

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kamil Mieczkowski

podpis:

Znaczenie FGFR2 w progresji i terapii luminalnych raków piersi

FGFR2 importance in luminal breast cancer progression and
therapy

Praca przedstawiona Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego
celem uzyskania stopnia
doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dziedzinie nauk biologicznych

Promotor: dr hab. Rafał Sądej, prof. GUMed
Zakład Enzymologii i Onkologii Molekularnej
Instytut Biotechnologii Medycznej i Onkologii Doświadczalnej GUMed

Gdańsk 2020

OŚWIADCZENIE

Ja, niżej podpisany oświadczam, iż przedłożona praca dyplomowa została wykonana przeze mnie samodzielnie, nie narusza praw autorskich, interesów prawnych i materialnych innych osób.

.....

data

.....

własnoręczny podpis

*Chciałbym złożyć szczególne wyrazy wdzięczności mojemu Promotorowi
za olbrzymie wsparcie, cierpliwość i zaufanie.*

*Dziękuję koleżankom z Zakładu Enzymologii i Onkologii Molekularnej
za stworzenie wyjątkowej atmosfery pracy oraz codzienną pomoc.*

*Dodatkowe podziękowania kieruję do mojej Rodziny i przyjaciół,
którzy zawsze byli obok.*

*Niniejszą pracę dedykuję mojej ukochanej córce Basi,
będącej radością mojego życia.*

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	7
ABSTRACT	9
WYKAZ SKRÓTÓW	11
1. WSTĘP.....	13
1.1. Rak piersi	13
1.1.1. Epidemiologia i etiologia	13
1.1.2. Klasyfikacja i leczenie.....	13
1.2. Receptory dla hormonów steroidowych	15
1.2.1. Receptor estrogenowy (ER, <i>Estrogen Receptor</i>)	15
1.2.2. Receptor progesteronowy (PR, <i>Progesterone Receptor</i>)	17
1.2.3. Ścieżki aktywacji i sygnalizacja ER i PR.....	19
1.2.4. Terapie anty-ER.....	21
1.2.5. Nowe podejście do roli ER i PR w raku piersi	23
1.3. Mikrośrodowisko guza	25
1.3.1. Znaczenie mikrośrodowiska w rozwoju choroby nowotworowej.....	25
1.3.2. Fibroblasty wchodzące w skład guza (CAFs, ang. <i>Cancer Associated Fibroblasts</i>).....	26
1.4. Receptory dla czynników wzrostu fibroblastów (FGFR, ang. <i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>).....	28
1.4.1. Sygnalizacja FGF/FGFR	28
1.4.2. FGFR2 w raku piersi	30
1.4.3. Receptor FGFR2 w regulacji hormonów steroidowych	32
1.4.4. Terapie celowane dla FGFR.....	34
2. CEL PROJEKTU.....	36
3. MATERIAŁY.....	37
3.1. Linie komórkowe	37
3.2. Pożywki oraz suplementy do hodowli komórkowej.....	37

3.3.	Bufory i roztwory stosowane do hodowli komórkowej.....	38
3.4.	Czynniki wzrostu oraz hormony.....	38
3.5.	Inhibitory	38
3.6.	Plazmidy oraz shRNA	39
3.7.	Sondy TaqMan (Life Technologies).....	39
3.8.	Odczynniki do klonowania	39
3.9.	Zestawy do izolacji DNA oraz RNA	40
3.10.	Odczynniki do reakcji RT-qPCR	40
3.11.	Przeciwciała I-rzędowe	40
3.12.	Przeciwciała II-rzędowe.....	41
3.13.	Odczynniki do PLA (Proximity Ligation Assay) (Sigma-Aldrich)	41
3.14.	Inne roztwory oraz bufony.....	41
3.15.	Inne odczynniki	44
3.16.	Sprzęt laboratoryjny	45
4.	METODY	46
4.1.	Hodowle komórkowe.....	46
4.2.	Konstrukcja wektora do wyciszania <i>FGFR2</i> (pLKO.1 sh <i>FGFR2</i>).....	46
4.3.	Transformacja <i>E.coli</i> DH5 α	47
4.4.	Analiza uzyskanych klonów	47
4.5.	Wyciszenie ekspresji <i>FGFR2</i> w linii komórkowej T47D – system lentiwirusowy...47	47
4.6.	Liza komórek oraz elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE).....	48
4.7.	Western blotting.....	49
4.8.	Trójwymiarowe (3D) hodowle komórkowe	49
4.9.	Analiza wpływu stymulacji komórek 17 β -estradiolem (E2), progesteronem (P4) i FGF7 na aktywację ER i PR.....	50
4.10.	Immunoprecypitacja.....	50
4.11.	PLA (ang. <i>Proximity Ligation Assay</i>)	51

4.12.	Ilościowa reakcja PCR (ang. <i>quantitative polymerase chain reaction</i> ; qPCR)	51
4.13.	RT ² Profiler PCR Array	52
5.	WYNIKI.....	53
5.1.	Analiza wpływu sygnalizacji FGF7/FGFR2 na wzrost komórek luminalnego raka piersi w obecności hormonów steroidowych.....	53
5.2.	Analiza wpływu FGFR2 na regulację ER i PR w obecności hormonów steroidowych 61	
5.3.	Analiza mechanizmu regulacji kompleksu ER-PR przez FGFR2 w komórkach raka piersi	64
5.4.	Ocena wpływu FGFR2 na aktywność transkrypcyjną ER.....	67
5.5.	Identyfikacja FGF7/FGFR2-zależnej ścieżki sygnalizacyjnej zaangażowanej w regulację ER i PR	71
5.6.	Analiza roli FGFR2 w odpowiedzi na terapię anti-ER.....	75
5.7.	Znaczenie kliniczne FGFR2 u pacjentek z ER+/PR+ rakiem piersi.....	76
	PODSUMOWANIE WYNIKÓW	82
6.	DYSKUSJA.....	83
7.	LITERATURA	95

STRESZCZENIE

Luminalne raki piersi, stanowiące do 70% wszystkich diagnozowanych przypadków raka gruczołu piersiowego (BCa), charakteryzują się ekspresją receptora estrogenowego (ER). W ostatnich latach dowiedziono, iż obecność receptora progesteronowego (PR) jest dobrym czynnikiem rokowniczym (podtyp luminalny A (ER+, PR+)), zaś nowotwory PR-negatywne są bardziej agresywne i gorzej odpowiadają na terapię (podtyp luminalny B (ER+, PR-)). Co więcej, w obecności swoistych ligandów, estrogenów i progesteronu, oba receptory wchodzi w bezpośrednią interakcję. PR staje się modulatorem aktywności transkrypcyjnej ER, co skutkuje ekspresją genów ER-zależnych, związanych z inhibicją wzrostu guza i dobrą odpowiedzią pacjentek na leczenie.

Istotnym czynnikiem promującym progresję BCa jest mikrośrodowisko guza. Komórki stromy, poprzez opartą o czynniki wzrostu (w tym czynniki z rodziny FGF) interakcję z komórkami nowotworowymi, mogą regulować aktywność receptorów dla hormonów steroidowych, uniezależniając je tym samym od działania swoistych ligandów. Receptor dla czynników wzrostu fibroblastów typu 2 (FGFR2) aktywnie uczestniczy w komunikacji komórek nowotworowych z ich mikrośrodowiskiem. W naszych ostatnich pracach pokazaliśmy, iż sygnalizacja od FGFR2 aktywuje niezależnie ER oraz PR, prowadząc do gorszej odpowiedzi komórek na terapię oraz degradacji PR, cechującej progresję choroby. Celem naukowym realizowanej pracy doktorskiej jest analiza wpływu FGFR2-zależnej sygnalizacji na regulację interakcji pomiędzy ER i PR w kontekście progresji oraz terapii BCa.

Przeprowadzone w toku pracy doktorskiej doświadczenia obejmowały obszerne badania *in vitro* z wykorzystaniem modelowych linii luminalnego raka piersi oraz analizę materiału klinicznego. Dzięki zastosowaniu testów PLA (Proximity Ligation Assay) udało się wykazać, iż FGFR2-zależna sygnalizacja hamuje formowanie kompleksu ER-PR. Co więcej, zastosowane stymulacje FGF7 znosiły hamujący efekt progesteronu na wzrost komórek w hodowlach trójwymiarowych w Matrigelu. FGF7 osłabiał również działanie tamoksyfenu (leku anti-ER) na komórki luminalnego raka piersi. Sygnalizacja FGF7/FGFR2 regulowała zarówno fosforylację, jak i poziom ekspresji ER oraz PR, w obecności hormonów steroidowych. Dodatkowo, analiza ekspresji panelu genów ER-zależnych pokazała, iż sygnalizacja FGF7/FGFR2 hamuje regulowaną przez progesteron ekspresję genów ER-zależnych. Ostatnim etapem prac były analizy kliniczne materiału pobranego od 226 pacjentek ER+/PR+. Korelacje poziomu FGFR2 z profilem ekspresji panelu genów ER-zależnych wykazały szereg istotnych korelacji w obrębie analizowanych grup pacjentek. Co więcej, w grupie pacjentek

postmenopauzalnych FGFR2 jest dobrym czynnikiem rokowniczym, czego nie obserwuje się u młodszych chorych.

Opisany projekt, łącząc badania *in vitro* z analizami klinicznymi, po raz pierwszy opisuje i charakteryzuje udział FGFR2 w regulacji funkcji receptorów dla hormonów steroidowych, w kontekście progresji i terapii luminalnych raków piersi. Biorąc pod uwagę fakt, iż terapie celujące w receptory z rodziny FGFR zyskują coraz większe zainteresowanie w onkologii wierzę, iż specyficzne inhibitory FGFR mogą znaleźć zastosowanie w terapii pacjentek z hormono-zależnym rakiem gruczołu piersiowego.

ABSTRACT

Luminal breast cancers, representing approximately 70% of all diagnosed breast cancer (BCa) cases, are characterised by high expression of estrogen receptor (ER). In recent years it has been proven that the presence of progesterone receptor (PR) is a good prognostic factor (luminal A subtype (ER+, PR+)), while PR-negative tumours are more aggressive and respond much worse to applied treatment (luminal B (ER+, PR-)). Moreover, in the presence of specific ligands, estrogens and progesterone, PR directly interacts with ER, resulting in a unique gene expression programme that is associated with tumour growth inhibition and patients' better response to the treatment.

The tumour microenvironment is an important factor promoting BCa progression. Intercellular communication between stromal and cancer cells is based on paracrine signalling with the engagement of different growth factors (including FGFs), which can regulate the activity of steroid hormone receptors, leading to hormone-independence. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) is actively involved in the transduction of signals from the microenvironment. In our recent work, we have shown that FGFR2 signalling activates ER and PR independently, leading to worse cell response to therapy and the degradation of PR, characteristic for disease progression. The doctoral thesis aims to analyse the involvement of FGFR2-dependent signalling in the regulation of ER-PR cross-talk in the context of luminal breast cancer progression and therapy.

The experiments carried out in the course of the doctoral dissertation included extensive *in vitro* studies using luminal breast cancer model cell lines and the analysis of clinical material. Using PLA (Proximity Ligation Assay) it was possible to demonstrate that FGFR2-dependent signalling inhibits the formation of ER-PR complex. Moreover, applied FGF7 stimulations abolished the inhibitory effect of progesterone on cell growth in three-dimensional Matrigel cultures. FGF7 also reduced the effect of tamoxifen (ER-targeting drug) on luminal breast cancer cells. FGF7/FGFR2 signalling regulated both, phosphorylation and the expression level of ER and PR, in the presence of steroid hormones. In addition, analysis of the expression of the ER-dependent gene panel showed that FGF7/FGFR2 signalling inhibited progesterone-mediated ER-dependent gene expression. The last stage of work was a clinical analysis of material collected from 226 ER+/PR+ patients. Correlation between FGFR2 level with the expression profile of ER-dependent gene panel showed several significant positive correlations within the analysed groups of patients. Moreover, in the group of postmenopausal patients, FGFR2 is a good prognostic factor, which is not observed in younger patients.

The described project, combining *in vitro* studies with clinical analyses, for the first time describes and characterises the role of FGFR2 in the regulation of steroid hormone receptors in the context of luminal breast cancer progression and therapy. Taking into account the fact that therapies targeting FGFR family are gaining more and more interest in oncology, I believe that specific FGFR inhibitors may find application in the treatment of patients with hormone-dependent breast cancer.

WYKAZ SKRÓTÓW

- AF, *ang. Activation Function*, domena aktywująca
- AJCC, *ang. American Joint Committee on Cancer*
- AR, *ang. Androgen Receptor*, receptor androgenowy
- BCa, *ang. Breast Cancer*, rak piersi
- CAAs, *ang. Cancer Associated Adipocytes*, adipocyty guza
- CAFs, *ang. Cancer Associated Fibroblasts*, fibroblasty guza
- CDK, *ang. Cyclin-dependent Kinase*, kinaza zależna od cyklin
- CTE, *ang. C-terminal Extension*, C-terminalne przedłużenie domeny wiążącej DNA
- DBD, *ang. DNA-binding Domain*, domena wiążąca DNA
- DCIS, *ang. Ductal Carcinoma In Situ*, przewodowy rak *in situ*
- E2, *ang. 17 β -estradiol*
- ECM, *ang. Extracellular Matrix*, macierz zewnątrzkomórkowa
- EGF, *ang. Epidermal Growth Factor*, naskórkowy czynnik wzrostu
- ER, *ang. Estrogen Receptor*, receptor estrogenowy
- ERE, *ang. Estrogen Response Element*, specyficzna sekwencja DNA związana z odpowiedzią na estrogeny
- ESR1, *ang. Estrogen Receptor α* ; gen receptora estrogenowego α
- FGF, *ang. Fibroblast Growth Factor*, czynnik wzrostu fibroblastów
- FGFR, *ang. Fibroblast Growth Factor Receptor*, receptor dla czynnika wzrostu fibroblastów
- GR, *ang. Glucocorticoid Receptor*, receptor glukokortykoidowy
- HER2, *ang. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu
- HR, *ang. Hormone Receptor*, receptory dla hormonów steroidowych
- HT, *ang. Hormonal Therapy*, hormonoterapia
- IDC, *ang. Invasive Ductal Carcinoma*, inwazyjny rak przewodowy
- IGF-1, *ang. Insuline-like Growth Factor 1*, insulinopodobny czynnik wzrostu 1
- IHC, *ang. Immunohistochemistry*, immunohistochemia
- IP, *ang. Immunoprecipitation*, immunoprecypitacja
- JNK, *ang. c-Jun N-terminal kinase*, kinaza N-terminalna c-Jun
- LBD, *ang. Ligand-binding Domain*, domena wiążąca ligand
- LCIS, *ang. Lobular Carcinoma In Situ*, zrazikowy rak *in situ*
- MAPK, *ang. Mitogen-activated Protein Kinase*, kinaza białkowa aktywowana mitogenami

MPA, *ang. Medroxyprogesterone Acetate*, octan medroksyprogesteronu
NETA, *ang. Norethisterone Acetate*, octan noretysteronu
NLS, *ang. Nuclear Localization Signal*, sekwencja sygnału lokalizacji jądrowej
NTD, *ang. N-terminal Domain*, domena N-terminalna
OHT, *ang. 4-hydroxytamoxifen*, 4-hydroksytamoksyfen
OMP, *ang. Oral Micronized Progesterone*, mikronizowany progesteron
P4, *ang. Progesterone*, progesteron
PDX, *ang. Patient-derived Xenograft*, ksenografty pochodzące od pacjentów
PGR, *ang. Progesterone Receptor*, gen receptora progesteronowego
PI3K, *ang. Phosphoinositide 3-kinases*, 3-kinaza fosfatydyloinozytolu
PLA, *ang. Proximity Ligation Assay*
PR, *ang. Progesterone Receptor*, receptor progesteronowy
PRE, *ang. Progesterone Response Element*, specyficzna sekwencja DNA związana z odpowiedzią na progesteron
RTK, *ang. Receptor Tyrosine Kinase*, receptor o aktywności kinazy tyrozynowej
SERM, *ang. Selective Estrogen Receptor Modulator*, selektywny modulator receptora estrogenowego
SNPs, *ang. Single Nucleotide Polymorphisms*, polimorfizmy pojedynczego nukleotydu
T-DM1, *ang. Trastuzumab Emtansine*, trastuzumab emtanzyna
TF, *ang. Transcription Factor*, czynnik transkrypcyjny
TKI, *ang. Tyrosine Kinase Inhibitor*, inhibitor kinazy tyrozynowej
TME, *ang. Tumour Microenvironment*, mikrośrodowisko guza
TNM, *ang. T, ang. tumour*, wielkość guza, *N, ang. nodules*, status węzłów chłonnych, *M, ang. metastases*, obecność przerzutów odległych
WHO, *ang. World Health Organisation*, Światowa Organizacja Zdrowia

1. WSTĘP

1.1. Rak piersi

1.1.1. Epidemiologia i etiologia

Zgodnie z danymi Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) i Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (*International Agency for Research on Cancer*; <https://gco.iarc.fr/>) chorobę nowotworową diagnozuje się co roku u ponad 18 milionów ludzi na całym świecie, spośród czego rak gruczołu piersiowego oraz rak płuca stanowią największy procent wszystkich przypadków (po 11,6% każdy). W Polsce rak piersi (BCa; *Breast Cancer*) jest najczęściej diagnozowanym nowotworem złośliwym (dane z 2017 roku mówią o 18 529 zachorowaniach; 22,5% przypadków spośród wszystkich pacjentów onkologicznych) i drugą przyczyną zgonów na nowotwory złośliwe u kobiet (6670 zgonów; 14,8% zgonów na choroby nowotworowe w 2017 roku) (Didkowska et al., 2019). Co ciekawe, z roku na rok obserwuje się wzrost liczby zachorowań na raka piersi, a czynnikami ryzyka związanymi z wystąpieniem tej choroby są: starszy wiek, nosicielstwo mutacji (głównie w genach *BRCA1* i *BRCA2*) oraz historia rodzinna choroby, naturalne zmiany hormonalne (np. wczesnie pojawiająca się pierwsza menstruacja, późna menopauza, późna pierwsza ciąża), hormonalna terapia zastępcza, długotrwała antykoncepcja hormonalna, a także styl życia (nadwaga i otyłość, brak aktywności fizycznej, nadmierne spożycie alkoholu) (Kamińska et al., 2015; Sun et al., 2017). Należy również zwrócić uwagę na fakt, iż statystyki jasno wskazują na bezpośredni związek pomiędzy stopniem zaawansowania choroby (zgodnie z klasyfikacją TNM opracowaną przez Union for International Cancer Control) a przeżywalnością. Stąd też, świadomość pacjentek dotycząca regularnych badań przesiewowych oraz kampanie społeczne promujące profilaktykę raka piersi są kluczowe dla wczesnej diagnozy, co bezpośrednio przyczynia się do obniżenia ryzyka rozwoju zaawansowanej choroby (DeSantis et al., 2019; Maajani et al., 2019).

1.1.2. Klasyfikacja i leczenie

Podstawą rozpoznania raka piersi jest diagnostyka patomorfologiczna materiału uzyskanego przy użyciu biopsji gruboigłowej, pozwalająca na sklasyfikowanie badanej zmiany, ustalenie zaawansowania nowotworu oraz wybranie możliwie najskuteczniejszej metody leczenia. Klasyfikacja oraz ocena stopnia złośliwości histologicznej opiera się na systemach opracowanych przez WHO oraz AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) (Amin et al., 2017; Hoon Tan et al., 2020). Rak piersi jest nowotworem pochodzenia nabłonkowego, który może wywodzić się ze zrazików lub przewodów gruczołu piersiowego. Rozpoznawane zmiany obejmują stadia przedinwazyjne/prekursorowe – raki przewodowe oraz

zrazikowe *in situ* (DCIS – *ductal carcinoma in situ*, oraz LCIS – *lobular carcinoma in situ*), oraz naciekające raki piersi, zagrażające przerzutowaniem. Wśród raków naciekających najczęstszą postacią jest inwazyjny rak przewodowy (IDC, *invasive ductal carcinoma*), stanowiący 70-80% wszystkich przypadków raka piersi. Standardowe badanie patomorfologiczne określa szereg czynników o znaczeniu rokowniczym oraz predykcyjnym dla pacjentki, do których należą m.in.: wielkość guza, jego typ histologiczny oraz stopień zróżnicowania, stan węzłów chłonnych (obecność przerzutów), a także ocena immunohistochemiczna (IHC) ekspresji ER, PR, HER2 oraz indeksu proliferacyjnego Ki67. Zdefiniowanie powyższych parametrów umożliwi precyzyjną klasyfikację do danego podtypu raka piersi (Jassem et al., 2018).

Obecnie wyróżnia się 4 molekularne podtypy raka piersi: luminalny A, luminalny B, HER2-zależny i podtyp trójujemny. Kryterium ich podziału oparte jest na ocenie ekspresji (IHC) receptorów dla hormonów steroidowych (receptora estrogenowego – ER, *Estrogen Receptor*; receptora progesteronowego – PR, *Progesterone Receptor*), receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER2, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) oraz indeksu proliferacyjnego Ki67 (Tab. 1). To właśnie zdefiniowanie molekularnego podtypu raka piersi pozwala określić rokowania pacjentek oraz stanowi podstawę do doboru odpowiedniego leczenia (Jassem et al., 2018; Malhotra et al., 2010; Peppercorn et al., 2008; Prat et al., 2015; Reis-Filho and Pusztai, 2011).

Cecha	Luminalny A	Luminalny B	HER2-dodatni	Trójujemny
ER	+	+	+/-	-
PR	+	+/-	+/-	-
HER2	-	-	+	-
Ki67	< 20%	≥ 20%	Każdy	Każdy
Częstotliwość	50-60%	10-20%	10-15%	13-15%

Tabela 1. Molekularne podtypy raka piersi na podstawie IHC; w oparciu o (Reis-Filho and Pusztai, 2011)

W przypadku niezaawansowanego raka piersi wiodącą rolę w leczeniu odgrywa interwencja chirurgiczna, która wraz z uzupełniającą radioterapią oraz leczeniem systemowym są skuteczne u ponad 90% chorych. Poważnym wyzwaniem w onkologii jest miejscowo zaawansowany oraz rozsiany (przerzutowy) rak gruczołu piersiowego, którego leczenie oparte jest głównie na terapii systemowej, tj. chemio- i/lub hormonoterapii (HT) oraz terapiach

celowanych (Balic et al., 2019). Wczesne rozpoznanie choroby oraz wprowadzanie coraz skuteczniejszych metod terapeutycznych (nowe chemioterapeutyki, kolejne generacje terapii hormonalnych oraz skuteczne terapie celowane, np. trastuzumab, pertuzumab, T-DM1, inhibitory CDK4/6) przyczyniają się do poprawy wyników leczenia. Jednak rosnąca liczba nowych przypadków raka piersi oraz powszechny problem wykształcającej się oporności na stosowane terapie to nadal główne wyzwania, z którymi mierzy się współczesna onkologia.

1.2. Receptory dla hormonów steroidowych

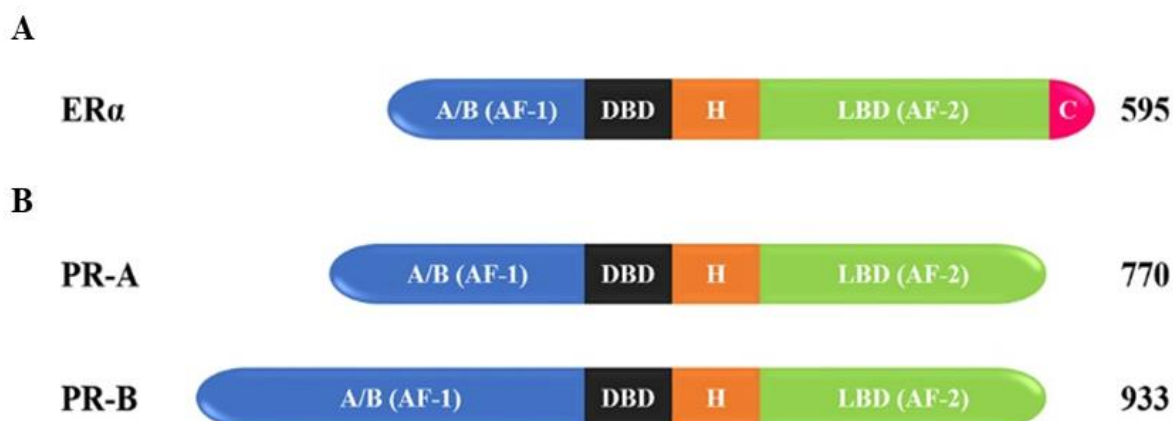
1.2.1. Receptor estrogenowy (ER, *Estrogen Receptor*)

Hormono-zależne raki piersi, stanowiące około 70% przypadków zachorowań na nowotwory tego gruczołu, charakteryzują się wysokim poziomem ekspresji ER oraz ER-zależną sygnaturą genów (Perou et al., 2000). Receptory estrogenowe są grupą receptorów dla hormonów steroidowych (HR; *hormone receptors*), należąca do rodziny receptorów jądrowych, będących jednocześnie czynnikami transkrypcyjnymi. W ludzkich tkankach występują dwie formy ER – ER α oraz ER β , kodowane odpowiednio przez geny *ESR1* i *ESR2*, a także kilka, powstałych w wyniku alternatywnego splicingu, izoform tychże receptorów. W związku z tym, iż w gruczole piersiowym oraz w komórkach nowotworowych raka piersi występuje głównie ER α , to w całej pracy skrót ER odnosi się właśnie do tej formy receptora (analogicznie jak w rutynowej diagnostyce patomorfologicznej raka piersi).

W warunkach fizjologicznych receptor estrogenowy zarządza estrogeno-zależną morfogenezą oraz funkcjonowaniem gruczołu piersiowego w okresie postnatalnym. ER jest kluczowym czynnikiem biorącym udział w tworzeniu i elongacji kanałków mlekowych w trakcie kształtowania się gruczołu, zaś w trakcie ciąży kieruje on rozgałęzianiem przewodów i tworzeniem pęcherzyków mlecznych (Briskin and O'Malley, 2010).

Wszystkie receptory jądrowe dla hormonów steroidowych (tj. receptor estrogenowy, progesteronowy, androgenowy i glukokortykoidowy) charakteryzują się ewolucyjnie zakonserwowaną funkcją i budową trój-domenową, w skład której wchodzi: hormono-niezależna domena aktywatorowa AF1 (*activation function 1*), domena wiążąca DNA (DBD; *DNA-binding domain*) oraz hormono-zależna domena aktywatorowa AF2/LBD (*activation function 2/ligand-binding domain*) (Kumar and Thompson, 1999). ER, o masie molekularnej 66 kDa, zbudowany jest z sześciu subdomen, strukturalnie będących częścią wyżej wymienionych regionów (Ryc. 1A). N-terminalnie zlokalizowane subdomeny A i B są częścią domeny AF1. Subdomena C, reprezentująca DBD, zbudowana jest z dwóch motywów palca cynkowego i odpowiada za oddziaływanie receptora z DNA. Subdomena D receptora łączy

DBD z AF2/LBD oraz zawiera w swojej strukturze sekwencję sygnału lokalizacji jądrowej (NLS; *nuclear localization signal*). Subdomena E jest składową domeny AF2, a jej funkcją jest zależna od liganda aktywność transkrypcyjna ER, która obejmuje zmiany strukturalne receptora i rekrutację szeregu koaktywatorów. C-terminalna część receptora to subdomena F, której funkcja nie jest do końca jasna, ale podejrzewa się jej udział w dimeryzacji receptora (Briskin and O'Malley, 2010; Heldring et al., 2007; Klinge, 2000; Nilsson et al., 2001; Perkins et al., 2018).



Rycina 1. Budowa receptorów dla hormonów steroidowych. A. ER α ; B. PR-A oraz PR-B; AF-1 – *activation function 1*; DBD – subdomena wiążąca DNA; H – rejon zawiasowy, subdomena łącząca DBD z AF-2; LBD – subdomena wiążąca ligand; AF-2 – *activation function 2*. Na podstawie Perkins. Et al., 2018.

Poza pełnieniem kluczowych funkcji w biologii gruczołu piersiowego, ER jest także dobrze poznanym czynnikiem diagnostycznym i prognostycznym w raku piersi oraz celem rutynowo stosowanych terapii hormonalnych. Należy wspomnieć, iż spośród wszystkich podtypów raka piersi to właśnie hormono-zależne nowotwory charakteryzują się najlepszą przeżywalnością, a wysoki poziom ekspresji ER koreluje z dobrym rokowaniem pacjentek (Dai et al., 2015; Parker et al., 2009). Ponadto, ER, poprzez regulację ekspresji szeregu białek cyklu komórkowego, w tym cykliny D1, jest swoistym „motorem napędowym” proliferacji komórek rakowych (Park et al., 2020; Parl et al., 1984; Samaan et al., 1981). Stąd też, znaczenie ER w rozwoju i progresji raka piersi na pierwszy rzut oka może nie być oczywiste. Wynika to z faktu, iż z jednej strony jest on zaangażowany w promocję choroby nowotworowej (luminalne raki piersi stanowią największy procent wszystkich przypadków), z drugiej zaś to nowotwory ER-pozytywne w porównaniu z innymi podtypami są mniej złośliwe, a na stosunkowo dobre rokowanie pacjentek wpływa dostępność skutecznych celowanych terapii anty-ER (Li et al., 2020; Puhalla et al., 2012; Zhang et al., 2014a).

1.2.2. Receptor progesteronowy (PR, *Progesterone Receptor*)

Progesteron, podobnie jak estrogeny, jest hormonem steroidowym produkowanym w jajnikach, którego stężenie zmienia się cyklicznie w trakcie cyklu menstruacyjnego. Poza funkcjami związanymi z rozbudową endometrium oraz różnicowaniem znajdujących się tu gruczołów, progesteron odgrywa również kluczową rolę w biologii gruczołu piersiowego, zarówno w okresie dojrzewania – rozwoju gruczołu, jak i podczas ciąży, w dojrzałej tkance. Wiążąc się do swoistego receptora progesteronowego (PR), zarządza on tworzeniem się zrazików oraz, współgrając z ER, uczestniczy w formowaniu pęcherzyków i rozgałęzień przewodów mlecznych (Obr and Edwards, 2012; Shyamala, 1999; Stingl, 2011; Taraborrelli, 2015). Na poziomie komórkowym PR stymuluje proliferację komórek luminalnych (promując ekspresję cykliny D1 oraz sekrecję i funkcję parakrynną RANKL) oraz aktywację komórek macierzystych (z udziałem sygnalizacji Wnt) (Briskin et al., 2015).

PR kodowany jest przez gen *PGR*, znajdujący się na chromosomie 11q22. Podobnie jak wszystkie jądrowe receptory dla hormonów steroidowych, PR jest czynnikiem transkrypcyjnym, zbudowanym z N-terminalnego regionu (NTD; *N-terminal domain*), zawierającego domeny aktywatorowe AF, domeny wiążącej DNA (DBD), regionu zawiasowego, który w przypadku PR opisywany jest jako C-terminalne przedłużenie domeny wiążącej DNA (CTE, *C-terminal extension*), oraz z domeny wiążącej ligand (LBD, *ligand-binding domain*) (Ryc. 1B). NTD oraz CTE są regionami o licznych miejscach dla różnego rodzaju modyfikacji post-translacyjnych receptora, takich fosforylacja, sumoilacja, ubikwitynacja, acetylacja czy metylacja, w następstwie których modulowana jest aktywność PR. Dodatkowo, na funkcjonowanie receptora wpływają także związane z nim białka koaktywatorowe oraz korepresowe, wiążące się najczęściej do LBD. Zidentyfikowano również szereg takich białek wiążących się do NTD, w tym np. p68 (helikaza RNA), TBP, TFIIB, TFIIF (czynniki transkrypcyjne) oraz HDAC4 (deacetylaza histonów) (Hill et al., 2012).

U ludzi występują trzy izoformy receptora progesteronowego – PR-A, PR-B oraz PR-C, które są produktami jednego genu (*PGR*), powstałymi na drodze alternatywnej transkrypcji z dwóch różnych promotorów. PR-B jest receptorem o pełnej długości i masie molekularnej 116 kDa, natomiast izoforma PR-A jest skrócona od strony N-terminalnej, a jej masa molekularna to 94 kDa (Ryc. 1B) (Taraborrelli, 2015). Zdrowe komórki, określane jako PR-pozytywne, charakteryzują się równym stosunkiem ekspresji PR-A : PR-B. Obie izoformy posiadają różne aktywności transkrypcyjne, co ma związek z ich odmienną strukturą (Richer et al., 2002; Tung et al., 2006). Co ciekawe, pomimo, że zarówno PR-A jak i PR-B pełnią

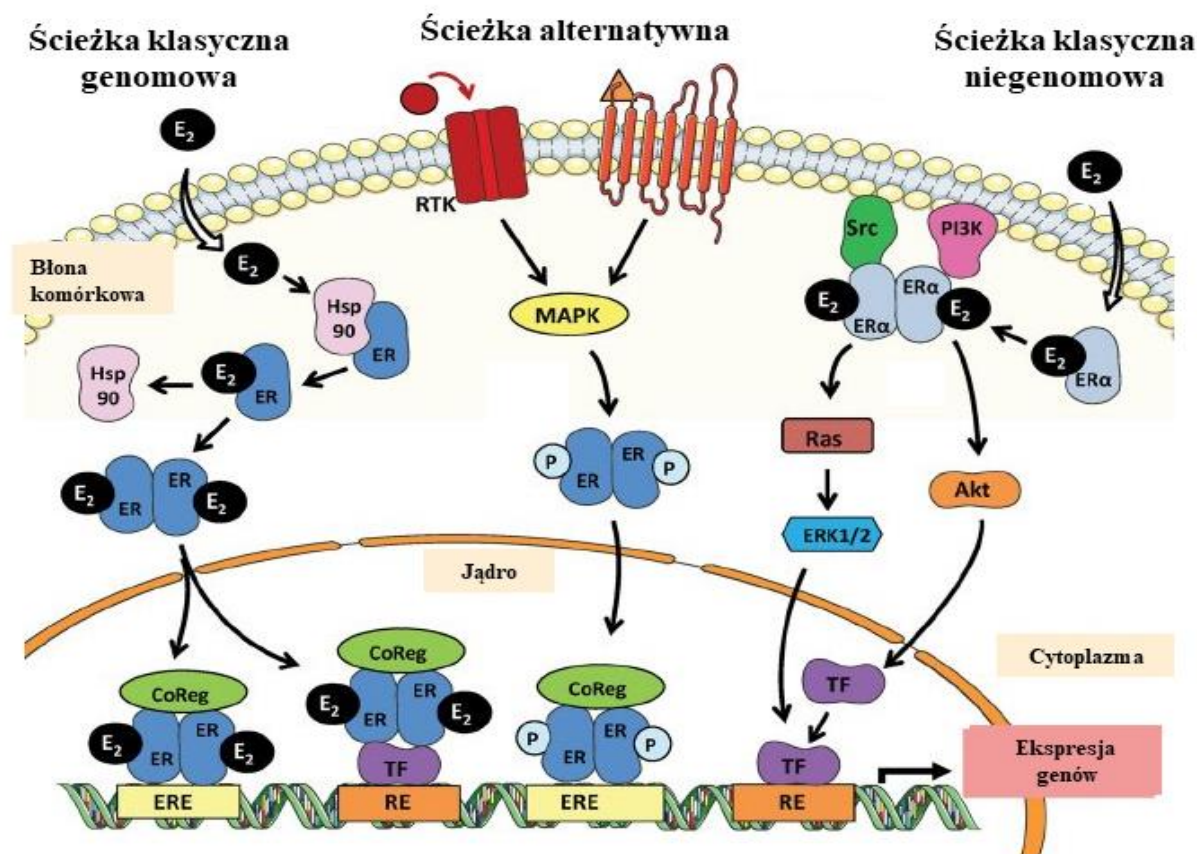
kluczowe funkcje w rozwoju gruczołu piersiowego oraz macicy (Mulac-Jericevic et al., 2003; Mulac-Jericevic et al., 2000), to jednak PR-A staje się dominującą izoformą w komórkach nowotworowych. Stosunek ekspresji izoform ulega w tym przypadku zmianie na korzyść PR-A i to właśnie ta izoforma wydaje się być istotnym czynnikiem zaangażowanym w progresję choroby i gorszą odpowiedź na terapie endokrynne (Graham et al., 2005; Graham et al., 1995; Hopp et al., 2004; McGowan and Clarke, 1999). Pojawiają się również prace wskazujące PR-B jako izoformę, której aktywacja zwiększa migrację komórek nowotworowych, co potencjalnie mogłoby się przełożyć na rozwój choroby (Bellance et al., 2013; Ibrahim et al., 2008). PR-C natomiast jest najkrótszą z izoform (60 kDa) i charakteryzuje się brakiem aktywności transkrypcyjnej. Jak dotąd ekspresję PR-C zaobserwowano jedynie w błonie mięśniowej macicy kobiet w ciąży, przypisując jej funkcję regulacji skurczów macicy w trakcie porodu (Condon et al., 2006). W diagnostyce raka piersi rutynowo stosuje się oznaczanie całkowitego poziomu PR w komórkach, co umożliwia klasyfikację choroby. Niniejsza praca również skupia się na całkowitym poziomie receptora progesteronowego i jego aktywności w komórkach luminalnego raka piersi.

Z racji tego, iż PR zarządza proliferacją komórek luminalnych w gruczole piersiowym, to ewentualne zaburzenia jego aktywności mogą przyczyniać się niekontrolowanych podziałów komórkowych, prowadząc tym samym do rozwoju raka piersi. W trakcie cyklu miesięczkowego u kobiet regularnie zmienia się stężenie hormonów steroidowych, w tym estrogenów i progesteronu. Wydłużony okres wpływu hormonów płciowych na organizm (wczesna pierwsza menstruacja, późna menopauza) oraz ingerencja w ich stężenie (późna ciąża, antykoncepcja hormonalna, hormonalna terapia zastępcza) wiążą się ze zwiększonym ryzykiem raka piersi. Sugeruje się, iż może mieć to związek z aktywnością progesteronu i mechanizmami molekularnymi wywołanymi sygnalizacją PR-zależną (Bernstein, 2002; Brisken, 2013; Brisken et al., 2015; Hankinson et al., 2004). Co więcej, niektóre badania epidemiologiczne oraz modele zwierzęce i komórkowe wskazują, iż progestyny (np. MPA – octan medroksyprogesteronu, NETA – octan noretysteronu), tj. syntetyczne ligandy receptora progesteronowego, wykazują właściwości pro-onkogenne. Terapie hormonalne u kobiet postmenopauzalnych, w których wraz z estrogenami stosowano progestyny, znacząco zwiększały częstotliwość zachorowania na raka piersi (Carnevale et al., 2007; Chlebowski et al., 2003; Chlebowski et al., 2009; Rossouw et al., 2002). Efekty te były obserwowane jednak w przypadku progestyn starej generacji, co miało związek z ich niespecyficzną funkcją androgeną. Natomiast progestyny nowej generacji, podobnie jak i naturalny progesteron, charakteryzują się anty-proliferacyjnymi właściwościami (Chen et al., 2011; Vignon et al., 1983). Na uwagę zasługuje również fakt, iż

wraz z progresją hormono-zależnego raka piersi obserwuje się utratę PR. Fenotyp PR-negatywny gorzej odpowiada na terapię endokrynną, co wiąże się z krótszym czasem przeżycia pacjentek (Creighton, 2012; Cui et al., 2005; Obr and Edwards, 2012; Parker et al., 2009; Prat and Perou, 2011; Sørlie et al., 2001; Yersal and Barutca, 2014). Świadczy to o wysokim stopniu złożoności mechanizmów regulujących aktywność i funkcję receptora progesteronowego, którego rola w rozwoju i progresji luminalnego raka piersi wciąż pozostaje nie do końca wyjaśniona.

