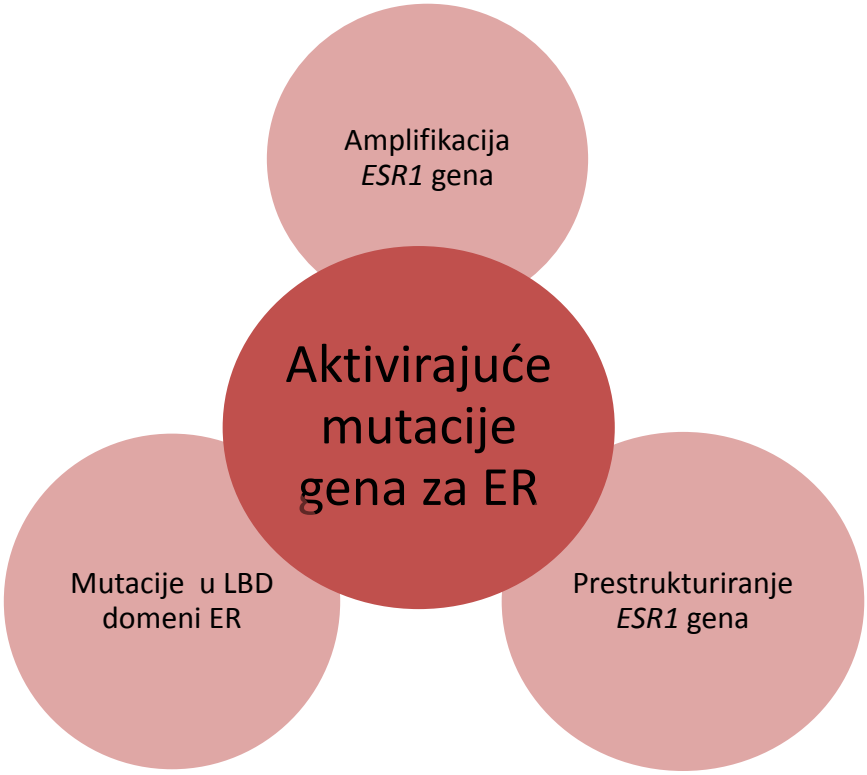
Glavni prediktor odgovora na hormonsku terapiju je status hormonskih receptora, a posebice ER. Gubitak izražaja istog predstavlja osnovni mehanizam *de novo* rezistencije na hormonsku terapiju. Važno je istaknuti da su provedena istraživanja koja su promatrala gubitak izražaja ER kao mehanizma stečene rezistencije na hormonsku terapiju. Pokazalo se da je u samo 17% - 28% (80,81) tumora, koji su inicijalno dobro odgovarali na tamoksifen te su tijekom terapije razvili rezistenciju na isti, došlo do gubitka izražaja ER dok je kod ostalih rezistencija nastupila unatoč tome što je status ER ostao pozitivan. Također, 10 - 20% bolesnica odgovara na drugu liniju terapije (AI ili fulvestrant) što govori u prilog tome da bolesnice sa stečenom rezistencijom na tamoksifen mogu imati pozitivan status ER (82). Slijedom navedenog vidimo da unatoč spoznajama o gubitku izražaja ER kao najčešćeg mehanizma razvoja *de novo* rezistencije, isti u razvoju stečene rezistencije nije toliko čest. Predloženo je nekoliko mehanizama sa svrhom objašnjenja gubitka izražaja ili promjene funkcije ER u razvoju rezistencije na hormonsko liječenje.

7.1.1. Genske alteracije ER

Unatoč centralnoj ulozi ERα u luminalnim tipovima karcinoma dojke, u istraživanju koje su 1994. godine proveli Karnik i sur. (83) pokazano je da mutacije *ESR1*, u većini slučajeva, nisu odgovorne za pojavu rezistencije na hormonsku terapiju. One se pojavljuju vrlo rijetko, dočim je pojava rezistencije česta.

Nedavne su studije, korištenjem metode sekvenciranja nove generacije na uzorcima metastatskog karcinoma dojke s pozitivnim statusom ER, pokazale da je učestalost *ESR1* mutacija puno veća te da može igrati važnu ulogu u stečenoj rezistenciji na hormonsku terapiju (84). S karcinomom dojke povezuje se nekoliko vrsta genomskih abnormalnosti koje su povezane s *ESR1,* a odnose se na mutacije krivog

smisla (od engl. *missense mutacije*) te na amplifikaciju i prestrukturiranje gena (Slika 4.). Štoviše, najveći dio tih mutacija odnosi se na mutacije s pogrešnim kodirajućim značenjem koje su grupirane unutar ER LBD te neovisno o prisutnosti liganda dovode do konstitutivne aktivacije receptora (85). Mutacije *ESR1*, s većom učestalošću se pojavljuju u metastatskim karcinomima dojke rezistentnima na hormonsko liječenje, a smatra se da je njihova pojava gotovo zanemariva u primarnim tumorima prije početka liječenja (85).



Slika 4. Promjene unutar *ESR1* gena koje uzrokuju njegovu aktivaciju

7.1.1.1. Amplifikacija *ESR1*

Amplifikacija gena je mehanizam kojim tumorske stanice povećavaju izražaj gena koji su uključeni u razvoj rezistencije na terapiju kako bi si omogućile preživljenje u domaćinu (86). Upravo pretjeran izražaj produkta amplificiranog gena stoji u podlozi neuspjeha liječenja i razvoja stečene rezistencije u mnogim tipovima malignih tumora. Studije koje su proučavale funkcionalne posljedice amplifikacije *ESR1* dale su oprečne rezultate. U istraživanjima koji su promatrali amplifikaciju *ESR1* u karcinomu dojke ranog stadija pronađena je relativno visoka stopa amplifikacije koja je korelirala s visokim izražajem ER, dobrim odgovorom na tamoksifen i povoljnim ishodom (87, 88). Rezultati drugih studija nisu bili u skladu s prethodnim, a pokazalo se također da

učestalost detektiranih amplifikacija *ESR1* gena ovisi o metodi koja se rabila za detekciju istih (85). Rezultati nedavnih studija koje su istraživale amplifikaciju *ESR1* gena metodom sekvenciranja nove generacije pokazali su da je stupanj amplifikacije u primarnim i metastatskim karcinomima dojke odprilike 2% (89, 90) što sugerira da taj mehanizam nema vodeću ulogu u razvoju rezistencije na hormonsko liječenje. Rezultati male neoadjuvantne studije ukazali su na akviziciju novih produkata amplifikacije koji sadržavaju *ESR1* nakon 6 mjeseci liječenja (91). Slijedom navedenog, klinički je značaj amplifikacije *ESR1* u patogenezi tumora dojke još uvijek nije jasan.

7.1.1.2. Prestrukturiranje *ESR1*

Prestrukturiranje genoma rezultira transkripcijskom disregulacijom gena, dobivanjem fuzijskih genskih transkripata ili proteina (85). U nedavnom istraživanju koje je analiziralo genetske alteracije koje dovode do agresivnije forme ER pozitivnog karcinoma dojke, identificirana je fuzija gena *ESR1* i njemu susjednog gena *CCDC170* (92). Ta fuzija primjer je prestrukturiranja koje rezultira pojačanjem funkcije pri čemu *CCDC170* spojen s *ESR1* koristi konstitutivno aktivni promotor gena za ER kako bi potakao izražaj okrnjene forme *CCDC170* gena (92). U istom radu je pokazano kako *ESR1-CCDC170* pomaže stanicama karcinoma dojke s pozitivnim estrogenskim receptorima razviti agresivniji fenotip i to na način da pojačava migraciju, invaziju te smanjenu osjetljivost na hormonsko liječenje (92). Fuzijski protein ER-CCDC170 je većinom izražen u agresivnijem podtipu hormonski ovisnog karcinoma dojke odnosno u luminalnom B tipu (92). Postoji još jedan oblik genskog prestrukturiranja koji ima ulogu u rezistenciji na hormonsko liječenje. To je translokacija *YAP1-ESR1,* koja je pronađena u metastatskom ER pozitivnom karcinomu dojke, što rezultira fuzijom N-terminalnog kraj ER s C-terminalnim krajem YAP1 (93). U tom proteinu nema LBD te izražaj tog proteina dovodi do o ligandu neovisnog tumorskog rasta i do kompletne rezistencije na fulvestrant (85). Nedavno su pronađeni dodatni geni s kojima *ESR1* stupa u fuziju, značajno je da u svim slučajevima promotor ER zadužen za kontrolu transkripcije proteina nastalih fuzijom (94). Proteini nastali fuzijom imaju ulogu u razvoju rezistencije na hormonsku terapiju (94).

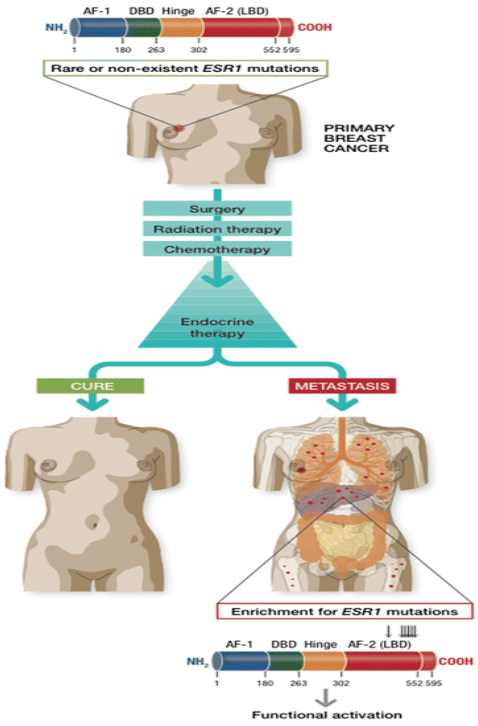
7.1.1.3. Mutacije krivog smisla

Točkaste mutacije unutar *ESR1* gena najčešće za posljedicu imaju aktivaciju ER te se stoga smatraju aktivirajućim mutacijama. Fuqua i suradnici (95) su 2000. godine u polovici analiziranih ER pozitivnih primarnih karcinoma dojke pronašli te

opisali mutaciju koja rezultira pojačanjem funkcije, a karakterizira je zamjena lizina 303 s argininom unutar gena *ESR1.* Somatska mutacija K303R, smještena na granici između domene D i LBD estrogenskog receptora dovodi do povećane osjetljivosti na estrogene (95).

Posljednjih godina, korištenjem metode sekvenciranja nove generacije, nekoliko studija ukazalo je na postojanje mutacija u *ESR1* genu koje rezultiraju pojačanjem funkcije, a prisutne su u 20% bolesnica s ER pozitivnom metastatskom bolešću liječenih hormonskom terapijom poput tamoksifena i inhibitora aromataze (11,85,96). Mutacije su grupirane unutar LBD regije ER i to najčešće na pozicijama Y537 i D538 te dovode do stabilizacije LBD u agonističkoj konformaciji što za posljedicu ima konstitutivnu, o ligandu neovisnu, aktivaciju ER koja potiče rast tumora, razvoj parcijalne rezistencije na hormonsko liječenje te povećani metastatski potencijal (84,85,89). Smatra se da u nepovoljnim uvjetima, proizašlim iz učinaka hormonske terapije na stanice tumora, dolazi do klonalne ekspanzije stanica koje nose određene mutacije koje im omogućavaju preživljavanje, što rezultira razvojem rezistencije na određeni modalitet hormonskog liječenja. To je potkrijepljeno istraživanjem koje je pokazalo kako se u bolesnica s karcinomom dojke kod kojih nije provedeno liječenje nisu mogle detektirati mutacije u genu *ESR1,* dok je kod bolesnica koje su liječene hormonskom terapijom učestalost mutacija korelirala s brojem linija liječenja (89). Također, mutacije gena *ESR1* uglavnom su pronađene kod bolesnica s metastatskim karcinomom dojke (Slika 5.) (84).