1.2.3. Ścieżki aktywacji i sygnalizacja ER i PR

Receptory estrogenowy i progesteronowy należą do klasy receptorów jądrowych, w związku z czym cechują się one licznymi podobieństwami, zarówno strukturalnymi, jak i funkcjonalnymi. Głównymi zadaniami ER i PR jest modulacja ekspresji specyficznych dla siebie genów w odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe. Istnieją dwie ścieżki aktywacji receptorów dla hormonów steroidowych – klasyczna i alternatywna, które uruchamiają serię molekularnych mechanizmów, związanych z aktywnością receptorów, tj.: i) bezpośrednią ścieżkę genomową, ii) pośrednią ścieżkę genomową, oraz iii) ścieżkę niegenomową (Ryc. 2) (Fuentes and Silveyra, 2019; Sever and Glass, 2013). Nieaktywny receptor zlokalizowany jest najczęściej w cytoplazmie komórki, tworząc kompleks z białkami opiekuńczymi, np. Hsp90 (Echeverria and Picard, 2010). Klasyczna ścieżka aktywacji obejmuje związanie specyficznego liganda, estrogenu bądź progesteronu, co prowadzi do oddysocjowania białek opiekuńczych oraz dimeryzacji danego receptora. Następnie aktywowany receptor ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie wiąże się do specyficznych sekwencji DNA – dla ER są to ERE (*estrogen response element*), zaś dla PR – odpowiednio PRE (*progesterone response element*). Co ciekawe, podczas gdy ER wiąże się w sposób specyficzny do sekwencji 5'-GGTCAnnnTGACC-3' (Klinge, 2001), to sekwencje rozpoznawane przez PR wykazują 90% homologię z sekwencjami dla receptorów androgenowego (AR) oraz glukokortykoidowego (GR) (sekwencja konsensusowa 5'-GGTACAnnnTGTTCT-3'), a na specyficzność wiązania dodatkowo wpływają sekwencje dystalne i proksymalne danego promotora (Lieberman et al., 1993; Nelson et al., 1999). W jądrze komórkowym ER i PR rekrutują pełną gamę koaktywatorów bądź korepresorów transkrypcji, które poprzez przebudowę chromatyny (na drodze metylacji DNA, acetylacji i deacetylacji histonów) wpływają na aktywność transkrypcyjną receptorów (Beato et al., 1996; Fiorito et al., 2013; Klinge, 2000; Rowan and O'Malley, 2000). Opisana aktywność transkrypcyjna ER i PR nie ogranicza się jedynie do bezpośredniego oddziaływania z DNA. Kierowana przez nie regulacja ekspresji genów może



Rycina 2. Ścieżki aktywacji i sygnalizacji receptorów dla hormonów steroidowych na przykładzie receptora estrogenowego. Ścieżka klasyczna genomowa – związanie specyficznego liganda (estrogenu lub progesteronu) promuje powstanie kompleksu transkrypcyjnego z udziałem receptora, który bezpośrednio bądź pośrednio rozpoznaje specyficzne sekwencje na nici DNA, prowadząc do ekspresji genów ER- lub PR-zależnych. Ścieżka alternatywna – receptory dla hormonów steroidowych są aktywowane głównie poprzez fosforylację, pod wpływem sygnalizacji od receptorów dla czynników wzrostu lub receptorów związanych z białkami G, bez udziału hormonów. Ścieżka klasyczna niegenomowa – stymulacja hormonalna prowadzi do aktywacji zlokalizowanych w obszarze błony komórkowej frakcji ER i PR, które uruchamiają szereg kaskad sygnalizacyjnych (np. MAPK, PI3K/Akt), promując w następstwie aktywność innych czynników transkrypcyjnych. ER – receptor estrogenowy, E_2 – estradiol, RTK – receptory o aktywności kinaz tyrozynowych, TF – czynnik transkrypcyjny (*transcription factor*), CoReg – białka koregulatorowe, ERE – *estrogen response element*, RE – sekwencje dla innych czynników transkrypcyjnych, P – fosforylacja. Na podstawie Le Romancer et al., 2011.

zachodzić dodatkowo w sposób pośredni – poprzez oddziaływania z innymi czynnikami transkrypcyjnymi. W tym przypadku rozpoznawana sekwencja może się różnić od klasycznych ERE bądź PRE, co znacząco zwiększa pulę genów regulowanych przez oba receptory (Jacobsen and Horwitz, 2012; Marino et al., 2006; Safe and Kim, 2008; Shatnawi et al., 2007; Wargon et al., 2015). Stymulacja hormonalna może również prowadzić do uruchomienia niegenomowej ścieżki sygnalizacyjnej, w której to cytoplazmatyczne, zlokalizowane w obszarze błony

komórkowej frakcje ER i PR aktywują szereg kaskad sygnalizacyjnych, jak np. PLC/PKC (fosfolipaza C/kinaza białkowa C), Ras/Raf/MAPK (szlak kinaz MAP), PI3K/Akt (kinaza 3-fosfatydyloinozytolu/Akt), cAMP/PKA (cykliczny AMP/kinaza białkowa A) (Björnström and Sjöberg, 2005; Levin and Hammes, 2016; Morley et al., 1992; Moussatche and Lyons, 2012). Dodatkowo, aktywność ER oraz PR może być również regulowana przez alternatywne ścieżki hormono-niezależne, od receptorów dla czynników wzrostu. Taki rodzaj sygnalizacji stymuluje aktywację obu receptorów poprzez ich fosforylację, prowadząc do ubikwitynacji, a w konsekwencji degradacji receptorów w systemie proteasomalnym (Lange et al., 2000; Qiu and Lange, 2003; Qiu et al., 2003; Shen et al., 2001; Zhou and Slingerland, 2014). Do czynników wzrostu zaangażowanych w alternatywną ścieżkę aktywacji PR należą: heregulina (Labriola et al., 2003), IGF-1 (Cui et al., 2003), EGF (Daniel et al., 2007), FGF2 oraz FGF7 (Cerliani et al., 2011; Piasecka et al., 2016). Podobnie IGF-1 (Richardson et al., 2011), EGF (Bunone et al., 1996; Ignar-Trowbridge et al., 1992) oraz FGF7 (Turczyk et al., 2017) mogą aktywować ER. Dodatkowo, funkcjonowanie obu receptorów może być regulowane na poziomie modyfikacji post-translacyjnych, które, poza dobrze poznaną fosforylacją, obejmują acetylację, metylację, sumoilację oraz różne typy ubikwitynacji (Abdel-Hafiz and Horwitz, 2014; Le Romancer et al., 2011).

1.2.4. Terapie anty-ER

Okolo 70% diagnozowanych przypadków raka piersi jest zależnych od estrogenów i ich receptora – ER. Stąd też standardowe leczenie dla tego typu nowotworów obejmuje szeroko pojęte terapie endokrynne (Ali and Coombes, 2002).

Pierwszym lekiem anty-estrogenowym wprowadzonym na rynek był tamoksyfen, który do dziś pozostaje najczęściej przepisywanym terapeutycznym hormonem na świecie (Quirke, 2017). Należy on do grupy selektywnych modulatorów receptora estrogenowego (SERM; *selective estrogen receptor modulators*), działających zarówno jako agoniści, jak i antagoniści ER, i wywołujących efekt tkankowo- i komórkowo-specyficzny. Mechanizm działania tamoksyfenu opiera się na blokowaniu funkcji transkrypcyjnej domeny AF2 w receptorze, a szereg badań klinicznych pokazuje, iż 5-letnie leczenie znacząco obniża ryzyko nawrotu choroby (o 47%) oraz śmiertelność pacjentek (o 26%) (Fisher et al., 1989; Riggs and Hartmann, 2003). Należy jednak pamiętać, iż tamoksyfen nie znosi całkowicie aktywności transkrypcyjnej ER, ponieważ domena AF1 wciąż pozostaje aktywna (Ali et al., 2016). Z kolei lekiem, który charakteryzuje się działaniem czysto antagonistycznym na ER jest fulvestrant (Faslodex). Blokują on funkcje obu domen – AF1 oraz AF2, przez co zapobiega dimeryzacji i całkowicie

hamuje aktywność transkrypcyjną ER, równocześnie prowadząc do jego gwałtownej degradacji (Dowsett et al., 2005; Howell, 2001).

Strategie terapeutyczne w przypadku hormono-zależnych raków piersi nie opierają się jedynie na bezpośrednim działaniu anty-ER. Innym podejściem w terapii jest zablokowanie syntezy estrogenu, hamując docelowo sygnalizację estrogeno-zależną. Stosowanymi w tym celu związkami są inhibitory aromatazy (enzymu katalizującego reakcję konwersji androgenów do estrogenów), do których zaliczamy eksemestan, anastrozol i letrozol (Johnston and Dowsett, 2003).

Należy pamiętać, iż dobór uzupełniającego leczenia systemowego opartego o hormonoterapie jest zależny od wieku pacjentki, a co za tym idzie – jej statusu hormonalnego. U kobiet przedmenopauzalnych estrogeny i progesteron produkowane są cyklicznie przez jajniki, natomiast wraz z menopauzą ustaje produkcja progesteronu, zaś estrogeny produkowane są lokalnie, m.in. w gruczole piersiowym, głównie przez tkankę tłuszczową. Mimo to, paradoksalnie u kobiet postmenopauzalnych znacznie częściej diagnozuje się hormono-zależne raki piersi i w związku z tym zdecydowana większość danych klinicznych dotyczących biologii i terapii luminalnych nowotworów obejmuje grupę starszych pacjentek, rzadko angażując chore przedmenopauzalne. Statystyki natomiast jasno wskazują, iż młodszy wiek w momencie diagnozy koreluje z gorszym przeżyciem, co w głównej mierze związane jest z występowaniem bardziej agresywnych podtypów raka piersi w tej grupie wiekowej (Brandt et al., 2015; Kulkarni et al., 2019; Sisti et al., 2016). Wydaje się więc, iż jednym z kluczowych czynników zaangażowanych w rozwój i progresję nowotworów luminalnych jest odpowiednia gospodarka hormonalna. Co ciekawe, odmienna, zależna od wieku pacjentek i ich statusu menopauzalnego, charakterystyka molekularna w obrębie ER-dodatnich raków piersi została opisana w kilku pracach. Analizy transkryptomomiczne oraz genomowe wykazały, iż w przypadku przedmenopauzalnych pacjentek ER+ obserwuje się wyższy poziom ekspresji genów zaangażowanych w sygnalizację od czynników wzrostu, natomiast badania *in vitro* potwierdziły udział zarówno estrogenu jak i progesteronu w charakterystycznym dla tych pacjentek profilu ekspresji genów (Anders et al., 2008; Liao et al., 2015; Need et al., 2015; Yau et al., 2007).

Zgodnie z wytycznymi postępowania diagnostyczno-terapeutycznego Polskiego Towarzystwa Onkologicznego oraz ASCO (*American Society for Clinical Oncology*) podstawowym lekiem hormonalnym u chorych przed menopauzą wciąż pozostaje tamoksyfen (Jassem et al., 2018; Visvanathan et al., 2019). Jak wspomniano, charakteryzuje się on stosunkowo wysoką skutecznością terapeutyczną. Niestety, około 45% pacjentek nie

odpowiada na leczenie tamoksyfenem (oporność *de novo*), natomiast u niemalże wszystkich leczonych ostatecznie z czasem wykształca się oporność, co stanowi poważny problem kliniczny (Clarke et al., 2003). Mechanizmy molekularne leżące u podstaw pojawiającej się oporności na terapię są przedmiotem analiz wielu zespołów badawczych na świecie. W związku z tym, iż mutacje w obrębie genu *ESR1* pojawiają się jedynie u 1% pacjentów, to modulacje funkcji ER oraz aktywacja alternatywnych ścieżek sygnalizacyjnych wydają się być kluczowymi czynnikami mającymi związek z opornością na terapię anti-ER (Ali and Coombes, 2002; Ali et al., 2016; Musgrove and Sutherland, 2009; Osborne and Schiff, 2011).

1.2.5. Nowe podejście do roli ER i PR w raku piersi

W związku tym, że 50-60% przypadków ER+ raka piersi posiada także ekspresję PR, a ekspresja genu *PGR* regulowana jest bezpośrednio przez ER, przez lata traktowano PR jedynie jako biomarker funkcji ER (Kastner et al., 1990). Z czasem jednak coraz lepiej poznawano znaczenie PR jako istotnego autonomicznego czynnika odgrywającego bezpośrednią rolę zarówno w morfogenezie gruczołu piersiowego, jak i w raku piersi (co zostało opisane powyżej). Podtyp luminalny A raka piersi (ER+/PR+) charakteryzuje się najlepszym wskaźnikiem przeżycia spośród wszystkich podtypów, co ma związek ze stosunkowo wolnym wzrostem guza oraz dostępem do efektywnych terapii endokrynnych (Parker et al., 2009; Perou et al., 2000). Znamienna dla progresji choroby utrata PR (związana z podtypem luminalnym B): i) koreluje z ekspresją licznych białek cyklu komórkowego niezależnych od ER, tym samym wskazując na częściowo hormono-niezależny wzrost takich guzów (Creighton, 2012; Nielsen et al., 2010), ii) wiąże się ze zdecydowanie gorszą odpowiedzią na terapię endokrynną (Bardou et al., 2003; Braun et al., 2013; Osborne et al., 2005) i może być traktowana jako jeden z potencjalnych molekularnych mechanizmów oporności na leczenie hormonalne. Mimo wszystko, z powodu wielu sprzecznych doniesień dotyczących powiązania zastosowania agonistów receptora progesteronowego w hormonalnej terapii zastępczej z ryzykiem zachorowania na raka piersi, badania nad znaczeniem regulacji aktywności PR w kontekście rozwoju i terapii raka piersi na dłuższy czas utknęły w martwym punkcie. Jednak w ostatnich latach, pojawiające się nowe doniesienia sprawiły, iż powrócono do zainteresowania PR w raku piersi (Lim et al., 2016). Kluczowym czynnikiem wydaje się być poprawnie usystematyzowana nomenklatura dotycząca ligandów PR, która pozwoliła lepiej zrozumieć biologię receptora. W pracy z 2017 roku zespół prof. Jasona Carrolla zwrócił uwagę na fakt, iż leki progestagenne (obejmujące wszystkich agonistów PR), zarówno naturalne jak i syntetyczne, mają różne efekty w kontekście ryzyka rozwoju BCa. Przeanalizowane w jego pracy badania kliniczne jasno

wskazują, iż to zastosowanie progestyn (syntetycznych ligandów PR) wiązało się ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka piersi, co może mieć związek z ich dodatkowym działaniem androgennym. Jednak naturalny ligand PR, tj. progesteron (P4), oraz nowe klinicznie dostępne jego formy (np. mikronizowany progesteron – OMP, a także dydrogesteron), korelowały z obniżonym ryzykiem choroby nowotworowej gruczołu piersiowego (Carroll et al., 2017).

Wiadomo, że PR i ER tworzą bezpośredni kompleks poprzez oddziaływanie domen ERID-I oraz ERID-II PR z domeną LBD ER (Ballaré et al., 2003). Co więcej, to aktywacja PR okazuje się być niezbędnym sygnałem do formowania takiego kompleksu, modulując tym samym aktywność ER. W części prac zastosowanie progestyn (MPA lub R5020) stymulowało aktywację ER (np. poprzez fosforylację seryny 118 receptora) oraz niektórych ścieżek sygnalizacyjnych (cSrc → MAPK/ERK lub cSrc → Akt), prowadząc do wzmożonej proliferacji komórek nowotworowych oraz ekspresji pro-proliferacyjnych genów, jak np. *CCND1* i *MYC*, a także samego *PGR* (Diep et al., 2016; Giulianelli et al., 2012; Migliaccio et al., 1998). Natomiast w mysich modelach badawczych z wykorzystaniem ksenograftów pochodzących od pacjentów (PDX; *patient-derived xenograft*) wykazano, iż PR, w obecności estrogenów oraz naturalnego bądź sztucznego liganda (odpowiednio progesteronu lub progestyny R5020), wchodzi w bezpośrednie oddziaływanie z ER, zmieniając jego miejsce wiązania na chromatynie oraz aktywując ekspresję genów związanych z dobrym rokowaniem u pacjentek z BCa. Co więcej, progesteron dodatkowo promował anty-proliferacyjny efekt tamoksyfenu (Finlay-Schultz et al., 2017; Mohammed et al., 2015). Ponadto wykazano, iż MPA oraz progesteron efektywnie hamują estrogeno-zależny wzrost guza w modelu PDX (Kabos et al., 2012).

Tworzenie kompleksu ER-PR może być także indukowane pod wpływem estrogenów oraz czynników wzrostu, np. IGF-1. Estradiolo- oraz IGF-1-zależna sygnalizacja prowadzi do fosforylacji seryny 167 ER, w której pośredniczą PR oraz szlaki MAPK i PI3K/Akt. W konsekwencji formowany jest kompleks transkrypcyjny ER-PR-PELP1, który zmienia aktywność transkrypcyjną ER oraz stymuluje wzrost guza, znosząc działanie tamoksyfenu (Daniel et al., 2015).

Aktualne doniesienia jasno wskazują, iż istotnym modulatorem funkcji ER w hormono-zależnych nowotworach jest PR, a formowany przez oba receptory kompleks odgrywa kluczową rolę w progresji i terapii raka piersi. Ilość prac opisujących charakter interakcji ER-PR jest stosunkowo niewielka, toteż badania dotyczące regulacji tej zależności wydają się być ciekawym i aktualnym tematem. Co ważne, należy zwrócić uwagę na fakt, iż aktywność i

funkcjonowanie kompleksu ER-PR są zależne od jednoczesnej obecności estradiolu oraz progesteronu. Takie tło hormonalne występuje u pacjentek przedmenopauzalnych oraz postmenopauzalnych, przyjmujących hormonalną terapię zastępczą. Stąd też wszystkie badania planowane i wykonane w niniejszym projekcie uwzględniały odpowiednie środowisko hormonalne, cechujące taką grupę chorych (szczegółowo opisane w kolejnych rozdziałach pracy).

1.3. Mikrośrodowisko guza

1.3.1. Znaczenie mikrośrodowiska w rozwoju choroby nowotworowej

Powszechnie wiadomo, że guz nie jest środowiskiem homogennym, a raczej wysoce heterogennym zbiorem komórek nowotworowych oraz towarzyszących im fibroblastów, adipocytów, komórek endotelialnych i układu odpornościowego (stanowiących zrąb zmiany nowotworowej), otoczonym przez gęstą sieć białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM; *extracellular matrix*). Komunikacja w obrębie mikrośrodowiska guza (TME; *tumour microenvironment*) oparta jest głównie na sygnalizacji parakrynej przy udziale pełnej gamy czynników wzrostu (np. FGF, VEGF, EGF, TGF β), cytokin i chemokin (np. IL-1, IL-6, TNF α), a także na oddziaływaniach komórek z białkami ECM (np. kolagenami, fibronektyną, lamininami) (Balkwill et al., 2012; Hu and Polyak, 2008; Mao et al., 2013; Polyak et al., 2009). Oprócz kluczowej roli w rozwoju choroby nowotworowej, TME jest także istotnym czynnikiem wpływającym na rozwój oporności na stosowane terapie oraz regulującym proces przerzutowania (Hanahan and Weinberg, 2011; Quail and Joyce, 2013; Sun, 2016; Trédan et al., 2007). Udowodniono, iż właściwie każdy z komponentów TME wchodzi w interakcję z komórkami nowotworowymi, modulując tym samym ich fenotyp i funkcjonowanie.

Dla przykładu, adipocyty towarzyszące nowotworowi (CAAs; *cancer associated adipocytes*), produkując różnego rodzaju adipokiny (w tym najbardziej znane – leptynę, adiponektynę oraz IL-6, TNF- α i HGF), zaangażowane są zarówno w proces inicjacji transformacji nowotworowej, jak i w procesy charakterystyczne dla progresji choroby, w tym oporność na terapie czy tworzenie przerzutów (Choi et al., 2018; Pallegar and Christian, 2020; Wu et al., 2019). Co więcej, CAAs mogą przechodzić unikalny proces transformacji. W pobliżu centrum guza, pod wpływem sygnalizacji Wnt3/ β -katenina, dochodzi do ich odróżnicowania do fibroblastów pochodzących od adipocytów (ADFs; *adipocyte-derived fibroblasts*), co prowadzi do wzmożonej depozycji fibronektyny oraz kolagenu typu I w guzie (Bochet et al., 2013).

Należy również zwrócić uwagę na fakt, iż reorganizacja białek ECM jest istotną cechą zmian neoplastycznych. Tkanka nowotworowa w obrębie gruczołu piersiowego charakteryzuje się zdecydowanie zwiększoną sztywnością włókien kolagenowych niż zdrowe tkanki. Wynika to z podwyższonej aktywności enzymów sieciujących kolagen (w tym LOXL-1 i LOXL-2), produkowanych przez komórki zrębu (Brassart-Pasco et al., 2020; Walker et al., 2018).

Stosunkowo dobrze scharakteryzowaną częścią nacieku komórek układu odpornościowego w obrębie guza są makrofagi (TAMs; *tumour associated macrophages*). Silne wzajemne interakcje pomiędzy komórkami nowotworowymi a TAMs, obejmujące parakrynną sygnalizację z udziałem takich czynników wzrostu i cytokin jak VEGF, EGF, CSF-1, TNF- α , CCL2 oraz CCL18, stymulują proliferację, tranzycję epithelialno-mezenchymalną (EMT; *epithelial-mesenchymal transition*) oraz inwazyjność komórek rakowych, a także wspierają angiogenezę i immunosupresję w obrębie zmiany nowotworowej (Aras and Zaidi, 2017; Qiu et al., 2018; Wyckoff et al., 2004). Jednak najliczniejszymi składnikami zrębu mikrośrodowiska guza są znajdujące się tu fibroblasty (CAFs; *cancer associated fibroblasts*), których charakterystyka zostanie przedstawiona w kolejnym rozdziale.

1.3.2. Fibroblasty wchodzące w skład guza (CAFs, ang. *Cancer Associated Fibroblasts*)

Fibroblasty guza, ze względu na ich wpływ na szereg kluczowych funkcji komórek nowotworowych, często określanymi mianem „*Hallmarks of cancer*” (opisanych po raz pierwszy 20 lat temu przez (Hanahan and Weinberg, 2000) i rozszerzonych 11 lat później (Hanahan and Weinberg, 2011)), są uważane za swoistych „dyrygentów” całego mikrośrodowiska guza. Ich rola oparta jest o rozbudowaną parakrynną i/lub jukstakrynną komunikację ze wszystkimi komponentami TME.

Pochodzenie CAFs nie jest jednoznaczne. Badania sugerują, że mogą one wywodzić się z nowotworowych komórek macierzystych, z komórek epithelialnych przechodzących tranzycję epithelialno-mezenchymalną, z perycytów lub komórek endothelialnych, adipocytów czy też z normalnych fibroblastów (Avgustinova et al., 2016; Jotzu et al., 2011; Weber et al., 2015). Mechanizmy molekularne prowadzące do aktywacji fibroblastów guza obejmują zarówno sygnalizację od czynników wzrostu (np. PDGF lub FGF), cytokin pro-zapalnych (np. IL-1 lub IL-6) oraz TGF- β , a także uszkodzenia nici DNA (wywołane np. chemio- lub radioterapią), stres oksydacyjny oraz rearanżację białek ECM. Taka różnorodność pochodzenia CAFs oraz dróg ich transformacji sprawiają, iż fibroblasty guza stanowią jedną z najbardziej heterogennych populacji komórek zrębu. Ich identyfikacja wśród pozostałych komponentów

TME jest możliwa jedynie dzięki zastosowaniu kombinacji potencjalnych markerów, w tym α -SMA, kaweoliny 1, PDGFR α/β , galektyny 1, FAP, FSP1 czy wimentyny, bowiem każdy z nich pojedynczo ekspresjonowany jest również w innym typie komórek (Bu et al., 2019).

Heterogenność CAFs decyduje także o szerokim zakresie pełnionych przez nie funkcji, które objawiają się w fizycznej i chemicznej ingerencji w otaczające je mikrośrodowisko. CAFs bardzo efektywnie produkują oraz organizują strukturalnie i przestrzennie białka ECM (w tym kolagen I i fibronektynę), zmieniając tym samym właściwości mechaniczne guza. Indukowane przez nie usztywnienie białek zrębu stymuluje sygnalizację pro-proliferacyjną oraz pro-przeżyciową, a dodatkowo, wraz z produkcją metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs; *matrix metalloproteinases*), promuje bardziej agresywny fenotyp komórek rakowych. Nowotwory określane są mianem „niegojących się ran”, co ma bezpośredni związek z chronicznym stanem zapalnym w obrębie zmian neoplastycznych. CAFs, poprzez sekrecję wielu cytokin (np. TGF- β 1, CCL2, CXCL1, IL-6, IL-8, IL-10), kierują odpowiedzią układu odpornościowego i tworzą immunosupresyjne TME, co sprzyja progresji choroby (Houthuijzen and Jonkers, 2018; Monteran and Erez, 2019; Ziani et al., 2018). Co więcej, CAFs są również bogatym źródłem czynników wzrostu, w tym VEGF, HGF oraz FGF (m.in. FGF2, FGF7, FGF10) (Gascard and Tlsty, 2016; Palmieri et al., 2003). Indukowane przez nie ścieżki sygnalizacyjne mogą stymulować angiogenezę i wzrost guza, a także, poprzez regulację aktywności receptorów dla hormonów steroidowych, promować oporność na terapie endokrynne (Brechtbuhl et al., 2017; Fabris et al., 2010; Luo et al., 2015; Sahai et al., 2020; Yuan et al., 2015).

Pojawia się coraz więcej danych na temat wpływu TME na regulację funkcji ER i PR w kontekście progresji choroby nowotworowej. Udowodniono, iż komórki zrębu mogą przyczyniać się do lokalnego wzrostu stężenia estrogenów poprzez zwiększenie poziomu ekspresji aromatazy (Santen et al., 1997). W badaniach z wykorzystaniem modelowej linii komórkowej luminalnego raka piersi – MCF7, pożywką znad CAFs, bogata w produkowane przez nie czynniki wzrostu i cytokiny, indukowała oporność na tamoksyfen oraz fulvestrant (Martinez-Outschoorn et al., 2011). Dodatkowo, zaobserwowano, iż swoiste podtypy CAFs mogą mieć istotne znaczenie zarówno w regulacji obu receptorów dla hormonów steroidowych, jak i w odpowiedzi na terapie hormonalne. Fibroblasty wyizolowane z guzów ER-/PR-, w przeciwieństwie do tych wyizolowanych z tkanki ER+/PR+, przyczyniają się do wykształcenia oporności na tamoksyfen, przy jednoczesnej aktywacji ścieżek sygnalizacyjnych MAPK oraz PI3K/Akt (Shekhar et al., 2007). Co więcej, populacja fibroblastów CD146-ujemnych indukowała wyciszenie ekspresji ER, a co za tym idzie obniżenie wrażliwości na estrogeny i

tamoksyfen *in vitro* w komórkach MCF7 oraz *in vivo* w modelu mysim. Odwrotny efekt obserwowano natomiast w przypadku CAFs CD146-dodatnich. Obecność tej populacji fibroblastów guza prowadziła do stabilizacji poziomu ER w komórkach nowotworowych oraz utrzymywała ich estrogeno-zależną proliferację (Brechbuhl et al., 2017). Kolejne badania wykazały, iż fibroblasty wyizolowane z hormono-niezależnego guza charakteryzują się wyższą ekspresją FGF2 oraz FGFR2, co prowadzi do zwiększonej aktywacji PR i wzmożonej proliferacji komórek nowotworowych. Sugeruje to tym samym, iż CAFs, poprzez sekrecję czynników wzrostu (w tym FGF), aktywnie uczestniczą w hormono-niezależnym wzroście guza, a inhibitory ścieżki FGF2/FGFR mogłyby znaleźć zastosowanie w terapii luminalnych raków piersi (Giulianelli et al., 2008). Publikacja naszego zespołu z 2017 roku wyjaśnia z kolei jeden z przykładowych mechanizmów oporności na terapię tamoksyfenem, związany z funkcją CAFs. Zakłada on FGFR2-zależną fosforylację ER przez szlak sygnalizacyjny PI3K/Akt i zniesienie hamującego proliferację efektu tamoksyfenu w komórkach traktowanych pożywką znaną jako aktywowanych fibroblastów (Turczyk et al., 2017).

1.4. Receptory dla czynników wzrostu fibroblastów (FGFR, ang. *Fibroblast Growth Factor Receptor*)

1.4.1. Sygnalizacja FGF/FGFR

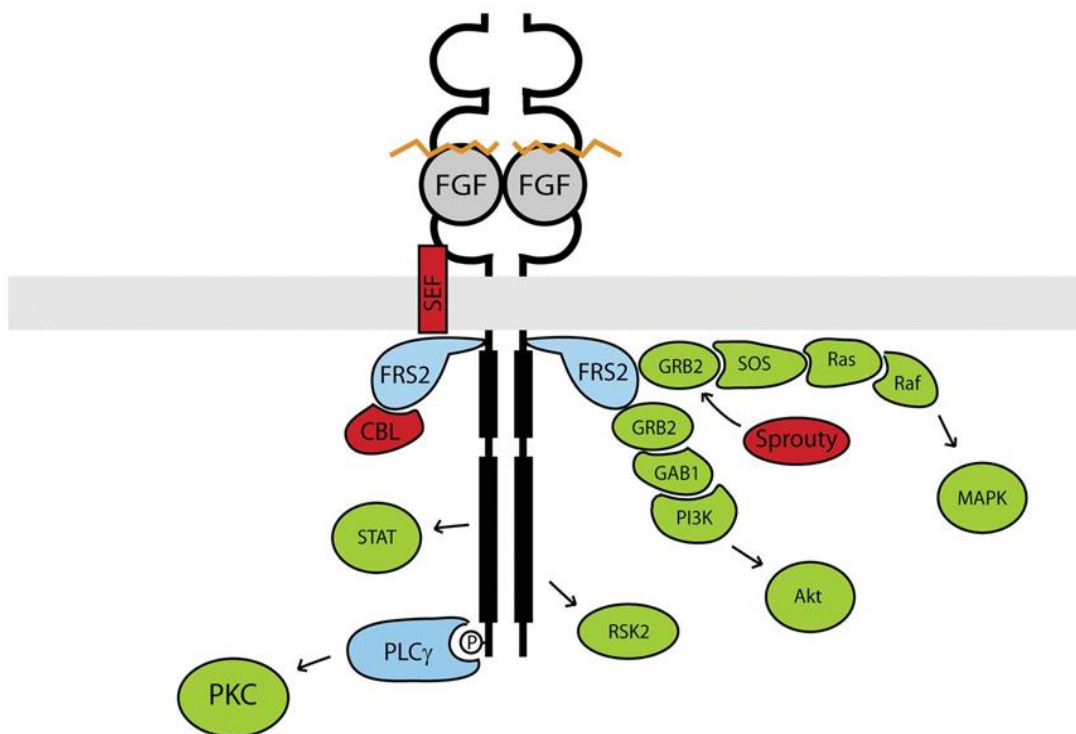
Receptory dla czynników wzrostu fibroblastów (FGFRs; *fibroblast growth factor receptors*) stanowią rodzinę czterech receptorów błonowych o aktywności kinazy tyrozynowej (FGFR1-4) oraz jeden receptor, charakteryzujący się brakiem wewnątrzkomórkowej domeny kinazowej – FGFR5/FGFRL1 (Trueb, 2011). Razem z receptorami dla naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF; *vascular-endothelial growth factor receptor*) i płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGFR; *platelet-derived growth factor receptor*) należą one do klasy silnie zakonserwowanych strukturalnie receptorów. FGFR zbudowane są z trzech immunoglobulino-podobnych domen zewnątrzkomórkowych (D1, D2 oraz D3), domeny przezbłonowej oraz wewnątrzkomórkowej domeny kinazowej (TK; *tyrosine kinase*). Uważa się, że D1 pełni funkcje autoinhibitorowe, natomiast domeny D2 oraz D3, wraz z rejonem łącznikowym między nimi, tworzą miejsce wiązania substratu. Co istotne, specyficzność względem liganda generowana jest poprzez alternatywny splicing zachodzący w egzonie kodującym D3. W ten sposób FGFR1-3 występują w postaci dwóch tkankowo-specyficznych izoform – IIIb (obecnej głównie w komórkach epitelialnych) oraz IIIc (charakterystycznej dla komórek mezenchymalnych) (Brady et al., 2013; Zhang et al., 2006). FGFR4, jako jedyny przedstawiciel tej rodziny, występuje tylko w postaci izoformy IIIc (Vainikka et al., 1992).

Ligandy dla FGFR, czynniki wzrostu fibroblastów (FGFs; *fibroblast growth factors*), to osiemnaście glikoprotein podzielonych na dwie podgrupy, kanoniczną (FGF1-10, 16-18 i 20) oraz hormono-podobną (endokrynną; FGF19, 21 i 23), które różnią się sposobem wiązania, specyficznością względem receptorów oraz pełnionymi funkcjami (Beenken and Mohammadi, 2009; Itoh, 2010). Kanoniczne FGF działają jako parakryne bądź autokryne czynniki wzrostu. Produkowane są głównie przez fibroblasty i gromadzą się w macierzy zewnątrzkomórkowej. FGF wiążą się tu proteoglikanami siarczanu heparyny (HSPGs), będącymi jednocześnie kofaktorami zapewniającymi ich odpowiednie powinowactwo do receptorów. Natomiast endokryne FGF charakteryzują się słabym wiązaniem do HSPGs, a ich kofaktorami są białka z rodziny Klotho (α Klotho, β Klotho i KLPH) (Ornitz and Itoh, 2001; Ornitz and Itoh, 2015).

Związanie liganda do FGFR (z udziałem HSPGs) indukuje dimeryzację receptora, która poprzez zmiany konformacyjne w jego strukturze prowadzi do transfosforylacji reszt tyrozynowych w obrębie wewnątrzkomórkowej domeny kinazowej. Późniejsza propagacja sygnału zachodzi przy udziale dwóch głównych białek adaptorowych - FRS2 (*FGFR substrate 2*) oraz fosfolipazy $C\gamma$ (PLC γ ; *phospholipase C γ*). Za pośrednictwem FRS2 dochodzi do aktywacji ścieżek sygnalizacyjnych Ras/Raf/MAPK oraz PI3K/Akt, z kolei PLC γ aktywuje białkową kinazę C (PKC). Co więcej, FGFR mogą aktywować szereg innych białek, w tym STAT (*signal transducers and activators of transcription*), RSK2 (p90 *ribosomal S6 kinase 2*) lub kinazę Src (Ryc. 3; elementy niebieskie oraz zielone) (Brady et al., 2013; Ornitz and Itoh, 2015; Perez-Garcia et al., 2018; Tiong et al., 2013).

Sygnalizacja FGF/FGFR jest ściśle regulowana na kilku poziomach molekularnych. Jednym z przykładów negatywnego regulatora FGFR są białka Sprouty, których mechanizm działania opiera się zarówno na wiązaniu do GRB2, inhibicji białka Raf, jak i regulacji funkcji E3 ligazy ubikwityny – Cbl (Fong et al., 2003; Martínez et al., 2007; Yusoff et al., 2002). Sama ubikwitynaza Cbl odpowiedzialna jest za mono-ubikwitynację FGFR oraz jego recykling i degradację (Thien and Langdon, 2001). Dodatkowo, przezbłonowe białko SEF działa jako antagonistą FGF, bowiem wiąże się do FGFR i hamuje jego fosforylację (Ryc. 3; elementy zaznaczone na czerwono) (Kovalenko et al., 2006).

Inicjowane przez FGFR ścieżki sygnalizacyjne zaangażowane są w wiele procesów biologicznych. Ich aktywność obejmuje m.in.: stymulację proliferacji (głównie przez szlak MAPK), regulację sygnałów pro- i anti-apoptotycznych (przy udziale PI3K/Akt), a także wpływ na zdolności migracyjne komórek (Beenken and Mohammadi, 2009).



Rycina 3. Ścieżki sygnalizacyjne indukowane przez FGF/FGFR. Związanie liganda (FGF) wraz z HSPGs (zaznaczone kolorem pomarańczowym) aktywuje receptor i powoduje transfosforylację jego domen kinazowych. Fosforylacja białek adaptorowych – FRS2 oraz PLC γ (zaznaczone kolorem niebieskim), uruchamia szereg kaskad sygnalizacyjnych (m.in.: Ras/Raf/MAPK, PI3K/Akt oraz PKC; zaznaczone na zielono). Negatywne regulatory sygnalizacji FGF/FGFR są zaznaczone kolorem czerwonym. Na podstawie Wesche et al., 2011.

1.4.2. FGFR2 w raku piersi

FGFR2 jest jednym z kluczowych receptorów w morfogenezie i fizjologii gruczołu piersiowego. Jego ekspresja oraz sygnalizacja od specyficznych ligandów – FGF2 oraz FGF10, zarządza funkcjami komórek epitelialnych oraz formowaniem kanalików i pęcherzyków mlecznych podczas rozwoju gruczołu piersiowego (Lu et al., 2008; Mailleux et al., 2002; Parsa et al., 2008; Pond et al., 2013; Zhang et al., 2014b; Zhang et al., 2014c). Poza fundamentalną rolę w procesach fizjologicznych, sygnalizacja FGF/FGFR2 może mieć także związek z wieloma schorzeniami, w tym z rakiem piersi.

Deregulacja sygnalizacji FGF/FGFR2, znamieną dla chorób nowotworowych, może mieć dwojakie podłoże. Składają się na nią zmiany na poziomie genomowym (tj. amplifikacje, mutacje, fuzje oraz polimorfizmy, które napędzają sygnalizację niezależną od ligandów receptora) oraz zaburzona sygnalizacja auto- i parakrylna (zależna od ligandów). Gen *FGFR2* znajduje się na chromosomie 10q26, a jego amplifikacja w przypadku chorych na raka piersi jest zdarzeniem raczej rzadkim i występującym u 1-4% chorych (najwięcej w podtypie trójjemnym) (Heiskanen et al., 2001; Helsten et al., 2016; Turner et al., 2010). Mutacje punktowe w obrębie *FGFR2* również nie są częstym zjawiskiem u chorych na raka piersi. Sporadycznie pojawiają się mutacje missensowne w obrębie domeny D2 (R203C) oraz w kinazowej domenie wewnątrzkomórkowej (N549K i K659E) (Jain and Turner, 2012; Reintjes et al., 2013). Wieloośrodkowe badania asocjacyjne całego genomu (GWAS; *genome-wide association study*) zidentyfikowały *FGFR2* oraz polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNPs; *single nucleotide polymorphisms*) w jego obrębie jako czynniki ryzyka raka piersi (Easton et al., 2007; Hunter et al., 2007; Jia et al., 2010; Zhang et al., 2017; Zhou et al., 2012). Jedno z takich badań epidemiologicznych obejmowało dane od łącznie 121 740 pacjentek oraz 198 549 prób kontrolnych. Analizy te powiązały 10 wariantów SNPs (z 23 poznanych) w intronie 2 *FGFR2* (rs1078806, rs11200014, rs1219648, rs2420946, rs2981578, rs2981579, rs2981582, rs3135718, rs10736303 i rs3750817) z podwyższonym ryzykiem raka piersi (Cui et al., 2016). Meta-analiza obejmująca 37 badań i w sumie 288 142 pacjentki wykazała, że trzy z tych polimorfizmów (rs2981582, rs1219648 i rs2420946) promują powstanie hormonozależnego (ER+/PR+) BCa (Wang et al., 2013). Następstwa molekularne polimorfizmów *FGFR2* są słabo poznane, jednak praca zespołu Kristen Meyer pokazuje, iż dwa analizowane polimorfizmy – rs2981578 i rs7895676, zmieniają miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych Oct-1 i Runx2, prowadząc do transkrypcji *FGFR2* w ER-dodatnich komórkach raka piersi (Meyer et al., 2008). Co więcej, w guzie może również dochodzić do zmian w poziomie ekspresji ligandów *FGFR2*. Linie komórkowe luminalnego raka piersi – MCF7 oraz ZR-75-1, charakteryzują się wyższą ekspresją FGF7 (najbardziej specyficznego liganda *FGFR2*) w porównaniu z liniami ER-ujemnymi (MDA-MB-231 oraz SK-BR-3) (Tamaru et al., 2004). Dodatkowo wykazano, iż polimorfizm w obrębie *FGF10* (rs10941679) wiąże się ze zwiększonym ryzykiem ER-pozytywnego raka piersi (Ghousaini et al., 2016). Z kolei nasz zespół zidentyfikował nowy szlak sygnalizacyjny, w którym aktywowany *FGFR2* prowadzi do fosforylacji tyrozyny 529 RSK2, co z kolei promuje migrację komórek raka piersi, zaś pacjentki z ko-ekspresją *FGFR2* oraz aktywowanej RSK2 charakteryzowały się prawie 5-

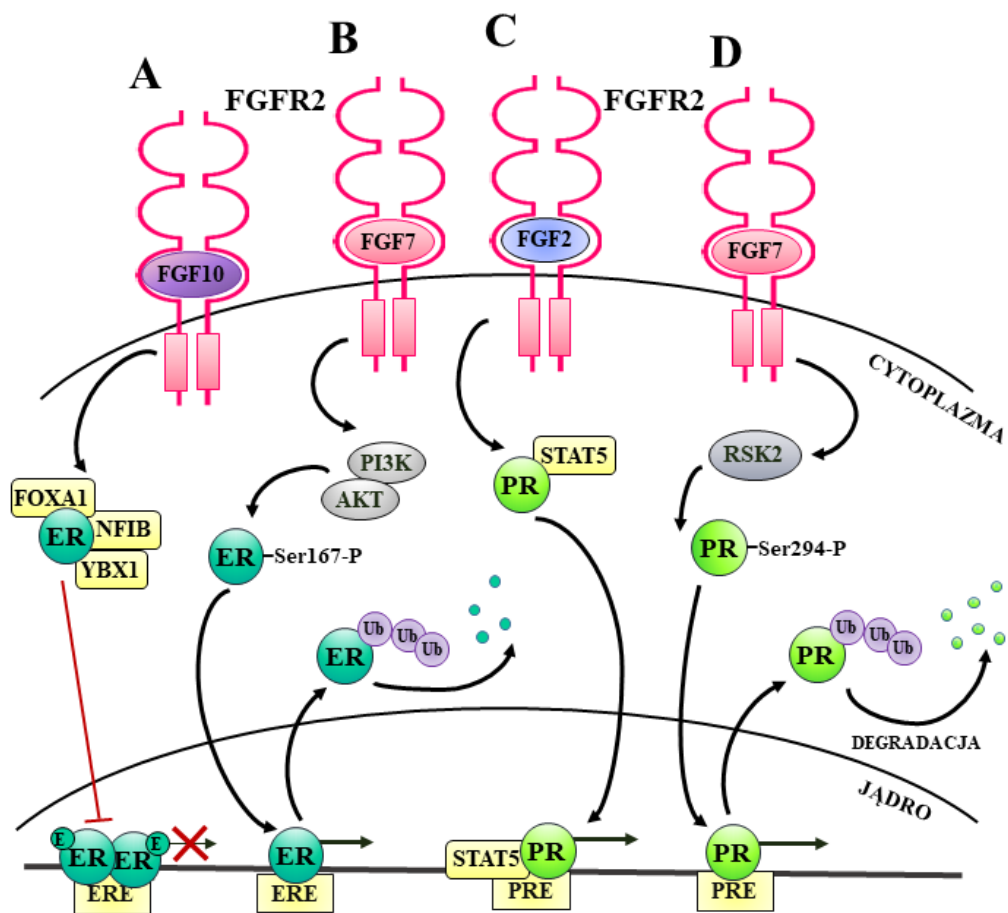
krotnie zwiększonym ryzykiem nawrotu choroby (Czaplinska et al., 2016; Czaplinska et al., 2014).

1.4.3. Receptor FGFR2 w regulacji hormonów steroidowych

Pierwsze prace ukazujące zależności między sygnalizacją od receptorów z rodziny FGFR a receptorami dla hormonów steroidowych ukazały się już 20 lat temu. Komórki linii MCF7 z nadekspresją FGF1 (najmniej specyficznym ligandem spośród wszystkich FGF, aktywującym wszystkie FGFR) oraz FGF4 (specyficznym względem izoform IIIc każdego z FGFR) (Zhang et al., 2006) nabywały zdolności do wzrostu niezależnego od estrogenu. Co ciekawe, FGF-zależna sygnalizacja omijała w tym przypadku ścieżkę sygnalizacyjną ER i była odpowiedzialna za znacznie gorszą odpowiedź komórek na terapię anty-ER z użyciem tamoksyfenu i fulvestrantu (McLeskey et al., 1998). Inne badania z wykorzystaniem linii komórkowej MCF7 jako modelu komórkowego *in vitro* jak i *in vivo*, wykazały, iż FGF8b jest istotnym czynnikiem regulującym wzrost guza w obecności estrogenu oraz zwiększającym inwazyjność komórek (Ruohola et al., 2001). Pomimo, iż obie publikacje ukazują zaangażowanie ścieżek FGF-zależnych w biologię hormono-zależnych nowotworów, to nie identyfikują one konkretnego FGFR biorącego udziału w opisanym procesach.

Istnieje szereg prac dokumentujących wzajemne zależności pomiędzy FGFR2 a ER oraz PR. Po pierwsze, ER α jest mediatorem FGFR2-zależnej sygnalizacji. Ekspresja głównych genów ER-regulowanych, w tym *ESR1*, *FOXA1* oraz *GATA3*, jest związana z aktywnością FGFR2 (Fletcher et al., 2013). Co więcej, aktywacja FGFR2 przez jeden z bardziej specyficznych dla niego ligandów – FGF10, jest odpowiedzialna za odwrócenie stymulowanej przez estrogen aktywności regulonu *ESR1*. Dokładniejsze analizy pokazały, iż trzy polimorfizmy w obrębie intronu 2 *FGFR2* (rs2981578, rs35054928 oraz rs45631563) powodują spadek ekspresji FGFR2, a co za tym idzie, lepszą odpowiedź komórek na estrogen, a także większe ryzyko ER-dodatniego BCa (Campbell et al., 2016). Sygnalizacja FGF10/FGFR2 wpływa także na interakcję ER z dwoma czynnikami transkrypcyjnymi, NFIB oraz YBX1 (Ryc. 4A). Ich wiązanie do kompleksu ER-FOXA1 hamuje ekspresję genów ER-zależnych i promuje progresję nowotworu w kierunku fenotypu bazalnego. Dodatkowo, zastosowanie inhibitorów FGFR w liniach komórkowych ER+ raka piersi (MCF7, T47D oraz ZR-75-1) uwrażliwia komórki na terapię tamoksyfenem (Campbell et al., 2018). W pracy naszego zespołu wykazaliśmy, iż indukowana przez FGF7/FGFR2 ścieżka sygnalizacyjna PI3K/Akt prowadzi do fosforylacji seryny 167 receptora estrogenowego, jego ubikwitynacji i późniejszej proteasomalnej degradacji (Ryc. 4B). FGFR2-zależna utrata ER została również potwierdzona

w analizach klinicznych, gdzie zaobserwowano odwrotną korelację ekspresji FGFR2 i ER (Turczyk et al., 2017). Co ciekawe, w hormono-niezależnych guzach zidentyfikowano wyższy poziom ekspresji FGFR2, w porównaniu z indukowanymi przez progestynę MPA guzami hormono-zależnymi. W tym wypadku sygnalizacja od FGFR2 prowadzi do fosforylacji seryn 190 oraz 294 receptora progesteronowego oraz hormono-niezależnego wzrostu komórek nowotworowych (Giulianelli et al., 2008). Ta sama grupa badawcza pokazała, iż pod wpływem MPA oraz FGF2 dochodzi do stymulacji powstawania kompleksu STAT5-PR, który lokalizuje się w jądrze komórkowym i reguluje transkrypcję genów z promotorów zawierających sekwencję PRE (Ryc. 4C). Sugeruje to funkcję koaktywatorową FGFR2 w aktywności



Rycina 4. Sygnalizacja FGF/FGFR2 w regulacji aktywności i funkcji ER oraz PR. A. FGF10/FGFR2 stymuluje powstanie kompleksu ER-FOXA1 z czynnikami transkrypcyjnymi NFIB oraz YBX1, co hamuje ER-zależną ekspresję genów, B. Sygnalizacja FGF7/FGFR2 indukują aktywację ścieżki PI3K/Akt oraz fosforylację, ubikwitynację i degradację ER, C. Aktywacja ścieżki FGF2/FGFR2 prowadzi do lokalizacji kompleksu PR-STAT5 w jądrze komórkowym i transkrypcji genów zawierających PRE, D. Sygnalizacja FGF7/FGFR2 reguluje RSK2-zależną fosforylację PR na Ser294 oraz późniejszą ubikwitynację i degradację receptora progesteronowego. E – estrogen; ER – receptor estrogenowy; ERE – *estrogen response element*; PR – receptor progesteronowy; PRE – *progesterone response element*; Ub – ubikwityna. Na podstawie Piasecka et al., 2019.

transkrypcyjnej PR (Cerliani et al., 2011). Relacja pomiędzy FGFR2 a PR została również pokazana przez nasz zespół. W tym wypadku sygnalizacja FGF7/FGFR2 z udziałem kinazy RSK2 prowadzi do fosforylacji PR na serynie 294, kierując PR do ubiquitynacji i degradacji w systemie proteasomalnym (Ryc. 4D). Analiza immunohistochemiczna materiału od pacjentek wykazuje odwrotną zależność między PR a aktywną formą RSK, a status RSK-P(+)/PR(-) koreluje z większym ryzykiem nawrotu choroby (Piasecka et al., 2019; Piasecka et al., 2016).

1.4.4. Terapie celowane dla FGFR

Z racji niepodważalnej roli FGFR2 w regulacji funkcji ER i PR, oraz związanej z tym progresji choroby i oporności na terapię endokrynną, ścieżka FGF/FGFR2 jest nowym obiecującym celem potencjalnych terapii luminalnych raków piersi.

Jedynym, jak do tej pory, zatwierdzonym przez Agencję Żywności i Leków (FDA; *Food and Drug Administration*) inhibitorem FGFR stosowanym w terapii przerzutującego lub lokalnie zaawansowanego FGFR2/FGFR3-dodatniego raka pęcherza moczowego jest Erdafitinib (Balversa; JNJ-42756493) (Montazeri and Bellmunt, 2020). Zgodnie z bazą clinicaltrials.gov inhibitory FGFR są lub były testowane w łącznie aż 198 różnych badaniach klinicznych, obejmujących pacjentów onkologicznych, z czego 18 takich badań dotyczy pacjentek z rakiem piersi

Strategie hamowania ścieżek FGFR-zależnych obejmują zastosowanie inhibitorów trzech różnych klas/grup. Pierwszą stanowią małowiązujące nieselektywne inhibitory kinaz tyrozynowych (TKIs; *tyrosine kinase inhibitors*), blokujące kieszeń wiążącą ATP w kilku rodzajach receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej (w tym FGFR, VEGFR oraz PDGFR). Sztandarowymi przykładami tej klasy inhibitorów są dovitinib (TKI258), lucitanib (E-3810) oraz nintedanib. Drugą grupę reprezentują selektywne inhibitory FGFR, celujące w wewnątrzkomórkową domenę kinazową. W związku z dużym podobieństwem strukturalnym w obrębie tej domeny w receptorach FGFR1-3, nawet najbardziej specyficzne inhibitory hamują wszystkie trzy wymienione receptory, natomiast FGFR4 jest celem tylko niektórych inhibitorów tej klasy (np. JNJ-42756493). Przykładami selektywnych inhibitorów FGFR są: AZD4547, NVP-BGJ398 oraz wcześniej już opisany JNJ-42756493 (Erdafitinib). Co istotne, od roku 2016 nasz zespół, we współpracy z Celon Pharma S.A., zaangażowany jest w realizację projektu pt. „Opracowanie nowoczesnych biomarkerów oraz rozwój innowacyjnego inhibitora kinaz FGFR stosowanego w terapii nowotworów” (CELONKO) w ramach programu STRATEGMED, finansowanego przez NCBiR. CPL-304-110 – inhibitor FGFR, którego

dotyczy projekt, w roku 2019 wszedł w pierwszą fazę badań klinicznych. Trzecią kategorię potencjalnych terapeutów stanowią przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw receptorom FGFR bądź ich ligandom. Pomimo, że zostały już opracowane przeciwciała monoklonalne anty-FGFR2, -FGFR3 oraz blokujące FGF2, to jednak żadne z nich nie weszło jeszcze w fazę kliniczną testów (Babina and Turner, 2017; Katoh, 2019; Perez-Garcia et al., 2018).

Najczęściej prowadzone badania kliniczne z udziałem związków celujących w receptory z rodziny FGFR obejmują terapie skojarzone. W przypadku hormono-zależnych raków piersi najbardziej obiecujące wydaje się być łączenie inhibitorów FGFR z terapiami endokrynnymi (z zastosowaniem tamoksyfenu, fulvestrantu oraz inhibitorów aromatazy - eksemestanu, anastrozolu lub letrozolu). W badaniach klinicznych pojawiły się już liczne terapie skojarzone, np.: AZD4547 + fulvestrant lub eksemestan (NCT01202591), AZD4547 + anastrozol lub letrozol (NCT01791985), dovitinib + fulvestrant (NCT01528345), nintedanib + letrozol (NCT02619162) oraz erdafitinib + fulvestrant + inhibitor CDK4/6 palbocyclob (NCT03238196) (Katoh, 2019). Co ciekawe, dość obiecujące wyniki udało się zaobserwować dla badania NCT01528345 II fazy klinicznej, włączającego pacjentki post-menopauzalne, HR-dodatnie, HER2-ujemne, z progresją po hormonoterapii oraz z amplifikacją *FGFR1*, *FGFR2* i/lub *FGFR3*, w którym u 28% pacjentek zaobserwowano odpowiedź na terapię skojarzoną dovitinibem z fulvestranem, podczas gdy w grupie kontrolnej (placebo + fulvestrant) odpowiedź pojawiła się u 10% badanych (Musolino et al., 2017). Wyniki te, mimo, że pochodzą z wczesnej fazy badań, sugerują słuszność koncepcji użycia inhibitorów FGFR w skojarzeniu z terapiami celującymi w ER, a dodatkowo zachęcają do bardziej szczegółowych analiz funkcjonalnych takich strategii terapeutycznych. Wydaje mi się, że inhibitory FGFR mogłyby znaleźć zastosowanie u pacjentek nie odpowiadających na terapię anty-ER, uwrażliwiając je na stosowane leki. Możliwy jest również scenariusz, w którym zahamowanie opartej o FGFR2 sygnalizacji od mikrośrodowiska guza chroniłoby chore z ER+ rakiem piersi przed rozwojem oporności na aplikowane leczenie endokryne.

2. CEL PROJEKTU

Biorąc pod uwagę podkreślaną w ostatnich latach rolę PR w zmianie aktywności transkrypcyjnej ER oraz w odpowiedzi na terapie endokrynne anty-ER, a także udokumentowane przez nasz zespół zaangażowanie FGFR2 w regulację funkcji zarówno ER jak i PR, niniejszy projekt doktorski miał na celu **analizę wpływu FGFR2, jako mediatora sygnałów pochodzących z mikrośrodowiska guza, na zależność ER-PR oraz jego znaczenie w progresji i terapii luminalnych raków piersi.**

Realizacja projektu obejmowała obszerne badania *in vitro* z wykorzystaniem modelowych linii komórkowych luminalnego raka piersi, które zostały uzupełnione analizami materiału klinicznego od pacjentek z hormono-zależnym rakiem piersi. Co istotne, doświadczenia *in vitro* przeprowadzono w warunkach odzwierciedlających tło hormonalne charakterystyczne dla pacjentek przedmenopauzalnych, tj. w obecności obu hormonów steroidowych – estradiolu oraz progesteronu. Poszczególne etapy pracy obejmowały:

- 1) Analizę udziału FGFR2 w hormono-zależnym wzroście komórek luminalnego BCa
- 2) Zbadanie wpływu sygnalizacji FGFR2-zależnej na interakcję ER-PR oraz regulację aktywności obu receptorów
- 3) Identyfikację indukowanego przez FGFR2 szlaku sygnalizacyjnego zaangażowanego w regulację receptorów dla hormonów steroidowych
- 4) Ocenę znaczenia FGFR2 w odpowiedzi komórek luminalnego BCa na tamoksyfen
- 5) Wykazanie roli FGFR2 w regulacji ekspresji genów ER-zależnych u pacjentek z luminalnym rakiem piersi w zależności od ich statusu menopauzalnego
- 6) Ewaluację znaczenia prognostycznego FGFR2 u pacjentek z ER+/PR+ rakiem piersi

3. MATERIAŁY

3.1. Linie komórkowe

- 293T – linia komórkowa ludzkich embrionalnych komórek nerki; stosowana jako linia „pakująca” w systemie transdukcji opartej o wirusowy transfer shRNA (ATCC)
- BT-474 – linia komórkowa ludzkiego luminalnego raka gruczołu piersiowego, HER2-dodatnia (ATCC)
- BT-483 – linia komórkowa ludzkiego luminalnego raka gruczołu piersiowego (ATCC)
- CAMA-1 – linia komórkowa ludzkiego luminalnego raka gruczołu piersiowego (ATCC)
- HCC1428 – linia komórkowa ludzkiego luminalnego raka gruczołu piersiowego (ATCC)
- HCC1500 – linia komórkowa ludzkiego luminalnego raka gruczołu piersiowego (ATCC)
- MCF7 – linia komórkowa ludzkiego luminalnego raka gruczołu piersiowego (ATCC)
- SUM44PE – linia komórkowa ludzkiego luminalnego raka gruczołu piersiowego (BIOIVT)
- SUM52PE – linia komórkowa ludzkiego luminalnego raka gruczołu piersiowego (BIOIVT)
- T47D – linia komórkowa ludzkiego luminalnego raka gruczołu piersiowego (ATCC)
- ZR-75-1 – linia komórkowa ludzkiego luminalnego raka gruczołu piersiowego (ATCC)

3.2. Pożywki oraz suplementy do hodowli komórkowej

- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Sigma-Aldrich, HyClone lub Corning)
- DMEM bez czerwieni fenolowej (*Dulbecco's Modified Eagle Medium w/o phenol red*) (HyClone)
- MEM (*Minimal Essential Medium*) (Sigma-Aldrich, HyClone lub Corning)
- Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma-Aldrich, HyClone lub Corning)
- RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) (Sigma-Aldrich, HyClone lub Corning)
- FBS (*Fetal Bovine Serum*; płodowa surowica bydłęca) (Biowest)
- FBS oczyszczana na węglu aktywnym (*Fetal Bovine Serum charcoal stripping*) (Biowest)
- Insulina (Sigma-Aldrich)

- Hydrokortyzon (Sigma-Aldrich)
- Penicylina oraz streptomycyna (HyClone, Sigma-Aldrich)
- HEPES (Sigma-Aldrich)
- Etanolamina (Sigma-Aldrich)
- Selenin sodu (Sigma-Aldrich)
- Trijodotyronina (T3) (Sigma-Aldrich)
- Transferyna (Sigma-Aldrich)

3.3. Bufory i roztwory stosowane do hodowli komórkowej

- PBS (*Phosphate Buffered Saline*; sól fizjologiczna buforowana fosforanami) (Sigma-Aldrich)
- Trypsyna-EDTA (HyClone)

3.4. Czynniki wzrostu oraz hormony

- FGF7 (*ang. Fibroblast Growth Factor 7*; czynnik wzrostu fibroblastów 7) (PeproTech)
- 17 β -Estradiol (Sigma-Aldrich)
- Progesteron (Sigma-Aldrich)

3.5. Inhibitory

- ABT-199 (GDC-0199) (Selleckchem)
- LY294002 (Sigma-Aldrich)
- Magnolol (Selleckchem)
- BI-D1870 (Axon Medchem)
- SB202190 (Sigma-Aldrich)
- SP600125 (Cell Signaling)
- SU6656 (Calbiochem)
- OHT - 4-Hydoksytamoksyfen (Selleckchem)
- UO126-EtOH (Selleckchem)

3.6. Plazmidy oraz shRNA

- shRNA dla FGFR2:
 - Nić „forward”:
5’CCGGGCCACCAACCAAAATACCAAATCTCCTCGAGGAGATTTGGTATTG
GTTGGTGGCTTTTTG 3’
 - Nić „reverse”:
5’AATTCAAAAAGCCACCAACCAAAATACCAAATACCAAATCTCCTCGAGGA
GATTTGGTATTTGGTTGGTGGC 3’
- pLKO.1 TRC cloning vector (Addgene)
- pMD2.G (Addgene)
- psPAX2 (Addgene)

3.7. Sonda TaqMan (Life Technologies)

- *Bcl2L1* – Hs00236329_m1
- *IRS1* – Hs00178563_m1
- *ACTB* – Hs99999903_m1
- *GAPDH* – Hs02786624_g1

3.8. Odczynniki do klonowania

- Startery do plazmidu pLKO.1 shFGFR2:
 - „Forward”: 5’ CTATCATATGCTTACCGTAAC 3’
 - „Reverse”: 5’ GCTTGTACTCGGTCATG 3’
- Thermo Scientific™ T4 Polynucleotide Kinase (ThermoFisher)
- Thermo Scientific™ FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (ThermoFisher)
- Thermo Scientific™ DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (ThermoFisher)
- Invitrogen™ T4 DNA Ligase (ThermoFisher)
- Enzymy restrykcyjne:
 - Thermo Scientific™ FastDigest BshTI (ThermoFisher)
 - Thermo Scientific™ FastDigest EcoRI (ThermoFisher)

3.9. Zestawy do izolacji DNA oraz RNA

- GenElute® HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)
- QIAGEN® Plasmid Maxi Kit (QIAGEN)
- TriPure Isolation Reagent (Roche)
- PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen)

3.10. Odczynniki do reakcji RT-qPCR

- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)
- TaqMan® 2x Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- RT² Profiler™ PCR Array Human Estrogen Receptor Signaling (QIAGEN)

3.11. Przeciwciała I-rzędowe

- anti- β -aktyna (klon AC-15) – mysie przeciwciała monoklonalne (Sigma-Aldrich)
- anti-ER α (SP1) – królicze przeciwciała monoklonalne (ThermoFisher)
- anti-ER α (1D5) – mysie przeciwciała monoklonalne (ThermoFisher)
- anti-ER α (NCL-L-ER-6F11) – mysie przeciwciała monoklonalne (Leica)
- anti-fosfo-ER α (Ser118) – mysie przeciwciała monoklonalne (Cell Signaling Technology)
- anti-fosfo-ER α (Ser167) – królicze przeciwciała monoklonalne (Cell Signaling Technology)
- anti-FGFR2 (D4L2V) – królicze przeciwciała monoklonalne (Cell Signaling Technology)
- anti-PR A/B (D8Q2J) – królicze przeciwciała monoklonalne (Cell Signaling Technology)
- anti-PR (hPR α 7) – mysie przeciwciała monoklonalne (ThermoFisher)
- anti-PR A/B (NCL-L-PGR-AB) – mysie przeciwciała monoklonalne (Leica)
- anti-fosfo-PR (Ser190) – królicze przeciwciała poliklonalne (Cell Signaling Technology)
- anti-fosfo-PR (Ser294) – mysie przeciwciała monoklonalne (ThermoFisher)

- anty-fosfo-PR (Ser345) – królicze przeciwciała poliklonalne (Cell Signaling Technology)

3.12. Przeciwciała II-rzędowe

- anty-królicze sprzężone z fluoroforem:
 - IRDye 680RD (Li-COR)
 - Alexa Fluor® 680 (Jackson Immuno Research)
- anty-mysie sprzężone z fluoroforem:
 - IRDye 800CW (Li-COR)
 - Alexa Fluor® 790 (Jackson Immuno Research)

3.13. Odczynniki do PLA (Proximity Ligation Assay) (Sigma-Aldrich)

- Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Rabbit MINUS
- Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Mouse PLUS
- Duolink® In Situ Detection Reagents Orange
- Duolink® In Situ Wash Buffers, Fluorescence

3.14. Inne roztwory oraz bufony

Bufor PBS, pH 7,4 (1000 ml 10x stężonego roztworu wodnego):

- 80 g NaCl
- 2 g KCl
- 26,8 g Na₂HPO₄ x 7 H₂O
- 2,4 g KH₂PO₄

TBS (*ang. Tris-buffer solution*) (1000 ml 10x stężonego roztworu wodnego):

- 60,3 g Tris-HCl
- 87,6 g NaCl

TBS-T:

- TBS + 0,1% Tween20

Bufor „blokujący” do immunofluorescencji i PLA (w PBS):

- 3% BSA
- 3% FBS

Bufor, w którym przygotowywano roztwór przeciwciał I-rzędowych (w TBST):

- 3% BSA
- 0,02% NaN_3

Bufor do elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) (1000 ml 10x stężonego roztworu wodnego):

- 144,3 g glicyny
- 10 g SDS
- 30,3 g Tris-HCl

Bufor do elektrotransferu (w wodzie, 1000ml):

- 14,43 g glicyny
- 3,03g Tris-HCl
- 10% metanol

Bufor do „skrobania” komórek (w PBS):

- Inhibitory proteaz:
 - 2 mM PMSF
 - 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotynina
 - 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptyna

- 5 mM EGTA
- 1 mM EDTA

- Inhibitory fosfataz i kinaz:

- 2 mM Na₄P₂O₇
- 5 mM NaF
- 5 mM Na₃VO₄

Bufor Laemmli (2x stężony, w wodzie):

- 4% SDS
- 0,125 M Tris-HCl pH 6,8
- 20% glicerol

Bufor Laemmli (4x stężony, w wodzie):

- 8% SDS
- 0,250 M Tris-HCl pH 6,8
- 20% glicerol
- 20% β-merkaptotanol
- 0,4% błękit bromofenolowy

Bufor do lizy komórek (w 2x stężonym buforze Laemmli):

- Inhibitory proteaz:
 - 2 mM PMSF
 - 10 µg/ml aprotynina
 - 10 µg/ml leupeptyna
 - 5 mM EGTA
 - 1 mM EDTA
- Inhibitory fosfataz i kinaz:
 - 2 mM Na₄P₂O₇

- 5 mM NaF
- 5 mM Na₃VO₄

Bufory lizujące do immunoprecypitacji:

- 1% Triton X-100 w PBS (warunki „silnej” lizy) lub 0,8% Brij + 0,2% Triton X-100 w PBS (warunki „łagodnej” lizy)
- Inhibitory proteaz:
 - 2 mM PMSF
 - 10 µg/ml aprotynina
 - 10 µg/ml leupeptyna
 - 5 mM EGTA
 - 1 mM EDTA
- Inhibitory fosfataz i kinaz:
 - 2 mM Na₄P₂O₇
 - 5 mM NaF
 - 5 mM Na₃VO₄

Pożywka LB (w wodzie, 1000 ml):

- 10 g Pepton/Trypton
- 10 g NaCl
- 5 g ekstrakt drożdżowy

3.15. Inne odczynniki

- Agaroza (Sigma-Aldrich)
- Agaroza o niskiej temperaturze tężenia (Sigma-Aldrich)
- APS (nadsiarczan amonu) (Sigma-Aldrich)
- BSA (albumina surowicy bydlęcej) (Roth)
- Kolagen typu I (Millipore)
- Heparyna (Sigma-Aldrich)

- Matrigel o zredukowanym stężeniu czynników wzrostu (Corning)
- Polybrene (Sigma-Aldrich)
- Rotiphorese Gel 30 (37,5:1), 30% akrylamid z bis-akrylamidem, roztwór wodny (Roth)
- Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich)
- PerfectTM Tricolor Protein Ladder (EurX) – wzorzec masowy do elektroforezy białek
- Protein Assay (Bio-Rad) - zestaw do oznaczania stężenia białka
 - Protein Assay Reagent S (BioRad)
 - Protein Assay Reagent A (BioRad)
 - Protein Assay Reagent B (BioRad)
- TEMED (N', N', N', N'- Tetrametyloetylenodiamina) (Sigma-Aldrich)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
- Brij (Sigma-Aldrich)
- TurboFect – odczynnik do transfekcji (ThermoFisher)
- Lipofectamine 2000 – odczynnik do transfekcji (ThermoFisher)

3.16. Sprzęt laboratoryjny

- Aparaty do elektroforezy i elektrotransferu Trans-Blot (Bio-Rad)
- Czytnik płytek (BioTek)
- Inkubator do hodowli komórkowych (Panasonic MCO-170AICUVH-PE)
- Komora z laminarnym przepływem powietrza (Heraeus HERAsafe Safety Cabinet HS18)
- Mikroskop ZEISS PrimoVert
- Mikroskop fluorescencyjny ZEISS AxioVert
- Mieszadło obrotowe SB2 Rotator (Stuart)
- Spektrofotometr NanoDropND-1000 (Thermo Scientific)
- Odyssey CLx – system obrazowania w podczerwieni (*LI-COR*)
- Termoblok (VWR)
- Termocykler CFX96 (Bio-Rad)
- Wirówki (Eppendorf Mini Spin plus i Sigma 2-16KL)

4. METODY

4.1. Hodowle komórkowe

Komórki linii T47D, MCF7 oraz 293T hodowane były w pożywce DMEM suplementowanej 10% FBS. Komórki linii ZR-75-1, HCC1500 oraz HCC1428 hodowane były w pożywce RPMI1640 z dodatkiem 10% FBS. Linie komórkowe BT-474 oraz BT-483 hodowane były w RPMI1640 suplementowanej odpowiednio 10% FBS i 5 µg/ml insuliny, oraz 20% FBS i 1 µg/ml insuliny. Komórki linii CAMA-1 hodowane były w uboższej pożywce, MEM, z dodatkiem 10% FBS. Natomiast linie komórkowe SUM52PE oraz SUM44PE hodowane były w pożywce Ham's F-12, która dla linii SUM52PE suplementowana była 5% FBS, 10 mM HEPES, 1 µg/ml hydrokortyzonem oraz 5 µg/ml insuliny, zaś dla linii SUM44PE 10% FBS, 10 mM HEPES, 5 mM etanolaminą, 1 µg/ml hydrokortyzonem, 5 µg/ml insuliny, 50nM seleninem sodu, 5 µg/ml transferyną oraz 10 nM trijodotyroniną. Ponadto, do wszystkich z wymienionych pożywek rutynowo dodawano penicylinę (100 U/ml) oraz streptomycynę (100 µg/ml). Komórki hodowane były do momentu osiągnięcia około 90% konfluencji (w zależności od specyfikacji linii komórkowej poziom konfluencji mógł się wahać od 70% do 90%) i następnie pasażowane, stosując trypsynę 1x stężoną. Pasaże przeprowadzane były co 3-4 dni. Co istotne, wszystkie opisane linie komórkowe hodowane były przez okres maksymalnie 4 miesięcy po rozmrożeniu i regularnie testowane pod kątem zakażeń mykoplazmą. Wszystkie hodowle komórkowe prowadzone były w inkubatorze (Panasonic MCO-170AICUVH-PE) przy ściśle określonych parametrach, w 37°C w wilgotnej atmosferze, z 5% CO₂.

4.2. Konstrukcja wektora do wyciszenia *FGFR2* (pLKO.1 sh*FGFR2*)

Z dostępnej literatury wybrano sekwencję siRNA (5' GAG AUU UGG UAU UUG GUU GGU GGC 3') (Dutt et al., 2008), na podstawie której została zaprojektowana sekwencja shRNA, kompatybilna do wektora pLKO.1 TRC Cloning Vector. Oligonukleotydy zostały zsyntezowane przez Sigma-Aldrich w postaci dwóch pojedynczych nici, a następnie zhybrydowane zgodnie z protokołem producenta (tj. oba oligonukleotydy zostały zawieszony w buforze z 10 mM Tris, pH 7.5-8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, a następnie zmieszane ze sobą w równym stosunku; tak przygotowana mieszanina podgrzewana była przez 5 min w 95°C, a następnie schładzana do temperatury pokojowej przez minimum 60 minut). Uzyskana cząsteczka shRNA została ufosforylowana na końcu 5' przy pomocy kinazy polinukleotydowej faga T4. Plazmid pLKO.1 TRC Cloning Vector został poddany reakcji trawienia restrykcyjnego

przy użyciu enzymów BshTI (AgeI) oraz EcoRI, przy jednoczesnej defosforylacji za pomocą fosfatazy alkalicznej FastAP. Po inaktywacji enzymów w 80°C przeprowadzona została reakcja ligacji insertu (ufosforylowanego shRNA) oraz wektora (trawionego i defosforylowanego plazmidu) (w molarnym stosunku 3:1) przy użyciu ligazy faga T4, w 22°C, przez 10 minut. Przygotowane zostały odpowiednie kontrole negatywne reakcji (gdzie do reakcji użyto albo samego wektora, albo samego insertu). W następnym kroku 5 µl mieszaniny ligacyjnej zostało użyte do transformacji bakterii szczepu *E.coli* DH5α.

4.3. Transformacja *E.coli* DH5α

5 µl (~500 ng) plazmidowego DNA zostało dodane do 50 µl wcześniej przygotowanych komórek kompetentnych *E.coli* DH5α (komórki kompetentne w chlorku rubidu), które następnie inkubowano przez 45 minut w 4°C. Po tym czasie bakterie poddano szokowi cieplnemu przez 3 minuty w 42°C i przeniesiono na 3 minuty do lodu, po czym dodano do nich 1 ml ciepłej pożywki (37°C) LB i inkubowano w termomikserze przez 1 godzinę w 37°C przy 300 RPM. Tak przygotowane bakterie wysiano na szalki z LA i ampicyliną (100 µg/ml) i inkubowano przez noc w 37°C.

4.4. Analiza uzyskanych klonów

Wyzolowane plazmidy sprawdzono w kierunku obecności wstawki shRNA dwoma sposobami: reakcją PCR oraz trawieniem restrykcyjnym. Do reakcji PCR użyto dwóch zaprojektowanych wcześniej starterów: „forward”: 5' CTA TCA TAT GCT TAC CGT AAC 3' oraz „reverse”: 5' GCT TGT ACT CGG TCA TG 3', a produkt reakcji rozdzielono w 1% żelu agarozowym. Do reakcji trawienia restrykcyjnego zastosowano enzymy EcoRI oraz NcoI, a produkty reakcji rozdzielono w 1% żelu agarozowym.

4.5. Wyciszenie ekspresji *FGFR2* w linii komórkowej T47D – system lentiwirusowy

Jako linii „pakującej” użyto komórek 293T, które w dniu transfekcji osiągały konfluencję 30-40% na szalce do hodowli 60 mm. Godzinę przed transfekcją komórkom zmieniano pożywkę na świeżą. W celu przygotowania mieszaniny transfekcyjnej zmieszano ze sobą trzy wektory w następujących stosunkach: 0,29 µg pMD2.G : 0,73 µg psPAX2 : 0,98 µg pLKO.1 shFGFR2, które dodano do 200 µl pożywki DMEM niezawierającej surowicy. Następnie do mieszaniny dodano 4 µl odczynnika do transfekcji TurboFect (stosunek odczynnika do ilości DNA wynosił 4 µl : 2 µg) i całość delikatnie wymieszano. Po 20-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej całą mieszaninę ostrożnie równomiernie nakropiono na płytkę z komórkami i delikatnie wymieszano. Następnego dnia transfekowanym

komórkom zmieniono pożywkę na świeżą. Po mniej więcej 36 godzinach znad komórek linii 293T zbierano pożywkę zawierającą wirusy, dodawano do niej Polybrene (5 $\mu\text{g/ml}$, w celu zwiększenia wydajności infekcji), filtrowano przez filtr strzykawkowy PVDF 0,45 μm i dodawano do komórek linii docelowej (w tym wypadku T47D). Po całonocnej inkubacji rano zmieniano pożywkę na świeżą, a cały proces infekcji powtarzano raz jeszcze po południu. Po 36 godzinach od reinfekcji rozpoczynano selekcję komórek z wykorzystaniem puromycyny. Wyselekcjonowaną populację komórek z wyciszoną ekspresją *FGFR2* hodowano w obecności puromycyny (0,25 $\mu\text{g/ml}$). Skuteczność wyciszenia *FGFR2* sprawdzano metodą Western blotting, a jako kontroli użyto komórek nieinfekowanych oraz infekowanych z zastosowaniem pustego wektora pLKO.1.

4.6. Liza komórek oraz elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Dzień przed planowanym przygotowaniem lizatów komórki przesiewano na świeże płytki 60 mm tak, aby w dniu lizy osiągały konfluencję 70-90%. W pierwszym kroku zbierano pożywkę znad komórek i przepłukiwano je dwukrotnie przy pomocy PBS, a następnie dodawano 1 ml schłodzonego buforu do skrobania. Po zdrapaniu komórek skrobaczką przenoszono je do probówek 1,5 ml na lodzie i wirowano w wirówce Eppendorf Mini Spin plus przez 1 minutę przy maksymalnej prędkości. Po wirowaniu zlewano supernatant, a osad zawieszano w 130-200 μl buforu do lizy i dokładnie rozpipetowywano. W kolejnym kroku próbki wstawiano do termobloku nagrzanego do 95°C, a po 15 minutach całość worteksowano i mrożono w -20°C. Procedurę gotowania/mrożenia powtarzano 2-3-krotnie, do całkowitego rozpuszczenia osadu. Tak przygotowane lizaty przechowywano w -20°C, bądź przystępowano do pomiaru stężenia białka metodą Lowry'ego (Bio-Rad). W pierwszym kroku mieszano ze sobą dwa odczynniki z zestawu (Protein Assay Reagent S oraz Protein Assay Reagent A) w stosunku 20 μl : 1000 μl , tworząc reagent A' (Protein Assay Reagent A'). Do płytki 96-dołkowej dodawano 2,5 μl przygotowanego lizatu (w trzech powtórzeniach), 25 μl odczynnika A' oraz 200 μl odczynnika B (Protein Assay Reagent B), inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15-60 minut, a następnie dokonywano odczytu absorbancji w czytniku płytek BioTek przy długości fali $\lambda = 750 \text{ nm}$. Na podstawie przygotowanej krzywej wzorcowej zależności stężenia białka od absorbancji obliczano stężenie białka w przygotowanych lizatach. Stosując bufor Laemmli 4x stężony z dodatkiem β -merkaptoetanolu i błękitu bromofenolowego rozcieńczano i tym samym wyrównywano stężenie białka we wszystkich lizatach. Tak przygotowane próbki były nanoszone w równych ilościach do studzienek żelu

poliakrylamidowego (najczęściej po 20 μ l). Do pierwszej i ostatniej studzienki наносono po 1 μ l markera białkowego. Stosowane żełe poliakrylamidowe składały się z 5% żelu zagęszczającego (żelu górnego) oraz z 10-12% żelu rozdzielającego (żelu dolnego). Po nałożeniu próbek dokonywano ich rozdziału elektroforetycznego w wertykalnym aparacie firmy Bio-Rad wypełnionym buforem do elektroforezy, przy napięciu prądu 90-120 V.