U istraživanju koje su proveli Jeselsohn i suradnici (89) somatske mutacije unutar LBD nisu pronađene u primarnim karcinomima dojke, karcinomima dojke koji nisu bili izloženi liječenju te karcinomima dojke s negativnim statusom ER bez obzira na stadij bolesti. Rezultati studije koju su proveli Robinson i suradnici (97) ukazuju na važnost aktivirajućih mutacija *ESR1* gena kao potencijalnih ključnih mehanizama u razvoju stečene rezistencije na hormonsko liječenje.



Slika 5. Razvoj mutacija *ESR1* gena u karcinomu dojke s pozitivnim statusom estrogenskih receptora uz hormonsko liječenje. Mutacije unutar *ESR1* gena su rijetke u primarnim karcinomima dojke, a njihov je broj značajno veći u metastatskim karcinomima dojke koji su rezistentni na hormonsko liječenje. Skoro su sve mutacije lokalizirane u domeni koja veže ligand (LBD) estrogenskog receptora te često rezultiraju konstitutivnom aktivacijom ER. Prema: Alluri (84), str. 5.

Analizom izvanstanične cirkulirajuće DNA (cfDNA, od engl. circulating cell-free DNA) iz uzoraka plazme pacijentica koje su sudjelovale u studiji BOLERO-2 identificirana je visoka stopa mutacija u *ESR1* genu (98). U uzorcima 28,8% bolesnica pronađene su mutacije D538G i Y537S gena *ESR1* (98). U cjelokupnoj populaciji, obje mutacije povezane su s agresivnijim tijekom bolesti te su se pokazale kao nepovoljan prognostički čimbenik koji je povezan s kraćim ukupnim preživljenjem (98).

7.1.2. Epigenetsko utišavanje *ESR1*

Epigenetskim mehanizmima reguliran je izražaj mnoštva gena, pa tako i gena koji kodira ER. Važnost epigenetskih modifikacija leži u činjenici da su one reverzibilne. Za razliku od genetskih mutacija koje su relativno rijetke, epigenetske modifikacije su vrlo česte te zbog toga inhibicija mehanizama nastanka istih predstavlja potencijalnu i obećavajuću strategiju djelovanja na hormonski rezistentne karcinome dojke. One

mijenjaju aktivnost ER regulirajući izražaj gena bez da pritom mijenjaju strukturu sekvence DNA.

Sve je veći broj istraživanja koja ukazuju na važnosti epigenetskih promjena u razvoju rezistencije na endokrinu terapiju. Neke od tih promjena su metilacija DNA, modifikacije histona te nekodirajuća RNA. Epigenetske promjene poput aberantne metilacije CpG otoka u promotorskoj regiji gena za ERα i deacetilacija histona, rezultiraju nastankom kompaktne strukture nukleosoma koja onemogućuje transkripciju (34). Lapidus i suradninci (99) pokazali su da normalno tkivo dojke kao i karcinomi dojke s pozitivnim statusom ER receptora imaju nemetilirano područje CpG otoka za razliku od ER negativnih tumora dojke kod kojih je isto područje opsežno metilirano. Metilacija tih CpG otoka je povezana sa smanjenjem ili izostankom izražaja ER. Pokazano je da histon-lizin N-metiltransferaza WHSC1, u interakciji s BET proteinom BRD3/4 olakšava izražaj *ESR1* gena i signalizaciju signalnim putem ER (11). Kombinacija BET inhibitora JQ1 i fulvestranta je pokazala sinergističku protutumorsku aktivnost u pretkliničkim modelima rezistentnima na tamoksifen (100). Inhibitori DNA metiltransferaze-1 (DNMT-1) i histonske deacetilaze (HDAC) mogu inducirati izražaj *ESR1* gena u ER negativnim stanicama karcinoma dojke i vratiti osjetljivost na hormonsku terapiju (101,102).

Nekodirajuća RNA (ncRNA, od engl. noncoding RNA) je funkcionalna RNA molekula koja se prepisuje iz DNA, ali se ne translatira u proteine. Dvije su forme nekodirajuće RNA od velike važnosti u regulaciji genskog izražaja te posljedično tome i razvoju rezistencije na hormonsko liječenje, a to su mikro RNA (miRNA, od engl. microRNA) i duga nekodirajuća RNA (lncRNA, od engl. long noncoding RNA). miRNA su male RNA molekule koje reguliraju genski izražaj kroz inhibiciju translacije ili degradaciju produkata transkripcije (103), dok su lncRNA veće RNA molekule koje imaju ulogu u funkcijama poput regulacije genskog izražaja, kontrole staničnog ciklusa, apoptoze i diferencijacije (104).

U istraživanju koje su proveli Zhao i suradnici (105) pokazalo se da miRNA koja inhibira ERα (miR-221/222) ima ulogu u rezistenciji na hormonsku terapiju i to na način smanjuje izražaj ERα u MCF-7 i T47D stanicama karcinoma dojke što dovodi do stečene rezistencije na tamoksifen. Ista je studija pokazala da smanjena količina miR-221 odnosno miR-222 u ERα negativnim stanicama karcinoma dojke rezistentnima na

hormonsko liječenje može povratiti izražaj ERα i osjetljivost na apoptozu induciranu tamoksifenom (105). Također, pokazano je da regulacija na više miR-221 i miR-222 utječe i na razvoj rezistencije na fulvestrant (106).

7.1.3. Ostali mehanizmi povezani s gubitkom izražaja ER

Istraženo je još nekoliko mehanizama koji dovode do gubitka izražaja ER poput hipoksije, pretjeranog izražaja EGFR ili HER2 te hiperaktivacije mitogenom aktivirane proteinske kinaze (MAPK, od engl. *mitogen-activated protein kinases*). Hipoksija dovodi do smanjenja ERα inducirajući o proteosomima ovisnu degradaciju ERα u ZR-75 stanicima karcinoma dojke, no ne utječe na ERα mRNA (107). Visok izražaj EGFR i HER2 u karcinomu dojke s negativnim statusom ER sugerira da aktivacija signalizacije čimbenicima rasta te posljedična aktivacija MAPK može pridonijeti smanjenju transkripcije *ESR1* gena što rezultira rezistencijom na hormonsko liječenje (34, 108).

ERα36 je varijanta ERα, molekularne mase 36kDa, nastala alternativnim prekrajanjem pre-mRNA. Lee i sur. (109) su pronašli da je ERα36 izražen u stanicama karcinoma dojke s pozitivnim i u stanicama s negativnim statusom ER te da je izražaj ERα36 povezan sa smanjenim izražajem ER u jezgri i citoplazmi. Uglavnom se nalazi u citoplazmi (50%) ili blizu stanične membrane (40%) i sudjeluje u brzoj estrogenskoj signalizaciji poput aktivacije MAPK/ERK (110). ERα36 upravlja negenomskim signalnim putevima aktiviranim od strane estrogena, a također je nositelj rezistencije na 4-hidroksitamoksifen (111). S obzirom da je ERα36 često izražen u ER negativnom karcinomu dojke, isti bi mogao imati važnu ulogu u dijagnozi i prognozi karcinoma dojke. Već je ranije u tekstu navedeno da je uloga ERβ u rezistenciji na hormonsku terapiju još uvijek nedovoljno razjašnjena. Istraživanje koje su proveli Hopp i suradnici (112) pokazalo je da je niska razina ERβ povezana s rezistencijom na tamoksifen, a da visoke razine ERβ govore u prilog boljem odgovoru na isti. Nedavno istraživanje pokazalo je da pretjeran izražaj ERβ dovodi do rezistencije na hormonsko liječenje i lošije prognoze u postmenopauzalnih bolesnica s ERα pozitivnim karcinomom dojke što nam sugerira da bi ERβ mogao utjecati na prognozu karcinoma dojke povećavajući rezistenciju na hormonsku terapiju (113).

Velik dio karcinoma s mutiranim p53 ima negativan status ER receptora. Gubitak funkcionalnog p53 korelira s lošom prognozom, negativnim statusom ER i rezistencijom na antiestrogensku terapiju (114). Stoga rane mutacije ili gubitak funkcije

p53 tijekom tumorigeneze mogu dovesti do ER negativnog karcinoma dojke sa svim posljedicama koje to donosi po pitanju tumorske progresije i učinkovitosti hormonske terapije (34). Angeloni (115) je u svom istraživanju o regulaciji izražaja ERα pomoću p53 u stanicama MCF-7 pokazao da p53 regulira na više izražaja ERα povećavajući transkripciju gena za ERα te da ista nije ovisna o vezanju p53 za DNA, već o njegovoj mogućnosti da uđe u interakciju s drugim proteinima. U istraživanju o regulaciji izražaja ERα u MCF-7 stanicama tretiranih paklitakselom, pokazano je da uzrokuje indukciju transkripcije ERα gena koja može biti posredovana indukcijom p53 (116).

Multimolekularni kompleksi regrutirani od strane pRb2/p130 mogu biti jedan od ključnih elemenata u regulaciji genskog izražaja *ESR1*, pri čemu mogu djelovati na dva načina ili se vežu za njegov promotor, ili mogu biti uključeni u regulaciju transkripcije *ESR1* gena mijenjajući strukturu kromatina i obrazac metilacije DNA (117,118). Također, pokazano je da prisutnost istih multimolekularnih kompleksa izrazito korelira s metilacijskim statusom gena za ERα (119). S obzirom na navedeno pRb2/p130 predstavljaju obećavajuću metu u razvoju lijekova za karcinome dojke i to posebno onih negativnog statusa hormonskih receptora.

7.1.4. Koregulatori aktivnosti ER

Kao što je ranije u tekstu navedeno, nakon vezanja liganda za ER on mijenja svoju konformaciju te na taj način omogućava regrutaciju koregulatora transkripcijskog procesa (120). Koregulatori se djele na korepresore čije se djelovanje ogleda u smanjenju transkripcijske aktivnosti i koaktivatore koji djeluju s ciljem pojačanja transkripcijske aktivnosti. S obzirom da je njihov izražaj uglavnom sveprisutan i redundantan njihovo djelovanje ponajviše ovisi kontekstu događanja u stanici. Stoga, ovisno o prirodi vezanog liganda, ER privlači koregulatore i ulazi s njima u interakciju te tako pojačava ili smanjuje transkripcijsku aktivnost (59). Aktivnost i izražaj koregulatora može pojačati o ligandu neovisnu aktivaciju ER i promijeniti aktivnost parcijalnih agonista ER (121).

U stanicama karcinoma dojke tamoksifen uglavnom djeluje kao antagonist ER. U prisutnosti visoke razine koaktivatora on na stanice karcinoma dojke može djelovati kao agonist i na taj način poticati transkripcijsku aktivnost ER (127). Niske razine korepresora poput N-CoR (od engl. nuclear receptor co-repressor) i SMRT (od engl. silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors) koreliraju s razvojem

rezistencije na tamoksifen (122). Visoke razine koaktivatora poput SRC-3 (AIB1, od engl. *amplified in breast cancer 1*) povezane su s razvojem rezistencije na tamoksifen te posljedično lošijim ishodom pacijentica liječenih tamoksifenom (44). Gen za SRC-3 je amplificiran u 5 - 10% tumora dojke, a njegov pretjerani izražaj postoji u više od 30% karcinoma dojke (34). Aktivnost koregulatora mogu mijenjati i postranslacijske modifikacije poput fosforilacije koja je inducirana pretjeranom aktivnošću signalnih puteva receptora za čimbenike rasta (11). Fosforilacija SRC-3 rezultira povećanom regrutacijom koregulatora te posljedično povećanom transkripcijskom aktivnosti čak i u prisutnosti tamoksifena, dok fosforilacija korepresora dovodi do smanjenja inhibitornog efekta istog na aktivnost ER (122,123). S obzirom da neki od mehanizama rezistencije uključuju aktivaciju ERα neovisnu o vezanju liganda ili mutacije u ERα koji omogućuju interakciju ERα i koregulatora što dovodi do neprekidne signalizacije signalnim putem estrogenskog receptora te tumorske proliferacije razvili su se novi lijekovi poput ECBI (od engl. *coregulator binding inhibitor*) koji predstavljaju obećavajuću strategiju liječenja metastatskih karcinoma dojke rezistentnih na hormonsko liječenje (124).