4.7. Western blotting

Elektrotransfer białek na membranę nitrocelulozową przeprowadzano w aparacie do transferu „mokrego” (Bio-Rad) przy stałym napięciu 35-40 V, przez noc w pomieszczeniu chłodzonym do 4°C. Kolejnego dnia membrany płukano w roztworze TBS-T, blokowano przez 1 godzinę w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w TBS-T, ponownie płukano, a następnie inkubowano przez noc w 4°C na wytrząsarce z odpowiednimi przeciwciałami I-rzędowymi. Po całonocnej inkubacji membrany płukano w TBS-T i inkubowano przez 60 minut z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z fluoroforem, przygotowanymi w buforze do blokowania (5% mleko w TBS-T), chroniąc membrany przed światłem. W ostatnim kroku membrany trzykrotnie płukano w TBS-T, suszono i dokonywano detekcji sygnału fluorescencyjnego przy zastosowaniu systemu do obrazowania Odyssey CLx (*LI-COR*).

4.8. Trójwymiarowe (3D) hodowle komórkowe

Hodowle trójwymiarowe prowadzono w Matrigelu i w kolagenie I. Policzone komórki zawieszano w mieszaninie pożywki z Matrigelem (w stosunku 1:1), bądź z kolagenem I (końcowe stężenie wcześniej zneutralizowanego roztworem NaOH kolagenu wynosiło 1,7 mg/ml) i wysiewano w postaci 40- μ l kropli na płytce 12-dołkowej. Ilości komórek w kroplach różniły się w zależności od linii komórkowej i oscylowały w granicach 1-4 x 10³ komórek/kroplę. Wysiane krople inkubowano przez 30-45 minut w inkubatorze, do spolimeryzowania Matrigelu/kolagenu. Następnie dołki zalewano pożywką przygotowaną z odpowiednimi hormonami i/lub czynnikami wzrostu i/lub inhibitorami, którą zmieniano co 3-4 dni. Hodowle prowadzone były przez 14-21 dni, w zależności od specyfiki linii komórkowej. Po tym czasie wykonywano reprezentatywne zdjęcia przy użyciu odwróconego mikroskopu świetlnego Zeiss Primovert (AxioCam ERc 5s, Zeiss). Warto podkreślić, iż każdą kroplę wysiewano w dwóch powtórzeniach na dołek, zaś każdy eksperyment powtórzono co najmniej trzykrotnie dla każdej linii komórkowej i każdego z zastosowanych warunków. Następnie dokonywano pomiaru wielkości przynajmniej 50 kolonii (ich średnicy), stosując oprogramowania ImageJ. Istotność statystyczną obliczano przy pomocy testu t-Studenta. Zastosowane we wszystkich

przeprowadzonych doświadczeniach stężenia hormonów, czynników wzrostu oraz inhibitorów wynosiły: E2 (10 nM), P4 (100 nM), FGF7 (50 ng/ml), heparyna (50 ng/ml), OHT (1 μ M), LY294002 (2 μ M), SP600125 (2 μ M) oraz SU6656 (2 μ M).

4.9. Analiza wpływu stymulacji komórek 17 β -estradiolem (E2), progesteronem (P4) i FGF7 na aktywację ER i PR

W celu analizy aktywacji receptorów estrogenowego oraz progesteronowego w obecności opisanych hormonów steroidowych i/lub czynnika wzrostu FGF7, w pierwszym kroku komórki hodowano przez 24 godziny w obecności E2 oraz P4, w pożywce bezsurowiczej i bez czerwieni fenolowej. Następnie, komórki stymulowano FGF7 w obecności obu hormonów steroidowych, w określonych punktach czasowych (w zakresie 15-60 minut). Kontrolę stanowiły komórki rosnące w opisanej pożywce, bez stymulacji. W przypadku stymulacji przez dłuższy okres czasu (24-72 godziny), komórki nie były uprzednio traktowane hormonami. We wszystkich doświadczeniach wraz z FGF7 stosowano heparynę, jako niezbędny odczynnik do właściwego wiązania czynnika wzrostu do receptora. Zastosowane stężenia hormonów oraz czynników wzrostu wynosiły: E2 (10 nM), P4 (100 nM), FGF7 (50 ng/ml) oraz heparyna (50 ng/ml).

4.10. Immunoprecypitacja

W celu analizy oddziaływania pomiędzy receptorami ER i PR w obecności hormonów steroidowych i/lub FGF7 komórki pierw głodzono w pożywce bezsurowiczej i bez czerwieni fenolowej, a następnie stymulowano przez 3-24 godziny odpowiednimi hormonami i/lub FGF7. W przypadku doświadczeń, w których przed przystąpieniem do lizy przeprowadzono sieciowanie białek, tuż po stymulacji komórki płukano zimnym PBS, a następnie dodawano do nich pożywkę DMEM z 1% paraformaldehydem i inkubowano przez 8 minut w 37°C. Po stymulacji/sieciowaniu komórki lizowano przez noc w 4°C na mieszadle w odpowiednim buforze – tj. 1% Triton X-100 lub w 0,8% Brij + 0,2% Triton X-100, z dodatkiem inhibitorów proteaz, kinaz oraz fosfataz. Po zwirowaniu lizatów pozbywano się osadu, a supernatant inkubowano przez noc w 4°C na mieszadle z przeciwciałami anti-ER (klon SP1) lub anti-PR (hPRA7), skoniugowanymi ze złożem agarozowym zawierającym białko A (Santa Cruz Biotechnology). Kolejnego dnia, po odwirowaniu, osad płukano trzykrotnie buforem, który został zastosowany do lizy, a następnie wyprecypitowane kompleksy białkowe eluowano ze złoża buforem Laemmli 2x stężonym, przez 30-45 minut, w 4°C na mieszadle. W ostatnim etapie eluat wirowano celem pozbycia się złoża, dodawano buforu Laemmli 4x stężonego z

dotatkami β -merkaptopetanolu i tak przygotowane próbki rozdzielano na SDS-PAGE, a następnie analizowano metodą Western blotting.

4.11. PLA (ang. *Proximity Ligation Assay*)

Do badania interakcji ER-PR metodą PLA komórki wysiewano na 8-dołkowe szkiełka Millicell® EZ Slide, głodzono przez noc w pożywce bezsurowiczej oraz bez czerwieni fenolowej, a następnie stymulowano przez 60 minut hormonami E2 (50 nM) oraz P4 (500 nM) i/lub FGF7 (50 ng/ml). Po stymulacji komórki płukano zimnym PBS, utrwalano przez 15 minut 4% roztworem paraformaldehydu w temperaturze pokojowej, ponownie płukano PBS, a następnie permeabilizowano błony komórkowe przy użyciu 0,1% Triton X-100 w 4°C. Po kolejnych płukaniach PBS blokowano niespecyficzne oddziaływania przeciwciał przy pomocy roztworu 3% BSA wraz z 3% FBS w PBS i inkubowano preparaty przez noc z przeciwciałami anti-ER oraz anti-PR w 4°C. Następnego dnia preparaty po płukaniach inkubowano w 37°C z przeciwciałami anti-mysimi oraz anti-króliczymi skoniugowanymi z oligonukleotydami, dostarczonymi przez producenta (Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Rabbit MINUS oraz Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Mouse PLUS). Następnym krokiem była 30-minutowa ligacja komplementarnych oligonukleotydów w 37°C, po czym przeprowadzono reakcję amplifikacji uzyskanego produktu z wykorzystaniem znakowanych fluorescencyjnie nukleotydów, przez 100 minut w 37°C. W ostatnim kroku jądra komórkowe wybarwiono przy pomocy barwnika Hoechst 33342 (0,05 μ g/ml) i złożono preparaty. Analizę tworzenia kompleksów ER-PR wykonano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Zeiss AxioVision 200.

4.12. Ilościowa reakcja PCR (ang. *quantitative polymerase chain reaction*; qPCR)

Do przeprowadzanych reakcji qPCR komórki przez 3 dni hodowano w pożywce DMEM bez czerwieni fenolowej, suplementowanej 10% surowicą pozbawioną hormonów steroidowych, po czym „głodzono” je przez noc w pożywce bezsurowiczej, a następnie przez 8 godzin traktowano E2, E2 i P4, FGF7 wraz z E2 i P4, lub badanym inhibitorem (LY294002, UO126, SB202190, BI-D1870, SP600125, SU6656, ABT-199 lub Magnolol) wraz z FGF7, E2 i P4. Całościowy RNA izolowano ze stymulowanych komórek przy wykorzystaniu reagentu TriPure bądź zestawu do izolacji PureLink™ RNA Mini Kit, zgodnie z protokołem producenta. Stężenie oraz czystość wyizolowanego RNA określano przy pomocy pomiaru spektrofotometrycznego z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDropND-1000. Do reakcji odwrotnej transkrypcji (RT-PCR) każdorazowo wykorzystywano 1 μ g RNA oraz losowo

wybrane, 6-nukleotydomowe startery z zestawu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit. Warunki reakcji dobrano zgodnie z zaleceniami producenta. Analizę poziomu ekspresji wybranych genów przeprowadzano z zastosowaniem specyficznych sond TaqMan (opisanych w sekcji 3.7.). Uzyskane dane przeanalizowano metodą $\Delta\Delta C_T$, z normalizacją do poziomu genów referencyjnych (*ACTB* oraz *GAPDH*) przy wykorzystaniu oprogramowania CFX Manager. Do każdej reakcji przygotowywano odpowiednie kontrole negatywne (NTC, bez zastosowania matrycy) oraz kontrolę weryfikującą ewentualną kontaminację DNA obecną w użytym w RT-PCR RNA (NRT).

4.13. RT² Profiler PCR Array

Do opisanych doświadczeń komórki po całkowitym „głodzeniu” w pożywce bezsurowiczej i bez czerwieni fenolowej przez 12 godzin traktowano E2 i/lub P4, i/lub FGF7. Izolację całościowego RNA oraz RT-PCR przeprowadzano w ten sam sposób jak w sekcji 4.12. Następnie, przygotowany cDNA (po reakcji RT-PCR) mieszano z dołączonym odczynnikiem do reakcji qPCR (dostępnym w zestawie), po czym całość nanoszono na płytkę 96-dółkową (przygotowaną przez producenta). Zastosowany zestaw RT² Profiler PCR Array obejmował analizę 84 genów ER-zależnych wraz z 5 genami referencyjnymi. Analizę poziomu ekspresji badanych genów wykonano metodą $\Delta\Delta C_T$, z normalizacją do poziomu ekspresji genów referencyjnych, przy pomocy dołączonego do zestawu arkusza kalkulacyjnego programu Excel. Każde z doświadczeń przeprowadzono trzykrotnie.

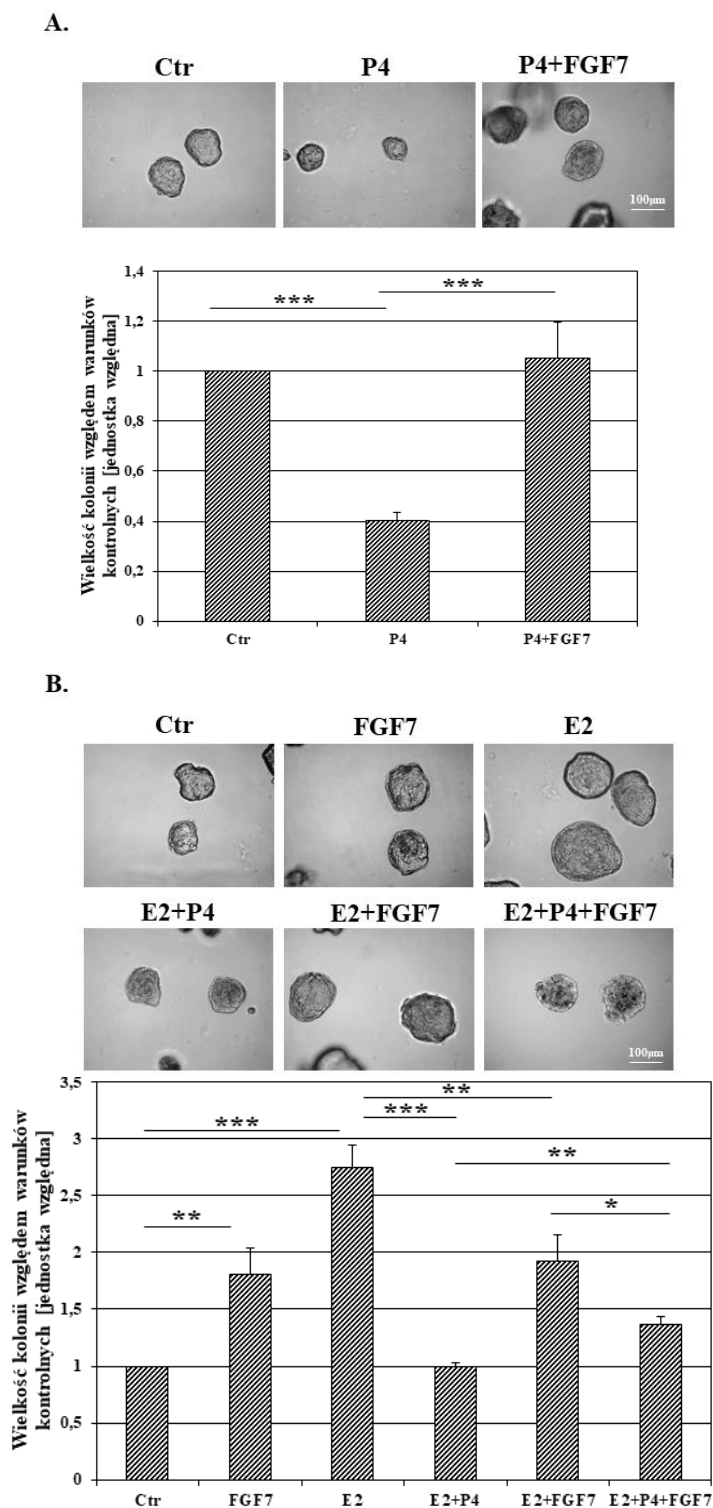
5. WYNIKI

5.1. Analiza wpływu sygnalizacji FGF7/FGFR2 na wzrost komórek luminalnego raka piersi w obecności hormonów steroidowych

Receptor estrogenowy jest głównym czynnikiem diagnostycznym i prognostycznym w luminalnych rakach piersi, który to, poprzez regulację ekspresji szeregu genów proliferacyjnych i anti-apoptotycznych, promuje wzrost guza. Aktywność transkrypcyjna ER może być regulowana na kilku poziomach, zarówno przez związane z nim koaktywatory oraz korepresory, jak i przy udziale ścieżek sygnalizacyjnych indukowanych przez czynniki wzrostu i cytokiny. W ciągu ostatnich lat pojawiły się badania opisujące PR jako kluczowy partner ER, zaangażowany w modulację jego funkcji (Ballaré et al., 2003; Daniel et al., 2015; Diep et al., 2016; Finlay-Schultz et al., 2017; Kabos et al., 2012; Migliaccio et al., 1998; Mohammed et al., 2015). Co więcej, udokumentowano, że spośród wszystkich progestagenów to progesteron (P4) najefektywniej hamuje estrogeno-zależny wzrost guza oraz koreluje z obniżonym ryzykiem raka piersi (Carroll et al., 2017). W pracach opublikowanych przez nasz zespół dowiedliśmy, iż w środowisku bez hormonów steroidowych sygnalizacja FGF7/FGFR2 aktywuje niezależnie ER oraz PR, a następnie prowadzi do ubikwitynacji i degradacji proteasomalnej każdego z receptorów (Piasecka et al., 2016; Turczyk et al., 2017). W przedstawionym projekcie doktorskim wszystkie doświadczenia były przeprowadzane z uwzględnieniem tła hormonalnego, aby jak najbardziej wiarygodnie odzwierciedlić warunki panujące w tkance nowotworowej pacjentek. Należy pamiętać, iż status hormonalny zmienia się wraz z wiekiem. U kobiet młodszych, przedmenopauzalnych, cyklicznie produkowane są zarówno estrogeny jak i progesteron. W trakcie i po menopauzie ustaje produkcja progesteronu, zaś estrogeny produkowane są lokalnie, m.in. w gruczole piersiowym, głównie przez tkankę tłuszczową (Cui et al., 2013; Hamilton et al., 2017; Simpson and Davis, 2001).

Początkowe etapy projektu obejmowały analizy wpływu sygnalizacji od FGF7 na wzrost komórek luminalnego raka piersi w obecności hormonów steroidowych. Należy wspomnieć, iż w niniejszej pracy wszystkie doświadczenia testujące wzrost linii komórkowych przeprowadzono w środowisku trójwymiarowym (3D) w Matrigelu. Taki rodzaj hodowli w wysokim stopniu odzwierciedla warunki dla wzrostu komórek panujące w tkance, co stanowi o znaczącej przewadze tego typu układu nad standardowymi hodowlami dwuwymiarowymi na plastiku. W pierwszych doświadczeniach wykorzystano linię komórkową T47D – jeden z najpowszechniej stosowanych modeli *in vitro* luminalnego raka piersi. Zaobserwowano, iż analogicznie do danych literaturowych progesteron hamował wzrost komórek tej linii w

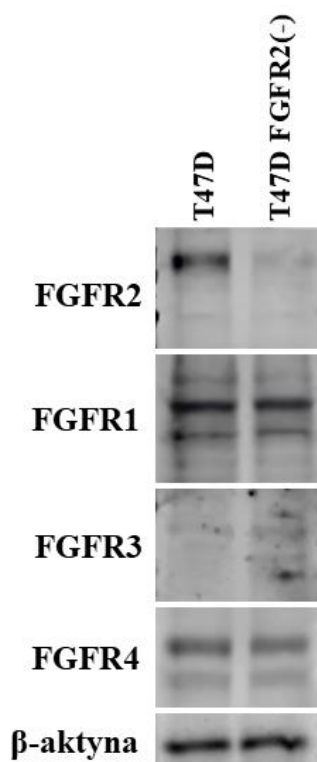
Matrigelu, natomiast FGF7 całkowicie znosił hamujący efekt P4 (Ryc. 5A). Następnie rozszerzono warunki hodowli o stymulację 17 β -estradiolem (E2), zarówno w obecności P4 i/lub FGF7. Zgodnie z oczekiwaniami, E2 promował wzrost komórek, natomiast progesteron



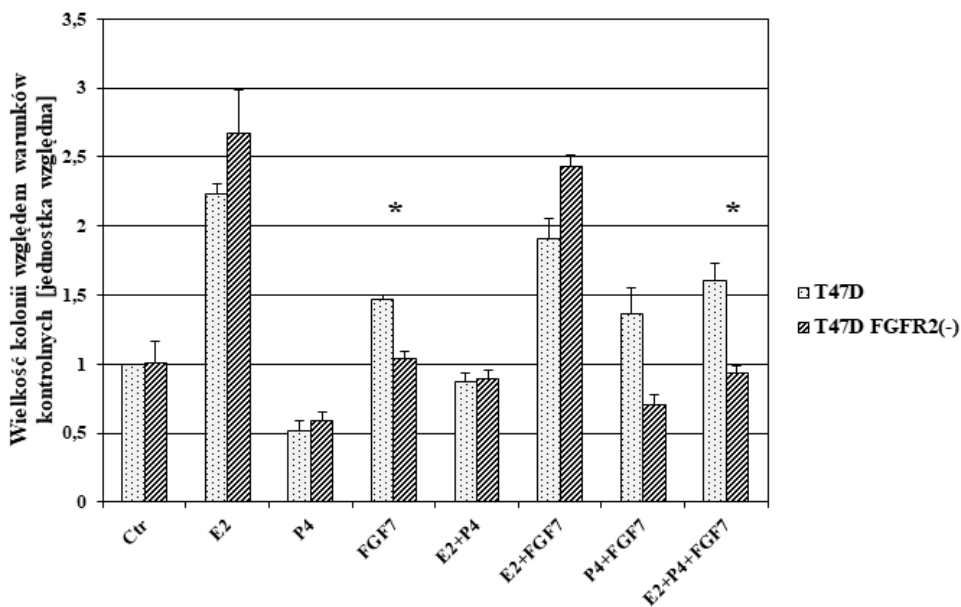
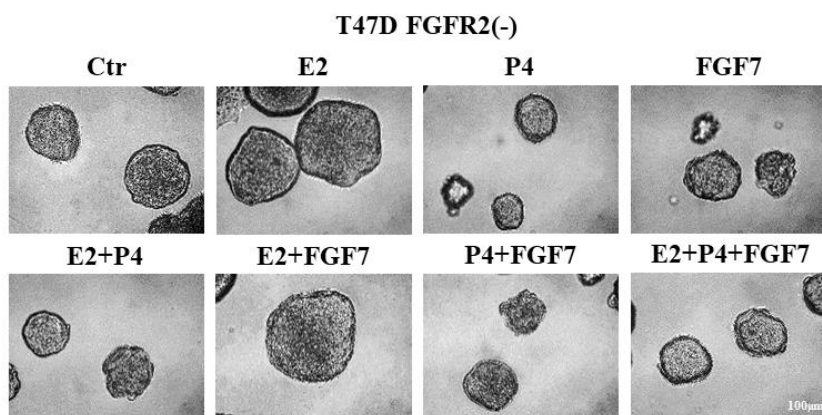
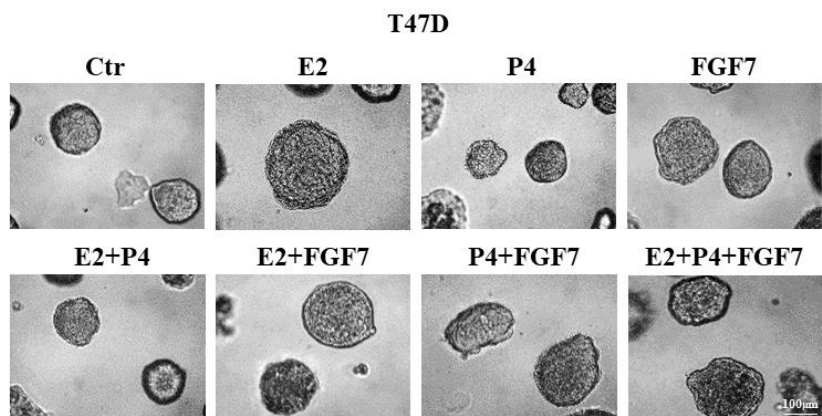
Rycina 5. FGF7 znosi hamujący efekt progesteronu na wzrost komórek linii T47D. Komórki linii T47D zawieszono w Matrigelu i hodowano przez 14 dni w pełnej pożywce z dodatkiem (A) P4 (100 nM) lub P4 i FGF7 (50 ng/ml) oraz (B) z dodatkiem E2 (10 nM) i/lub P4 (100 nM) i/lub FGF7 (50 ng/ml). Warunki kontrolne (Ctrl) stanowiła pełna pożywka. Wykonano reprezentatywne zdjęcia, a średnicę pojedynczych kolonii zmierzono przy pomocy programu ImageJ, po czym dokonano analizy statystycznej; n=3, * p<0,05, ** p<0,005, *** p<0,001.

hamował E2-zależną proliferację. Co istotne, stymulacja FGF7 znosiła negatywny efekt P4 dla wzrostu, sugerując istotne znaczenie sygnalizacji FGF7-inicjowanej w hormono-zależnym wzroście komórek BCa (Ryc. 5B).

FGF7 jest najbardziej specyficznym ligandem dla FGFR2. Aby potwierdzić, iż wyżej opisane efekty są rzeczywiście FGFR2-zależne, wyprowadzono wariant linii T47D z wyciszoną ekspresją FGFR2 (T47D FGFR2(-)). Zaprojektowana sekwencja shRNA wykazywała wysoce specyficzny efekt wyciszenia FGFR2, bez ingerencji w poziom ekspresji pozostałych receptorów z rodziny FGFR (FGFR1, FGFR3 oraz FGFR4) (Ryc. 6). Następnie komórki T47D oraz T47D FGFR2(-) hodowano w 3D w Matrigelu w obecności E2 +/- P4 +/- FGF7. Uzyskane wyniki pokazują, że: i) komórki T47D FGFR2(-) przestały odpowiadać na stymulację FGF7, potwierdzając funkcjonalne wyciszenie receptora, ii) utrata FGFR2 związana była z lepszą, aczkolwiek nieistotną statystycznie, odpowiedzią na E2, sugerując potencjalne zaangażowanie innego z receptorów z FGFR w regulację funkcji ER, oraz iii) w przypadku komórek z wyciszoną ekspresją FGFR2 FGF7 nie wpływał na hamujący wzrost efekt P4 w obecności E2, podkreślając istotne znaczenie sygnalizacji FGF7/FGFR2 w regulację odpowiedzi komórek nowotworowych na hormony steroidowe (Ryc. 7).

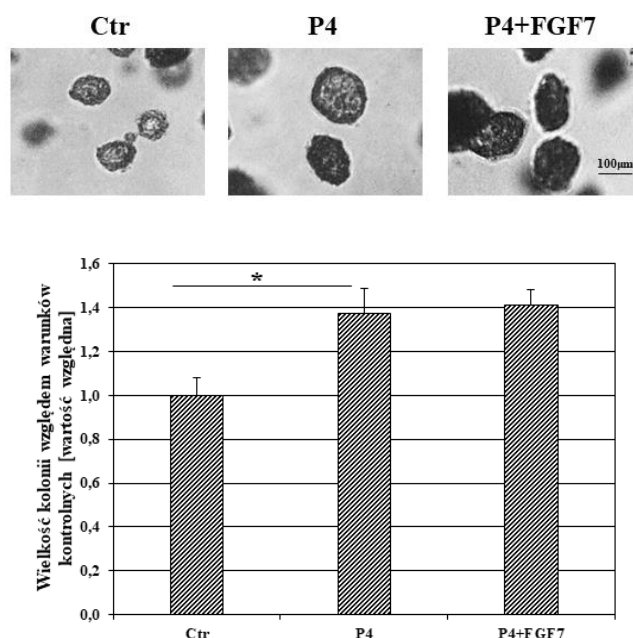


Rycina 6. Analiza poziomu ekspresji receptorów z rodziny FGFR w komórkach linii T47D i wariacie T47D FGFR2(-). Wyciszenie ekspresji FGFR2 wydajnie obniża poziom białka receptora, natomiast nie zmienia poziomu ekspresji innych receptorów z tej rodziny. Analizę poziomu ekspresji receptorów wykonano metodą Western blotting.



Rycina 7. FGFR2 jest zaangażowany w regulowany przez FGF7 hormono-zależny wzrost komórek T47D. Komórki linii T47D (górny panel) i T47D FGFR2(-) (dolny panel) zawieszono w Matrigelu i hodowano przez 14 dni w pełnej pożywce z dodatkiem E2 (10 nM) i/lub P4 (100 nM) i/lub FGF7 (50 ng/ml). Warunki kontrolne (Ctr) stanowiła pełna pożywka. Wykonano reprezentatywne zdjęcia, a średnicę pojedynczych kolonii zmierzono przy pomocy programu ImageJ, po czym dokonano analizy statystycznej; n=3, * p<0,05.

Drugą modelową linią komórkową luminalnego raka piersi wykorzystaną w kolejnych doświadczeniach była linia MCF7. Jednak w tym przypadku, w analogicznych warunkach hodowli jak dla linii T47D, zaobserwowano odwrotny efekt działania progesteronu na wzrost komórek MCF7 w Matrigelu. P4 stymulował wzrost kolonii, natomiast dodatkowa stymulacja FGF7 w żaden sposób nie wpływała na efekty wywołane przez ten hormon (Ryc. 8). Aby zweryfikować czy na obserwowane odmienne efekty stymulacji hormonalnej obu linii komórkowych nie wpływa kompozycja białkowa zastosowanego „rusztowania” w hodowlach 3D, komórki T47D i MCF7 wysiano również w kolagenie I (najpowszechniej występującym białku macierzy zewnątrzkomórkowej w gruczole piersiowym). Modyfikacja warunków hodowli 3D nie przyczyniła się jednak do zmian w hormono-zależnym wzroście komórek obu linii komórkowych (wyniki niezłączone do pracy).



Rycina 8. Progesteron stymuluje wzrost komórek MCF7, a efekt ten nie jest regulowany przez FGF7. Komórki linii MCF7 zawieszono w Matrigelu i hodowano przez 14 dni w pełnej pożywce z dodatkiem P4 (100 nM) lub P4 i FGF7 (50 ng/ml). Warunki kontrolne (Ctrl) stanowiła pełna pożywka. Wykonano reprezentatywne zdjęcia, a średnicę pojedynczych kolonii zmierzono przy pomocy programu ImageJ, po czym dokonano analizy statystycznej; n=3, * p<0,05.

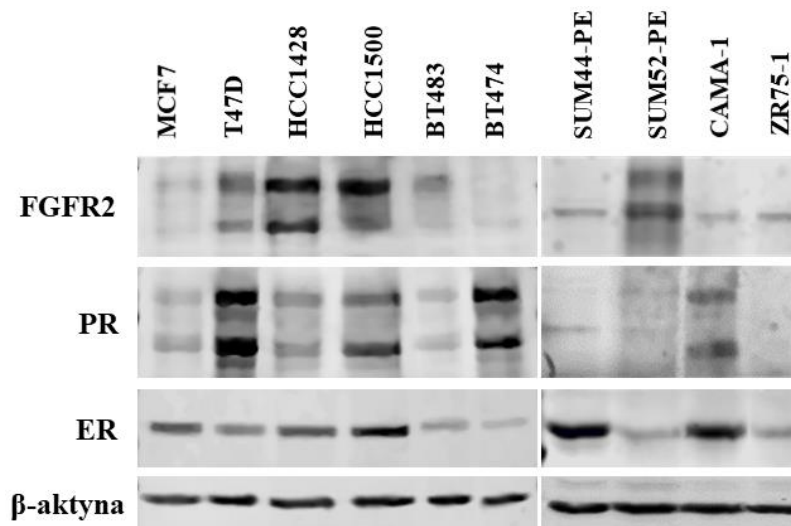
Linie komórkowe T47D oraz MCF7 są najpowszechniej stosowanymi modelowymi liniami luminalnego raka gruczołu piersiowego. W ostatnich latach pojawiają się jednak prace opisujące ich odmienną charakterystykę molekularną, a tym samym znacząco różną odpowiedź na hormony steroidowe, w tym 17 β -estradiol i progesteron (Yu et al., 2017). Stąd też w pracy postanowiono przetestować szereg linii komórkowych, opisanych w literaturze jako ER+/PR+. Były to linie: HCC1428, HCC1500, BT483, BT474, ZR-75-1, SUM-44PE, SUM-52PE oraz CAMA-1. Analiza metodą Western blotting panelu wszystkich wymienionych linii

komórkowych wykazała zróżnicowany poziom ekspresji FGFR2, PR oraz ER (Ryc. 9). Taka heterogenność ekspresji badanych receptorów znalazła odzwierciedlenie we wzroście wszystkich linii w hodowlach 3D, zarówno w Matrigelu, jak i w kolagenie I, w obecności E2 i/lub P4 i/lub FGF7. Komórki linii HCC1500, HCC1428 oraz BT483 charakteryzowały się bardzo wolnym tempem wzrostu i powstawaniem wysoce heterogennych kolonii. W związku z tym, aby uniknąć problemu z powtarzalnością wyników, nie zostały one uwzględnione w dalszych doświadczeniach. Na rycinie 10A przedstawiono przykładowe zdjęcia hodowli 3D w Matrigelu linii HCC1500. W przypadku linii SUM-52PE, SUM-44PE oraz ZR-75-1 nie zaobserwowano natomiast istotnej odpowiedzi na stosowane stymulacje, co wykluczyło je z dalszych analiz. Zdjęcia z ryciny 10B przedstawiają przykładowe kolonie linii komórkowej SUM-52PE w Matrigelu.

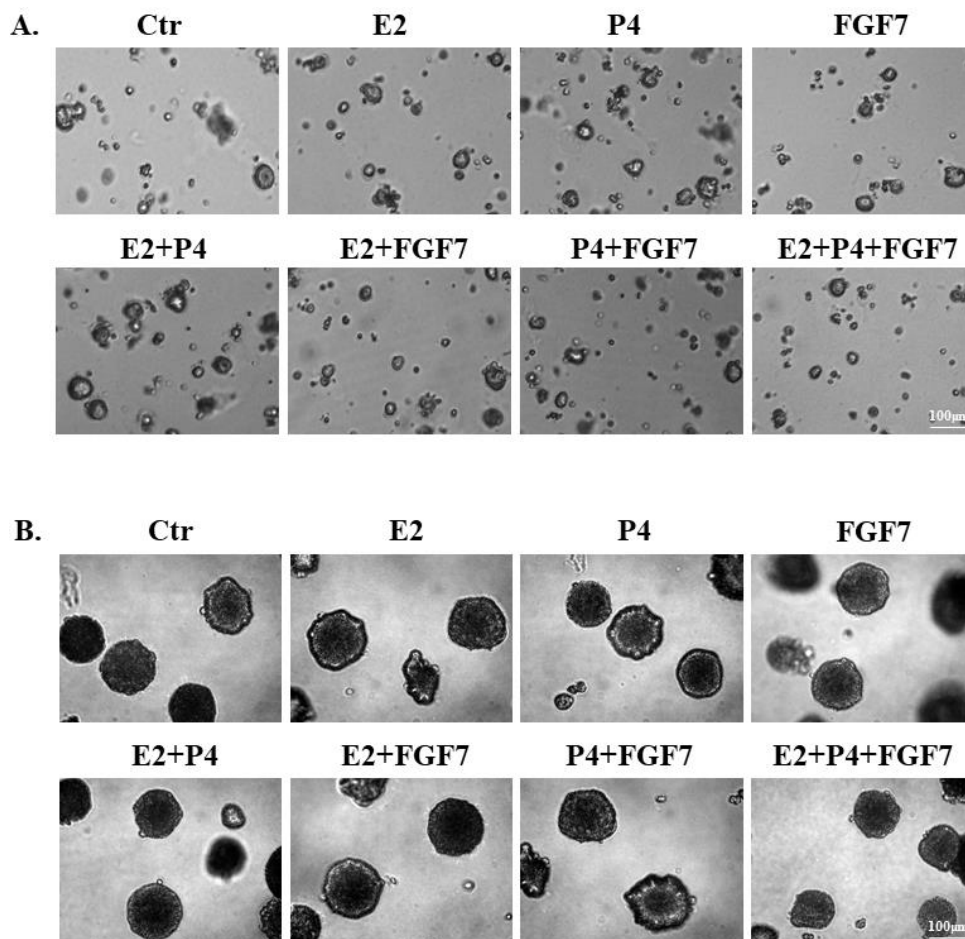
Jedyną spośród nowo wybranych linii komórkowych, która w sposób znaczący odpowiadała na stymulacje hormonami (E2 i P4) oraz FGF7, była linia komórkowa CAMA-1. Należy wspomnieć, iż jest stosunkowo często stosowany model *in vitro* luminalnego raka piersi, a badania z jego użyciem znalazły zastosowanie między innymi w pracy opisującej zależność między FGFR1 a ER (Formisano et al., 2017). Stąd też wybór takiego modelu badawczego wydaje się być całkowicie słuszny. W zastosowanych hodowlach trójwymiarowych w Matrigelu P4 hamował wzrost komórek linii CAMA-1, zaś FGF7 znosił ten efekt (Ryc. 11A). Rozszerzenie warunków hodowli do pełnego spektrum tła hormonalnego wykazało, iż komórki CAMA-1 odpowiadają na stosowane stymulacje analogicznie jak komórki linii T47D, tj. P4 hamuje E2-zależny wzrost komórek, zaś FGF7 znosił obserwowany efekt P4 (Ryc. 11B).

Co istotne, wszystkie wyżej opisane hodowle komórkowe 3D prowadzone były w pożywkach pełnych (suplementowanych 10% FBS) z czerwienią fenolową. Analogiczne wyniki uzyskaliśmy również stosując pożywkę bez czerwieni fenolowej, suplementowaną surowicą oczyszczaną węglem aktywnym (wyniki niezałączone do pracy).

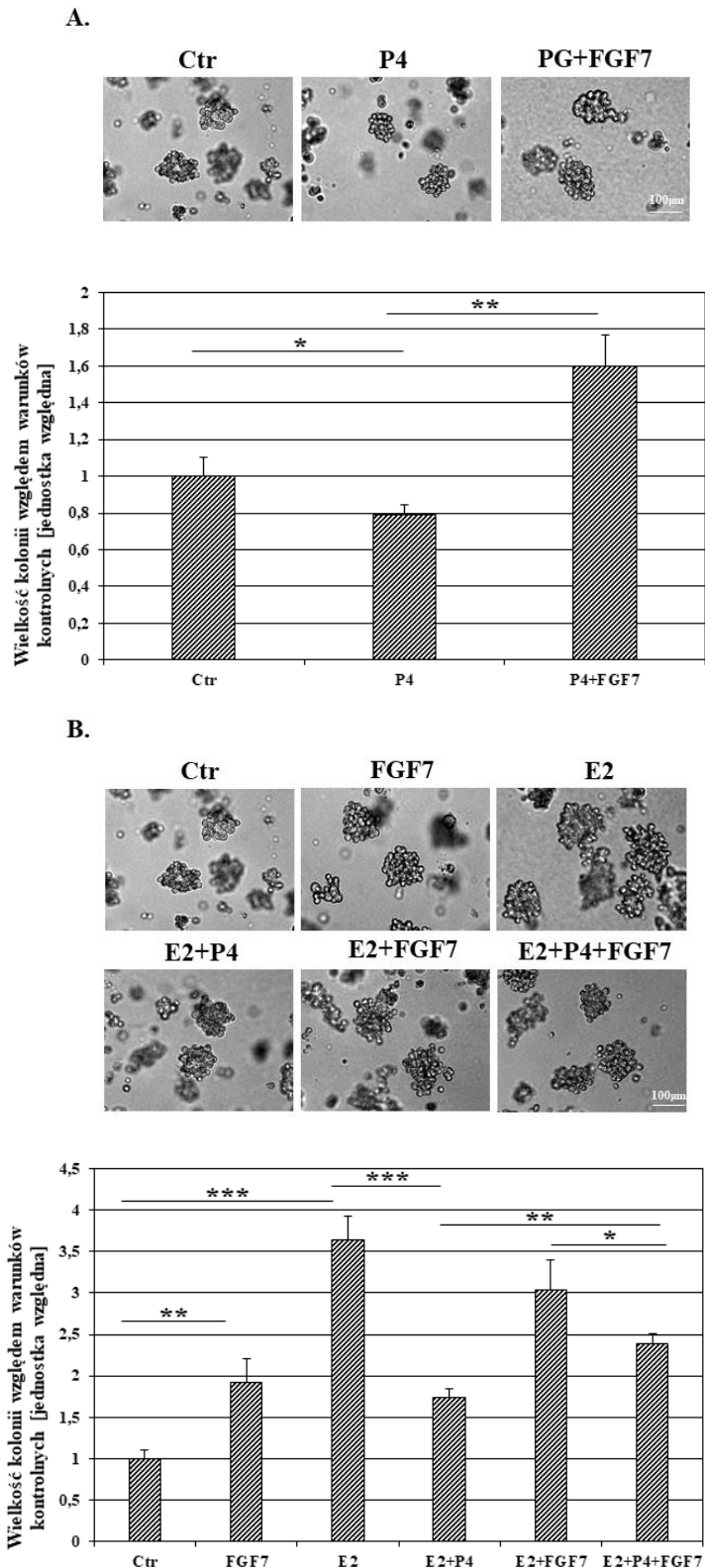
Podsumowując, przeprowadzone analizy wzrostu komórek luminalnego raka piersi jednoznacznie wskazują na udział sygnalizacji FGF7/FGFR2 w regulacji odpowiedzi komórek na hormony steroidowe. Komórki linii T47D oraz CAMA-1 zostały wybrane do dalszych doświadczeń przeprowadzonych w niniejszym projekcie.