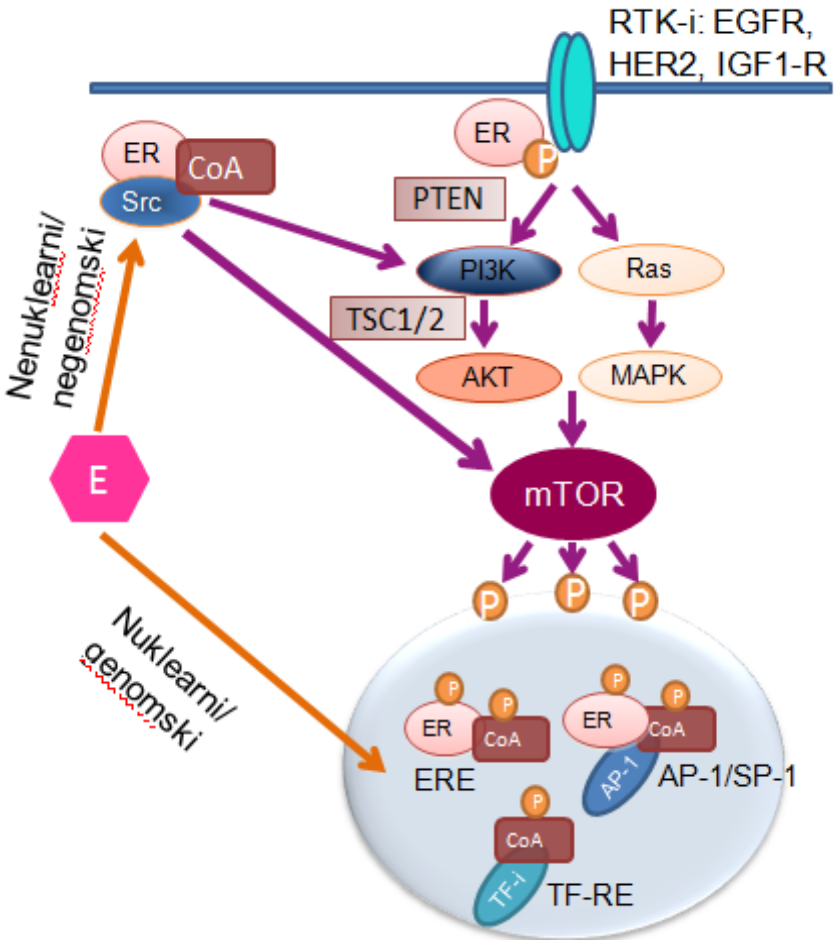
Osim koregulatora u regulaciji transkripcijske aktivnosti ER sudjeluju i „pionirski“ čimbenici. Oni su transkripcijski čimbenici koji se mogu direktno vezati i otvoriti zgusnuti kromatin kako bi olakšali vezanje drugih transkripcijskih čimbenika poput ER i ostalih nuklearnih receptora (11). U nekoliko studija pokazano je da FOXA1 (od engl. *Forkhead box protein A1*) ima važnu ulogu u interakcijama ER i kromatina, a isto tako i u transkripciji gena potaknutoj ER (11,125). Nedavne studije upućuju da bi amplifikacija gena za FOXA1 mogla biti uključena u nastanak endokrine rezistencije (126).

7.2. Razmjena informacija između puteva prijenosa signala

Razmjena informacija između signalnog puta ER i drugih puteva prijenosa signala poput signalnog puta receptora za čimbenike rasta, kinaza povezanih s preživljavanjem stanice (PI3K/Akt) te protein kinaza aktiviranih stresom dovodi do fosforilacije ER i njegovih koregulatora što može pridonijeti razvoju rezistencije na hormonsko liječenje u bolesnica s karcinomom dojke. Interakcija između navedenih signalnih puteva može biti prisutna prije početka ili se javiti za vrijeme trajanja liječenja, a njeno djelovanje očituje se u zaobilaženju blokade ER osiguravajući tako alternativni poticaj za proliferaciju i preživljavanje tumorskih stanica (127).

7.2.1. Aktivacija signalnih puteva receptora za čimbenike rasta

Aktivacija ER neovisna o prisutnosti liganda može biti posljedica aktivnosti puteva prijenosa signala nizvodno od receptora prisutnih na staničnoj površini koji su izravno povezani s unutarstaničnim enzimima. Najveća porodica takvih receptora su tirozin kinazni receptori (RTK) koji fosforiliraju proteinske supstrate na tirozinu. Vezanje liganda za izvanstaničnu domenu tih receptora aktivira njihovu citosolnu kinaznu domenu te uzrokuje fosforilaciju samog receptora i unutarstaničnih ciljnih proteina preko kojih se širi signal. Tirozin kinazna domena unutarstanični je dio receptora za čimbenike rasta uključujući receptor humanog epidermalnog čimbenika rasta 2 (HER2, od engl. *human epidermal growth factor receptor 2*), receptor za epidermalni čimbenik rasta (EGFR, od engl. *epidermal growth factor receptor*) i receptor čimbenika rasta nalik inzulinu tip 1 (IGF-1R, od engl. . *insulin-like growth factor 1 receptor*). Dugotrajna deprivacija estrogena može direktno inducirati transkripciju receptora za čimbenike rasta poput EGFR, HER2 i IGF-1R što uzrokuje povećanje aktivnosti njihovih nizvodnih medijatora te povećanu proliferaciju tumorskih stanica i rast tumora neovisan o prisutnosti estrogena (128). Razmjena informacija između puteva prijenosa signala ER i RTK pokazala se važnom za razvoj rezistencije na endokrinu terapiju u pretkliničkim modelima (Slika 6.) (76). Danas postoje jasni dokazi koji upućuju na ulogu razmjene signala između signalnih puteva ER i receptora za čimbenike rasta u razvoju intrinzičke i stečene rezistencije na hormonsko liječenje.



Slika 6. Prikazana je interakcija signalnih puteva RTK s signalnim putem ER. ER smješteni izvan jezgre ili na staničnoj membrane nakon aktivacije s estrogenima povezuju se s receptorima za čimbenike rasta te ostalim molekulama važnim za signalizaciju. Ta interakcija rezultira aktivacijom nizvodnih kinaznih puteva (PI3K/Akt I Ras/MAPK) koji potom fosoriliraju različite koregulatore i transkripcijske čimbenike dovodeći tako do transkripcije. Akt, protein kinaza B; CoA, koenzim A; EGFR, receptor epidermalnog čimbenika rasta; HER2, receptor za humani epidermalni čimbenika rasta 2; IGF1-R, receptor za čimbenik rasta sličan inzulinu tip 1; MAPK, mitogenom aktivirana protein kinaza; PI3K, fosfatidilinozitol 3-kinaza; PTEN, homolog fosfataze i tenzina; RTK, tirozin kinazni receptor; Src, protoonkogenska tirozinska kinaza; TSC1/2, kompleks tuberozne skleroze 1/2 (od engl. *tuberous sclerosis complex ½).* Prilagođeno prema Osborne (43), str. 236.

7.2.1.1. Pretjeran izražaj HER2

Receptor humanog epidermalnog čimbenika rasta 2 član je obitelji HER tirozin kinaznih receptora koji imaju važnu ulogu u poticanju tumorske proliferacije i rasta (76).

HER2 fosforilira ER i njegove koregulatore čime dovodi do o ligandu neovisnog genskog izražaja čak i u prisutnosti negativnih regulatora poput SERM-a (128). Studije su pokazale da pacijentice s ranim karcinomom dojke kod kojeg je prisutan pretjeran izražaj HER2 lošije odgovaraju na tamoksifen od onih s HER2 negativnim tumorom (129). Stoga se pretjeran izražaj HER2 smatra prediktorom lošeg odgovora na tamoksifen (130). Štoviše, istraživanja su pokazala da HER2 pozitivni metastatski karcinomi dojke lošije odgovaraju od HER2 negativnih tumora ne samo na tamoksifen nego i na druge oblike hormonskog liječenja (129). Aktivacija HER2 dovodi do smanjenja razina ER te povećane fosforilacije ER, čak i u odsutnosti estrogena (76).

Istraživanje koje su proveli Hurtado i suradnici (131) sa svrhom traženja poveznice između regulacije transkripcije ER i HER2 pokazalo je da na genski izražaj *HER2* negativno utječe kompleks PAX2-ER-tamoksifen kod staničnih linija karcinoma dojke osjetljivih na tamoksifen. Za razliku od toga, kod staničnih linija rezistentnih na tamoksifen, koaktivator SRC-3 se natječe s PAX2 (od engl. *paired box 2 gene product*) pri vezanju za ER što dovodi do poticanja transkripcije HER2 (131). Signalni put HER2 utječe na transkripciju posredovanu ER ometajući interakciju između ER i njegovih koregulatora. Signalizacija signalnim putem ER može aktivirati ili inhibirati signalizaciju putem HER direktnim i indirektnim mehanizmima. ER svojom genomskom aktivnošću može inducirati izražaj različitih liganada i receptora za čimbenike rasta, svojom negenomskom aktivnošću aktivirati signalne putove tih receptora, ali isto tako i inhibirati izražaj ključnih receptora poput HER1 i HER2 (11).

Stoga, hormonsko liječenje blokirajući genomske učinke ER dovodi do povećanog izražaja HER1 i HER2 receptora te povećane signalizacije nizvodno od njih (43). To je jedan od mogućih mehanizama kojima hormonsko liječenje doprinosi nastanku rezistencije. Pojačana aktivacija HER2 signalnog puta može se pojaviti u nekim karcinomima dojke u tijeku progresije bolesti za vrijeme trajanja hormonskog liječenja (76). HER2 aktivira i nizvodne signalne puteve poput PI3K/AKT I MAPK što će biti opisano u tekstu koji slijedi.

7.2.1.2. EGFR signalni put

HER1 je jedan od četiri člana obitelji receptora za humane epidermalne čimbenike rasta (HER1 - 4), a u literaturi je poznatiji kao receptor za epidermalni čimbenik rasta (EGFR). Vezanjem čimbenika rasta povezanih s epidermalnim

čimbenikom rasta (EGF, od engl. *epidermal growth factor*) dovodi do homodimerizacije odnosno heterodimerizacije receptora te aktivacije nizvodnih signalnih puteva PI3K/Akt i MAPK (76). Pretjeran izražaj EGFR povezan je s gubitkom ER, lošijom prognozom bolesnica s karcinomom dojke te progresijom bolesti u tijeku hormonskog liječenja (132,133). Također, pretjeran izražaj EGFR može se smatrati prediktorom slabog odgovora na tamoksifen (128,133). Dugotrajno hormonsko liječenje olakšava translokaciju estrogenskog receptora GPR30 na površinu stanice pri čemu dolazi do interakcije sa signalnim putem EGFR (37). Interakcija između GPR30 i EGFR intenzivira se u toku liječenja endokrinom terapijom te dolazi do stimulacije rasta inducirane signalizacijom putem EGFR što se smatra inicijalnim čimbenikom u razvoju rezistencije na tamoksifen u stanicama karcinoma dojke (37). U karcinomu dojke povećan izražaj EGFR dovodi do prekomjerne aktivnosti signalnih puteva PI3K/AKT i MAPK što za posljedicu ima razvoj rezistencije na hormonsko liječenje (76).

7.2.1.3. IGF-1R signalni put

Aktivacija signalnog puta estrogenskog receptora najčešće se događa posredovanjem estrogena, no do nje se može doći i interakcijom sa signalnim putevima receptora za čimbenike rasta poput inzulinu sličnog čimbenika rasta 1 (IGF-1, od engl. *Insulin-like growth factor 1*). Ligandom posredovana aktivacija IGF-1R te posljedična aktivacija nizvodnih signalnih puteva potiču proliferaciju, transformaciju i preživljavanje (134). Signalizacija putem IGF-1R preko IRS-1 (od engl. *Insulin receptor substrate 1*) nizvodno aktivira puteve MAPK i PI3K/Akt. Istraživanja su pokazala da MAPK fosforilira serin118 u AF-1 domeni ER što dovodi do aktivacije receptora (135). Poput toga pokazano je da i signalni put PI3K, preko Akt, fosforilacijom serina167 u AF-1 aktivira ER (135). Razmjena signala između signalnih puteva IGF-1R i ER je važna za razvoj rezistencije na hormonsko liječenje posredovane IGF-1R (74). Pretjeran izražaj IRS-1 (od engl. *Insulin receptor substrate 1*) potiče rast i transformaciju neovisnu o estrogenu (134). Pokazano je da jedan of liganada IGF-1R (IGF-1) aktivira program genske transkripcije povezan s agresivnijim tumorskim ponašanjem te potencijalnom neovisnošću karcinoma dojke o estrogenima (136). Štoviše, rezultati studija koju su proveli Cui i suradici (137) pokazali su da u stanicama karcinoma dojke IGF-1 djelovanjem preko PI3K/Akt/mTOR signalnog puta smanjuje izražaj PR na razini mRNA i proteina prvenstveno inhibirajući transkripciju gena za PR. S obzirom da se niske razine PR u primarnom karcinomu dojke povezuju s lošijom

prognozom i odgovorom na hormonsku terapiju, nizak izražaj PR bi se mogao koristiti kao indikator aktivne signalizacije signalnim putevima receptora za čimbenike raste te posljedično agresivnijeg tumorskog fenotipa i rezistencije na hormonsko liječenje (137).

7.2.1.4. FGFR signalni put

Receptori za čimbenike rasta fibroblasta (FGFR, od engl. *fibroblast growth factor receptor*) su članovi obitelji RTK. Kada je aktiviran FGFR potiče proliferaciju, migraciju, angiogenezu i preživljavanje tumorskih stanica (138). Poput drugih članova obitelji RTK i FGFR1 je povezan s aktivacijom signalnih puteva PI3K/AKT/mTOR i MAPK. Smatra se da pretjeranom aktivacijom tih puteva u stanicama karcinoma dojke FGFR1 doprinosi razvoju rezistencije na hormonsko liječenje (139). *FGFR1* je amplificiran u otprilike 10% karcinoma dojke te se smatra jednim od najčešće amplificiranih gena u karcinomima dojke (140). Amplifikacija *FGFR1* se češće pronalazi u luminalnom B podtipu karcinoma dojke (16% - 27%), a povezana je s visokom proliferacijom, negativnim statusom PR te se smatra prediktivnom za lošu prognozu bolesnica oboljelih od karcinoma dojke (139). Stanice karcinoma dojke s amplifikacijom *FGFR1* te pretjeranim izražajem receptora za FGFR1 pokazuju pojačanu signalizaciju ovisnu o ligandu što dovodi do pojačane aktivacije nizvodnih signalnih puteva (139). Smatra se da amplifikacija *FGFR1* i pretjeran izražaj FGFR1 doprinose lošijoj prognozi pacijentica oboljelih od karcinoma dojke i razvoju rezistencije na hormonsko liječenje.

7.2.2. Hiperaktivacija puta PI3K/Akt/mTOR

Ključna interakcija u razvoju rezistencije na hormonsko liječenje je ona između signalnih puteva PI3K/Akt/mTOR i ER. PI3K/Ak/mTOR signalni put se nalazi nizvodno od ranije navedenih puteva te ga isti mogu aktivirati. Smatra se središnjim signalnim putem uključenim u regulaciju staničnog preživljavanja, rasta, proliferacije i migracije, a pokazalo se da u malignim tumorima često postoji njegova nepravilna regulacija što doprinosi progresiji tumora (141). Aktivacijom fosfatidil-inozitol-3-kinaze (PI3K) fosforilira se fosfatidil-inozitol-4,5-bisfosfat (PIP_2) te nastaje fosfatidil-inozitol-3,4,5-fosfat (PIP_3) koji dovodi do fosforilacije te posljedične aktivacije protein kinaze B (Akt). Akt fosforilira i koči aktivnosti negativnih regulatora mTOR-a (od engl. *mammalian target of rapamycin*) (TSC1/2) te tako potiče aktivaciju mTOR signalnog u odgovoru na poticanje čimbenicima rasta (142).

Istraživanje koje su proveli Miller i suradnici (143) pokazalo je povećana aktivnost signalnih puteva IGF1-R/PI3K/mTOR prisutna u stanicama karcinoma dojke koje su neovisne o hormonima te da je intrinzička aktivnost PI3K signalnog puta nužna za stjecanje te održavanje hormonske neovisnosti. Direktna inhibicija PI3K je učinkovito suprimirala rast neovisan o hormonima, dok je inhibicija uzvodnih (RTK) ili nizvodnih (mTOR) puteva pokazala samo parcijalnu inhibiciju staničnog rasta (143). Deregulacija tog puta je ključna za razvoj stečene rezistencije na hormonsko liječenje (128).

Signalni put PI3K/Akt/mTOR, osim već navedenih čimbenika rasta, mogu aktivirati i PI3K aktivirajuće mutacije te smanjena ekspresija negativnih regulatora puta poput homologa fosfataze i tenzina (PTEN). DeGaraffenried i suradnici (144) su pokazali da su stanice karcinoma dojke s povećanom aktivnošću Akt rezistentne na hormonsko liječenje te da se njihova se osjetljivost može vratiti davanjem mTOR inhibitora. Štoviše, rezultati randomizirane studije BOLERO-2 koja je evaluirala kombinaciju egzemestana i everolimusa (inhibitor mTOR-a) u liječenju metastatskih karcinoma dojke s pozitivnim hormonskim receptorima pokazale su značajno produljenje preživljenja do progresije bolesti (PFS, od engl. *progression free survival*) kod pacijentica liječenih s kombinacijom oba lijeka u odnosu na one liječene samo egzemestanom (145).

PI3K signalni put je često nepravilno reguliran u karcinomima dojke zahvaljujući mutacijama ili amplifikacijama gena koji kodiraju različite komponente tog puta (*PIK3CA, PIK3CB, PIK3R1, AKT1, AKT2*) te smanjenim izražajem negativnih regulatora puta poput PTEN i INPP4B (146,147,148). U luminalnom A podtipu karcinomima dojke najčešća pronađena mutacija je mutacija gena *PIK3CA* u 45% slučajeva, dok je u luminalnom B podtipu pronađena u 29% slučajeva (90). Povećana aktivnost signalnog puta PI3K povezana je sa smanjenim razinama ER te njegovom manjom aktivnosti i lošijim ishodom kod bolesnica liječenih adjuvantnom hormonskom terapijom (11). Postoje studije koje su pokazale kako se kod bolesnica kod kojih se javila hormonska rezistencija, osjetljivost na hormonsko liječenje može vratiti inhibitorima signalnog puta PI3K (145).

7.2.3. Hiperaktivacija puta MAPK/ERK

Signalni put protein-kinaze aktivirane mitogenom (MAPK, od engl. *mitogen-activated protein kinases*) je kaskada protein-kinaza koje imaju ključnu ulogu u prijenosu signala koji sudjeluju u regulaciji staničnog rasta i diferencijacije (142,149). Središnji element tog puta je porodica protein-serin/treonin-kinaza, nazvanih MAPK, koje se aktiviraju u odgovoru na različite čimbenike rasta i druge signalne molekule (142). Od tri MAPK najbolje je istražena ERK (od engl. *extracellular signal-regulated kinases*), a također je najbolje okarakteriziran signalni put povezan s njom Raf-MEK-ERK (149). Aktivacija ERK je povezana s aktivacijom dvije uzvodne protein kinaze koje su preko Ras-proteina povezane s receptorima za čimbenike rasta, a to su Raf i MEK. Visok izražaj EGFR i HER2 pronađen je u ER negativnim karcinomima dojke što upućuje da bi aktivacija signalizacije putem faktora rasta te posljedična aktivacija MAPK mogli doprinjeti smanjenju transkripcije *ESR1* i razvoju rezistencije na hormonsko liječenje (108). Signalni put MAPK važan je posrednik u razvoju resistencije kao odgovora na pretjeranu signalizaciju faktorima rasta.

Istraživanje koje su proveli Shim i sur. (150) pokazalo je da aktivacija MAPK čini stanice karcinoma dojke s dugotrajnom deprivacijom estrogena osjetljivijim na proliferativno djelovanje E2. ER na poziciji S118 fosforiliraju različite kinaze među kojima je i MAPK. Pokazano je da ta fosforilacija povećava afinitet kompleksa ER-E2 za koaktivator SRC-3, no ne utječe na vezanje ER s E2 i DNA (151). ERK fosforilacijom može dovesti do o ligandu neovisne aktivacije ER (79). Bergqvist i sur. (152) pokazali su da su aktivirana ERK1/2 i fosforilirani ER povezani s boljim preživljenjem žena oboljelih od karcinoma dojke liječenih tamoksifenom.

7.3. Apoptoza i promjene u regulaciji staničnog ciklusa

Ova kategorija mehanizama povezanih s razvojem rezistencije na hormonsko liječenje obuhvaća molekule uključene u stanične i biološke odgovore na hormonsko liječenje poput inhibicije, proliferacije i indukcije apoptoze (43). Antiestrogenska terapija dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa u G_1 (od engl. *gap 1*) fazi koja predstavlja interval između mitoze i početka replikacije DNA te dolazi do usporavanja

brzine rasta tumorskih stanica (76,142). Proliferaciju stanica reguliraju različiti izvanstanični čimbenici rasta koji kontroliraju napredovanje stanice kroz restrikcijsku točku pri kraju G_1 faze. U odsutnosti čimbenika rasta, stanice nisu sposobne prijeći restrikcijsku točku te umjesto toga ulaze u stanje mirovanja, poznato kao faza G_0 iz kojeg se mogu ponovo uključiti u stanični ciklus tek u odgovoru na stimulaciju određenim čimbenicima rasta (142). Kritičnu vezu između signalizacije čimbenicima rasta i napredovanja kroz stanični ciklus omogućuju ciklini tipa D. Sintezu ciklina D potiče stimulacija čimbenicima rasta kao rezultat signalizacije putem Ras/Raf/ERK te se sinteza nastavlja tako dugo dok su čimbenici rasta prisutni (142). Ulazak ciklina D1 u kompleks s kinazama ovisnim o ciklinima (CDK, od engl. *cyclin-dependent kinases*), CDK4 i CDK6, te njihova posljedična aktivacija nužni su kako bi se uz pomoć Rb postiglo napredovanje staničnog ciklusa kroz restrikcijsku točku G_1/S (153). Fosforilacija Rb pomoću kompleksa CDK4,6/ciklin D1 rezultira pri kraju faze G_1 odvajanjem transkripcijskog čimbenika koji potom stimulira izražaj svojih ciljnih gena koji kodiraju proteine potrebne za napredovanje kroz stanični ciklus. Ulazak u S-fazu staničnog ciklusa u kojoj se odigrava sinteza DNA posredovana je aktivacijom kompleksa CDK2/ciklin E. Aktivnost tog kompleksa inhibirana je u G_0 ili ranoj G_1 fazi pomoću CDK inhibitora p27 (142). Protein p21 inhibira kompleks CDK2/ciklin E i zaustavlja stanični ciklus u G_1 fazi (142).

U karcinomu dojke ciklin D1, ciklin E1, CDK inhibitor p21 i CDK inhibitor p27 predstavljaju važne molekule uključene u kontrolu staničnog ciklusa. Poremećena regulacija pozitivnih i negativnih regulatora staničnog ciklusa dovodi do ometanja i inhibicije antiproliferativniog djelovanja hormonske terapije odnosno do rezistencije na hormonsko liječenje. Stoga pretjeran izražaj Myc-a, ciklina E1, ciklina D1 odnosno inaktivacija tumor supresora Rb te smanjen izražaj inhibitora kinaza ovisnih o ciklinima (CDK, od engl. *cyclin dependent kinase*s) p21 ili p27 dovodi do smanjene osjetljivosti na hormonsko liječenje *in vitro* (79). U stanicama karcinoma dojke oni su regulirani aktivacijom RTK i receptora za steroidne hormone, a njihova deregulacija često utječe na osjetljivost na hormonsko liječenje (154).