Rycina 9. Profil ekspresji FGFR2, ER oraz PR w panelu linii komórkowych luminalnego BCa. Analizy poziomu ekspresji badanych receptorów dokonano metodą Western blotting.



Rycina 10. Wzrost komórek luminalnego raka piersi w hodowlach 3D w Matrigelu na przykładzie linii komórkowych HCC1500 oraz SUM52-PE. Komórki linii HCC1500 (A) oraz SUM52-PE (B) zawieszono w Matrigelu i hodowano przez 16-22 dni w pełnej pożywce z dodatkiem P4 (100 nM) lub P4 i FGF7 (50 ng/ml). Warunki kontrolne (Ctr) stanowiła pełna pożywka. Wykonano reprezentatywne zdjęcia.

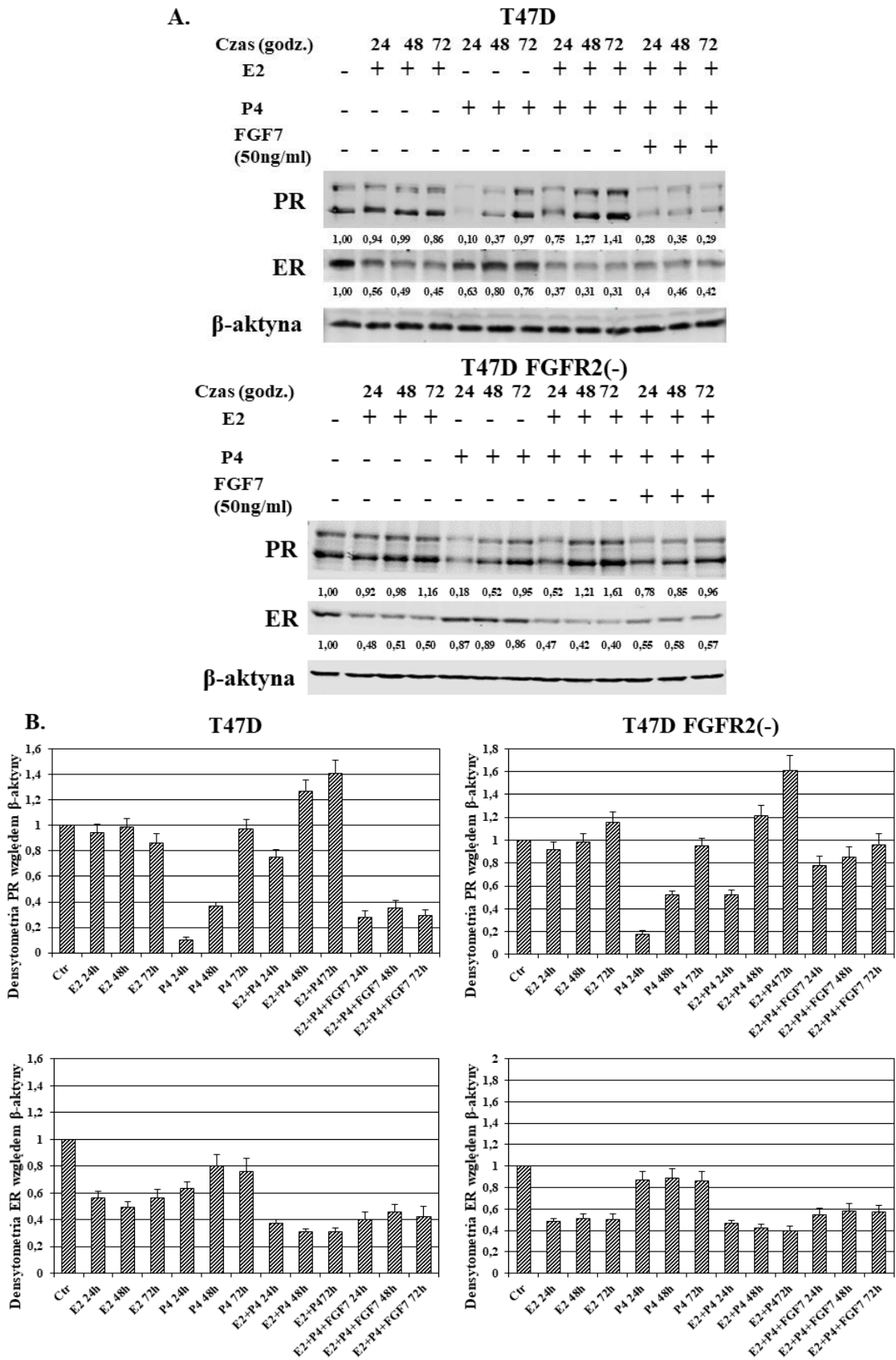


Rycina 11. FGF7 znosi hamujący efekt progesteronu na E2-zależny wzrost komórek linii CAMA-1. Komórki linii CAMA-1 zawieszono w Matrigelu i hodowano przez 18 dni w pełnej pożywce z dodatkiem (A) P4 (100 nM) lub P4 i FGF7 (50 ng/ml) oraz (B) z dodatkiem E2 (10 nM) i/lub P4 (100 nM) i/lub FGF7 (50 ng/ml). Warunki kontrolne (Ctrl) stanowiła pełna pożywka. Wykonano reprezentatywne zdjęcia, a średnicę pojedynczych kolonii zmierzono przy pomocy programu ImageJ, po czym dokonano analizy statystycznej; n=3, * p<0,05, ** p<0,005, *** p<0,001.

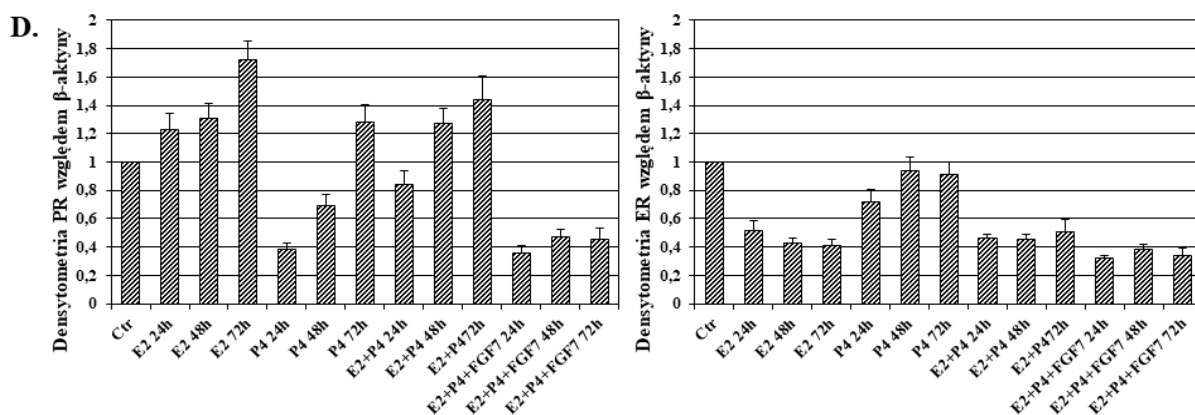
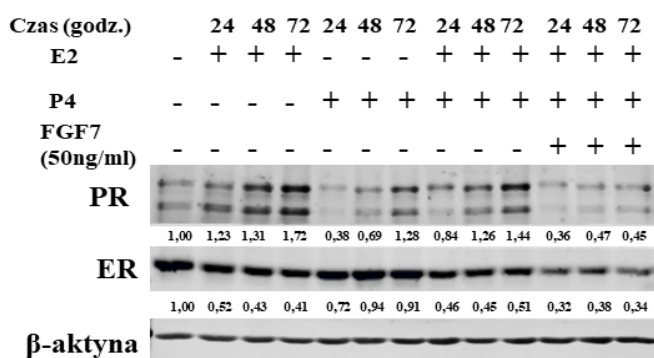
5.2. Analiza wpływu FGFR2 na regulację ER i PR w obecności hormonów steroidowych

Wyniki opisane we wcześniejszym rozdziale pracy pokazują, iż sygnalizacja mediowana przez FGFR2 reguluje zależny od receptorów dla hormonów steroidowych wzrost komórek. Mechanizm molekularny tej regulacji pozostaje nieznany. Kolejne doświadczenia w projekcie miały więc na celu identyfikację mechanizmów zarządzających tymi zależnościami. Analizy metodą Western blotting wykazały, iż w obu liniach komórkowych (T47D oraz CAMA-1) FGF7, w obecności hormonów steroidowych (E2 i P4), przyczyniał się do obniżenia poziomu ekspresji PR, a efekt ten był stabilny i utrzymywał się przez co najmniej 72 godziny. Natomiast w przypadku ER jego poziom ekspresji był zależny jedynie od stymulacji hormonalnej E2, co ma związek z udokumentowanym wpływem estradiolu na degradację receptora (Alarid et al., 1999; Totta et al., 2014) (Ryc. 12A i C). Co istotne, wyciszenie ekspresji FGFR2 w komórkach linii T47D prawie całkowicie znosiło efekt FGF7 wywierany na PR w obecności obu hormonów steroidowych (Ryc. 12A). Aby przyjrzeć się bliżej zaobserwowanym FGFR2-regulowanym zmianom w poziomie PR, postanowiono przeanalizować indukowaną przez FGF7 kinetykę fosforylacji PR oraz ER. Układ doświadczalny został zaprojektowany w ten sposób, aby jak najdokładniej odzwierciedlić warunki panujące w tkance, tj. komórki przez 24 godziny rosły w obecności E2 i P4, a następnie były traktowane FGF7 (15, 30 i 60 min). Dodatkowo, w przypadku tych doświadczeń wszystkie stymulacje przygotowane były w pożywce bezsurowiczej oraz bez czerwieni fenolowej, aby wyciszyć sygnalizację indukowaną przez czynniki wzrostu/cytokiny zawarte w surowicy oraz uniknąć imitującego działanie estrogenów wpływu czerwieni fenolowej. Analiza sygnalizacji metodą Western blotting w komórkach linii T47D oraz CAMA-1 wykazała, iż już 15-minutowa stymulacja FGF7 prowadziła do indukcji fosforylacji seryny 294 PR, odpowiedzialnej za hiperaktywację oraz późniejszą degradację receptora (Lange et al., 2000; Shen et al., 2001). Natomiast obserwowana fosforylacja seryny 345 PR zależna była jedynie od stymulacji hormonalnej i utrzymywała się na podobnym poziomie niezależnie od dodatku FGF7. W przypadku receptora estrogenowego FGF7 po 15 minutach stymulował fosforylację seryny 167, niezbędnej do aktywacji funkcji transkrypcyjnych receptora i zaangażowanej w odpowiedź na terapię tamoksyfenem (Turczyk et al., 2017) (Ryc. 13A i B). W wariancie linii T47D FGFR2(-) nie obserwowano FGF7-indukowanych fosforylacji ER i PR, co jasno wskazuje na udział ścieżki sygnalizacyjnej FGF7/FGFR2 w aktywacji obu receptorów w warunkach tła hormonalnego odpowiadającego pacjentkom przedmenopauzalnym. Zauważalne jest również uwrażliwienie ER i PR na

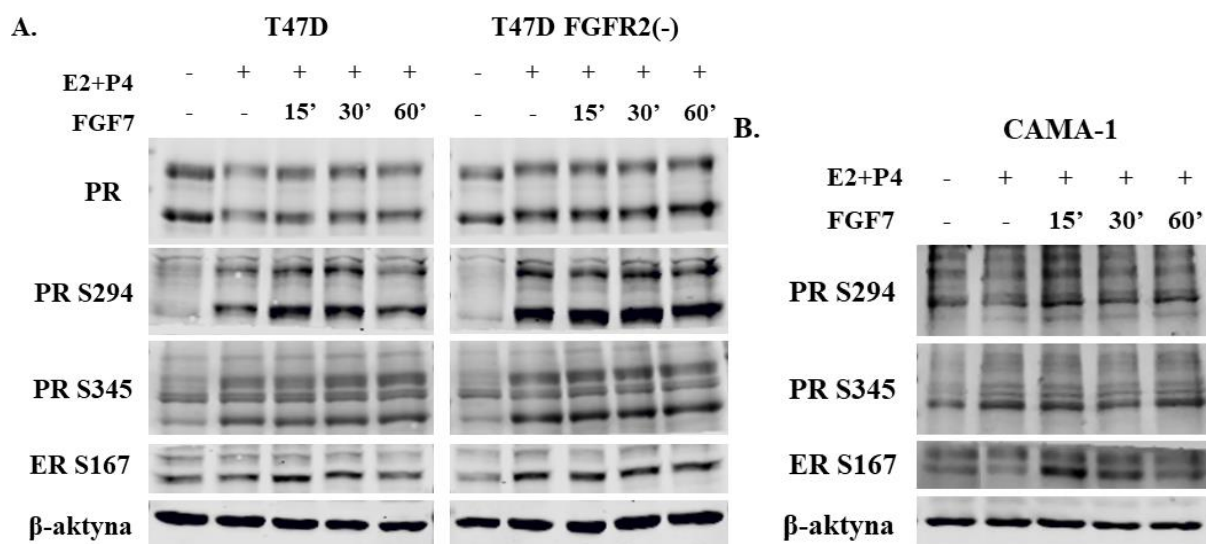
stymulacje odpowiednio E2 i P4 w komórkach T47D FGFR2(-), co może wskazywać na wykształcenie się w komórkach dodatkowych mechanizmów kompensujących wyciszenie sygnalizacji FGFR2 (Ryc. 13A).



C. CAMA-1



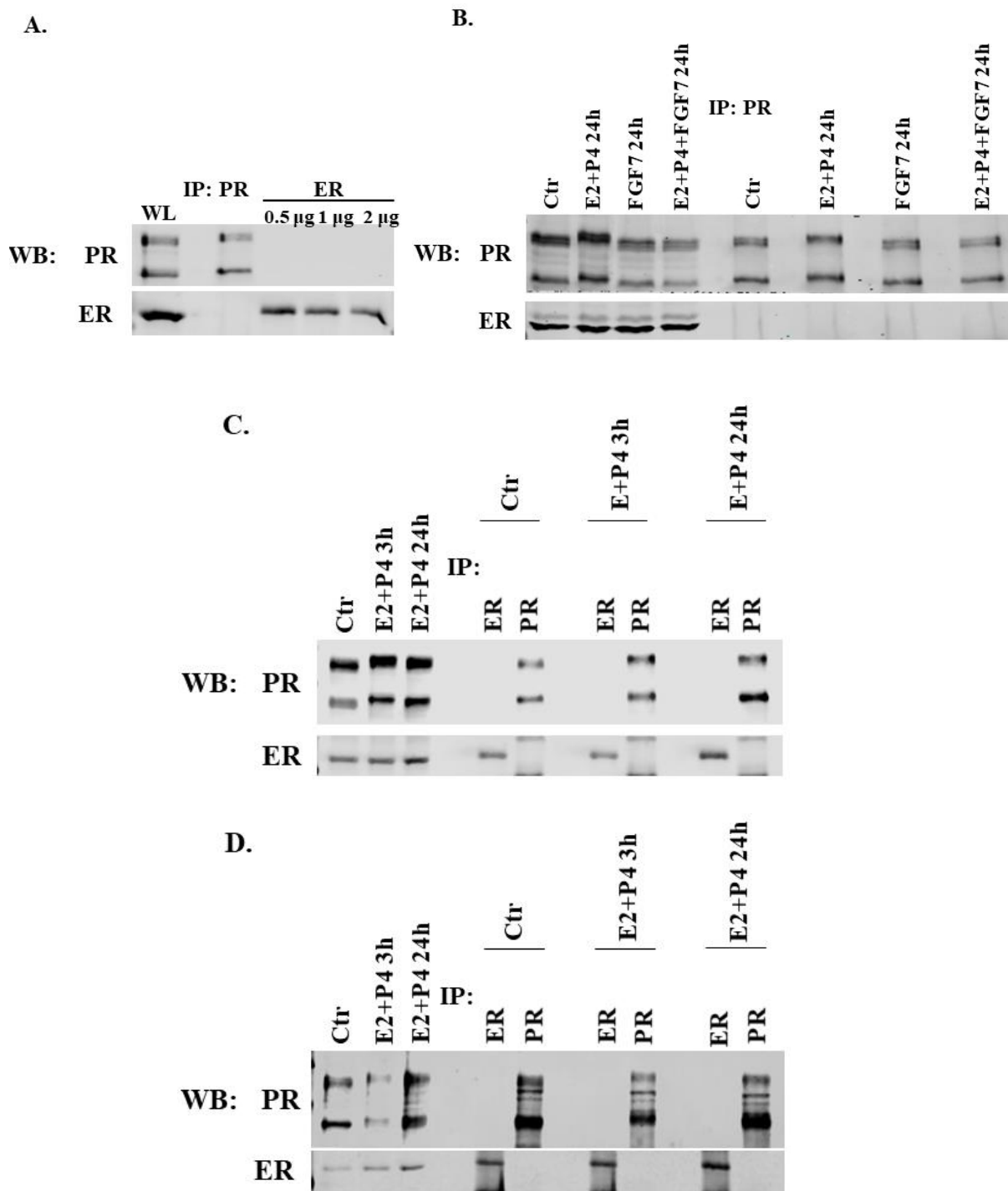
Rycina 12. Sygnalizacja FGF7/FGFR2 prowadzi do stabilnej utraty receptora progesteronowego w obecności hormonów steroidowych. Komórki linii T47D (A, górny panel), T47D FGFR2(-) (A, dolny panel) oraz CAMA-1 (C) rosły w obecności E2 (10 nM) i/lub P4 (100 nM) i/lub FGF7 (50 ng/ml) przez 24, 48 i 72 godziny. Analizy ekspresji PR oraz ER dokonano metodą Western blotting. Przedstawione wykresy zawierają pomiary densytometryczne poszczególnych prążków względem β -aktyny w warunkach kontrolnych (komórki w pełnej pożywce) (B i D); n=3.



Rycina 13. Sygnalizacja FGF7/FGFR2 prowadzi do fosforylacji seryny 294 PR oraz seryny 167 ER. Komórki linii T47D (A), T47D FGFR2(-) (A) oraz CAMA-1 (B) przez 24 godziny rosły w obecności E2 (10 nM) i P4 (100 nM) w pożywce bezsurowiczej i bez czerwieni fenolowej, po czym stymulowano je FGF7 (50 ng/ml) w punktach czasowych 15, 30 oraz 60 minut. Analizy fosforylacji ER oraz PR dokonano metodą Western blotting. Kontrolę stanowiły komórki rosnące w opisanej pożywce, bez stymulacji.

5.3. Analiza mechanizmu regulacji kompleksu ER-PR przez FGFR2 w komórkach raka piersi

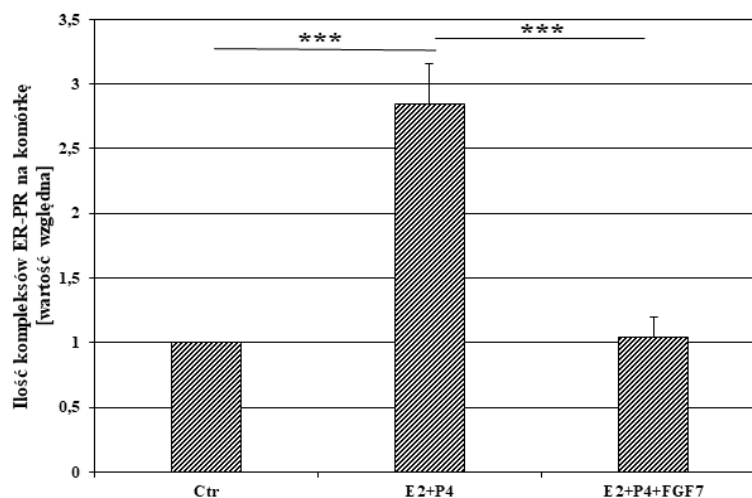
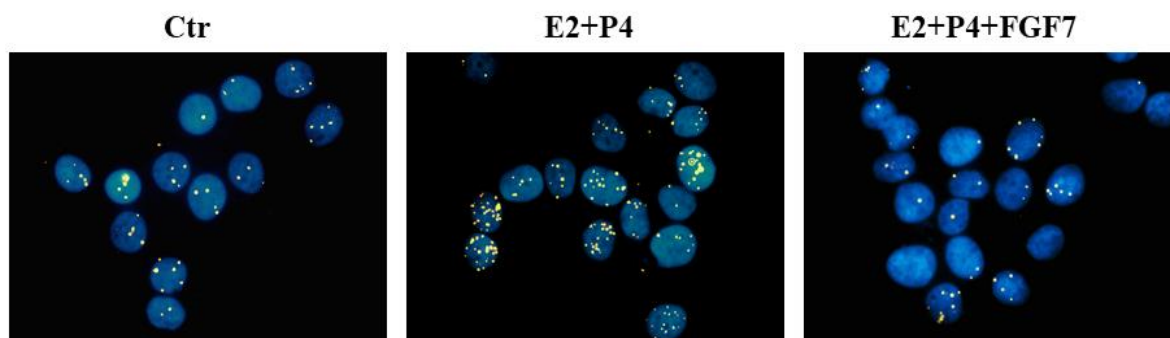
Przez długi czas PR traktowany był jedynie jako czynnik predykcyjny oraz biomarker aktywności ER (ekspresja *PGR* jest zależna od ER). W ostatnich latach podejście do znaczenia PR w raku piersi znacząco się zmieniło. Szereg prac opisuje bezpośrednie oddziaływanie ER i PR, a formowanie kompleksu pomiędzy dwoma receptorami zależne jest od aktywacji PR pod wpływem progesteronu bądź progestyn w obecności estrogenów (Diep et al., 2016; Finlay-Schultz et al., 2017; Giulianelli et al., 2012; Migliaccio et al., 1998; Mohammed et al., 2015). W związku z tym, iż uzyskane dotychczas w pracy wyniki udowadniają, iż sygnalizacja FGF7/FGFR2 reguluje poziom ekspresji PR, fosforylację ER oraz PR, a także odpowiedź komórek na hormony steroidowe, postanowiono sprawdzić czy będzie ona miała też wpływ na tworzenie się kompleksu pomiędzy receptorami estrogenowym i progesteronowym. W celu zbadania FGFR2-zależnego oddziaływania między ER i PR przeprowadzono doświadczenia ko-immunoprecypitacji. W pierwszym kroku postanowiono zoptymalizować ilość przeciwciał potrzebną do wydajnej immunoprecypitacji każdego z receptorów. I tak, PR precypitował się z najwydajniej przy zastosowaniu 2 μg przeciwciał anti-PR, zaś ER – 0,5 μg przeciwciał anti-ER (Ryc. 14A). Do właściwych doświadczeń ko-immunoprecypitacji komórki linii T47D „głodzono” przez noc w pożywce DMEM bez surowicy oraz bez czerwieni fenolowej, a następnie stymulowano E2 (10 nM) i P4 (100 nM) przez 24 godziny (czas stymulacji wybrany na podstawie (Mohammed et al., 2015)), samym FGF7 (50 ng/ml) oraz mieszaniną E2, P4 i FGF7. Analiza Western blotting frakcji wyprecypitowanej wykazała, iż sam PR precypitował się wydajnie, jednak w żadnym z warunków stymulacji nie udało się ko-precypitować ER (Ryc. 14B). W związku z tym w kolejnych doświadczeniach postanowiono zmienić warunki lizy komórek na „łagodniejsze”, z zastosowaniem 0,2% Triton X-100 oraz 0,8% Brij, oraz czas stymulacji E2 i P4, na odpowiednio 3 oraz 24 godziny. Zmiany te nie przyniosły jednak oczekiwanego rezultatu, ponieważ w dalszym ciągu ER i PR immunoprecypitowały się pojedynczo, lecz nie w kompleksie (Ryc. 14C). Kolejną modyfikacją doświadczenia było zastosowanie sieciowania białek komórkowych przy pomocy 1% paraformaldehydu, które poprzedzało lizę komórek. Użycie paraformaldehydu jako związku sieciującego białka zmieniło wzór prążków wyprecypitowanego PR, jednak ponownie analiza Western blotting wykazała wyprecypitowane pojedyncze receptory ER oraz PR (Ryc. 14D).



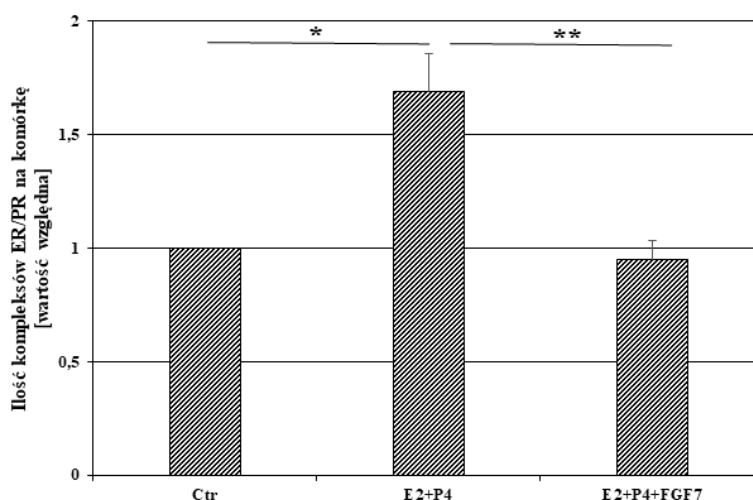
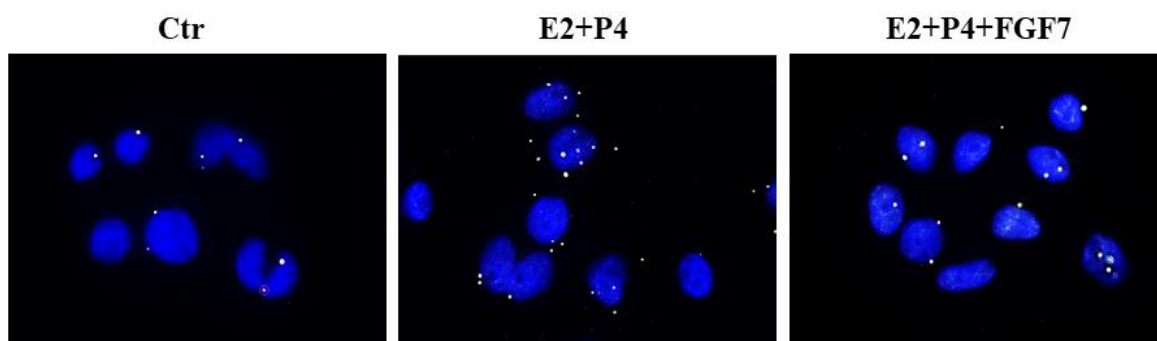
Rycina 14. Doświadczenia immunoprecypitacji ER oraz PR z komórek linii T47D. (A) Optymalizacja ilości przeciwciał użytych do immunoprecypitacji ER i PR; (B) Immunoprecypitacja PR z komórek linii T47D po 24-godzinnych stymulacjach E2 (10 nM) i P4 (100 nM), lub FGF7 (50 ng/ml), lub E2 i P4 i FGF7 w warunkach lizy w 1% Triton X-100; (C) Immunoprecypitacja ER oraz PR z komórek linii T47D stymulowanych E2 i P4 przez 3 bądź 24 godziny, z „łagodnymi” warunkami lizy (0,2% Triton X-100 oraz 0,8% Brij); (D) Immunoprecypitacja ER oraz PR z komórek linii T47D stymulowanych E2 i P4 przez 3 bądź 24 godziny, z dodatkowo zastosowanym sieciowaniem białek przy pomocy 1% paraformaldehydu oraz lizą w 1% Triton X-100. Kontrolę (Ctr) stanowią komórki „głodzone” w pożywce bezsurowiczej i bez czerwieni fenolowej. Detekcji dokonano techniką Western blotting, wykorzystując przeciwciała I-rzędowe pochodzące z innego gatunku niż przeciwciała użyte do immunoprecypitacji.

Analizę interakcji białko-białko można przeprowadzać wieloma metodami. Stosunkowo nową techniką, charakteryzującą się wysoką czułością i specyficznością, jest test PLA (ang. *Proximity Ligation Assay*), który umożliwia badanie takich oddziaływań zarówno w hodowlach *in vitro*, jak i w tkance. Doświadczenia optymalizacyjne, badające kinetykę tworzenia kompleksu ER-PR wykazały, iż w komórkach linii T47D oraz CAMA-1 najczęściej interakcji pomiędzy dwoma receptorami obserwuje się po 60 minutach stymulacji E2 i P4 (wyniki niezałączone do pracy). Co istotne, FGF7 w obecności hormonów steroidowych redukuje ilość oddziaływań ER i PR do poziomu charakterystycznego dla komórek w warunkach kontrolnych (Ryc. 15A i B). Warto wspomnieć, iż obserwowane w postaci fluorescencyjnych żółtych punktów kompleksy ER-PR lokalizowały się głównie w jądrze komórkowym. Uzyskane wyniki pokazują, iż sygnalizacja FGF7-zależna negatywnie reguluje tworzenie się kompleksu ER-PR w komórkach luminalnego raka piersi w obecności hormonów steroidowych. Ilość takich kompleksów w jednej komórce jest stosunkowo niewielka, stąd też do ich detekcji najskuteczniejsze są metody wysokoczułe, jak np. PLA.

A.



B.



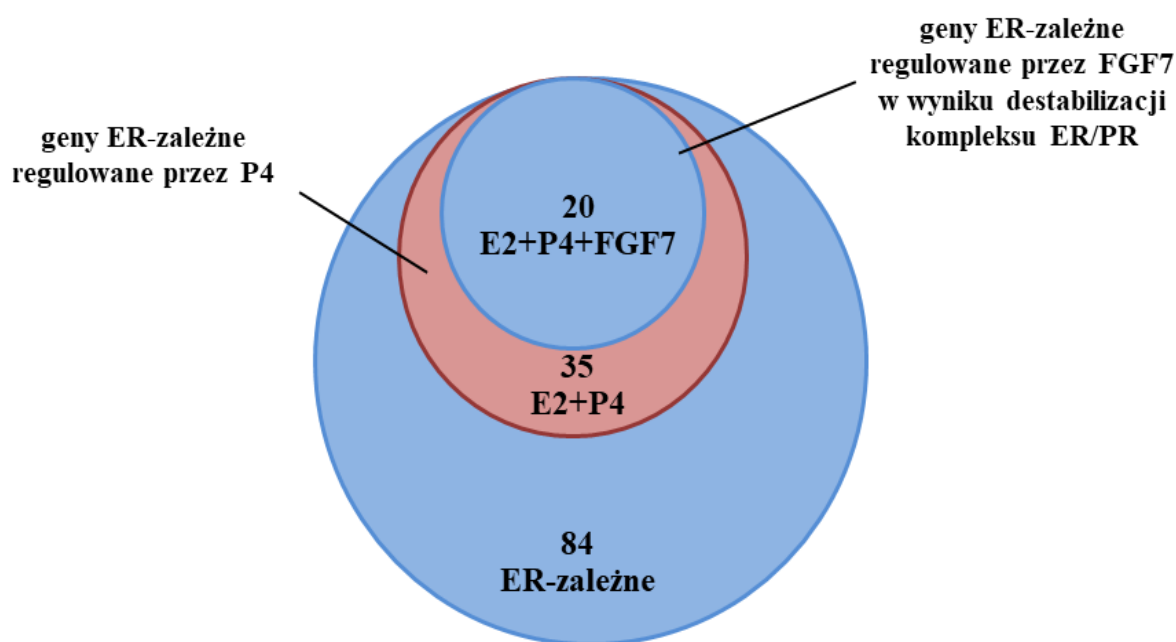
Rycina 15. Stymulacja FGF7 hamuje indukowane przez hormony steroidowe tworzenie się kompleksu ER-PR. Komórki linii T47D (A) oraz CAMA-1 (B) stymulowano E2 (10 nM) i P4 (100 nM) lub FGF7 (50 ng/ml) w obecności obu hormonów steroidowych przez 60 minut. Detekcję powstałych kompleksów wykonano metodą PLA. Kontrolę stanowiły komórki głodzone przez noc w pożywce bezsurowiczej i bez czerwieni fenolowej; n=3; * p<0,05, ** p<0,005.

5.4. Ocena wpływu FGFR2 na aktywność transkrypcyjną ER

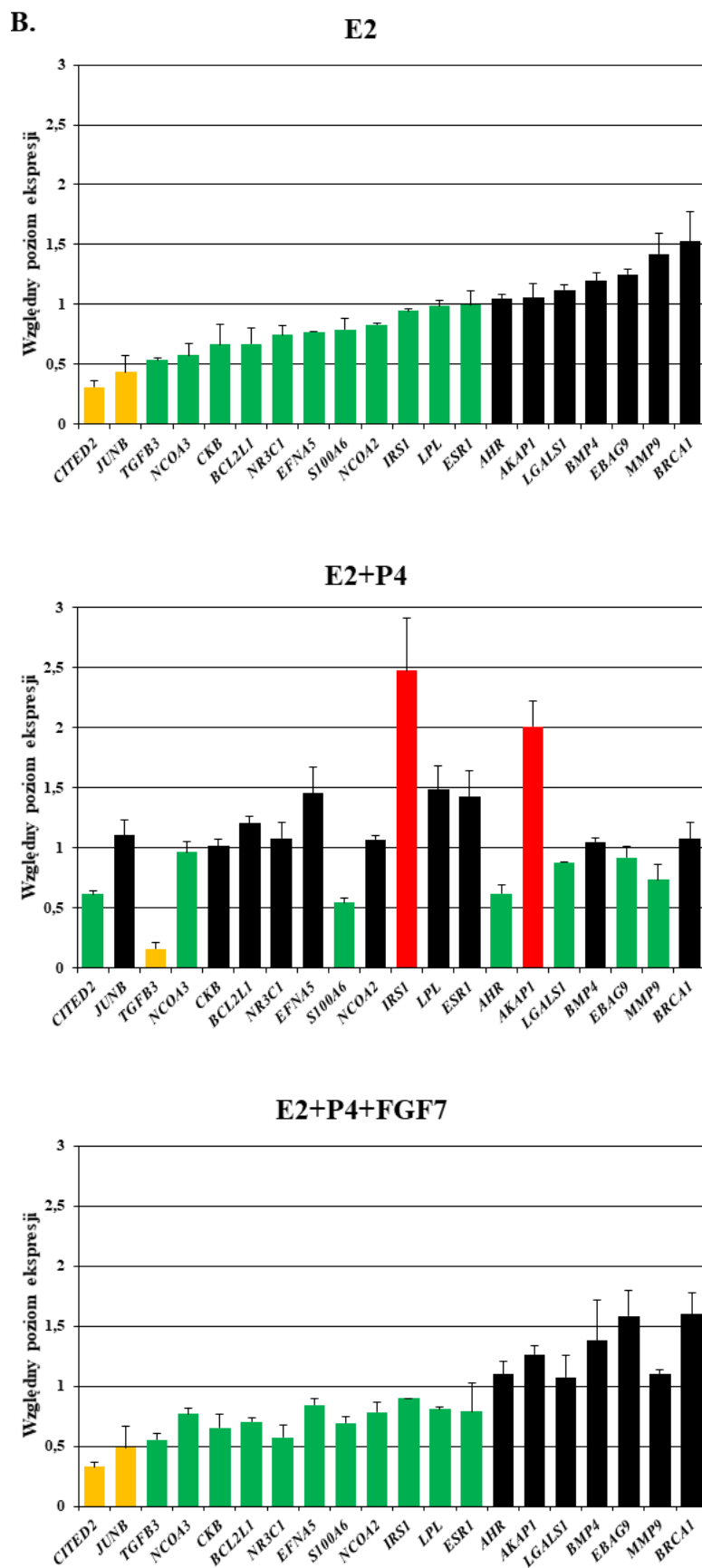
Z racji tego, iż progesteron może modulować aktywność transkrypcyjną ER poprzez tworzenie kompleksu z PR i zmianę miejsca wiązania receptora na chromatynie, prowadząc tym samym do ekspresji genów związanych z dobrym rokowaniem pacjentek z luminalnym rakiem piersi (Mohammed et al., 2015), a FGFR2 reguluje formowanie takiego kompleksu (co wykazano w sekcji powyżej), postanowiono sprawdzić jak sygnalizacja FGF7/FGFR2 będzie wpływała na regulowaną przez PR ekspresję genów ER-zależnych. W tym celu zastosowano RT² Profiler PCR Array – zestaw dedykowany do analizy ekspresji panelu 84 genów regulowanych przez ER. Układ doświadczalny obejmował komórki linii T47D, które po całonocnym „głodzeniu” w pożywce bezsurowiczej i bez czerwieni fenolowej przez 12 godzin traktowano E2 (10 nM) i/lub P4 (100 nM), i/lub FGF7 (50 ng/ml). Uzyskane wyniki wskazują,

iż progesteron w obecności 17β -estradiolu powoduje zmianę profilu ekspresji 35 spośród 84 analizowanych genów ER-zależnych, potwierdzając tym samym wcześniejsze doniesienia o znaczeniu PR w regulacji aktywności transkrypcyjnej ER. Dodatkowo, traktowanie komórek FGF7 w obecności obu hormonów steroidowych przywracało profil ekspresji 20 ze zmienionych wcześniej przez P4 35 genów, do poziomu ekspresji charakterystycznego dla komórek traktowanych jedynie E2 (Ryc. 16A). Wyniki te dodatkowo podkreślają rolę sygnalizacji indukowanej przez FGF7 w regulacji formowania kompleksu pomiędzy dwoma receptorami dla hormonów steroidowych, co skutkuje zmianą sygnatury genowej w kierunku ER-zależnej, tj. napędzającej proliferację komórek luminalnego BCa. Wśród genów ER-zależnych, regulowanych przez FGF7 w wyniku destabilizacji kompleksu ER-PR, znalazły się: *CITED2*, *JUNB*, *TGFB3*, *NCOA3*, *CKB*, *BCL2L1*, *NR3C1*, *EFNA5*, *S100A6*, *NCOA2*, *IRS1*, *LPL*, *ESR1*, *AHR*, *AKAP1*, *LGALS1*, *BMP4*, *EBAG9*, *MMP9*, *BRCA1* (Ryc. 16B). Zidentyfikowane geny stanowiły punkt wyjścia zarówno do dalszych badań molekularnych *in vitro*, jak i analiz materiału klinicznego od pacjentek z luminalnym rakiem piersi, co zostanie omówione w kolejnych częściach pracy.

A.

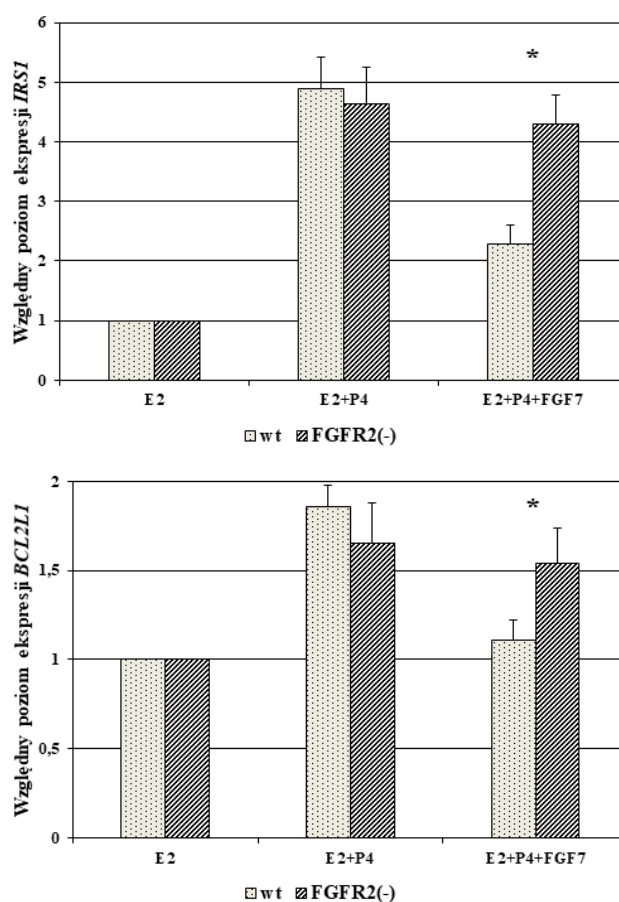


Rycina 16. FGF7 odwraca aktywność transkrypcyjną kompleksu ER/PR w komórkach BCa linii T47D. (A) Diagram Venna ilustrujący ilość genów ER-zależnych z RT² Profiler PCR Array (84 geny), których ekspresja zmieniła się pod wpływem stymulującego powstanie kompleksu ER-PR progesteronu (35 genów, kolor różowy), a spośród których 20 zostało zidentyfikowanych jako geny ER-zależne regulowane przez FGF7 w obecności hormonów steroidowych (najmniejsze niebieskie koło); (B) Wykresy prezentujące zmieniający się względny poziom ekspresji 20 zidentyfikowanych genów pod wpływem E2 (górny wykres), E2 i P4 (środkowy wykres) oraz FGF7 w obecności obu hormonów (dolny wykres); kontrolę stanowiły komórki gładzone; n=3.



Rycina 16. Ciąg dalszy

Aby jednoznacznie potwierdzić, iż to FGFR2 jest mediatorem w FGF7-zależnej regulacji aktywności transkrypcyjnej kompleksu ER-PR, do kolejnych doświadczeń użyto wariantu linii T47D FGFR2(-). Należy wspomnieć, iż doświadczenia te obejmowały klasyczne testy qPCR, w których analizowano ekspresję dwóch genów ER-zależnych (*IRS1* oraz *BCL2L1*), wybranych na podstawie RT² Profiler PCR Array oraz dodatkowych doświadczeń optymalizacyjnych (wyniki niezłączone do pracy), stanowiących swoiste biomarkery aktywności ER. W tym wypadku komórki linii T47D oraz T47D FGFR2(-) przez trzy dni rosły w pożywce DMEM bez czerwieni fenolowej, suplementowanej 10% surowicą oczyszczaną na węglu aktywnym, po czym były głodzone przez noc w pożywce bezsurowiczej, a następnie przez 8 godzin traktowano je E2 (10 nM), E2 i P4 (100 nM) oraz FGF7 (50 ng/ml) w obecności E2 i P4. Zaobserwowano, iż w komórkach T47D progesteron, w obecności 17 β -estradiolu, powodował zwiększenie poziomu ekspresji obu badanych genów, zaś FGF7 odwracał ten efekt. W komórkach linii T47D FGFR2(-) efekty wywołane przez stymulację FGF7 zostały zniesione, co jasno wskazuje na udział ścieżki FGF7/FGFR2 w regulacji P4-zależnej aktywności transkrypcyjnej ER (Ryc. 17).



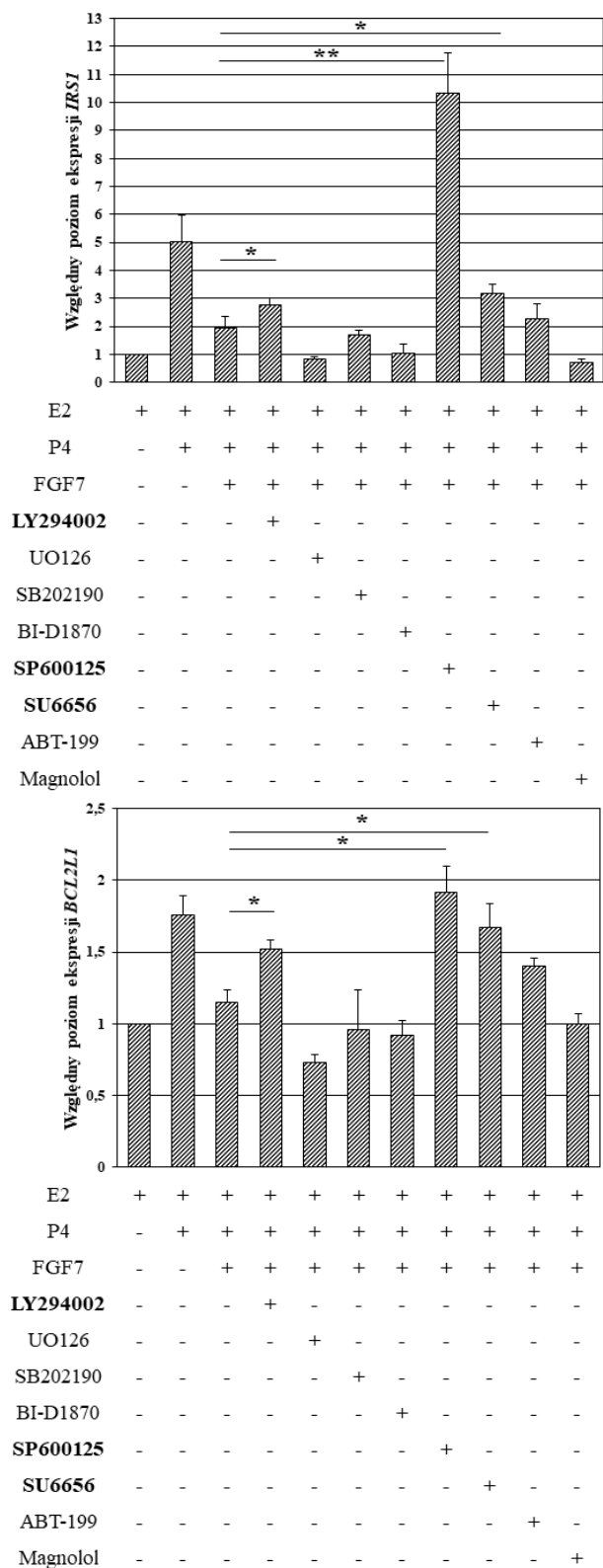
Rycina 17. Sygnalizacja FGF7/FGFR2 reguluje aktywność transkrypcyjną ER-PR. Komórki linii T47D oraz T47D FGFR2(-) przez 8 godzin traktowano E2 (10 nM), E2 i P4 (100 nM) oraz FGF7 (50 ng/ml) w obecności E2 i P4. Analizę względnego poziomu ekspresji genów *IRS1* oraz *BCL2L1* wykonano metodą qPCR; n=3; * p < 0,05.

5.5. Identyfikacja FGF7/FGFR2-zależnej ścieżki sygnalizacyjnej zaangażowanej w regulację ER i PR

FGFR2-zależna sygnalizacja obejmuje aktywację szeregu kaskad sygnalizacyjnych, takich jak: MAPK, PI3K/AKT, JAK/STAT czy PLC γ /PKC (Eswarakumar et al., 2005; Wesche et al., 2011). W związku z wykazaniem w niniejszej pracy wpływem ścieżki FGF7/FGFR2 na fosforylację ER i PR, destabilizację kompleksu ER-PR oraz zmianę regulowanej przez P4 aktywności transkrypcyjnej ER, w kolejnych doświadczeniach podjęto próbę identyfikacji konkretnej kaskady sygnalizacyjnej zaangażowanej efekty regulowane przez FGFR2. W tym celu postanowiono przetestować wpływ inhibitorów szerokiej palety kinaz, będących częścią poszczególnych szlaków sygnalizacyjnych, na zmianę poziomu ekspresji testowanych wcześniej genów *IRS1* oraz *BCL2L1* (jako biomarkerów aktywności transkrypcyjnej ER), w obecności FGF7 oraz obu hormonów steroidowych. Warunki doświadczenia były zbliżone do zastosowanych dla wcześniejszych testów qPCR, tj. komórki linii T47D przez 3 dni rosły w pożywce DMEM bez czerwieni fenolowej, suplementowanej 10% surowicą pozbawioną hormonów steroidowych, po czym „głodzono” je przez noc w pożywce bezsurowiczej, a następnie przez 8 godzin traktowano E2 (10 nM), E2 i P4 (100 nM), FGF7 (50 ng/ml) wraz z E2 i P4, lub danym testowanym inhibitorem wraz z FGF7, E2 i P4. Zastosowane inhibitory obejmowały: LY294002 (inhibitor PI3K), UO126 (inhibitor ERK1/2), SB202190 (inhibitor p38), BI-D1870 (inhibitor RSK), SP600125 (inhibitor JNK), SU6656 (inhibitor Src), ABT-199 (inhibitor Bcl-2) oraz Magnolol (inhibitor NF κ B). Uzyskane wyniki potwierdziły obserwowany uprzednio wpływ progesteronu oraz FGF7 na względny poziom ekspresji *IRS1* oraz *BCL2L1*, tj. P4 powodował wzrost poziomu ekspresji obu ER-zależnych genów, zaś stymulacja FGF7 w obecności E2 i P4 znosiła efekty P4 i obniżała ich poziom względnej ekspresji do charakterystycznego dla komórek traktowanych jedynie E2. Dodatkowo, spośród wszystkich zastosowanych inhibitorów jedynie LY294002, SP600125 oraz SU6656 zauważalnie znosiły efekty FGF7-zależne, przy najsilniejszym wpływie inhibitora JNK dla obu analizowanych genów (Ryc. 18).

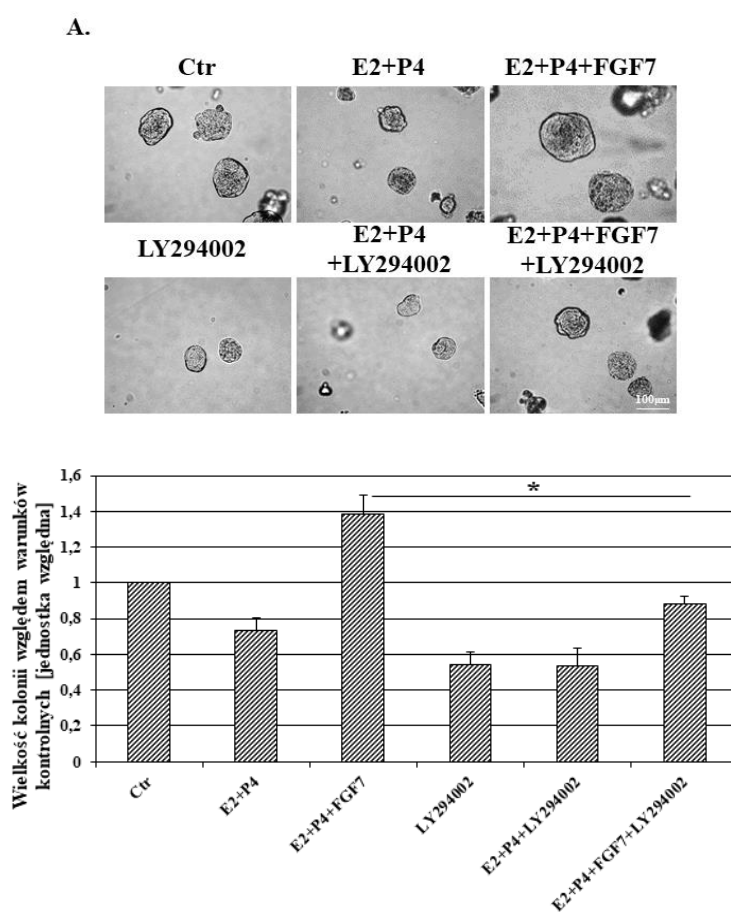
Powyższe doświadczenie wytypowało trzy ścieżki sygnalizacyjne, PI3K/Akt, MAPK/JNK oraz ścieżkę Src, które potencjalnie mogą być zaangażowane w regulowaną przez FGFR2 aktywność ER w obecności obu hormonów. Aby potwierdzić uzyskane w testach qPCR efekty danych inhibitorów na zmianę poziomu względnej ekspresji *IRS1* i *BCL2L1* oraz jednoznacznie wskazać konkretną ścieżkę sygnalizacyjną indukowaną przez FGF7 w obecności

E2 i P4, postanowiono sprawdzić ich wpływ na wzrost komórek luminalnego raka piersi modelowej linii komórkowej T47D w hodowlach 3D w Matrigelu.

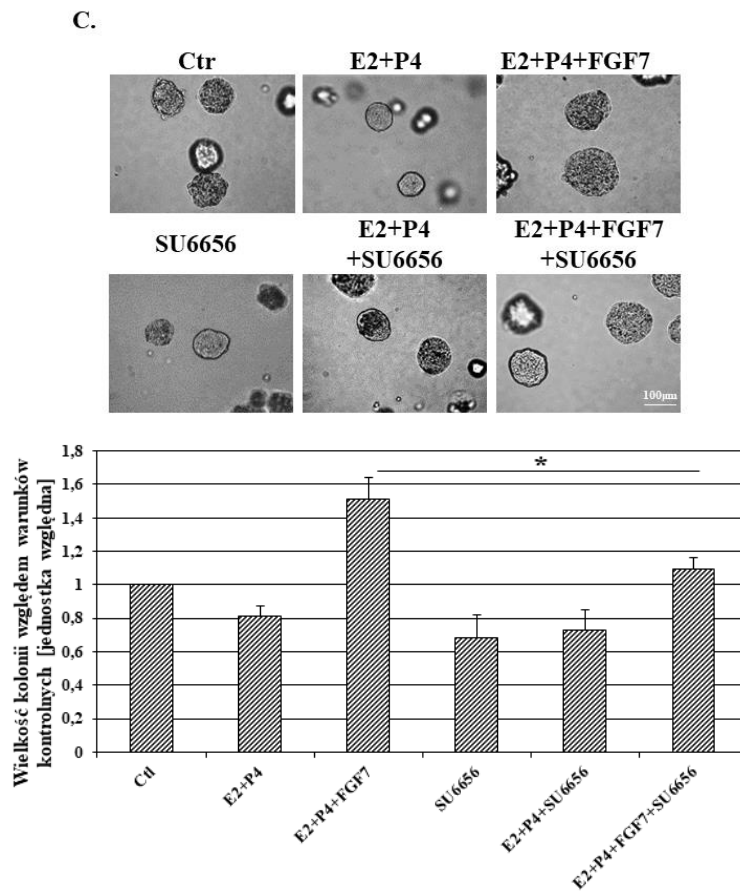
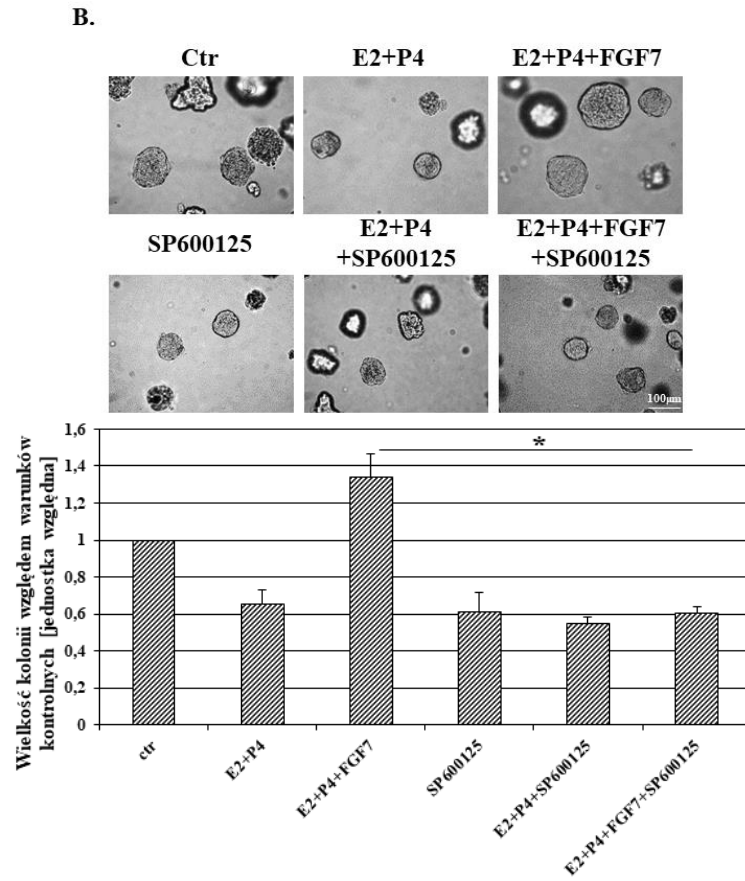


Rycina 18. Identyfikacja ścieżki sygnalizacyjnej zaangażowanej w regulowaną przez FGF7 aktywność transkrypcyjną ER w obecności E2 i P4. Komórki linii T47D przez 8 godzin traktowano inhibitorami poszczególnych kinaz w obecności E2 (10 nM), P4 (100 nM) oraz FGF7 (50 ng/ml). Analizę względnego poziomu ekspresji genów *IRS1* (górny wykres) oraz *BCL2L1* (dolny panel) wykonano metodą qPCR; n=3; * p<0,05, ** p<0,005.

Po pierwsze, po raz kolejny potwierdzono, iż P4 hamuje ER-zależny wzrost komórek, zaś FGF7 znosi ten efekt (Ryc. 19). Po drugie, same inhibitory (LY294002, SP600125 oraz SU6656) hamowały wzrost komórek w zakresie 30-45%. Dodatkowo, ich zastosowanie znosiło efekt FGF7 na negatywny wpływ P4 wobec E2-zależnego wzrostu (Ryc. 19). Co istotne, efekt ten był szczególnie widoczny w przypadku inhibitora kinazy JNK (Ryc. 19B). Niniejsze wyniki sugerują, iż to ścieżka MAPK z udziałem kinazy JNK jest kluczowym mediatorem między aktywowanym przez FGF7 receptorem FGFR2, a receptorami dla hormonów steroidowych, ER i PR.



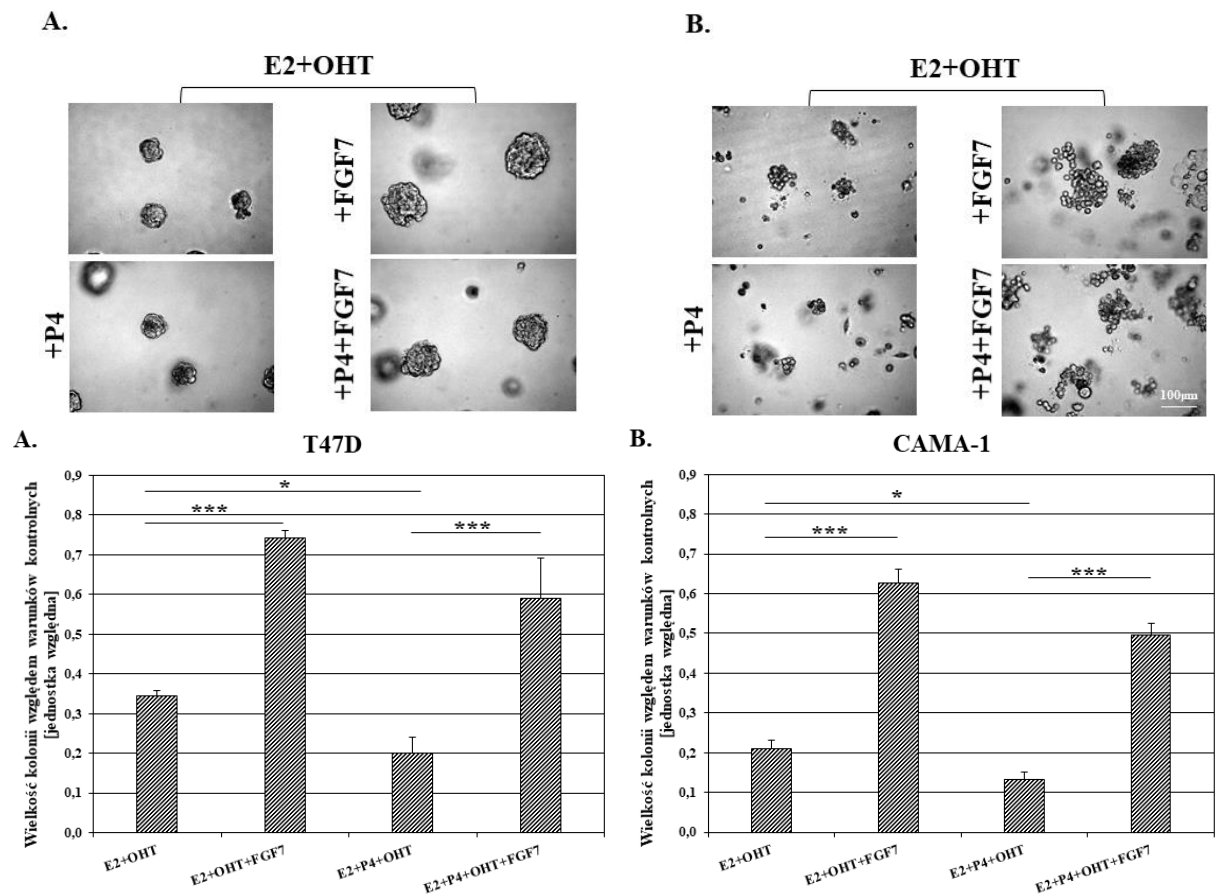
Rycina 19. Ścieżka sygnalizacyjna JNK jest zaangażowana w regulowany przez FGF7/FGFR2 hormono-zależny wzrost komórek BCa. Komórki linii T47D zawieszono w Matrigelu i hodowano przez 14 dni w pełnej pożywce z inhibitorami (A) PI3K (LY294002; 2 μ M), (B) JNK (SP600125; 2 μ M) lub (C) Src (SU6656; 2 μ M), w obecności hormonów steroidowych – E2 (10 nM) i P4 (100 nM), i/lub FGF7 (50 ng/ml). Warunki kontrolne (Ctr) stanowiły komórki rosnące w pełnej pożywce. Wykonano reprezentatywne zdjęcia, a średnicę pojedynczych kolonii zmierzono przy pomocy programu ImageJ, po czym dokonano analizy statystycznej; n=3; * p<0,05.



Rycina 19. Ciąg dalszy.

5.6. Analiza roli FGFR2 w odpowiedzi na terapię anti-ER

Jak do tej pory w projekcie dowiedziono, iż sygnalizacja FGF7/FGFR2 negatywnie reguluje formowanie kompleksu ER-PR oraz znosi wpływ P4 na ER-zależną aktywność transkrypcyjną, co odzwierciedlone jest we wzroście komórek w hodowlach 3D w Matrigelu. Dodatkowo, w związku z udokumentowanym już wcześniej wpływem progesteronu na promocję anti-proliferacyjnego efektu tamoksyfenu (Mohammed et al., 2015), w kolejnych doświadczeniach postanowiono sprawdzić wpływ relacji FGFR2/ER/PR na odpowiedź komórek linii T47D oraz CAMA-1 na tą najpowszechniej stosowaną terapię anti-ER u pacjentek z luminalnym rakiem piersi. W hodowlach 3D w Matrigelu zaobserwowano, iż FGF7 znosi, a progesteron w sposób istotny statystycznie pogłębia hamujący wzrost komórek wpływ 4-hydroksytamoksyfenu (OHT). Co istotne, w obu modelowych liniach komórkowych FGF7 hamował efekt P4 oraz znacząco obniżał skuteczność OHT, sugerując możliwe zaangażowanie sygnalizacji FGF-zależnej w proces wykształcania się oporności na terapię celujące w ER (Ryc. 20A i B).



Rycina 20. FGF7 znosi hamujący wzrost komórek BCa efekt tamoksyfenu. Komórki linii (A) T47D oraz (B) CAMA-1 zawieszono w Matrigelu i hodowano przez 14-18 dni w pełnej pożywce z dodatkiem E2 (10 nM) oraz 4-hydroksytamoksyfenu (OHT; 1 μ M) i/lub P4 (100 nM), i/lub FGF7 (50 ng/ml). Warunki kontrolne stanowiły komórki rosnące w pełnej pożywce. Wykonano reprezentatywne zdjęcia, a średnicę pojedynczych kolonii zmierzono przy pomocy programu ImageJ, po czym dokonano analizy statystycznej; n=3 * p<0,05; *** p<0,001.

5.7. Znaczenie kliniczne FGFR2 u pacjentek z ER+/PR+ rakiem piersi

Opisane dotychczas w pracy wyniki badań *in vitro* wskazują, iż sygnalizacja FGF7/FGFR2 jest zaangażowana w regulację aktywności ER – kluczowego receptora oraz czynnika transkrypcyjnego w luminalnym raku piersi. Aby zweryfikować czy wyniki otrzymane *in vitro* mają rzeczywiste znaczenie kliniczne, ostatni etap projektu obejmował analizę materiału pochodzącego od pacjentek z hormono-zależnym rakiem piersi. Dzięki wieloletniej współpracy z Zakładem Patologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (dr hab. Hanna Romańska, prof. Radzisław Kordek oraz lek. med. Marcin Braun) dysponujemy dostępem do banku tkanek. W projekcie doktorskim użyty został materiał pochodzący od 291 pacjentek, w wieku 52-70 lat, ze zdiagnozowanym ER-dodatnim inwazyjnym rakiem piersi, zbieranym w latach 2008-2018 w Wojewódzkim Wielospecjalistycznym Centrum Onkologii i Traumatologii im. M. Kopernika w Łodzi oraz Świętokrzyskim Centrum Onkologii. Fragmenty tkanki nowotworowej były utrwalone w formalinie i zatopione w bloczkach parafinowych. Status receptorowy ER, PR i HER2, indeks proliferacyjny Ki67 oraz poziom ekspresji FGFR2 (na podstawie barwienia immunohistochemicznego) badanych wycinków został oceniony przez dwóch niezależnych patologów. Spośród wszystkich 291 ER-dodatnich guzów 226 charakteryzowało się ekspresją obu receptorów dla hormonów steroidowych (ER i PR), z czego 194 przypadki stanowiły pacjentki postmenopauzalne, a 32 przedmenopauzalne (Tab. 2). Wyizolowany RNA z opisanych 226 ER+/PR+ wycinków stanowił materiał do analizy profilu ekspresji 21 genów, wybranych na podstawie doświadczeń *in vitro* w testach RT² Profiler PCR Array, przy wykorzystaniu systemu nCounter[®] technologii NanoString („złotego standardu” dla oceny poziomu ekspresji danego mRNA w tkance utrwalonej w parafinie).

Status receptorowy	Status menopauzalny - postmenopauzalne	Status menopauzalny - przedmenopauzalne	
Liczba przypadków ER+/PR+	194	32	226
% przypadków w grupie ER+/PR+	85.84%	14.16%	
% wszystkich przypadków ER+	66.67%	11.00%	77.67%
Wszystkie przypadki ER+	256	35	291
% wszystkich przypadków ER+	87.97%	12.03%	100%

Tabela 2. Tabela przedstawiająca częstości przypadków ER+/PR+ w analizowanej grupie pacjentek, z podziałem uwzględniającym ich status menopauzalny w momencie rozpoznania choroby.

Analizy statystyczne poziomu ekspresji wybranych genów w grupach przed- i postmenopauzalnych wykazały, iż jedynym genem, którego ekspresja w sposób istotny statystycznie różni się w obu grupach pacjentek, jest gen *ESR1* (kodujący ER) (Tab. 3). Jest to zgodne z danymi literaturowymi, które wskazują na wyższy poziom ekspresji ER u pacjentek postmenopauzalnych (Bertuzzi et al., 1981; Wilking et al., 1989). Stąd też, biorąc pod uwagę uzyskane w pracy wyniki z badań *in vitro*, wskazujące na zaangażowanie FGFR2 w regulację aktywności transkrypcyjnej ER, postanowiono skorelować ekspresję profilu wybranych genów ER-zależnych z poziomem ekspresji FGFR2 (na poziomie białka, barwienie immunohistochemiczne).

Gen	Średni poziom ekspresji		p (korekta Benjamini-Hochberg)
	Przedmenopauzalne	Postmenopauzalne	
<i>ESR1</i>	10.55	11.91	<0.0001
<i>CKB</i>	8.11	7.52	>0.05
<i>IRS1</i>	8.17	7.81	>0.05
<i>CITED2</i>	10.15	10.37	>0.50
<i>EBAG9</i>	9.42	9.55	>0.50
<i>LPL</i>	7.59	7.32	>0.50
<i>LGALS1</i>	12.90	12.75	>0.50
<i>NR3C1</i>	8.27	8.14	>0.50
<i>AKAP1</i>	8.14	8.03	>0.50
<i>TGFB3</i>	9.32	9.13	>0.50
<i>CCL2</i>	10.13	9.98	>0.50
<i>BMP4</i>	7.21	7.36	>0.50
<i>MMP9</i>	8.37	8.13	>0.50
<i>NCOA3</i>	8.94	9.01	>0.50
<i>JUNB</i>	11.48	11.60	>0.50
<i>BRCA1</i>	6.54	6.60	>0.50
<i>BMP7</i>	5.71	5.63	>0.50
<i>AHR</i>	10.35	10.32	>0.50
<i>BCL2L1</i>	9.85	9.87	>0.50
<i>SI00A6</i>	11.91	11.92	>0.50
<i>EFNA5</i>	6.47	6.46	>0.50

Tabela 3. Profil ekspresji genów ER-zależnych w grupie pacjentek ER+/PR+, w zależności od ich statusu menopauzalnego; przedmenopauzalne, n=32; postmenopauzalne, n=194; p<0.05 traktowane są jako statystycznie istotne.

Genami, które pozytywnie i istotnie statystycznie korelowały z FGFR2 były *BCL2L1*, *S100A6*, *IRS1*, *AHR*, *JUNB*, *MMP9*, *EFNA5*, *BRCA1* oraz *CCL2* (Tab. 4). Aby mieć pełen obraz wpływu tła hormonalnego na obserwowane relacje FGFR2/ER postanowiono sprawdzić w jaki sposób badane geny będą korelowały z FGFR2 w obrębie grupy przed- i postmenopauzalnej. I tak, genami silnie dodatnio korelującymi z FGFR2 u pacjentek przedmenopauzalnych były *JUNB* oraz *S100A6* (Tab. 5), zaś w grupie postmenopauzalnej były to *BCL2L1*, *MMP9*, *IRS1* oraz *BRCA1* (Tab. 6). Sugeruje to, iż na FGFR2-regulowaną aktywność transkrypcyjną ER znaczący wpływ ma tło hormonalne, a więc obecność obu hormonów – estradiolu oraz progesteronu.

Gen	R (Spearman)	p (korekta Benjamini-Hochberg)
<i>BCL2L1</i>	0.248503	<0.005
<i>S100A6</i>	0.220078	<0.05
<i>IRS1</i>	0.196928	<0.05
<i>AHR</i>	0.192656	<0.05
<i>JUNB</i>	0.190624	<0.05
<i>MMP9</i>	0.172355	<0.05
<i>EFNA5</i>	0.170972	<0.05
<i>BRCA1</i>	0.170240	<0.05
<i>CCL2</i>	0.150391	<0.05
<i>CKB</i>	0.142134	>0.05
<i>LGALS1</i>	0.141058	>0.05
<i>NCOA3</i>	0.128377	>0.05
<i>NR3C1</i>	0.111271	>0.05
<i>TGFB3</i>	0.110279	>0.05
<i>LPL</i>	0.105338	>0.05
<i>CITED2</i>	0.096186	>0.05
<i>ESR1</i>	0.068621	>0.05
<i>EBAG9</i>	-0.062332	>0.05
<i>AKAP1</i>	0.053590	>0.05
<i>BMP4</i>	0.045255	>0.05
<i>BMP7</i>	-0.013841	>0.05

Tabela 4. Korelacja ekspresji genów ER-zależnych z poziomem ekspresji FGFR2 (na podstawie oceny IHC) w grupie wszystkich pacjentek ER+/PR+; R – współczynnik korelacji rang Spearmana; n=226; p<0.05 traktowane są jako statystycznie istotne.

Gen	R (Spearman)	p (korekta Benjamini-Hochberg)
<i>JUNB</i>	0.512915	<0.05
<i>SI00A6</i>	0.479478	<0.05
<i>TGFB3</i>	0.436680	>0.05
<i>CITED2</i>	0.303770	>0.05
<i>NR3C1</i>	0.285213	>0.05
<i>LGALS1</i>	0.266656	>0.05
<i>LPL</i>	0.259132	>0.05
<i>BCL2L1</i>	0.253114	>0.05
<i>IRS1</i>	0.212990	>0.05
<i>CCL2</i>	0.180055	>0.05
<i>MMP9</i>	-0.165343	>0.05
<i>NCOA3</i>	-0.152637	>0.05
<i>BMP7</i>	-0.129733	>0.05
<i>ESR1</i>	-0.117863	>0.05
<i>AKAP1</i>	0.095795	>0.05
<i>EBAG9</i>	-0.095294	>0.05
<i>EFNA5</i>	0.066873	>0.05
<i>BMP4</i>	0.049987	>0.05
<i>AHR</i>	-0.040625	>0.05
<i>BRCA1</i>	-0.023907	>0.05
<i>CKB</i>	0.009697	>0.05

Tabela 5. Korelacja ekspresji genów ER-zależnych z poziomem ekspresji FGFR2 (na podstawie oceny IHC) w grupie przedmenopauzalnych pacjentek ER+/PR+; R – współczynnik korelacji rang Spearmana; n=32; p<0.05 traktowane są jako statystycznie istotne.

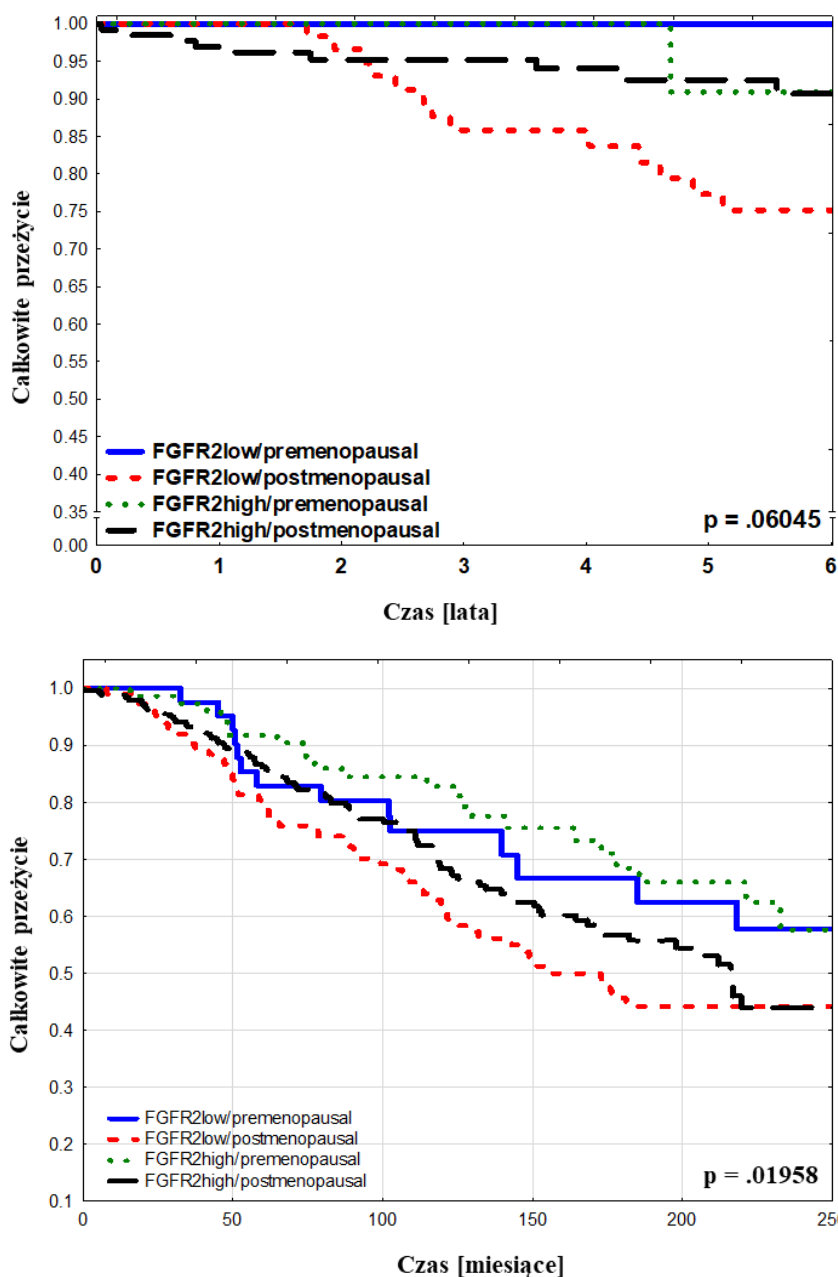
Gen	R (Spearman)	p (korekta Benjamini-Hochberg)
<i>BCL2L1</i>	0.231385	<0.05
<i>MMP9</i>	0.223329	<0.05
<i>IRS1</i>	0.192368	<0.05
<i>BRCA1</i>	0.188076	<0.05
<i>AHR</i>	0.179219	>0.05
<i>EFNA5</i>	0.169514	>0.05
<i>ESR1</i>	0.168385	>0.05
<i>CKB</i>	0.167651	>0.05
<i>SI00A6</i>	0.153844	>0.05
<i>NCOA3</i>	0.119525	>0.05

<i>JUNB</i>	0.113605	>0.05
<i>LGALS1</i>	0.111893	>0.05
<i>CCL2</i>	0.097607	>0.05
<i>LPL</i>	0.092146	>0.05
<i>NR3C1</i>	0.080280	>0.05
<i>BMP4</i>	0.068758	>0.05
<i>CITED2</i>	0.068178	>0.05
<i>EBAG9</i>	-0.066549	>0.05
<i>TGFB3</i>	0.057625	>0.05
<i>BMP7</i>	-0.041618	>0.50
<i>AKAP1</i>	0.036647	>0.50

Tabela 6. Korelacja ekspresji genów ER-zależnych z poziomem ekspresji FGFR2 (na podstawie oceny IHC) w grupie postmenopauzalnych pacjentek ER+/PR+; R – współczynnik korelacji rang Spearmana; n=194; p<0.05 traktowane są jako statystycznie istotne.