Mnogi signalni putevi vezani uz različite receptore čimbenika rasta fosforilacijom proteina i modulacijom specifičnih transkripcijskih čimbenika i miRNA reguliraju izražaj i aktivnost negativnih regulatora staničnog ciklusa (43). Tipičan primjer puteva s takvim djelovanjem predstavlja HER2 signalni put te hiperaktivacija Akt i Src. Aktivacija

signalizacije receptora za čimbenike rasta preko puteva PI3K/Akt djeluje kao modulator molekula uključenih u mehanizme apoptoze i preživljavanja stanice. Izražaj p27 je često smanjen u tumorskom tkivu zbog aktivacije signalizacije koja potiče mitozu i njegove povećane degradacije usprkos tome što je gen koji kodira p27 rijetko mutiran ili deletiran (155). Također, smatra se da mi-R221 i mi-R222 smanjuju izražaj p27 te tako dovode do rezistencije na tamoksifen (79). U karcinomu dojke pretjeran izražaj Myc-a, ciklina D1 i ciklina E1 je 2 do 3 puta češći nego što je to aplifikacija gena koji kodiraju te molekule (156). Također, inaktivacija Rb je učestalija nego što je to delecija ili mutacija gena *RB1* (157). Razlozi koji stoje u podlozi toga su aktivacija signalnih puteva koji potiču mitozu i deregulacija transkripcije tih gena. Pretjeran izražaj i amplifikacija ciklina D čest je događaj u karcinomima dojke luminalnog B podtipa. Ciklin D1 je amplificiran u 58% luminalnih B podtipova karcinoma dojke dok je u luminalnom A podtipu amplificiran u 29% slučajeva (158). Varijanta ciklina D1 nastala alternativnim prekrajanjem može biti uključena u nastanak rezistencije na hormonsku terapiju (159). Pokazano je da pretjeran izražaj ciklina D1 i Myc može na više načina modulirati osjetljivost na antiestrogene te se povezuje s rezistencijom na tamoksifen (79). Ciklin D1 te njegovi nizvodni medijatori predstavljaju potencijalnu metu za razvoj lijekova sa svrhom liječenja hormonski rezistentnih karcinoma dojke. Palbociklib, inhibitor CDK4/6, je odobren od strane Agencije za hranu i lijekove (FDA, od engl. *Food and Drug Administration*), u kombinaciji s letrozolom, kao prva linija liječenja postmenopauzalnih bolesnica s ER+ HER2- metastatskim karcinomom dojke (160).

Povećan izražaj antiapoptotskih molekula i aktivnost signalnih putova uključenih u preživljenje stanice (Bcl-XL) te smanjen izražaj proapoptotskih molekula (Bik, kaspaza 9) mogu također dovesti do razvoja rezistencije na hormonsko liječenje (43).

8. Kliničke implikacije

Hormonska terapija predstavlja okosnicu liječenja bolesnica s luminalnim podtipovima karcinoma dojke. Unatoč njenoj učinkovitosti u većine bolesnica prije ili kasnije dolazi do pojave rezistencije na hormonsko liječenje. Prema inicijalnom odgovoru na hormonsku terapiju razlikujemo dva tipa rezistencije, intrinzičku i stečenu. Definicije intrinzičke i stečene rezistencije uvrštene u smjernice za liječenje uznapredovalog karcinoma dojke su navedene u tablici 3 (75).

Tablica 3. Definicije intrinzičke i stečene rezistencije

Intrinzička rezistencija	karakterizirana je relapsom bolesti unutar prve dvije godine liječenja adjuvantnom hormonskom terapijom ili progresijom bolesti unutar 6 mjeseci liječenja prvom linijom hormonske terapije za metastatski karcinom dojke
Stečena rezistencija	karakterizirana je relapsom bolesti za vrijeme trajanja liječenja hormonskom terapijom nakon dvije godine od početka iste, ili relapsom unutar 12 mjeseci nakon završetka hormonskog liječenja, ili progresijom bolesti 6 mjeseci nakon početka hormonske terapije za metastatski karcinom dojke

Inhibicija djelovanja estrogena nužna je u liječenju bolesnica sa stečenom rezistencijom na hormonsko liječenje jer se pokazalo da unatoč razvoju rezistencije, postoji izražaj ER te on aktivno pridonosi progresiji bolesti. AI, SERM i SERD su se pokazali učinkovitima u liječenju karcinoma dojke s pozitivnim hormonskim receptorima i to posebno u ranim stadijima bolesti. Usprkos tome u slučaju rezistencije na hormonsko liječenje uviđa se potreba potentnije blokade signalnog puta estrogenskog receptora te drugih signalnih puteva koji zajedno dovode do progresije bolesti.

Zadnje dvije godine prepoznata je važnost aktivirajućih mutacija *ESR1*, a njihova učestalost iz cfDNA uzoraka veća je nego što se detektira sekvencioniranjem iz tumorskog tkiva. Štoviše, takvi tumori su biološki agresivniji što se demonstrira kao kraće ukupno preživljenje (OS). Rezultati pretkliničkih studija sugeriraju da aktivirajuće mutacije dovode do relativne rezistencije na tamoksifen i fulvestrant te da su za učinkovitu inhibiciju aktivnosti ER potrebne veće doze tih lijekova. U skladu s tim su i rezultati dvije kliničke studije (CONFIRM i FIRST). Fulvestrant (500 mg) se kao prva linija liječenja bolesnica s uznapredovalim karcinomom dojke pokazao učinkovitijim od anastrozola (74). Viša doza fulvestranta (500mg) pokazala se učinkovitijom od niže (250 mg) u liječenju bolesnica s karcinomom dojke rezistentnim na hormonsko liječenje (161). S obzirom da aktivnost mutiranog ER ovisi o njihovoj interakciji s koaktivatorima razvoj novih lijekova poput SRC-3 inhibitora predstavlja obećavaju strategiju u liječenju karcinoma dojke koji nose mutacije *ESR1* gena. Unutar studije BOLERO-2 provedeno je istraživanje koje je pokazalo da bolesnice liječene egzemestanom čiji tumor ima mutaciju D538G imaju kraći PFS u odnosu na divlji tip (98). Isto istraživanje je pokazalo

da su bolesnice s D538G mutacijom pokazale PFS benefit ako im se doda everolimus, za razliku od onih s Y537S mutacijom (98).

S obzirom na važnost i učestalost interakcije signalnog puta estrogenskog receptora i različitih drugih signalnih puteva u razvoju rezistencije na hormonsko liječenje provedeno je nekoliko studija u kojima se analizirala učinkovitost kombinacije hormonske terapije s inhibitorima različitih komponenti puteva prijenosa signala u usporedbi s monoterapijom ljekovima s antiestrogenskim djelovanjem. Randomizirana studija TAnDEM je evaluirala kombinaciju anastrozola i trastuzumaba u odnosu na monoterapiju anastrozolom u liječenju ER+/HER2+ metastatskog karcinoma dojke. Pokazano je da kombinacija trastuzumaba i anastrazola značajno poboljšava PFS, ali i da dovodi do češćih neželjenih učinaka (162). Rezultati randomizirane studije BOLERO-2 koja jesu evaluirala kombinaciju hormonske terapije i everolimusa u liječenju metastatskih karcinoma dojke s pozitivnim hormonskim receptorima pokazali su značajno dulje preživljenje do progresije bolesti (PFS, od engl. progression free survival) kod bolesnica liječenih kombinacijom oba lijeka u odnosu na one liječene samo hormonskom terapijom (145). Rezultati studije BELLE-2 koja je evaluirala kombinaciju buparlisiba i fulvestranta u odnosu na monoterapiju fulvestrantom, u liječenju uznapredovalog karcinoma dojke s pozitivnim hormonskim receptorima i negativnim statusom HER2, pokazali su značajno produljenje PFS-a kod bolesica liječenih kombinacijom buparlisiba i fulvestranta (163). Buparlisib u kombinaciji s fulvestrantom klinički značajno poboljšava PFS u bolesnica s *PIK3CA* mutacijama (163). Baselga i sur. (163) su utvrdili da se karakterizacijom mutacija gena *PIK3CA* iz cfDNA može predvidjeti učinkovitost kombinacije buparlisiba i fulvestranta u liječenju ER pozitivnog, HER2 negativnog karcinoma dojke rezistentnog na hormonsko liječenje kod bolesnica u postmenopauzi.

Također, u stanicama karcinoma dojke često postoji nepravilna regulacija staničnog ciklusa što dovodi do ometanja i inhibicije antiproliferativniog djelovanja hormonske terapije odnosno do rezistencije na hormonsko liječenje. Pretklinička istraživanja su pokazala da pretjeran izražaj Myc-a, ciklina E1, ciklina D1 odnosno inaktivacija tumor supresora Rb te smanjen izražaj inhibitora CDK (p21 ili p27) dovode do smanjene osjetljivosti na hormonsko liječenje *in vitro* (79). Studija PALOMA-1 je pokazala značajno produljenje PFS i OS u postmenopauzalnih bolesnica s metastatskim ER+/HER2- karcinomom dojke liječenih kombinacijom palbocikliba i letrozola u odnosu

na monoterapiju letrozolom kao prvom linijom liječenja (164). U veljači 2015. godine, FDA je odobrila palbociklib, u kombinaciji s letrozolom, kao prvu liniju liječenja postmenopauzalnih bolesnica s ER+/HER2- metastatskim karcinomom dojke (160).

9.Zaključak

Hormonska terapija predstavlja osnovni modalitet liječenja bolesnica oboljelih od karcinomom dojke s pozitivnim statusom ER. Takvi tumori čine 70% karcinoma dojke, a prema molekularnom profilu pripadaju luminalnim podtipovima karcinoma dojke. Usprkos učinkovitosti endokrine terapije glavnu prepreku optimalnom liječenju predstavlja rezistencija koja se javlja u dva oblika, ovisno o početnom odgovoru na hormonsku terapiju, kao intrinzička (*de novo*) ili stečena. Unatoč razvoju rezistencije, u najvećem broju slučajeva, ER ostaje trajno izražen i aktivan te doprinosi rastu tumora, stoga je nužna njegova trajna inhibicija. Otprilike 30% bolesnica čija je bolest dijagnosticirana u ranom stadiju razvit će rezistenciju na hormonsko liječenje koja se manifestira kao povrat bolesti koji je najčešće metastatske naravi, a ista će se razviti i kod gotovo svih bolesnica čija je bolest dijagnosticirana u uznapredovalom stadiju. Budući da liječenje metastatske bolesti još uvijek predstavlja izazov u medicini s gotovo nikakvim šansama za izliječenje možemo prepoznati važnost boljeg poznavanja mehanizama kojima tumor razvija rezistenciju na hormonsko liječenje te posljedično tome i razvoja ciljane terapije kojom bi se vratila osjetljivost na hormonsko liječenje ili blokirali aberantni signalni putevi.