Dodatkowo, analiza całkowitego czasu przeżycia badanej grupy pacjentek (6-letni okres obserwacji) wykazała, iż FGFR2 jest istotnym czynnikiem rokowniczym, szczególnie pacjentek postmenopauzalnych. Wysoki poziom ekspresji FGFR2 w tej grupie związany jest dobrym rokowaniem tj. dłuższym czasem całkowitego przeżycia, nie wpływając natomiast znacząco na całkowite przeżycie pacjentek przedmenopauzalnych (Ryc. 21, górny wykres). W związku z tym, iż omawiane wyniki znajdują się na granicy istotności statystycznej, ich znaczenie dodatkowo zweryfikowano w publicznej bazie TCGA (The Cancer Genome Atlas). Warto wspomnieć, iż w tym wypadku analiza obejmowała korelację poziomu mRNA FGFR2 z całkowitym czasem przeżycia łącznie 476 pacjentek przed- i postmenopauzalnych, z dodatkowym wyłączeniem pacjentek HER2-dodatnich (u których FGFR2 silnie korelował z poziomem HER2). Podobnie jak w uprzedniej analizie, obserwuje się istotne statystycznie znaczenie rokownicze poziomu *FGFR2* w grupie pacjentek postmenopauzalnych (wysoki poziom *FGFR2* związany jest z dłuższym czasem przeżycia). Co istotne, w kohorcie pacjentek młodszych, przedmenopauzalnych, efekt ten zanika (Ryc. 21, dolny wykres). Wyniki te po raz pierwszy wskazują, iż dla pacjentek postmenopauzalnych FGFR2 (zarówno na poziomie mRNA jak i białka) jest dobrym czynnikiem rokowniczym, jednak efekt ten nie jest obserwowany u pacjentek przedmenopauzalnych. Sugeruje to większą heterogenność tej grupy chorych i istnienie podgrup wśród młodszych pacjentek, w których FGFR2 jest korzystnym lub niekorzystnym czynnikiem rokowniczym.

Należy również podkreślić, że analizy kliniczne projektu, będące integralną częścią całości badania, wykonane zostały we współpracy z grupą klinicystów z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Zespół ten stworzył bazę danych, wyizolował z tkanek RNA i przeprowadził analizy statystyczne. Autor niniejszej pracy wytypował geny do analizy oraz zinterpretował otrzymane wyniki. Detekcja poziomu ekspresji wybranych genów w materiale biologicznym wykonana została w formie usługi komercyjnej.



Rycina 21. Analiza całkowitego czasu przeżycia pacjentek ER+/PR+ przed- i postmenopauzalnych, z uwzględnieniem poziomu ekspresji FGFR2. Znaczenie prognostyczne FGFR2: górny wykres na poziomie białka (baza danych z Zakładu Patologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi), dolny wykres na poziomie mRNA (dane z bazy TCGA). Estymacja przeżycia została zaprezentowana przy pomocy wykresów Kaplana-Meiera. Wieloczynnikowej analizie przeżycia dokonano przy pomocy modelu proporcjonalnego ryzyka Coxa. Wartości $p < 0.05$ są uznawane jako statystycznie istotne.

PODSUMOWANIE WYNIKÓW

- Analiza poziomu ekspresji FGFR2, ER oraz PR metodą Western blotting w panelu linii komórkowych luminalnego raka piersi wykazała wysoce heterogenny profil ekspresji badanych receptorów, co wiązało się ze zróżnicowaną odpowiedzią badanych linii na estradiol (E2), progesteron (P4) i FGF7 w hodowlach 3D w Matrigelu i kolagenie I.
- Sygnalizacja FGF7/FGFR2 promuje wzrost modelowych linii komórkowych T47D i CAMA-1 w hodowlach 3D oraz znosi hamujące ER-zależną proliferację efekty progesteronu i tamoksyfenu.
- Ścieżka sygnalizacyjna FGF7/FGFR2 w obecności E2 i P4 prowadzi do szybkiej fosforylacji seryny 167 ER oraz seryny 294 PR oraz stabilnej utraty ekspresji PR.
- Stymulacja komórek FGF7 w obecności hormonów steroidowych hamuje tworzenie się kompleksu ER-PR. Dodatkowo, sam kompleks lokalizuje się głównie w jądrze komórkowym.
- Sygnalizacja FGF7/FGFR2 zmienia profil ekspresji genów ER zależnych w obecności E2 i P4.
- c-Jun N-terminalna kinaza (JNK) jest zaangażowana w regulowaną przez FGF7/FGFR2 aktywność transkrypcyjną ER oraz hormono-zależny wzrost komórek.
- FGFR2 reguluje profil ekspresji ER-zależnych genów w sposób zależny od statusu hormonalnego pacjentek. Szczególnie silne pozytywne korelacje u chorych przedmenopauzalnych obserwowane są między FGFR2 a genami *JUNB* i *S100A6*.
- U pacjentek postmenopauzalnych FGFR2 jest dobrym czynnikiem rokowniczym, lecz efekt ten nie jest zauważalny u pacjentek przedmenopauzalnych z luminalnym rakiem piersi.

6. DYSKUSJA

Rak piersi jest najczęściej diagnozowanym nowotworem złośliwym wśród kobiet na świecie, a najpowszechniejszym podtypem tej choroby (do 70% przypadków BCa) są hormono-zależne raki luminalne, charakteryzujące się ekspresją ER (DeSantis et al., 2019). W ich terapii rutynowo stosuje się leczenie hormonalne oparte o regulatory funkcji ER (np. tamoksyfen, fulvestrant itp.). Niestety, pojawiająca się z czasem u zdecydowanej większości pacjentek oporność drastycznie obniża ich rokowania (Clarke et al., 2003; Davies et al., 2011). Stąd też, aktualnym wyzwaniem onkologii nadal pozostaje zarówno zrozumienie mechanizmów molekularnych kierujących lekoopornością, jak i opracowywanie nowych terapii celowanych. Od stosunkowo niedawna stosuje się dodatkowy podział raków luminalnych na podtyp luminalny A (ER+, PR+), charakteryzujący się wolnym wzrostem guza i dobrym rokowaniem, oraz bardziej agresywny podtyp luminalny B (ER+, PR-). Zaobserwowano, iż to właśnie pacjentki z podtypem luminalnym B gorzej odpowiadają i szybciej nabierają oporności na stosowane leczenie anti-ER (Creighton, 2012). Dodatkowo, w ostatnim czasie zaczęto podkreślać anti-proliferacyjne, synergistyczne z efektami terapii tamoksyfenem, właściwości progesteronu (Chen et al., 2011; Vignon et al., 1983). Wykazano także, iż receptory ER i PR tworzą bezpośredni kompleks (Ballaré et al., 2003). W obecności estrogeny oraz progesteronu, a więc tle hormonalnym charakterystycznym dla pacjentek przedmenopauzalnych, PR moduluje aktywnością ER, a formowany kompleks odpowiada za ekspresję panelu genów związanych z dobrym rokowaniem pacjentek z luminalnym rakiem piersi i promuje hamujący wzrost guza efekt tamoksyfenu (Finlay-Schultz et al., 2017; Kabos et al., 2012; Mohammed et al., 2015). Badania te znacząco zmieniły podejście do znaczenia PR w BCa na przestrzeni ostatnich lat. PR przez długi czas opisywany był bowiem jedynie jako biomarker aktywności ER. Obecnie postuluje się, iż odgrywa on kluczową rolę w progresji i terapii choroby, jednak molekularne mechanizmy aktywności PR wciąż pozostają nie do końca poznane.

FGFR2 w kilku meta-analizach został opisany jako gen związany z podwyższonym ryzykiem zachorowania na raka piersi (Cui et al., 2016; Jia et al., 2010). Co istotne, sam receptor aktywnie uczestniczy w komunikacji komórek nowotworowych z mikrośrodowiskiem. W ostatnich pracach naszego zespołu pokazaliśmy, iż sygnalizacja od FGFR2 aktywuje niezależnie ER oraz PR, prowadząc do gorszej odpowiedzi komórek na tamoksyfen oraz utraty PR, cechującej progresję choroby (Piasecka et al., 2016; Turczyk et al., 2017). W związku z powyższym, niniejszy projekt doktorski miał na celu ocenę wpływu FGFR2 na zależność ER-

PR, analizę molekularną badanej interakcji oraz ewaluację jej znaczenia w progresji i terapii luminalnych raków piersi u pacjentek przedmenopauzalnych.

Początkowe etapy projektu obejmowały analizę wzrostu dwóch modelowych linii komórkowych luminalnego raka piersi – T47D oraz MCF7, w hodowlach trójwymiarowych w Matrigelu, w obecności progesteronu i/lub FGF7. Obie linie komórkowe są najczęściej stosowanymi modelami *in vitro* wykorzystywanymi w badaniach nad funkcją receptorów dla hormonów steroidowych (Holliday and Speirs, 2011; Mota et al., 2017). Należy wspomnieć, iż wszystkie doświadczenia w projekcie oceniające wzrost komórek *in vitro* przeprowadzane były z wykorzystaniem hodowli trójwymiarowych. Ich olbrzymią przewagą nad standardowymi hodowlami 2D na plastiku jest bardziej wiarygodne odzwierciedlenie warunków panujących w tkance. Poza klasyczną oceną proliferacji danej linii komórkowej umożliwiają one przeprowadzenie dodatkowych analiz fenotypowych powstających kolonii (Fang and Eglén, 2017; Langhans, 2018). Jednak uzyskane dla obu opisanych linii komórkowych wyniki okazały się być przeciwstawne. Po pierwsze, sam progesteron wywoływał odmienne efekty na wzrost komórek w Matrigelu – hamował proliferację linii T47D, zaś stymulował MCF7. Po drugie, dodatek FGF7 znosił hamujący efekt P4 dla linii T47D, w żaden sposób nie wpływając na stymulujący efekt P4 w MCF7. Co więcej, zmiana warunków hodowli i zastosowanie kolagenu I jako białkowego „rusztowania” do wzrostu komórek nie przyczyniła się zmian w odpowiedzi komórek linii T47D i MCF7 na stymulację hormonalną. Wyniki te, choć w pewnym stopniu zaskakujące, bowiem dotyczyły najpowszechniej stosowanych modelowych linii komórkowych luminalnego raka piersi, wpisują się jednak w pojawiające się w ostatnim czasie doniesienia, które opisują ich odmienną charakterystykę molekularną oraz różną odpowiedź na hormony steroidowe (Aka et al., 2012; Radde et al., 2015; Tian et al., 2018). Linia komórkowa T47D została wybrana jako jeden z modeli badawczych niniejszej pracy, bowiem obserwowany hamujący wzrost efekt progesteronu pokrywał się z danymi literaturowymi, dotyczącymi wpływu tego hormonu zarówno na wzrost komórek *in vitro* oraz w modelu mysim, a także na obniżone ryzyko rozwoju raka piersi (Carroll et al., 2017; Chen et al., 2011; Finlay-Schultz et al., 2017; Mohammed et al., 2015). Z racji tego, iż luminalne raki piersi są nowotworami ER-zależnymi (Nielsen et al., 2010; Prat et al., 2015), w niniejszej pracy starano się jak najdokładniej odzwierciedlić tło hormonalne pacjentek przedmenopauzalnych (z wysokim stężeniem estradiolu oraz progesteronu) (Hamilton et al., 2017; Taraborrelli, 2015), oceniając przy tym wpływ sygnałów pochodzących z mikrośrodowiska guza (w postaci sygnalizacji od czynników wzrostu, tutaj FGF7 - specyficznego liganda dla FGFR2 (Stauber et al., 2000; Zhang

et al., 2006; Zhang et al., 2010)) na hormono-zależny wzrost komórek. W takich warunkach P4 hamował E2-zależny wzrost komórek linii T47D, ale co ważniejsze, FGF7 znosił negatywny dla wzrostu komórek efekt P4.

Jak do tej pory zidentyfikowano osiemnaście ligandów dla receptorów z rodziny FGFR, które w zależności od ich rozwoju filogenetycznego, a tym samym specyficzności względem receptorów, podzielono na kilka podrodzin. FGF7, razem z FGF3, FGF10 oraz FGF22, należy do podrodziny FGF7, charakteryzującej się największym powinowactwem względem FGFR2 (Ornitz and Itoh, 2001; Ornitz and Itoh, 2015). Jednak aby zdefiniować obserwowane efekty jako stricte FGFR2-zależne, w pracy zastosowano wariant linii komórkowej T47D z wyciszoną ekspresją FGFR2. Taka manipulacja genetyczna skutkowała zniesieniem obserwowanych wcześniej efektów FGF7, jednoznacznie potwierdzając udział ścieżki sygnalizacyjnej FGF7/FGFR2 w hormono-zależnym wzroście komórek. Należy również zwrócić uwagę na fakt, iż komórki T47D FGFR2(-) lepiej odpowiadały na stymulację E2. Ten nieco zaskakujący efekt z pewnością wymaga dalszych analiz. Spekulować można, że „knock-down” FGFR2 powoduje kompensację sygnału poprzez aktywację innej ścieżki molekularnej. Pomimo, że FGF7 wykazuje największe powinowactwo do FGFR2, to może on aktywować także FGFR1, sugerując potencjalne zaangażowanie innego receptora z rodziny FGFR w regulację ER. Najbardziej prawdopodobnym kandydatem wydaje się być właśnie FGFR1, pojawiający się w szeregu najnowszych badań dotyczących udziału receptorów FGFR w funkcjonowaniu ER oraz oporności nabytej na terapię endokrynną. Co istotne, amplifikacja genu *FGFR1*, będąca niezależnym negatywnym czynnikiem prognostycznym, obserwowana jest u 8-20% przypadków chorych na raka piersi (Elbauomy Elsheikh et al., 2007; Perez-Garcia et al., 2018; Shi et al., 2016), a sam receptor FGFR1, poprzez wiązanie do ER, reguluje jego aktywność transkrypcyjną i promuje oporność na inhibitory aromatazy (np. letrozol) (Formisano et al., 2017). Innym wytłumaczeniem wpływu wyciszenia ekspresji *FGFR2* na stymulację wzrostu komórek w obecności E2 może być obserwowana w materiale klinicznym od chorych z luminalnym BCa i prezentowana w niniejszej pracy korelacja niskiego poziomu ekspresji FGFR2 ze złym rokowaniem pacjentek postmenopauzalnych (charakteryzujących się jedynie lokalną produkcją E2). W kilku wcześniejszych pracach zespół prof. Kerstin B. Meyer wykazał udział sygnalizacji FGF10/FGFR2 w estradiolo-zależnym wzroście komórek luminalnego BCa (Campbell et al., 2018; Campbell et al., 2016; Fletcher et al., 2013), lecz zastosowany tu układ doświadczalny nie obejmował obecności progesteronu. Stąd też prezentowane w projekcie doktorskim wyniki po raz pierwszy identyfikują zaangażowanie sygnalizacji FGF7/FGFR2 w

hormono-zależny wzrost komórek nowotworowych przy tle hormonalnym charakterystycznym dla pacjentek przedmenopauzalnych.

Aby wykazać, iż obserwowane efekty nie są specyficzne jedynie dla komórek linii T47D, w kolejnych doświadczeniach przetestowano wpływ badanych stymulacji E2, P4 oraz FGF7 na wzrost w hodowlach 3D w Matrigelu i kolagenie I ER+/PR+ linii komórkowych wybranych na podstawie danych literaturowych (Holliday and Speirs, 2011). Uzyskane wyniki, wraz z dodatkową analizą Western blotting poziomu ekspresji receptorów FGFR2, PR oraz ER, pokazały olbrzymią heterogenność analizowanych linii, zarówno pod kątem wzrostu w obecności hormonów i/lub FGF7, jak i statusu receptorowego. Takie zróżnicowanie w obrębie badanych linii nie jest zaskakujące i odzwierciedla sytuację obserwowaną w klinice. Rak piersi, w oparciu o ocenę IHC ekspresji ER, PR, HER2 oraz indeksu proliferacyjnego Ki67, klasyfikowany jest na 4 główne podtypy – luminalny A, luminalny B, HER2-dodatni oraz trójujemny. Zdefiniowanie molekularnego podtypu choroby pozwala określić rokowania pacjentek oraz stanowi podstawę do doboru odpowiedniego leczenia (Jassem et al., 2018; Malhotra et al., 2010; Reis-Filho and Pusztai, 2011). Jednak pomimo rutynowego stosowania takiej klasyfikacji wciąż obserwuje się grupy pacjentek, które nie odpowiadają na leczenie bądź niezwykle szybko wykształcają oporność na stosowane terapie, sugerując tym samym, iż każdy ze znanych podtypów charakteryzuje się dodatkowym wewnętrznym zróżnicowaniem. Stąd też istotne wydają się badania mające na celu identyfikację nowych białek zaangażowanych w rozwój, progresję oraz efektywność terapii raka piersi. Od kilku lat, wraz z rozwojem technik wysokoprzepustowych, obserwuje się próby dodatkowej dogłębnej klasyfikacji nowotworów gruczołu piersiowego w oparciu o analizy genomowe i transkryptomyczne. Najciekawsze prace związane z taką subklasyfikacją znanych już podtypów publikuje zespół z Uniwersytetu Cambridge, kierowany przez prof. Carlosa Caldas. Analizowana przez nich niestabilność genomowa i zidentyfikowany szereg mutacji w obrębie genów takich jak np.: *PIK3CA*, *TP53*, *GATA3*, *CCND1*, *MAP3K1*, *PTEN*, *MUC16* czy *FLG* pozwoliły na podział badanych przypadków na 10 zdefiniowanych klastrów (opisanych jako „integrative clusters”). Taka molekularna stratyfikacja chorych na raka piersi może nieść za sobą implikacje kliniczne w postaci lepszej oceny rokowania pacjentek oraz precyzyjnej predykcji odpowiedzi na stosowane terapie (Aure et al., 2017; Dawson et al., 2013; Mukherjee et al., 2018; Russnes et al., 2017).

Spośród wszystkich testowanych linii komórkowych jedna w sposób istotny odpowiadała na stymulacje hormonalne E2 i/lub P4 oraz FGF7, a obserwowane efekty były analogiczne do obserwowanych w komórkach T47D, tj. P4 hamował E2-zależny wzrost

komórek w hodowlach 3D w Matrigelu, zaś FGF7 znosił ten efekt. Wybrana linia komórkowa CAMA-1, jest stosunkowo często stosowanym modelem *in vitro* luminalnego raka piersi (Formisano et al., 2017; Leung et al., 1982; Yu et al., 1981), co stanowi o słuszności wyboru takiego modelu badawczego w prezentowanym projekcie doktorskim. W ten sposób pierwszy etap pracy doktorskiej wykazał, iż sygnalizacja FGF7/FGFR2 reguluje zależny od receptorów dla hormonów steroidowych wzrost komórek luminalnego raka piersi dwóch modelowych linii – T47D oraz CAMA-1.

Fakt, że szereg ścieżek sygnalizacyjnych indukowanych przez mikrośrodowisko guza może wpływać na aktywność i funkcje ER oraz PR jasno wskazuje na istotność sygnalizacji parakrynej (w głównej mierze od czynników wzrostu) w progresji hormono-zależnych nowotworów. Jednym z kluczowych mediatorów sygnałów pochodzących z mikrośrodowiska guza jest FGFR2, a jego rola w regulacji zarówno ER jak i PR została udokumentowana w kilku pracach. Po pierwsze, FGFR2 jest opisywany jako ważny regulator aktywności transkrypcyjnej ER. Indukowana przez FGFR2 sygnalizacja promuje wzmocnienie interakcji ER z dwoma czynnikami transkrypcyjnymi, NFIB oraz YBX1, co prowadzi do zahamowania ekspresji genów ER-zależnych, a w rezultacie progresji choroby w kierunku bardziej agresywnego podtypu bazalnego (Campbell et al., 2018). Dodatkowo, utrata ekspresji FGFR2, w wyniku występujących w obrębie jego genu polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNPs), przyczynia się do wzmocnienia odpowiedzi komórek na estrogeny (co dodatkowo pokrywa się z opisanym wcześniej w pracy wzmocnionym wzrostem FGFR2-negatywnego wariantu linii T47D) i zwiększenia ryzyka ER-dodatniego raka piersi (Campbell et al., 2016).

Jak opisaliśmy w jednej z naszych prac, sygnalizacja FGF7/FGFR2 stymuluje fosforylację seryny 167 ER, co prowadzi do późniejszej ubikwitynacji i degradacji receptora w systemie proteasomalnym (Turczyk et al., 2017). Co więcej, FGFR2 kolokalizuje jądrowo z kompleksem PR-STAT5 i odpowiada za regulację ekspresji genów PR-zależnych (Cerliani et al., 2011). Dodatkowo, stymulacja komórek FGF2 oraz FGF7 indukują fosforylację PR, co prowadzi odpowiednio do hormono-niezależnego wzrostu guza, a także do ubikwitynacji i degradacji PR, charakterystycznej dla progresji choroby w kierunku podtypu luminalnego B (Giulianelli et al., 2008; Piasecka et al., 2016). Wszystkie powyższe publikacje opisujące FGFR2-zależną regulację ER oraz PR nie uwzględniają jednak charakterystycznego dla pacjentek przedmenopauzalnych tła hormonalnego. Dlatego też przedstawione w projekcie doktorskim doświadczenia analizujące wpływ FGFR2 na bezpośrednią regulację obu receptorów przeprowadzone zostały w obecności hormonów steroidowych. Analizy Western blotting wykazały wpływ stymulacji FGF7 na stabilną utratę ekspresji PR, bez istotnej zmiany

poziomu ER. Opisane efekty obserwowano w obu badanych liniach komórkowych, a dodatkowe zastosowanie wariantu T47D FGFR2(-) potwierdziło udział FGFR2 w FGF7-zależnej utracie PR. Co więcej, mając na uwadze fakt, iż aktywność ER oraz PR może być modulowana przez szereg modyfikacji post-translacyjnych (Abdel-Hafiz and Horwitz, 2014; Le Romancer et al., 2011), spośród których to fosforylacje poszczególnych seryn obu receptorów wydają się być klinicznie najbardziej istotne (de Leeuw et al., 2011; Hagan et al., 2012; Murphy et al., 2011), w kolejnych etapach projektu postanowiono przeanalizować profil fosforylacji ER i PR. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły zaobserwować, iż sygnalizacja FGF7/FGFR2 prowadzi do fosforylacji seryny 294 PR oraz seryny 167 ER. Oba miejsca fosforylacji zostały już wcześniej scharakteryzowane, zarówno w naszych pracach, jak i w publikacjach innych zespołów. Fosforylacja seryny 294 PR jest odpowiedzialna za hiperaktywację oraz degradację PR w podjednostce 26S proteasomu (Lange et al., 2000; Piasecka et al., 2016; Shen et al., 2001), natomiast fosforylację seryny 167 ER wiąże się z aktywnością szlaku sygnalizacyjnego PI3K/Akt oraz wykształcającą się opornością na tamoksyfen (de Leeuw et al., 2011; Turczyk et al., 2017; Yamashita et al., 2005). Należy również zwrócić uwagę na zaobserwowane uwrażliwienie ER i PR na hormono-zależną fosforylację wyżej opisanych seryn w komórkach T47D z wyciszoną ekspresją FGFR2, co może sugerować pojawienie się mechanizmów kompensujących brak sygnalizacji FGFR2-zależnej. Efekt ten wydaje się być analogicznym do stymulującej aktywności ER i odpowiedzi na estrogeny polimorfizmów genu *FGFR2*, hamujących jego ekspresję (Campbell et al., 2016).

Z racji tego, iż ekspresja *PGR* jest zależna od ER (Shyamala et al., 1992), a nowotwory ER-/PR+ obserwowane są niezwykle rzadko (przez niektórych klinicystów traktowane są nawet jako artefakt immunohistochemiczny) (Chan et al., 2015; Kunc et al., 2018), PR przez długi czas uznawany był jedynie jako czynnik predykcyjny oraz biomarker aktywności ER (Kurozumi et al., 2017). Aktualne doniesienia zaczęły jednak podkreślać rolę PR w modulowaniu funkcji ER. W obecności estrogenów i progesteronu oba receptory tworzą bezpośredni kompleks, który jest niezwykle istotnym czynnikiem wpływającym na progresję i terapię luminalnych raków piersi (Diep et al., 2016; Finlay-Schultz et al., 2017; Giulianelli et al., 2012; Mohammed et al., 2015). Co więcej, w ostatnich latach intensywnie prowadzone są badania dotyczące zastosowania agonistów PR w leczeniu ER-zależnych nowotworów piersi (Carroll et al., 2017; Siersbæk et al., 2018). Jednym z przykładów jest octan megestrolu, znajdujący się obecnie w 2 fazie badań klinicznych (NCT03306472 oraz NCT03024580). Stąd też, biorąc pod uwagę rolę FGFR2 w regulacji funkcji receptorów dla hormonów steroidowych oraz opisane powyżej oddziaływanie między ER i PR, kolejne etapy projektu zakładały ocenę

wpływu sygnalizacji FGFR2-zależnej na formowanie kompleksu ER-PR. W marcu 2019 roku ukazała się pierwsza praca, która opisała wpływ stymulacji FGF2 na proliferację komórek luminalnego raka piersi poprzez hormono-niezależną aktywację ER oraz PR, promocję bezpośredniej interakcji między nimi i ekspresję genu *MYC* (Giulianelli et al., 2019). Zastosowany tu układ doświadczalny nie uwzględniał jednak tła hormonalnego charakterystycznego dla pacjentek przedmenopauzalnych. Należy zwrócić uwagę, iż obecność progesteronu mogłaby w sposób istotny zmienić obserwowane efekty indukowanej przez FGF2 aktywacji ER i PR. Dodatkowo, użyty ligand – FGF2, wykazuje największe powinowactwo do FGFR1 (Ornitz and Itoh, 2001; Ornitz and Itoh, 2015). W przedstawionej pracy doktorskiej przy zastosowaniu testu PLA zaobserwowano, iż 60-minutowa stymulacja hormonalna (E2 oraz P4) promowała formowanie kompleksu ER-PR, co potwierdziło wcześniejsze doniesienia dotyczące udziału obu hormonów w oddziaływaniu receptorów (Mohammed et al., 2015). Co istotne, FGF7 w obecności E2 i P4 hamował tworzenie się opisanego kompleksu w dwóch modelowych liniach komórkowych T47D oraz CAMA-1. Należy wspomnieć, iż ilość zidentyfikowanych kompleksów ER-PR przypadających na komórkę jest stosunkowo niewielka, a zdecydowana większość z nich lokalizuje się jądrowo. W związku z tym ich detekcja była możliwa jedynie przy zastosowaniu stosunkowo czulej metody (PLA), zaś wcześniejsze doświadczenia ko-immunoprecypitacji okazały się nieskuteczne. Co ciekawe, pomimo tak niewielkiej ilości zidentyfikowanych kompleksów, obserwowane w efekty stymulacji hormonalnej i/lub FGF7 na wzrost komórek w hodowlach 3D były znaczące. Sugeruje to istotną biologiczną rolę analizowanych zależności, które w wymierny sposób mogą wpływać na wzrost guza.

ER i PR należą do klasy receptorów jądrowych, a ich aktywność biologiczna wyraża się poprzez regulację ekspresji szerokiej gamy genów, zaangażowanych w takie procesy jak proliferacja, przeżycie czy migracja (Sever and Glass, 2013). Zespół prof. Jasona Carrolla w swojej pracy z 2015 roku wykazał, iż aktywowany PR moduluje aktywność transkrypcyjną ER, zmieniając miejsce wiązania receptora na chromatynie i prowadząc do ekspresji genów związanych z dobrym rokowaniem pacjentek z luminalnym rakiem piersi (Mohammed et al., 2015). Dodatkowo, to właśnie regulacja funkcji ER (czy to przez inne receptory dla hormonów steroidowych, czy też przez ścieżki sygnalizacyjne indukowane przez mikrośrodowisko) jest kluczowa dla progresji choroby nowotworowej oraz odpowiedzi na stosowane terapie endokrynne (Siersbæk et al., 2018). Stąd też, w kolejnych etapach pracy postanowiono skupić się na wpływie sygnalizacji FGF7/FGFR2 na regulowaną przez P4 aktywność transkrypcyjną ER. Analizy ekspresji panelu genów ER-zależnych wykazały, iż P4 w obecności E2 zmienia

profil ekspresji 35 spośród 84 analizowanych genów, natomiast stymulacja FGF7 w obecności obu hormonów przywraca profil ekspresji 20 z nich do poziomu charakterystycznego dla stymulacji jedynie E2. Co więcej, dodatkowe analizy qPCR poziomu ekspresji wybranych genów (*IRS1* oraz *BCL2L1*) potwierdziły zaangażowanie specyficznym FGFR2 w obserwowane efekty FGF7-zależne. Biorąc pod uwagę udokumentowany w innych badaniach udział sygnalizacji od FGFR2 w regulację aktywności regulonu ER oraz odpowiedź komórek na estradiol (Campbell et al., 2018; Campbell et al., 2016), prezentowane w niniejszej pracy wyniki, uwzględniające dodatkowy wpływ statusu hormonalnego charakterystycznego dla pacjentek przedmenopauzalnych, zdecydowanie rozszerzają kontekst obserwowanych zależności.

Aktywacja receptorów dla hormonów steroidowych może zachodzić na drodze dwóch ścieżek sygnalizacyjnych – klasycznej genomowej oraz ścieżki niegenomowej, obejmujących udział specyficznych ligandów danych receptorów (E2 dla ER, oraz P4 dla PR), a także ścieżki alternatywnej, która obejmuje sygnalizację od receptorów dla czynników wzrostu, cytokin lub receptorów związanych z białkami G (Sever and Glass, 2013). Co istotne, ścieżka alternatywna, mediująca sygnały pochodzące z mikrośrodowiska guza, wiąże się z modulacją aktywności ER i PR najczęściej na drodze ich fosforylacji. Dotychczas opisano szereg czynników wzrostu zaangażowanych w regulację obu receptorów, do których należą: heregulina, IGF-1, EGF, FGF2 oraz FGF7 (Bunone et al., 1996; Cerliani et al., 2011; Cui et al., 2003; Daniel et al., 2007; Labriola et al., 2003; Piasecka et al., 2016; Richardson et al., 2011; Turczyk et al., 2017), a indukowane przez nie kaskady sygnalizacyjne obejmują ścieżki Ras/Raf/MAPK, PI3K/Akt, JNK, PLC γ /PKC, cAMP/PKA, NF κ B czy JAK/STAT. W przedstawionej pracy podjęto próbę identyfikacji konkretnej kaskady sygnalizacyjnej zaangażowanej w regulowaną przez FGF7/FGFR2 P4-zależną aktywność ER. Analizy ekspresji ER-zależnych genów *IRS1* oraz *BCL2L1*, w obecności E2 oraz P4 i/lub FGF7 wraz z zastosowaniem inhibitorów szerokiej palety kinaz białkowych, wytypowały trzy ścieżki sygnalizacyjne, PI3K/Akt, MAPK z udziałem JNK oraz ścieżkę Src, które potencjalnie mogą być zaangażowane w przedstawione w pracy zależności FGFR2/ER/PR. Uzupełnieniem tych wyników były analizy wzrostu komórek linii T47D w hodowlach 3D w Matrigelu z zastosowaniem opisanych inhibitorów. Zaobserwowano, iż to inhibicja kinazy JNK najefektywniej znosiła efekt FGF7 na hamowany przez P4 E2-zależny wzrost komórek. Należy pamiętać, iż aktywność transkrypcyjna ER, poza bezpośrednim oddziaływaniem receptora ze specyficznymi sekwencjami ERE (Klinge, 2001), może opierać się także na regulacji innych czynników transkrypcyjnych, w tym czynnika transkrypcyjnego AP-1 (*activator protein 1*), będącego heterodimerem białek c-Jun oraz c-Fos

(Dahlman-Wright et al., 2012; Safe and Kim, 2008; Webb et al., 1999). Co istotne, kinaza JNK jest głównym regulatorem funkcji c-Jun (Bubici and Papa, 2014; Tournier, 2013; Zeke et al., 2016), co może sugerować, iż indukowana przez FGF7/FGFR2 ścieżka sygnalizacyjna z udziałem JNK może być odpowiedzialna za regulację wspomnianej aktywności transkrypcyjnej receptora estrogenowego. Przedstawiona potencjalna zależność stanowi ciekawy aspekt wpływu mikrośrodowiska guza na modulację funkcji ER i może stanowić przedmiot badań kolejnych projektów.

Jak już wcześniej wspomniano, agoniści PR stanowią nowe podejście do strategii terapeutycznych w ER-zależnych nowotworach gruczołu piersiowego. W przedstawionych w pracy wynikach P4 hamował E2-zależny wzrost komórek *in vitro*, co potwierdziło wcześniejsze doniesienia na temat udziału PR w regulacji wzrostu guza (Finlay-Schultz et al., 2017; Mohammed et al., 2015). Co więcej, we wspomnianych pracach stymulacja P4 dodatkowo promowała anty-proliferacyjny efekt tamoksyfenu – najczęściej stosowanego leku anty-ER u pacjentek z luminalnym rakiem piersi. Mikrośrodowisko guza, przy udziale fibroblastów guza i produkowanych przez nie FGF, jest głównym czynnikiem związanym z wykształcającą się opornością na terapie endokrynne. W jednej z naszych ostatnich prac wykazaliśmy, iż FGF7 oraz produkowane przez CAFs czynniki wzrostu znoszą hamujący wzrost komórek efekt tamoksyfenu przy udziale FGFR2 (Turczyk et al., 2017). W związku ze szczegółowo zaprezentowanym tu udziałem sygnalizacji FGF7/FGFR2 w regulacji fosforylacji i poziomu ekspresji ER i PR, oraz jej wpływie na modulowaną przez P4 aktywność transkrypcyjną ER i hormono-zależny wzrost guza, na ostatnim etapie doświadczeń *in vitro* postanowiono przeanalizować rolę FGFR2 w odpowiedzi komórek na terapię anty-ER. Zastosowane w tym celu hodowle 3D dwóch modelowych linii komórkowych wykazały, iż FGF7 znacząco obniżał skuteczność działania tamoksyfenu. Sugeruje to możliwe zaangażowanie sygnalizacji FGF7-zależnej w oporność na leczenie celowane anty-ER u pacjentek przedmenopauzalnych. W związku z tym skojarzenie inhibitorów FGFR z terapiami endokrynnymi mogłoby chronić chore przedmenopauzalne z ER+ rakiem piersi przed wykształceniem oporności na aplikowane leczenie. Co więcej, inhibitory FGFR mogłyby dodatkowo podnosić skuteczność potencjalnych terapii z wykorzystaniem agonistów PR.

Wszystkie opublikowane do tej pory prace opisujące znaczenie zależności FGFR2/ER/PR w raku piersi (Campbell et al., 2018; Cerliani et al., 2011; Fletcher et al., 2013; Giulianelli et al., 2008; Piasecka et al., 2016; Turczyk et al., 2017) oraz zaprezentowane w niniejszej rozprawie wyniki wykazujące zaangażowanie FGFR2 w hamowanie tworzenia się kompleksu ER-PR, regulację poziomu ekspresji i aktywności obu receptorów hormonów

steroidowych, a także w modulację aktywności transkrypcyjnej ER w obecności zarówno estrogenów jak i progesteronu, obejmują głównie badania *in vitro*. Opublikowane dane dotyczące znaczenia klinicznego FGFR2 skupiają się przede wszystkim na zaburzeniach genomowych (najczęściej związanych z polimorfizmami w obrębie *FGFR2*) (Easton et al., 2007; Hunter et al., 2007; Jia et al., 2010; Zhou et al., 2012), nie analizując ewentualnej roli sygnalizacji FGFR2–zależnej w prognozowaniu choroby. Stąd też, aby określić kliniczne znaczenie wyników otrzymanych w badaniach *in vitro*, kolejny etap mojego projektu obejmował analizę relacji FGFR2/ER/PR w materiale klinicznym od 226 pacjentek z luminalnym ER+/PR+ rakiem piersi, podzielonych na dwie grupy względem statusu menopauzalnego. Dwadzieścia jeden genów ER-zależnych, wyselekcjonowanych z doświadczeń RT² Profiler PCR Array, stanowiło podstawę analiz w systemie nCounter[®] technologii NanoString. Wyniki porównań ekspresji opisanych genów pomiędzy grupą przed- i postmenopauzalną w obrębie przypadków ER+/PR+ pokazują, że istnieje istotna i wysoka różnica dla poziomu mRNA receptora estrogenowego pomiędzy tymi dwiema grupami, potwierdzając tym samym wykazany już wcześniej wyższy poziom ER u pacjentek starszych, postmenopauzalnych (Bertuzzi et al., 1981; McCarty et al., 1983; Wilking et al., 1989). Jednak mimo wyższego poziomu ER w tej grupie chorych nie zaobserwowano istotnych różnic w poziomie ekspresji żadnego z pozostałych analizowanych genów ER-zależnych, co może sugerować zaangażowanie dodatkowych czynników w regulację aktywności transkrypcyjnej tego receptora. Korelacje profilu ekspresji wybranych genów z poziomem FGFR2 (na poziomie białka) wykazały szereg istotnych korelacji pozytywnych, a dodatkowe analizy w obrębie obu grup wskazały, iż geny *JUNB* oraz *S100A6* pozytywnie korelują z FGFR2 u pacjentek przedmenopauzalnych, zaś geny *BCL2L1*, *MMP9*, *IRS1* oraz *BRCA1* u postmenopauzalnych. W tym przypadku na szczególną uwagę zasługuje zidentyfikowana korelacja *JUNB*-FGFR2. Gen *JUNB* koduje czynnik transkrypcyjny JunB, należący do rodziny czynników transkrypcyjnych Jun (c-Jun, JunB oraz JunD) (Wisdom, 1999), których aktywność regulowana jest przez ścieżkę sygnalizacyjną kinazy JNK (Gurzov et al., 2008; Lopez-Bergami et al., 2007). Udokumentowano, że białka z tej rodziny regulują funkcję ER oraz odpowiedź komórek na terapię tamoksyfenem (Dahlman-Wright et al., 2012; He et al., 2018; Kim et al., 2014; Smith et al., 1999). Sam JunB został opisany jako negatywny czynnik prognostyczny zidentyfikowany w krążących komórkach nowotworowych (CTCs, *circulating tumour cells*) raka piersi (Kallergi et al., 2019). Co więcej, jak wykazano w niniejszej pracy, kaskada sygnalizacyjna MAPK/JNK jest mediatorem regulowanej przez FGFR2 aktywności transkrypcyjnej ER. Podkreśla to

szczególne znaczenie zidentyfikowanej zależności w regulacji ekspresji sygnatury genowej ER-zależnej i z pewnością wymaga dalszych dogłębnych analiz.