U ovom radu prikazani su poznati mehanizmi koji dovode do razvoja rezistencije na hormonsko liječenje. Također, prikazane su i mogućnosti liječenja ovisno o uzroku koji je doveo do rezistencije. Kombinacija terapije usmjerene na ER i one usmjerene na HER2 trenutno je standard u liječenju karcinoma dojke koji je ER i HER2 pozitivan. Rani rezultati kliničkih studija provedenih u bolesnica s karcinomom dojke s pozitivnim statusom ER, a negativnim statusom HER2 upućuju na to da bi dio bolesnica mogao imati koristi od terapije koja uz standardno hormonsko liječenje uključuje i inhibitore signalnih puteva čimbenika rasta. Kombinacija egzemestana i mTOR inhibitora everolimusa je odobrena za liječenje ER pozitivnog uznapredovalog karcinoma dojke u SAD-u i Europi jer se pokazalo da značajno produžuje preživljenje do progresije bolesti i ukupno preživljenje. U zadnje vrijeme sve se više razmišlja o korištenju epigenetske

terapije ili terapije koja je bazirana na nekodirajućoj miRNA zajedno s hormonskom terapijom. Također, smatra se da je razvoj novih lijekova poput ECBI veliki iskorak u razvoju ciljane terapije čija meta je ERα. Unatoč razvoju novih učinkovitih lijekova, potrebno je pronaći biomarkere koji će nam omogućiti liječenje prilagođeno bolesniku. Zbog brojnosti i heterogenosti molekularnih mehanizama koji leže u podlozi rezistencije na hormonsko liječenje te njihove evolucije za vrijeme trajanja bolesti ističe se važnost rutinskih biopsija u utvrđivanju promjena u stanicama koje su dovele do razvoja rezistencije. Budući da je uzimanje uzastopnih tkivnih biopsija iz udaljenih presadnica često otežano, nužno je pronaći lakše dostupne pristupe za detekciju promjena koje su dovele do rezistencije. Novi obećavajući pristup predstavljaju tekuće biopsije koje uključuju analizu cirkulirajućih tumorskih stanica i cfDNA iz uzoraka krvi. S obzirom da razvoj rezistencije na hormonsko liječenje predstavlja glavnu prepreku optimalnom liječenju raka dojke s pozitivnim hormonskim receptorima njeno zaobilaženje jedan je od najvećih izazova 21. stoljeća u liječenju raka dojke s pozitivnim hormonskim receptorima.

10. Zahvale

Na kraju bih se zahvalila svima koji su pomogli u izradi ovog diplomskog rada.

Posebnu zahvalu uputila bih svojoj mentorici doc. dr. sc. Nataliji Dedić Plavetić, dr. med. bez čijeg velikog truda, pomoći i strpljenja ne bih uspjela napisati ovaj rad.

Velika hvala Vedranu za strpljenje i trud koji je uložio u lektoriranje ovog rada te za podršku koju mi je pružao tijekom izrade istog.

Također, hvala i mojim kolegicama Aneri i Inki što su bile uz mene tijekom pisanja ovog rada.

Najveće zahvale uputila bih svojoj obitelji za podršku i razumijevanje koju su mi pružali tijekom cijelog razdoblja školovanja.

11. Literatura

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, i sur. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015 Mar 1;136(5):E359-86.
2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2013., Bilten 38. Šekerija M, ur. [Internet] Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2015 [pristupljeno 31.05.2016.]. Dostupno na http://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2013_final.pdf
3. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
4. Harbeck N, Thomssen C, Gnant M. St. Gallen 2013: brief preliminary summary of the consensus discussion. Breast Care (Basel). 2013 May;8(2):102-9.
5. Clark GM, Osborne CK, McGuire WL. Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor, and patient characteristics in human breast cancer. J Clin Oncol. 1984 Oct;2(10):1102-9.
6. Clarke R, Tyson JJ, Dixon JM. Endocrine reistance in breast cancer – an overwiev and update. Mol Cell Endocrinol. 2015 Dec 15;418 Pt 3:220-34.
7. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, i sur. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000 Aug 17; 406(6797):747-52.
8. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, i sur. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. Breast Cancer Res. 2010;12(5):R68.
9. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, i sur. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. Nature. 2012 Apr 18;486(7403):346-52.
10. Larionov AA, Miller WR. Challenges in defining predictive markers for response to endocrine therapy in breast cancer. Future Oncol. 2009 Nov;5(9):1415-28.
11. Nardone A, De Angelis C, Trivedi MV, Osborne CK, Schiff R. The changing role of ER in endocrine resistance. Breast. 2015 Nov;24 Suppl 2:S60-6.
12. Evans CT, Ledesma DB, Schulz TZ, Simpson ER, Mendelson CR. Isolation and characterization of a complementary DNA specific for human aromatase-

system cytochrome P-450 mRNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Sep;83(17):6387-91.

13. Dixon JM. Endocrine Resistance in breast cancer. New J Sci. vol. 2014. Article ID 390618. doi: 10.1155/2014/390618
14. Johnston SR, Dowsett M. Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. Nat Rev Cancer. 2003 Nov;3(11):821-31.
15. Simpson ER. Sources of estrogen and their importance. J Steroid Biochem Mol Biol. 2003 Sep;86(3-5):225-30.
16. Zhao H, Zhou L, Shangguan AJ, Bulun SE. Aromatase expression and regulation in breast and endometrial cancer. J Mol Endocrinol. 2016 Apr 11. pii: JME-15-0310.
17. Trkulja V, Marijan K, Šalković-Petrišić M, ur. Temeljna i klinička farmakologija. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
18. Bulun SE, Lin Z, Imir G, Amin S, Demura M, Yilmaz B, i sur. Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. Pharmacol Rev. 2005 Sep; 57(3):359-83.
19. Miller WR, Forrest AP. Oestradiol synthesis by a human breast carcinoma. Lancet.1974 Oct 12; 2(7885):866-8.
20. Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. J Natl Cancer Inst. 2002 Apr 17;94(8):606-16.
21. Weatherman RV, Fletterick RJ, Scanlan TS. Nuclear-receptor ligands and ligand-binding domains. Annu Rev Biochem. 1999;68:559-81.
22. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, i sur. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A.Nature. 1986 Mar 13-19; 320(6058):134-9.
23. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA.Science.1986 Mar 7;231(4742):1150-4.
24. Gosden JR, Middleton PG, Rout D. Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24----q27 by in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet. 1986;43(3-4):218-20.
25. Ponglikitmongkol M, Green S, Chambon P. Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. EMBO J. 1988 Nov;7(11):3385-8.

26. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jun 11; 93(12):5925-30.
27. Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, i sur. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. J Clin Endocrinol Metab. 1997 Dec;82(12):4258-65.
28. Robertson JFR, Nicholson RI, Hayes DF, ur. Endocrine Therapy of Breast Cancer. London: Martin Dunitz; 2002.
29. Enmark E, Gustafsson JA. Oestrogen receptors—An overview. J Intern Med. 1999 Aug; 246(2):133-8.
30. Gustafsson JA. Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. J Endocrinol. 1999 Dec;163(3):379-83.
31. Mader S, Chambon P, White JH. Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain. Nucleic Acids Res. 1993 Mar 11;21(5):1125-32.
32. Picard D, Kumar V, Chambon P, Yamamoto KR. Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. Cell Regul. 1990 Feb;1(3):291-9.
33. Dingwall C, Laskey RA. Nuclear targeting sequences—a consensus? Trends Biochem Sci. 1991 Dec; 16(12):478-81.
34. García-Becerra R, Santos N, Díaz L, Camacho J. Mechanisms of resistance to endocrine therapy in breast cancer: focuson signaling pathways, miRNAs and genetically based resistance. Int J Mol Sci. 2012 Dec 20;14(1): 108-45.
35. Osborne CK, Schiff R, Fuqua SA, Shou J. Estrogen receptor: Current understanding of its activation and modulation. Clin Cancer Res. 2001 Dec;7 (12 Suppl):4338s-4342s.
36. Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. Annu Rev Physiol. 2008; 70: 165-90.
37. Mo Z, Liu M, Yang F, Luo H, Li Z, Tu G, i sur. GPR30 as an initiator of tamoxifen resistance in hormone-dependent breast cancer. Breast Cancer Res. 2013 Nov 29;15(6):R114.
38. Segnitz B, Gehring U. Subunit structure of the nonactivated human estrogen receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Mar 14;92(6):2179-83.
39. MacGregor JI, Jordan VC. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. Pharmacol Rev 1998;50(2):151-96.

40. Kraus WL, McInerney EM, Katzenellenbogen BS. Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor.Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Dec 19;92(26):12314-8.
41. Cheskis BJ, Karathanasis S, Lyttle CR. Estrogen receptor ligands modulate its interaction with DNA. J Biol Chem. 1997 Apr 25;272(17):11384-91.
42. Klinge CM, Jernigan SC, Mattingly KA, Risinger KE, Zhang J. Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors alpha and beta by coactivators and corepressors. J Mol Endocrinol. 2004 Oct;33(2):387-410.
43. Osborne CK, Schiff R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. Annu Rev Med. 2011;62:233-47.
44. Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA, i sur. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. J Natl Cancer Inst 2003;95:353-61.
45. Wakeling AE. Similarities and distinctions in the mode of action of different classes of antioestrogens.Endocr Relat Cancer. 2000 Mar;7(1):17-28.
46. Reid G, Hübner MR, Métivier R, Brand H, Denger S, Manu D, i sur. Cyclic, proteasome-mediated
turnover of unliganded and liganded ERalphaonresponsive promoters is
an integral feature of estrogen signaling. Mol Cell. 2003 Mar;11(3):695-707.
47. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. Nucleic Acids Res. 2001 Jul 15;29(14):2905-19.
48. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, i sur. Mechanisms of estrogen action. Physiol Rev. 2001 Oct; 81(4):1535-65.
49. Scholz A, Truss M, Beato M. Hormone-induced recruitment of Sp1 mediates estrogen activation of the rabbit uteroglobin gene in endometrial epithelium. J Biol Chem. 1998 Feb 20; 273(8):4360-6.
50. Caizzi L, Ferrero G, Cutrupi S, Cordero F, Ballaré C, Miano V, i sur. Genome-wide activity of unliganded estrogen receptor-α in breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Apr 1;111(13):4892-7
51. Razandi M, Oh P, Pedram A, Schnitzer J, Levin ER. ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications forsignaling and cellular actions. Mol Endocrinol. 2002 Jan; 16(1):100-15.

52. Levin ER, Pietras RJ. Estrogen receptors outside the nucleus in breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2008;108:351–61.
53. Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK, Osborne CK. Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. Clin Cancer Res. 2004 Jan 1;10:331S–6S.
54. Santen RJ, Fan P, Zhang Z, Bao Y, Song RX, Yue W. Estrogen signals via an extra-nuclear pathway involving IGF-1R and EGFR in tamoxifen-sensitive and -resistant breast cancer cells. Steroids. 2009; 74:586–94.
55. Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. Mol Endocrinol. 2005;19:1951–9.
56. Beatson CT. On treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. Lancet 1896;2:104–7.
57. Lacassagne A. Hormonal pathogenesis of adenocarcinoma of the breast. Am. J. Cancer. 1936.27: 217-225.
58. Jensen EV, Jacobson HI. Fate of steroidal estrogens in target tissues.U: Pincus G, Vollmer EP, ur. Biological Activities of Steroids in Relation to Cancer. New York: Academic Press; 1960. str. 161–74.
59. Schiff R, Massarweh S, Shou J, Osborne CK. Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response. Clin Cancer Res. 2003 Jan;9(1 Pt 2):447S-54S.
60. Juretić A, Sarić N, Bisof V, Basić-Koretić M. Fulvestrant: a new agent in endocrine treatment for breast cancer. Lijec Vjesn. 2006 Jan-Feb; 128(1-2):31-6.
61. Bartsch R, Bago-Horvath Z, Berghoff A, DeVries C, Pluschnig U, Dubsky P, i sur. Ovarian function suppression and fulvestrant as endocrine therapy in premenopausal women with metastatic breast cancer. Eur J Cancer. 2012 Sep;48(13):1932-8.
62. Robertson JF. Selective oestrogen receptor modulators/new antioestrogens: a clinical perspective. Cancer Treat Rev. 2004 Dec;30(8):695-706.
63. Doughty JC. When to start an aromatase inhibitor: now or later?. J Surg Oncol. 2011 Jun 1; 103(7):730-8.
64. BIG 1-98 Collaborative Group, Mouridsen H, Giobbie-Hurder A, Goldhirsch A, Thürlimann B, Paridaens R, i sur. Letrozole therapy alone or in sequence

with tamoxifen in women with breast cancer. N Engl J Med. 2009 Aug 20; 361(8):766-76.

65. Guarneri V, Conte PF. The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2004 Jun;31 Suppl 1:S149-61.
66. Jordan VC. Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. Nat Rev Drug Discov. 2003 Mar; 2(3):205-13.
67. The Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Lancet 1998;351: 1451-67.
68. Osborne CK. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. N Engl J Med. 1998 Nov 26; 339(22): 1609-18.
69. DeFriend DJ, Anderson E, Bell J, Wilks DP, West CM, Mansel RE, i sur. Effects of 4-hydroxytamoxifen and a novel pure antioestrogen (ICI 182780) on the clonogenic growth of human breast cancer cells in vitro. Br J Cancer. 1994 Aug;70(2):204-11.
70. Smith IE, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. N Engl J Med. 2003 Jun 12; 348(24):2431-42.
71. Brodie A, MacEdo L, Sabnis G. Aromatase resistance mechanisms in model systems in vivo. J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 February 28; 118(4-5): 283–287.
72. Pagani O, Regan MM, Walley BA, Fleming GF, Colleoni M, Láng I, i sur. Adjuvant exemestane with ovarian suppression in premenopausal breast cancer. N Engl J Med. 2014 Jul 10;371(2):107-18.
73. Dowsett M, Cuzick J, Ingle J, Coates A, Forbes J, Bliss J, i sur. Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. J Clin Oncol. 2010 Jan 20;28(3):509-18.
74. Ellis MJ, Llombart-Cussac A, Feltl D, Dewar JA, Jasiówka M, Hewson N, Rukazenkov Y, i sur. Fulvestrant 500 mg Versus Anastrozole 1 mg for the First-Line Treatment of Advanced Breast Cancer: Overall Survival Analysis From the Phase II FIRST Study. J Clin Oncol. 2015 Nov 10;33(32):3781-7.
75. Cardoso F, Costa A, Norton L, Senkus E, Aapro M, André F, i sur. ESO-ESMO 2nd international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC2). Breast. 2014 Oct;23(5):489-502.
76. Zhao M, Ramaswamy B. Mechanisms and therapeutic advances in the management of endocrine-resistant breast cancer. World J Clin Oncol.2014 Aug 10;5(3):248-62.

77. Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemictherapy in patients with breast cancer. Adv Exp Med Biol. 2007;608:1-22.
78. Scherbakov AM, Krasil'nikov MA, Kushlinskii NE. Molecular mechanisms of hormone resistance of breast cancer. Bull Exp Biol Med. 2013 Jul;155(3):384-95.
79. Musgrove EA, Sutherland RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. Nat Rev Cancer. 2009 Sep;9(9):631-43.
80. Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, Mohsin SK, Shou J, Allred DC, i sur. Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, andp38 mitogen-activated protein kinase. J Clin Oncol. 2005 Apr 10;23(11):2469-76.
81. Johnston SR, Saccani-Jotti G, Smith IE, Salter J, Newby J, Coppen M, i sur. Changes in estrogen receptor, progesterone receptor, and pS2 expression in tamoxifen-resistant human breast cancer. Cancer Res. 1995 Aug 1; 55(15): 3331-8.
82. Howell A, Pippen J, Elledge RM, Mauriac L, Vergote I, Jones SE, i sur. Fulvestrant versus anastrozole for the treatment of advanced breast carcinoma: a prospectively planned combined survival analysis of two multicenter trials. Cancer. 2005 Jul 15;104(2):236-9.
83. Karnik PS, Kulkarni S, Liu XP, Budd GT, Bukowski RM. Estrogen receptor mutations in tamoxifen-resistant breast cancer. Cancer Res. 1994 Jan 15; 54(2):349-53.
84. Alluri PG, Speers C, Chinnaiyan AM. Estrogen receptor mutations and their role in breast cancer progression.Breast CancerRes. 2014 Dec 12;16(6):494.
85. 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. 2015 Oct;12(10):573-83.
86. Bertino JR. Cancer research: from folate antagonism to molecular targets. Best Pract Res Clin Haematol. 2009 Dec;22(4):577-82.
87. Holst F, Stahl PR, Ruiz C, Hellwinkel O, Jehan Z, Wendland M, i sur. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. Nat Genet. 2007 May;39(5):655-60.
88. Tomita S, Zhang Z, Nakano M, Ibusuki M, Kawazoe T, Yamamoto Y, i sur. Estrogen receptor alpha gene ESR1 amplification may predict endocrine

therapy responsiveness in breast cancer patients. Cancer Sci. 2009 Jun; 100(6):1012-7.

89. Jeselsohn R, Yelensky R, Buchwalter G, Frampton G, Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM, i sur. Emergence of constitutively active estrogen receptor-α mutations in pretreated advanced estrogen receptor-positive breast cancer. Clin Cancer Res. 2014 Apr 1;20(7):1757-67.
90. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2012 Oct 4;490(7418):61-70.
91. Iggo RD, Wood HM, Rabbitts P, Quenel-Tueux N, Mauriac L, MacGrogan G, i. sur. Next Generation Sequencing Shows Clonal Selection After Treatment With Anastrozole or Fulvestrant in a Randomized Trial of Postmenopausal Patients With Large Operable or Locally-Advanced HormoneReceptor-Positive Breast Cancer [sažetak]. 36th CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium. PD3-03 (2013.)
92. Veeraraghvan J, Tan Y, Cao XX, Kim JA, Wang X, Chamness GC, Maiti SN, Cooper LJ, Edwards DP,Contreras A, Hilsenbeck SG, Chang EC, Schiff R, Wang XS. Recurrent ESR1-CCDC170 rearrangements in an aggressive subset of oestrogen receptor-positive breast cancers. Nat Commun. 2014 Aug 7;5:4577.
93. Li S, Shen D, Shao J, Crowder R, Liu W, Prat A, i sur. Endocrine-therapy-resistant ESR1 variants revealed by genomic characterization of breast-cancer-derived xenografts. Cell Rep. 2013 Sep 26;4(6):1116-30.
94. Shao J, Zhang J, Crowder RJ, Goncalves R, Phommaly C, Breast AWG and Network, i sur. ESR1 gene fusions implicated in endocrine therapy resistance of ER+ breast cancer. U: 37th San Antonio Breast Cancer Symposium. San Antonio, Texas, USA; 2014.
95. Fuqua SA, Wiltschke C, Zhang QX, Borg A, Castles CG, Friedrichs WE, i sur. A hypersensitive estrogen receptor-alpha mutation in premalignant breast lesions. Cancer Res 2000;60:4026-9.
96. Toy W, Shen Y, Won H, Green B, Sakr RA, Will M, i sur. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. Nat Genet. 2013 Dec; 45(12):1439-45.
97. Robinson DR, Wu YM, Vats P, Su F, Lonigro RJ, Cao X, i sur. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. Nat Genet. 2013 Dec;45(12):1446-51.

98. Chandarlapaty S, Sung P, Chen D, He W, Samoila A, You D, i sur. cfDNA analysis from BOLERO-2 plasma samples identifies a high rate of ESR1 mutations: Exploratory analysis for prognostic and predictive correlation of mutations reveals different efficacy outcomes of endocrine therapy–based regimens. U: 38th San Antonio Breast Cancer Symposium. San Antonio, Texas, USA; 2015.
99. Lapidus RG, Nass SJ, Butash KA, Parl FF, Weitzman SA, Graff JG, i sur. Mapping of ER gene CpG island methylation-specific polymerase chain reaction. Cancer Res. 1998 Jun 15;58(12):2515-9.
100. Feng Q, Zhang Z, Shea MJ, Creighton CJ, Coarfa C, Hilsenbeck SG, i sur. An epigenomic approach to therapy for tamoxifen-resistant breast cancer. Cell Res. 2014 Jul;24(7):809-19.
101. Yang X, Phillips DL, Ferguson AT, Nelson WG, Herman JG, Davidson NE. 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. 2001 Oct 1;61(19):7025-9.
102. Fan J, Yin WJ, Lu JS, Wang L, Wu J, Wu FY, i sur. 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. 2008 Aug;134(8):883-90.
103. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev Genet. 2004;5:522–31.
104. Hayes EL, Lewis-Wambi JS. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer: an overview of the proposed roles of noncoding RNA. Breast Cancer Res. 2015 Mar 17;17:40.
105. Zhao JJ, Lin J, Yang H, Kong W, He L, Ma X, i sur. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. J Biol Chem. 2008;283:31079–86.
106. Xin F, Li M, Balch C, Thomson M, Fan M, Liu Y, i sur. Computational analysis of microRNA profiles and their target genes suggests significant involvement in breast cancer antiestrogen resistance. Bioinformatics. 2009 Feb 15;25(4):430-4.
107. Stoner M, Saville B, Wormke M, Dean D, Burghardt R, Safe S. Hypoxia induces proteasome-dependent degradation of estrogen receptor alpha in ZR-75 breast cancer cells. Mol Endocrinol. 2002 Oct;16(10):2231-42.

108. Creighton CJ, Hilger AM, Murthy S, Rae JM, Chinnaiyan AM, El-Ashry D. Activation of mitogen-activated protein kinase in estrogen receptor α-positive breast cancer cells in vitro induces an in vivo molecular phenotype of estrogen receptor α-negative human breast tumors. Cancer Res. 2006, 66, 3903–3911.
109. Lee LM, Cao J, Deng H, Chen P, Gatalica Z, Wang ZY. ER-alpha36, a novel variant of ER-alpha, is expressed in ER-positive and -negative human breast carcinomas. Anticancer Res. 2008;28:479–483.
110. Wang ZY, Zhang XT, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF. A variant of estrogen receptor-α, hER-α36: Transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jun 13;103(24):9063-8.
111. Inoue K, Fry EA. Aberrant Splicing of Estrogen Receptor, HER2, and CD44 Genes in Breast Cancer. Genet Epigenet. 2015 Dec 2;7:19-32.
112. Hopp TA, Weiss HL, Parra IS, Cui Y, Osborne CK, Fuqua SA. Low levels of estrogen receptor betaprotein predict resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. Clin Cancer Res. 2004 Nov 15;10(22):7490-9.
113. Guo L, Zhang YU, Yilamu D, Liu S, Guo C. ERβ overexpression results in endocrine therapy resistance and poor prognosis in postmenopausal ERα-positive breast cancer patients. Oncol Lett. 2016 Feb;11(2):1531-1536.
114. Shirley SH, Rundhaug JE, Tian J, Cullinan-Ammann N, Lambertz I, Conti CJ, i sur. Transcriptional regulation of estrogen receptor-alpha by p53 in human breast cancer cells. Cancer Res. 2009 Apr 15;69(8):3405-14
115. Angeloni SV, Martin MB, Garcia-Morales P, Castro-Galache MD, Ferragut JA, Saceda M. Regulation of estrogen receptor-α expression by the tumor suppressor gene p53 in MCF-7 cells. J. Endocrinol. 2004, 180, 497–504
116. Martin MB, Angeloni SV, Garcia-Morales P, Sholler PF, Castro-Galache MD, Ferragut JA, i sur. Regulation of estrogen receptor-alpha expression in MCF-7 cells by taxol. J Endocrinol. 2004 Mar;180(3):487-96.
117. Macaluso M, Cinti C, Russo G, Russo A, Giordano A. pRb2/p130-E2F4/5-HDAC1- SUV39H1-p300 and pRb2/p130-E2F4/5-HDAC1-SUV39H1-DNMT1 multimolecular complexes mediate the transcription of estrogen receptor-alpha in breast cancer. Oncogene. 2003 Jun 5;22(23):3511-7.
118. Macaluso M, Montanari M, Giordano A. The regulation of ER-alpha transcription by pRb2/p130 in breast cancer. Ann Oncol. 2005 May;16 Suppl 4:iv20-22.

119. Macaluso M, Montanari M, Noto PB, Gregorio V, Bronner C, Giordano A. Epigenetic modulation of estrogen receptor-alpha by pRb family proteins: a novel mechanism in breast cancer. Cancer Res. 2007 Aug 15;67(16):7731-7.
120. Bulynko YA, O'Malley BW. Nuclear receptor coactivators: structural and functional biochemistry. Biochemistry 2011;50:313-28
121. Smith CL, Nawaz Z, O'Malley BW. Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. Mol Endocrinol 1997;11:657-66
122. Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzel T, Torchia J, Mullen TM, Schiff R, i sur. Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:2920-5.
123. Wu RC, Qin J, Yi P, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, i sur. Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic reponses to multiple cellular signaling pathways. Mol cell 2004;15:937-49.
124. Vadlamudi RK, Sareddy GR, Viswanadhapalli S, Lee TK, Ma SH, Lee WR, i sur. Tekmal RR, Ahn J-M, Raj GV. ESR1 coregulator binding inhibitor (ECBI) as a novel therapeutic to target hormone therapy resistant metastatic breast cancer. In: 38th San Antonio Breast Cancer Symposium. San Antonio, Texas, USA; 2015.
125. Robinson JLL, Carroll JS. FoxA1 is a Key Mediator of Hormonal Response in Breast and Prostate Cancer. Frontiers in Endocrinology. 2012;3:68.
126. Fu XJR, Jeselsohn R, Hollingsworth EF, Lopez-Terrada D, Creighton CJ, Nardone A, i sur. FoxA1 gene amplification in ER+ breast cancer mediates endocrine resistance by increasing IL-8. U: 37th San Antonio Breast Cancer Symposium. San Antonio, Texas, USA; 2014.
127. Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, i sur. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. J Natl Cancer Inst 2004;96: 926-35
128. Milani A, Geuna E, Mittica G, Valabrega G. Overcoming endocrine resistance in metastatic breast cancer: Current evidence and future directions. World J Clin Oncol. 2014 Dec 10;5(5): 990-1001.
129. De Laurentiis M, Arpino G, Massarelli E, Ruggiero A, Carlomagno C, Ciardiello F, i sur. A meta-analysis on the interaction between HER-2 expression and

response to endocrine treatment in advanced breast cancer. Clin Cancer Res. 2005;11:4741–4748.

130. De Placido S, De Laurentiis M, Carlomagno C, Gallo C, Perrone F, Pepe S, i sur. Twenty-year results of the Naples GUN randomized trial: predictive factors of adjuvant tamoxifen efficacy in early breast cancer. Clin Cancer Res 2003;9:1039–46.

131. Hurtado A, Holmes KA, Geistlinger TR, Hutcheson IR, Nicholson RI, Brown M, i sur. Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen . Nature. 2008 Dec 4;456(7222):663-6.

132. Miller DL, el-Ashry D, Cheville AL, Liu Y, McLeskey SW, Kern FG. Emergence of MCF-7 cells overexpressing a transfected epidermal growth factor receptor (EGFR) underestrogen-depleted conditions: evidence for a role of EGFR in breast cancer growth and progression. Cell Growth Differ. 1994 Dec;5(12):1263-74.

133. Arpino G, Green SJ, Allred DC, Lew D, Martino S, Osborne CK, i sur. HER-2 amplification, HER-1 expression, and tamoxifen response in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a southwest oncology group study. Clin Cancer Res. 2004;10:5670–5676.

134. Surmacz E. Function of the IGF-I receptor in breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2000 Jan;5(1):95-105.

135. Fagan DH, Yee D. Crosstalk between IGF1R and estrogen receptor signaling in breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2008 Dec;13(4):423-9.

136. Creighton CJ, Casa A, Lazard Z, Huang S, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, i sur. Insulin-like growth factor-I activates gene transcription programs strongly associated with poor breast cancerprognosis.J Clin Oncol. 2008 Sep 1;26(25):4078-85.

137. Cui X, Zhang P, Deng W, Oesterreich S, Lu Y, Mills GB, i sur. Insulin-like growth factor-I inhibits progesterone receptor expression in breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway: progesterone receptor as a potential indicator of growth factor activity in breast cancer.Mol Endocrinol. 2003 Apr;17(4):575-88.

138. Dienstmann R, Rodon J, Prat A, Perez-Garcia J, Adamo B, Felip E, i sur. Genomic aberrations in the FGFR pathway: opportunities for targeted therapies in solid tumors. Ann Oncol. 2014 Mar;25(3):552-63.

139. Turner N, Pearson A, Sharpe R, Lambros M, Geyer F, Lopez-Garcia MA, i sur. FGFR1amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breastcancer. Cancer Res. 2010 Mar 1;70(5):2085-94
140. Courjal F, Cuny M, Simony-Lafontaine J, Louason G, Speiser P, Zeillinger R, i sur. Mapping of DNA amplifications at 15 chromosomal localizations in 1875 breast tumors: definition of phenotypic groups.Cancer Res. 1997 Oct 1;57(19):4360-7.
141. Fedele P, Calvani N, Marino A, Orlando L, Schiavone P, Quaranta A, i sur. Targeted agents to reverse resistance to endocrine therapy in metastatic breast cancer: where are we now and where are we going? Crit Rev Oncol Hematol. 2012;84:243–251.
142. Cooper GM, Hausman RE. Stanica: molekularni pristup. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
143. Miller TW, Hennessy BT, González-Angulo AM, Fox EM, Mills GB, Chen H, i sur. Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast cancer. J Clin Invest. 2010 Jul;120(7):2406-13.
144. deGraffenried LA, Friedrichs WE, Russell DH, Donzis EJ, Middleton AK, Silva JM, i sur. Inhibition of mTOR activity restores tamoxifen response in breast cancer cells with aberrant Akt Activity. Clin Cancer Res. 2004;10:8059–8067.
145. Beaver JA, Park BH. The BOLERO-2 trial: the addition of everolimus to exemestane in the treatment of postmenopausal hormone receptor-positive advanced breast cancer. Future Oncol. 2012 Jun;8(6):651-7.
146. Ellis MJ, Lin L, Crowder R, Tao Y, Hoog J, Snider J, i sur. Phosphatidyl-inositol-3-kinase alpha catalytic subunit mutation and response to neoadjuvant endocrine therapy for estrogen receptor positive breast cancer. Breast cancer Res Treat 2010;119:379-90
147. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M, i sur. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. Cancer Res 2008;68:6084-91.
148. Fu X, Creighton CJ, Biswal NC, Kumar V, Shea M, Herrera S, i sur. Overcoming endocrine resistance due to reduced PTEN levels in estrogen receptor-positive breast cancer by co-targeting mammalian target of rapamycin, protein kinase B, or mitogen-activated protein kinase kinase. Breast cancer Res BCR 2014;16: 430.

149. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. Cell Res. 2002;12:9–18.

150. Shim WS, Conaway M, Masamura S, Yue W, Wang JP, Kmar R, i sur. Estradiol hypersensitivity and mitogen-activated protein kinase expression in long-term estrogen deprived human breast cancer cells in vivo. Endocrinology. 2000 Jan;141(1):396-405.

151. Likhite VS, Stossi F, Kim K, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Kinase-specific phosphorylation of the estrogen receptor changes receptor interactions with ligand, deoxyribonucleic acid, and coregulators associated with alterations in estrogen and tamoxifen activity. Mol Endocrinol. 2006 Dec; 20(12):3120-32

152. Bergqvist J, Elmberger G, Ohd J, Linderholm B, Bjohle J, Hellborg H, i sur. Activated ERK1/2 and phosphorylated oestrogen receptor alpha are associated with improved breast cancer survival in women treated with tamoxifen.Eur J Cancer. 2006 May;42(8):1104-12.

153. 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 1996; 16: 6917-6925

154. Caldon CE, Daly RJ, Sutherland RL, Musgrove EA.Cell cycle control in breast cancer cells. J Cell Biochem. 2006 Feb 1;97(2):261-74.

155. Chu IM, Hengst L, Slingerland JM. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. Nat Rev Cancer.2008 Apr;8(4):253-67.

156. Butt AJ, McNeil CM, Musgrove EA, Sutherland RL. Downstream targets of growth factor and oestrogen signalling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E. Endocr Relat Cancer. 2005 Jul;12 Suppl 1:S47-59.

157. Bosco EE, Wang Y, Xu H, Zilfou JT, Knudsen KE, Aronow BJ, i sur. The retinoblastoma tumor suppressor modifies the therapeutic response of breast cancer. J Clin Invest. 2007 Jan;117(1):218-28.

158. Ma CX, Ellis MJ. The Cancer Genome Atlas: clinical applications for breast cancer. Oncology (Williston Park). 2013 Dec;27(12):1263-9, 1274-9.

159. Wang Y, Dean JL, Millar EK, Tran TH, McNeil CM, Burd CJ, i sur. Cyclin D1b is aberrantly regulated in response to therapeutic challenge and promotes resistance to estrogen antagonists. Cancer Res 2008; 68: 5628-5638.

160. Food and Drug Administration FDA approves Ibrance for post-menopausal women with advanced breast cancer. Feb 3, 2015. [pristupljeno 3.6.2016.]. Dostupno na: http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm432871.htm.
161. Di Leo A, Jerusalem G, Petruzelka L, Torres R, Bondarenko IN, Khasanov R, i sur. Results of the CONFIRM phase III trial comparing fulvestrant 250 mg with fulvestrant 500 mg in postmenopausal women with estrogen receptor-positive advanced breast cancer. J Clin Oncol. 2010 Oct 20;28(30):4594-600. doi: 10.1200/JCO.2010.28.8415. Epub 2010 Sep 20.
162. Kaufman B, Mackey JR, Clemens MR, Bapsy PP, Vaid A, Wardley A, i sur. 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. 2009 Nov 20;27(33):5529-37. doi: 10.1200/JCO.2008.20.6847.
163. Baselga J, Im S-A, Iwata H, Clemons M, Ito Y, Awada A, i sur. PIK3CA Status in Circulating Tumor DNA Predicts Efficacy of Buparlisib Plus Fulvestrant in Postmenopausal Women With Endocrine- Resistant HR+/HER2– Advanced Breast Cancer: First Results From the Randomized, Phase III BELLE-2 trial [sažetak]. 38th CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium. PD3-03 (2013.)
164. Finn RS, Crown JP, Lang I, Boer K, Bondarenko IM, Kulyk SO, i sur. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. Lancet Oncol. 2015 Jan;16(1):25-35. doi: 10.1016/S1470-2045(14) 71159-3.

12. Životopis

Rođena sam 18. rujna 1991. godine u Zadru gdje sam pohađala osnovnu školu. Završila sam Gimnaziju Franje Petrića (prirodoslovno-matematički smjer), a usporedno s tim i Srednju glazbenu školu Blagoje Bersa u Zadru. Tijekom obrazovanja sudjelovala sam na sedam državnih natjecanja, a 2010. godine sam osvojila prvo mjesto na Državnom natjecanju iz kemije s radom „Izrada kalorimetra i mjerenje entalpije otapanja soli“. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2010. godine. Dobitnica sam Dekanove nagrade za uspjeh, Dekanove nagrade za znanstveni rad „Promjena genskog i proteinskog izražaja betaglikana u tkivu karcinoma dojke“ i Zahvalnice za doprinos u očuvanju tradicije Zavoda za anatomiju „Drago Perović“. Od 2011. do 2014. godine bila sam demonstrator na Katedri za anatomiju i kliničku anatomiju. U akademskoj godini 2015./2016. bila sam demonstrator na Katedri za patofiziologiju i Katedri za pedijatriju. Sudjelovala sam u pripremi animacija za izborni predmet „Potencijali Membrane“ kojem je dodijeljena nagrada za najbolji e-kolegij Sveučilišta u Zagrebu u akademskoj godini 2011./2012. U srpnju 2012. godine vodila sam radionicu na temu „Zašto krv nije voda?“ u sklopu Ljetne tvornice znanosti na MedILS-u u Splitu. Koautor sam na radu „Soluble Type III TGFβ Receptor in diagnosis and follow-up of patients with breast cancer“. Aktivno se služim engleskim jezikom, a poznajem i osnove njemačkog jezika.