Ostatnim etapem projektu była ocena znaczenia prognostycznego FGFR2 w grupach pacjentek przed- i postmenopauzalnych. Estymacje całkowitego czasu przeżycia wykazały, iż wysoki poziom ekspresji FGFR2 (na poziomie białka) w grupie pacjentek postmenopauzalnych związany jest dobrym rokowaniem, zaś w grupie przedmenopauzalnej nie wpływa na całkowity czas przeżycia chorych z ER+/PR+ rakiem piersi. Należy jednak podkreślić, iż obserwowany efekt jest jedynie bliski istotności statystycznej, a na wiarygodność przeprowadzonej analizy wpływa zarówno wielkość grupy pacjentek przedmenopauzalnych (łącznie 32 przypadki), jak i fakt, iż wśród młodszych pacjentek, nawet w przypadku źle rokującego luminalnego A raka piersi, choroba rzadko kończy się zgonem w trakcie 6-letniego okresu obserwacji. W związku z tym znaczenie omawianych wyników dodatkowo zweryfikowano w publicznej bazie danych TCGA (The Cancer Genome Atlas). Analiza całkowitego czasu przeżycia w zależności od statusu menopauzalnego oraz poziomu mRNA FGFR2 potwierdziła obserwowane we wcześniejszym badaniu znaczenie prognostyczne FGFR2 na poziomie białka, podkreślając, iż u pacjentek postmenopauzalnych FGFR2 jest dobrym czynnikiem rokowniczym, zaś efekt ten nie jest zauważalny u młodszych chorych na raka piersi. Zanik znaczenia prognostycznego FGFR2 u pacjentek przedmenopauzalnych może być związany z większą heterogennością tej grupy chorych i istnieniem w jej obrębie podgrup, w których FGFR2 jest i) korzystnym lub ii) niekorzystnym czynnikiem rokowniczym, co maskuje jego jednoznaczną rolę prognostyczną u pacjentek młodszych. Wyniki te niejako tłumaczą obecność szeregu sprzecznych doniesień dotyczących znaczenia FGFR2 w rozwoju czy progresji choroby nowotworowej. Przykładowo, jedna z bardziej aktualnych prac wykazuje, iż wysoka ekspresja *FGFR2* koreluje z lepszą odpowiedzią raka piersi na terapię endokrynną w połączeniu z inhibitorami CDK4/6 (Formisano et al., 2019). Zaobserwowano również, że mutacje utraty funkcji w obrębie *FGFR2* przyczyniały się do progresji czerniaka (Gartside et al., 2009), a mutacje nabycia funkcji promowały wzrost raka endometrium (Byron et al., 2012; Pollock et al., 2007). Należy również pamiętać, iż polimorfizmy w obrębie *FGFR2*, jak i wyższy poziom ekspresji receptora, są związane ze zwiększonym ryzykiem raka piersi (Easton et al., 2007; Fletcher et al., 2013; Jia et al., 2010; Meyer et al., 2008; Zhang et al., 2017; Zhou et al., 2012), chociaż niektóre z SNPs *FGFR2*, prowadzące do utraty jego ekspresji, były związane z lepszą odpowiedzią na estrogeny i większym prawdopodobieństwem rozwoju hormono-zależnego raka piersi (Campbell et al., 2016). W doświadczeniach *in vitro* przeprowadzonych w niniejszej pracy wykazano, iż sygnalizacja FGF7/FGFR2 związana jest z hormono-zależną stymulacją wzrostu komórek

nowotworowych oraz wykształcającą się opornością na terapię anty-ER. Jednak przeprowadzane w jej toku analizy, obejmujące cały panel linii komórkowych luminalnego raka piersi, umożliwiły zobrazowanie dużej heterogenności w obrębie hormono-zależnych nowotworów, związanej zarówno z odpowiedzią na stymulację estradiolem i progesteronem, jak i statusem receptorowym badanych linii ER+/PR+. Stąd też, biorąc pod uwagę zaobserwowane w materiale klinicznym korelacje, jak i wszystkie dostępne doniesienia dotyczące aktywności oraz funkcji FGFR2, można stwierdzić, iż na znaczenie prognostyczne FGFR2 ma wpływ kontekst biologiczny analizowanej grupy chorych, uwzględniający poziom ekspresji ER i PR oraz status hormonalny pacjentek. Dodatkowa, bardziej szczegółowa subklasyfikacja pacjentek z luminalnym rakiem piersi może przyczynić się do doboru skuteczniejszego leczenia i tym samym do wydłużenia czasu przeżycia chorych.

Podsumowując, zrealizowane w niniejszej rozprawie doktorskiej badania, obejmujące doświadczenia z wykorzystaniem modeli komórkowych luminalnego raka piersi *in vitro*, uzupełnione analizami materiału klinicznego od pacjentek z hormono-zależnym rakiem piersi, w sposób kompleksowy przedstawiły udział FGFR2 oraz indukowanego przez niego szlaku sygnalizacyjnego MAPK/JNK w regulacji aktywności receptorów dla hormonów steroidowych oraz zmianie profilu ekspresji ER-zależnych genów u pacjentek w zależności od ich statusu menopauzalnego. Dodatkowo, uzyskane wyniki udowodniły istotne zaangażowanie FGFR2 w hormono-zależny wzrost komórek raka piersi oraz hamowanie efektywności tamoksyfenu.

W rezultacie opisany projekt dostarcza wielu nowych informacji na temat roli FGFR2, jako istotnego mediatora sygnałów pochodzących z mikrośrodowiska guza, w regulacji funkcji ER i PR, w kontekście progresji oraz terapii luminalnych raków piersi. Przedstawione wyniki sugerują, iż terapie oparte o inhibitory dla receptorów z rodziny FGFR mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu ER-zależnych nowotworów, a sam receptor może być istotnym czynnikiem rokowniczym u pacjentek z rakiem piersi.

7. LITERATURA

Abdel-Hafiz, H. A., and Horwitz, K. B. (2014). Post-translational modifications of the progesterone receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* *140*, 80-89.

Aka, J. A., Adjo Aka, J., and Lin, S. X. (2012). Comparison of functional proteomic analyses of human breast cancer cell lines T47D and MCF7. *PLoS One* *7*, e31532.

Alarid, E. T., Bakopoulos, N., and Solodin, N. (1999). Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation. *Mol Endocrinol* *13*, 1522-1534.

Ali, S., and Coombes, R. C. (2002). Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer* *2*, 101-112.

Ali, S., Rasool, M., Chaoudhry, H., N Pushparaj, P., Jha, P., Hafiz, A., Mahfooz, M., Abdus Sami, G., Azhar Kamal, M., Bashir, S., *et al.* (2016). Molecular mechanisms and mode of tamoxifen resistance in breast cancer. *Bioinformation* *12*, 135-139.

Amin, M. B., Greene, F. L., Edge, S. B., Compton, C. C., Gershenwald, J. E., Brookland, R. K., Meyer, L., Gress, D. M., Byrd, D. R., and Winchester, D. P. (2017). The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin* *67*, 93-99.

Anders, C. K., Hsu, D. S., Broadwater, G., Acharya, C. R., Foekens, J. A., Zhang, Y., Wang, Y., Marcom, P. K., Marks, J. R., Febbo, P. G., *et al.* (2008). Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol* *26*, 3324-3330.

Aras, S., and Zaidi, M. R. (2017). TAMEless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis. *Br J Cancer* *117*, 1583-1591.

Aure, M. R., Vitelli, V., Jernström, S., Kumar, S., Krohn, M., Due, E. U., Haukaas, T. H., Leivonen, S. K., Vollan, H. K., Lüders, T., *et al.* (2017). Integrative clustering reveals a novel split in the luminal A subtype of breast cancer with impact on outcome. *Breast Cancer Res* *19*, 44.

- Avgustinova, A., Iravani, M., Robertson, D., Fearn, A., Gao, Q., Klingbeil, P., Hanby, A. M., Speirs, V., Sahai, E., Calvo, F., and Isacke, C. M. (2016). Tumour cell-derived Wnt7a recruits and activates fibroblasts to promote tumour aggressiveness. *Nat Commun* 7, 10305.
- Babina, I. S., and Turner, N. C. (2017). Advances and challenges in targeting FGFR signalling in cancer. *Nat Rev Cancer* 17, 318-332.
- Balic, M., Thomssen, C., Würstlein, R., Gnant, M., and Harbeck, N. (2019). St. Gallen/Vienna 2019: A Brief Summary of the Consensus Discussion on the Optimal Primary Breast Cancer Treatment. *Breast Care (Basel)* 14, 103-110.
- Balkwill, F. R., Capasso, M., and Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* 125, 5591-5596.
- Ballaré, C., Uhrig, M., Bechtold, T., Sancho, E., Di Domenico, M., Migliaccio, A., Auricchio, F., and Beato, M. (2003). Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 23, 1994-2008.
- Bardou, V. J., Arpino, G., Elledge, R. M., Osborne, C. K., and Clark, G. M. (2003). Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol* 21, 1973-1979.
- Beato, M., Chávez, S., and Truss, M. (1996). Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 61, 240-251.
- Beenken, A., and Mohammadi, M. (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 8, 235-253.
- Bellance, C., Khan, J. A., Meduri, G., Guiochon-Mantel, A., Lombès, M., and Loosfelt, H. (2013). Progesterone receptor isoforms PRA and PRB differentially contribute to breast cancer cell migration through interaction with focal adhesion kinase complexes. *Mol Biol Cell* 24, 1363-1374.
- Bernstein, L. (2002). Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7, 3-15.

- Bertuzzi, A., Daidone, M. G., Di Fronzo, G., and Silvestrini, R. (1981). Relationship among estrogen receptors, proliferative activity and menopausal status in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat 1*, 253-262.
- Björnström, L., and Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol 19*, 833-842.
- Bochet, L., Lehuédé, C., Dauvillier, S., Wang, Y. Y., Dirat, B., Laurent, V., Dray, C., Guiet, R., Maridonneau-Parini, I., Le Gonidec, S., *et al.* (2013). Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res 73*, 5657-5668.
- Brady, N., Chuntova, P., Bade, L. K., and Schwertfeger, K. L. (2013). The FGF/FGFR axis as a therapeutic target in breast cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab 8*, 391-402.
- Brandt, J., Garne, J. P., Tengrup, I., and Manjer, J. (2015). Age at diagnosis in relation to survival following breast cancer: a cohort study. *World J Surg Oncol 13*, 33.
- Brassart-Pasco, S., Brézillon, S., Brassart, B., Ramont, L., Oudart, J. B., and Monboisse, J. C. (2020). Tumor Microenvironment: Extracellular Matrix Alterations Influence Tumor Progression. *Front Oncol 10*, 397.
- Braun, L., Mietzsch, F., Seibold, P., Schneeweiss, A., Schirmacher, P., Chang-Claude, J., Peter Sinn, H., and Aulmann, S. (2013). Intrinsic breast cancer subtypes defined by estrogen receptor signalling-prognostic relevance of progesterone receptor loss. *Mod Pathol 26*, 1161-1171.
- Brechbuhl, H. M., Finlay-Schultz, J., Yamamoto, T. M., Gillen, A. E., Cittelly, D. M., Tan, A. C., Sams, S. B., Pillai, M. M., Elias, A. D., Robinson, W. A., *et al.* (2017). Fibroblast Subtypes Regulate Responsiveness of Luminal Breast Cancer to Estrogen. *Clin Cancer Res 23*, 1710-1721.
- Brisken, C. (2013). Progesterone signalling in breast cancer: a neglected hormone coming into the limelight. *Nat Rev Cancer 13*, 385-396.
- Brisken, C., Hess, K., and Jeitziner, R. (2015). Progesterone and Overlooked Endocrine Pathways in Breast Cancer Pathogenesis. *Endocrinology 156*, 3442-3450.

- Brisken, C., and O'Malley, B. (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003178.
- Bu, L., Baba, H., Yoshida, N., Miyake, K., Yasuda, T., Uchihara, T., Tan, P., and Ishimoto, T. (2019). Biological heterogeneity and versatility of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Oncogene* 38, 4887-4901.
- Bubici, C., and Papa, S. (2014). JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. *Br J Pharmacol* 171, 24-37.
- Bunone, G., Briand, P. A., Miksicek, R. J., and Picard, D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* 15, 2174-2183.
- Byron, S. A., Gartside, M., Powell, M. A., Wellens, C. L., Gao, F., Mutch, D. G., Goodfellow, P. J., and Pollock, P. M. (2012). FGFR2 point mutations in 466 endometrioid endometrial tumors: relationship with MSI, KRAS, PIK3CA, CTNNB1 mutations and clinicopathological features. *PLoS One* 7, e30801.
- Campbell, T. M., Castro, M. A. A., de Oliveira, K. G., Ponder, B. A. J., and Meyer, K. B. (2018). ER α Binding by Transcription Factors NFIB and YBX1 Enables FGFR2 Signaling to Modulate Estrogen Responsiveness in Breast Cancer. *Cancer Res* 78, 410-421.
- Campbell, T. M., Castro, M. A. A., de Santiago, I., Fletcher, M. N. C., Halim, S., Prathalingam, R., Ponder, B. A. J., and Meyer, K. B. (2016). FGFR2 risk SNPs confer breast cancer risk by augmenting oestrogen responsiveness. *Carcinogenesis* 37, 741-750.
- Carnevale, R. P., Proietti, C. J., Salatino, M., Urtreger, A., Peluffo, G., Edwards, D. P., Boonyaratanakornkit, V., Charreau, E. H., Bal de Kier Joffé, E., Schillaci, R., and Elizalde, P. V. (2007). Progesterone effects on breast cancer cell proliferation, proteases activation, and in vivo development of metastatic phenotype all depend on progesterone receptor capacity to activate cytoplasmic signaling pathways. *Mol Endocrinol* 21, 1335-1358.
- Carroll, J. S., Hickey, T. E., Tarulli, G. A., Williams, M., and Tilley, W. D. (2017). Deciphering the divergent roles of progestogens in breast cancer. *Nat Rev Cancer* 17, 54-64.

- Cerliani, J. P., Guillardoy, T., Giulianelli, S., Vaque, J. P., Gutkind, J. S., Vanzulli, S. I., Martins, R., Zeitlin, E., Lamb, C. A., and Lanari, C. (2011). Interaction between FGFR-2, STAT5, and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer Res* 71, 3720-3731.
- Chan, M., Chang, M. C., González, R., Lategan, B., del Barco, E., Vera-Badillo, F., Quesada, P., Goldstein, R., Cruz, I., Ocana, A., *et al.* (2015). Outcomes of Estrogen Receptor Negative and Progesterone Receptor Positive Breast Cancer. *PLoS One* 10, e0132449.
- Chen, C. C., Hardy, D. B., and Mendelson, C. R. (2011). Progesterone receptor inhibits proliferation of human breast cancer cells via induction of MAPK phosphatase 1 (MKP-1/DUSP1). *J Biol Chem* 286, 43091-43102.
- Chlebowski, R. T., Hendrix, S. L., Langer, R. D., Stefanick, M. L., Gass, M., Lane, D., Rodabough, R. J., Gilligan, M. A., Cyr, M. G., Thomson, C. A., *et al.* (2003). Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA* 289, 3243-3253.
- Chlebowski, R. T., Kuller, L. H., Prentice, R. L., Stefanick, M. L., Manson, J. E., Gass, M., Aragaki, A. K., Ockene, J. K., Lane, D. S., Sarto, G. E., *et al.* (2009). Breast cancer after use of estrogen plus progestin in postmenopausal women. *N Engl J Med* 360, 573-587.
- Choi, J., Cha, Y. J., and Koo, J. S. (2018). Adipocyte biology in breast cancer: From silent bystander to active facilitator. *Prog Lipid Res* 69, 11-20.
- Clarke, R., Liu, M. C., Bouker, K. B., Gu, Z., Lee, R. Y., Zhu, Y., Skaar, T. C., Gomez, B., O'Brien, K., Wang, Y., and Hilakivi-Clarke, L. A. (2003). Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene* 22, 7316-7339.
- Condon, J. C., Hardy, D. B., Kovaric, K., and Mendelson, C. R. (2006). Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. *Mol Endocrinol* 20, 764-775.
- Creighton, C. J. (2012). The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics* 6, 289-297.

- Cui, F., Wu, D., Wang, W., He, X., and Wang, M. (2016). Variants of FGFR2 and their associations with breast cancer risk: a HUGE systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 155, 313-335.
- Cui, J., Shen, Y., and Li, R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med* 19, 197-209.
- Cui, X., Schiff, R., Arpino, G., Osborne, C. K., and Lee, A. V. (2005). Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol* 23, 7721-7735.
- Cui, X., Zhang, P., Deng, W., Oesterreich, S., Lu, Y., Mills, G. B., and Lee, A. V. (2003). 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* 17, 575-588.
- Czaplinska, D., Mieczkowski, K., Supernat, A., Skladanowski, A. C., Kordek, R., Biernat, W., Zaczek, A. J., Romanska, H. M., and Sadej, R. (2016). Interactions between FGFR2 and RSK2-implications for breast cancer prognosis. *Tumour Biol* 37, 13721-13731.
- Czaplinska, D., Turczyk, L., Grudowska, A., Mieszkowska, M., Lipinska, A. D., Skladanowski, A. C., Zaczek, A. J., Romanska, H. M., and Sadej, R. (2014). Phosphorylation of RSK2 at Tyr529 by FGFR2-p38 enhances human mammary epithelial cells migration. *Biochim Biophys Acta* 1843, 2461-2470.
- Dahlman-Wright, K., Qiao, Y., Jonsson, P., Gustafsson, J., Williams, C., and Zhao, C. (2012). Interplay between AP-1 and estrogen receptor α in regulating gene expression and proliferation networks in breast cancer cells. *Carcinogenesis* 33, 1684-1691.
- Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., and Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res* 5, 2929-2943.
- Daniel, A. R., Faivre, E. J., and Lange, C. A. (2007). Phosphorylation-dependent antagonism of sumoylation derepresses progesterone receptor action in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 21, 2890-2906.

- Daniel, A. R., Gaviglio, A. L., Knutson, T. P., Ostrander, J. H., D'Assoro, A. B., Ravindranathan, P., Peng, Y., Raj, G. V., Yee, D., and Lange, C. A. (2015). Progesterone receptor-B enhances estrogen responsiveness of breast cancer cells via scaffolding PELP1- and estrogen receptor-containing transcription complexes. *Oncogene* 34, 506-515.
- Davies, C., Godwin, J., Gray, R., Clarke, M., Cutter, D., Darby, S., McGale, P., Pan, H. C., Taylor, C., Wang, Y. C., *et al.* (2011). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 378, 771-784.
- Dawson, S. J., Rueda, O. M., Aparicio, S., and Caldas, C. (2013). A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *EMBO J* 32, 617-628.
- de Leeuw, R., Neefjes, J., and Michalides, R. (2011). A role for estrogen receptor phosphorylation in the resistance to tamoxifen. *Int J Breast Cancer* 2011, 232435.
- DeSantis, C. E., Ma, J., Gaudet, M. M., Newman, L. A., Miller, K. D., Goding Sauer, A., Jemal, A., and Siegel, R. L. (2019). Breast cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 69, 438-451.
- Didkowska, J., Wojciechowska, U., Czaderny, K., Olasek, P., and Ciuba, A. (2019). Cancer in Poland in 2017. In, (Warszawa: Zakład Epidemiologii i Prewencji Nowotworów; Centrum Onkologii - Instytut w Warszawie).
- Diep, C. H., Ahrendt, H., and Lange, C. A. (2016). Progesterone induces progesterone receptor gene (PGR) expression via rapid activation of protein kinase pathways required for cooperative estrogen receptor alpha (ER) and progesterone receptor (PR) genomic action at ER/PR target genes. *Steroids* 114, 48-58.
- Dowsett, M., Nicholson, R. I., and Pietras, R. J. (2005). Biological characteristics of the pure antiestrogen fulvestrant: overcoming endocrine resistance. *Breast Cancer Res Treat* 93 Suppl 1, S11-18.
- Easton, D. F., Pooley, K. A., Dunning, A. M., Pharoah, P. D., Thompson, D., Ballinger, D. G., Struwing, J. P., Morrison, J., Field, H., Luben, R., *et al.* (2007). Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 447, 1087-1093.

Echeverria, P. C., and Picard, D. (2010). Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. *Biochim Biophys Acta* 1803, 641-649.

Elbauomy Elsheikh, S., Green, A. R., Lambros, M. B., Turner, N. C., Grainge, M. J., Powe, D., Ellis, I. O., and Reis-Filho, J. S. (2007). FGFR1 amplification in breast carcinomas: a chromogenic in situ hybridisation analysis. *Breast Cancer Res* 9, R23.

Eswarakumar, V. P., Lax, I., and Schlessinger, J. (2005). Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 139-149.

Fabris, V. T., Sahores, A., Vanzulli, S. I., Colombo, L., Molinolo, A. A., Lanari, C., and Lamb, C. A. (2010). Inoculated mammary carcinoma-associated fibroblasts: contribution to hormone independent tumor growth. *BMC Cancer* 10, 293.

Fang, Y., and Eglen, R. M. (2017). Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discov* 22, 456-472.

Finlay-Schultz, J., Gillen, A. E., Brechbuhl, H. M., Ivie, J. J., Matthews, S. B., Jacobsen, B. M., Bentley, D. L., Kabos, P., and Sartorius, C. A. (2017). Breast Cancer Suppression by Progesterone Receptors Is Mediated by Their Modulation of Estrogen Receptors and RNA Polymerase III. *Cancer Res* 77, 4934-4946.

Fiorito, E., Katika, M. R., and Hurtado, A. (2013). Cooperating transcription factors mediate the function of estrogen receptor. *Chromosoma* 122, 1-12.

Fisher, B., Costantino, J., Redmond, C., Poisson, R., Bowman, D., Couture, J., Dimitrov, N. V., Wolmark, N., Wickerham, D. L., and Fisher, E. R. (1989). A randomized clinical trial evaluating tamoxifen in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-positive tumors. *N Engl J Med* 320, 479-484.

Fletcher, M. N., Castro, M. A., Wang, X., de Santiago, I., O'Reilly, M., Chin, S. F., Rueda, O. M., Caldas, C., Ponder, B. A., Markowitz, F., and Meyer, K. B. (2013). Master regulators of FGFR2 signalling and breast cancer risk. *Nat Commun* 4, 2464.

Fong, C. W., Leong, H. F., Wong, E. S., Lim, J., Yusoff, P., and Guy, G. R. (2003). Tyrosine phosphorylation of Sprouty2 enhances its interaction with c-Cbl and is crucial for its function. *J Biol Chem* 278, 33456-33464.

Formisano, L., Lu, Y., Servetto, A., Hanker, A. B., Jansen, V. M., Bauer, J. A., Sudhan, D. R., Guerrero-Zotano, A. L., Croessmann, S., Guo, Y., *et al.* (2019). Aberrant FGFR signaling mediates resistance to CDK4/6 inhibitors in ER+ breast cancer. *Nat Commun* 10, 1373.

Formisano, L., Stauffer, K. M., Young, C. D., Bhola, N. E., Guerrero-Zotano, A. L., Jansen, V. M., Estrada, M. M., Hutchinson, K. E., Giltnane, J. M., Schwarz, L. J., *et al.* (2017). Association of FGFR1 with ERalpha Maintains Ligand-Independent ER Transcription and Mediates Resistance to Estrogen Deprivation in ER(+) Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 23, 6138-6150.

Fuentes, N., and Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol* 116, 135-170.

Gartside, M. G., Chen, H., Ibrahimi, O. A., Byron, S. A., Curtis, A. V., Wellens, C. L., Bengston, A., Yudt, L. M., Eliseenkova, A. V., Ma, J., *et al.* (2009). Loss-of-function fibroblast growth factor receptor-2 mutations in melanoma. *Mol Cancer Res* 7, 41-54.

Gascard, P., and Tlsty, T. D. (2016). Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev* 30, 1002-1019.

Ghousaini, M., French, J. D., Michailidou, K., Nord, S., Beesley, J., Canisus, S., Hillman, K. M., Kaufmann, S., Sivakumaran, H., Moradi Marjaneh, M., *et al.* (2016). Evidence that the 5p12 Variant rs10941679 Confers Susceptibility to Estrogen-Receptor-Positive Breast Cancer through FGF10 and MRPS30 Regulation. *Am J Hum Genet* 99, 903-911.

Giulianelli, S., Cerliani, J. P., Lamb, C. A., Fabris, V. T., Bottino, M. C., Gorostiaga, M. A., Novaro, V., Góngora, A., Baldi, A., Molinolo, A., and Lanari, C. (2008). Carcinoma-associated fibroblasts activate progesterone receptors and induce hormone independent mammary tumor growth: A role for the FGF-2/FGFR-2 axis. *Int J Cancer* 123, 2518-2531.

Giulianelli, S., Riggio, M., Guillardoy, T., Pérez Piñero, C., Gorostiaga, M. A., Sequeira, G., Pataccini, G., Abascal, M. F., Toledo, M. F., Jacobsen, B. M., *et al.* (2019). FGF2 induces breast cancer growth through ligand-independent activation and recruitment of ER α and PRB Δ 4 isoform to MYC regulatory sequences. *Int J Cancer* 145, 1874-1888.

Giulianelli, S., Vaqué, J. P., Soldati, R., Wargon, V., Vanzulli, S. I., Martins, R., Zeitlin, E., Molinolo, A. A., Helguero, L. A., Lamb, C. A., *et al.* (2012). Estrogen receptor alpha mediates

progesterin-induced mammary tumor growth by interacting with progesterone receptors at the cyclin D1/MYC promoters. *Cancer Res* 72, 2416-2427.

Graham, J. D., Yager, M. L., Hill, H. D., Byth, K., O'Neill, G. M., and Clarke, C. L. (2005). Altered progesterone receptor isoform expression remodels progesterin responsiveness of breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 19, 2713-2735.

Graham, J. D., Yeates, C., Balleine, R. L., Harvey, S. S., Milliken, J. S., Bilous, A. M., and Clarke, C. L. (1995). Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res* 55, 5063-5068.

Gurzov, E. N., Bakiri, L., Alfaro, J. M., Wagner, E. F., and Izquierdo, M. (2008). Targeting c-Jun and JunB proteins as potential anticancer cell therapy. *Oncogene* 27, 641-652.

Hagan, C. R., Daniel, A. R., Dressing, G. E., and Lange, C. A. (2012). Role of phosphorylation in progesterone receptor signaling and specificity. *Mol Cell Endocrinol* 357, 43-49.

Hamilton, K. J., Hewitt, S. C., Arao, Y., and Korach, K. S. (2017). Estrogen Hormone Biology. *Curr Top Dev Biol* 125, 109-146.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Hankinson, S. E., Colditz, G. A., and Willett, W. C. (2004). Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. *Breast Cancer Res* 6, 213-218.

He, H., Sinha, I., Fan, R., Haldosen, L. A., Yan, F., Zhao, C., and Dahlman-Wright, K. (2018). c-Jun/AP-1 overexpression reprograms ER α signaling related to tamoxifen response in ER α -positive breast cancer. *Oncogene* 37, 2586-2600.

Heiskanen, M., Kononen, J., Bärlund, M., Torhorst, J., Sauter, G., Kallioniemi, A., and Kallioniemi, O. (2001). CGH, cDNA and tissue microarray analyses implicate FGFR2 amplification in a small subset of breast tumors. *Anal Cell Pathol* 22, 229-234.

- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., and Gustafsson, J. A. (2007). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 87, 905-931.
- Helsten, T., Elkin, S., Arthur, E., Tomson, B. N., Carter, J., and Kurzrock, R. (2016). The FGFR Landscape in Cancer: Analysis of 4,853 Tumors by Next-Generation Sequencing. *Clin Cancer Res* 22, 259-267.
- Hill, K. K., Roemer, S. C., Churchill, M. E., and Edwards, D. P. (2012). Structural and functional analysis of domains of the progesterone receptor. *Mol Cell Endocrinol* 348, 418-429.
- Holliday, D. L., and Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res* 13, 215.
- Hoon Tan, P., Ellis, I., Allison, K., Brogi, E., Fox, S. B., Lakhani, S., Lazar, A. J., Morris, E. A., Sahin, A., Salgado, R., *et al.* (2020). The 2019 WHO classification of tumours of the breast. *Histopathology*.
- Hopp, T. A., Weiss, H. L., Hilsenbeck, S. G., Cui, Y., Allred, D. C., Horwitz, K. B., and Fuqua, S. A. (2004). Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clin Cancer Res* 10, 2751-2760.
- Houthuijzen, J. M., and Jonkers, J. (2018). Cancer-associated fibroblasts as key regulators of the breast cancer tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 37, 577-597.
- Howell, A. (2001). Preliminary experience with pure antiestrogens. *Clin Cancer Res* 7, 4369s-4375s; discussion 4411s-4412s.
- Hu, M., and Polyak, K. (2008). Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr Opin Genet Dev* 18, 27-34.
- Hunter, D. J., Kraft, P., Jacobs, K. B., Cox, D. G., Yeager, M., Hankinson, S. E., Wacholder, S., Wang, Z., Welch, R., Hutchinson, A., *et al.* (2007). A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat Genet* 39, 870-874.

Ibrahim, Y. H., Byron, S. A., Cui, X., Lee, A. V., and Yee, D. (2008). Progesterone receptor-B regulation of insulin-like growth factor-stimulated cell migration in breast cancer cells via insulin receptor substrate-2. *Mol Cancer Res* 6, 1491-1498.

Ignar-Trowbridge, D. M., Nelson, K. G., Bidwell, M. C., Curtis, S. W., Washburn, T. F., McLachlan, J. A., and Korach, K. S. (1992). Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4658-4662.

Itoh, N. (2010). Hormone-like (endocrine) Fgfs: their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease. *Cell Tissue Res* 342, 1-11.

Jacobsen, B. M., and Horwitz, K. B. (2012). Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Mol Cell Endocrinol* 357, 18-29.

Jain, V. K., and Turner, N. C. (2012). Challenges and opportunities in the targeting of fibroblast growth factor receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res* 14, 208.

Jassem, J., Krzakowski, M., Bobek-Billewicz, B., Duchnowska, R., Jeziorski, A., Olszewski, W., Senkus-Konefka, E., Tchórzewska-Korba, H., and Wycsocki, P. (2018). Breast Cancer. *Oncol Clin Pract* 14, 171-215.

Jia, C., Cai, Y., Ma, Y., and Fu, D. (2010). Quantitative assessment of the effect of FGFR2 gene polymorphism on the risk of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 124, 521-528.

Johnston, S. R., and Dowsett, M. (2003). Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. *Nat Rev Cancer* 3, 821-831.

Jotzu, C., Alt, E., Welte, G., Li, J., Hennessy, B. T., Devarajan, E., Krishnappa, S., Pinilla, S., Droll, L., and Song, Y. H. (2011). Adipose tissue derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor derived factors. *Cell Oncol (Dordr)* 34, 55-67.

Kabos, P., Finlay-Schultz, J., Li, C., Kline, E., Finlayson, C., Wisell, J., Manuel, C. A., Edgerton, S. M., Harrell, J. C., Elias, A., and Sartorius, C. A. (2012). Patient-derived luminal breast cancer xenografts retain hormone receptor heterogeneity and help define unique estrogen-dependent gene signatures. *Breast Cancer Res Treat* 135, 415-432.

- Kallergi, G., Tsintari, V., Sfakianakis, S., Bei, E., Lagoudaki, E., Koutsopoulos, A., Zacharopoulou, N., Alkahtani, S., Alarifi, S., Stournaras, C., *et al.* (2019). The prognostic value of JUNB-positive CTCs in metastatic breast cancer: from bioinformatics to phenotypic characterization. *Breast Cancer Res* 21, 86.
- Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-Szatan, K., Miotła, P., and Starosławska, E. (2015). Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny* 14, 196-202.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 9, 1603-1614.
- Katoh, M. (2019). Fibroblast growth factor receptors as treatment targets in clinical oncology. *Nat Rev Clin Oncol* 16, 105-122.
- Kim, S., Lee, J., Lee, S. K., Bae, S. Y., Kim, J., Kim, M., Kil, W. H., Kim, S. W., Lee, J. E., and Nam, S. J. (2014). Protein kinase C- α downregulates estrogen receptor- α by suppressing c-Jun phosphorylation in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Oncol Rep* 31, 1423-1428.
- Klinge, C. M. (2000). Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65, 227-251.
- Klinge, C. M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 29, 2905-2919.
- Kovalenko, D., Yang, X., Chen, P. Y., Nadeau, R. J., Zubanova, O., Pigeon, K., and Friesel, R. (2006). A role for extracellular and transmembrane domains of Sef in Sef-mediated inhibition of FGF signaling. *Cell Signal* 18, 1958-1966.
- Kulkarni, A., Stroup, A. M., Paddock, L. E., Hill, S. M., Plascak, J. J., and Llanos, A. A. M. (2019). Breast Cancer Incidence and Mortality by Molecular Subtype: Statewide Age and Racial/Ethnic Disparities in New Jersey. *Cancer Health Disparities* 3, e1-e17.
- Kumar, R., and Thompson, E. B. (1999). The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64, 310-319.

- Kunc, M., Biernat, W., and Senkus-Konefka, E. (2018). Estrogen receptor-negative progesterone receptor-positive breast cancer - "Nobody's land" or just an artifact? *Cancer Treat Rev* 67, 78-87.
- Kurozumi, S., Matsumoto, H., Hayashi, Y., Tozuka, K., Inoue, K., Horiguchi, J., Takeyoshi, I., Oyama, T., and Kurosumi, M. (2017). Power of PgR expression as a prognostic factor for ER-positive/HER2-negative breast cancer patients at intermediate risk classified by the Ki67 labeling index. *BMC Cancer* 17, 354.
- Labriola, L., Salatino, M., Proietti, C. J., Pecci, A., Coso, O. A., Kornblihtt, A. R., Charreau, E. H., and Elizalde, P. V. (2003). Heregulin induces transcriptional activation of the progesterone receptor by a mechanism that requires functional ErbB-2 and mitogen-activated protein kinase activation in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 23, 1095-1111.
- Lange, C. A., Shen, T., and Horwitz, K. B. (2000). Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1032-1037.
- Langhans, S. A. (2018). Three-Dimensional. *Front Pharmacol* 9, 6.
- Le Romancer, M., Poulard, C., Cohen, P., Sentis, S., Renoir, J. M., and Corbo, L. (2011). Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr Rev* 32, 597-622.
- Leung, B. S., Qureshi, S., and Leung, J. S. (1982). Response to estrogen by the human mammary carcinoma cell line CAMA-1. *Cancer Res* 42, 5060-5066.
- Levin, E. R., and Hammes, S. R. (2016). Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 783-797.
- Li, Y., Yang, D., Yin, X., Zhang, X., Huang, J., Wu, Y., Wang, M., Yi, Z., Li, H., and Ren, G. (2020). Clinicopathological Characteristics and Breast Cancer-Specific Survival of Patients With Single Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *JAMA Netw Open* 3, e1918160.
- Liao, S., Hartmaier, R. J., McGuire, K. P., Puhalla, S. L., Luthra, S., Chandran, U. R., Ma, T., Bhargava, R., Modugno, F., Davidson, N. E., *et al.* (2015). The molecular landscape of premenopausal breast cancer. *Breast Cancer Res* 17, 104.

- Lieberman, B. A., Bona, B. J., Edwards, D. P., and Nordeen, S. K. (1993). The constitution of a progesterone response element. *Mol Endocrinol* 7, 515-527.
- Lim, E., Palmieri, C., and Tilley, W. D. (2016). Renewed interest in the progesterone receptor in breast cancer. *Br J Cancer* 115, 909-911.
- Lopez-Bergami, P., Huang, C., Goydos, J. S., Yip, D., Bar-Eli, M., Herlyn, M., Smalley, K. S., Mahale, A., Eroshkin, A., Aaronson, S., and Ronai, Z. (2007). Rewired ERK-JNK signaling pathways in melanoma. *Cancer Cell* 11, 447-460.
- Lu, P., Ewald, A. J., Martin, G. R., and Werb, Z. (2008). Genetic mosaic analysis reveals FGF receptor 2 function in terminal end buds during mammary gland branching morphogenesis. *Dev Biol* 321, 77-87.
- Luo, H., Tu, G., Liu, Z., and Liu, M. (2015). Cancer-associated fibroblasts: a multifaceted driver of breast cancer progression. *Cancer Lett* 361, 155-163.
- Maajani, K., Jalali, A., Alipour, S., Khodadost, M., Tohidinik, H. R., and Yazdani, K. (2019). The Global and Regional Survival Rate of Women With Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Breast Cancer* 19, 165-177.
- Mailleux, A. A., Spencer-Dene, B., Dillon, C., Ndiaye, D., Savona-Baron, C., Itoh, N., Kato, S., Dickson, C., Thierry, J. P., and Bellusci, S. (2002). Role of FGF10/FGFR2b signaling during mammary gland development in the mouse embryo. *Development* 129, 53-60.
- Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H., and Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther* 10, 955-960.
- Mao, Y., Keller, E. T., Garfield, D. H., Shen, K., and Wang, J. (2013). Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 32, 303-315.
- Marino, M., Galluzzo, P., and Ascenzi, P. (2006). Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics* 7, 497-508.
- Martinez-Outschoorn, U. E., Goldberg, A., Lin, Z., Ko, Y. H., Flomenberg, N., Wang, C., Pavlides, S., Pestell, R. G., Howell, A., Sotgia, F., and Lisanti, M. P. (2011). Anti-estrogen resistance in breast cancer is induced by the tumor microenvironment and can be overcome by inhibiting mitochondrial function in epithelial cancer cells. *Cancer Biol Ther* 12, 924-938.

- Martínez, N., García-Domínguez, C. A., Domingo, B., Oliva, J. L., Zarich, N., Sánchez, A., Gutiérrez-Eisman, S., Llopis, J., and Rojas, J. M. (2007). Sprouty2 binds Grb2 at two different proline-rich regions, and the mechanism of ERK inhibition is independent of this interaction. *Cell Signal* *19*, 2277-2285.
- McCarty, K. S., Silva, J. S., Cox, E. B., Leight, G. S., and Wells, S. A. (1983). Relationship of age and menopausal status to estrogen receptor content in primary carcinoma of the breast. *Ann Surg* *197*, 123-127.
- McGowan, E. M., and Clarke, C. L. (1999). Effect of overexpression of progesterone receptor A on endogenous progestin-sensitive endpoints in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* *13*, 1657-1671.
- McLeskey, S. W., Zhang, L., El-Ashry, D., Trock, B. J., Lopez, C. A., Kharbanda, S., Tobias, C. A., Lorant, L. A., Hannum, R. S., Dickson, R. B., and Kern, F. G. (1998). Tamoxifen-resistant fibroblast growth factor-transfected MCF-7 cells are cross-resistant in vivo to the antiestrogen ICI 182,780 and two aromatase inhibitors. *Clin Cancer Res* *4*, 697-711.
- Meyer, K. B., Maia, A. T., O'Reilly, M., Teschendorff, A. E., Chin, S. F., Caldas, C., and Ponder, B. A. (2008). Allele-specific up-regulation of FGFR2 increases susceptibility to breast cancer. *PLoS Biol* *6*, e108.
- Migliaccio, A., Piccolo, D., Castoria, G., Di Domenico, M., Bilancio, A., Lombardi, M., Gong, W., Beato, M., and Auricchio, F. (1998). Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J* *17*, 2008-2018.
- Mohammed, H., Russell, I. A., Stark, R., Rueda, O. M., Hickey, T. E., Tarulli, G. A., Serandour, A. A., Birrell, S. N., Bruna, A., Saadi, A., *et al.* (2015). Progesterone receptor modulates ER α action in breast cancer. *Nature* *523*, 313-317.
- Montazeri, K., and Bellmunt, J. (2020). Erdafitinib for the treatment of metastatic bladder cancer. *Expert Rev Clin Pharmacol* *13*, 1-6.
- Monteran, L., and Erez, N. (2019). The Dark Side of Fibroblasts: Cancer-Associated Fibroblasts as Mediators of Immunosuppression in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol* *10*, 1835.

- Morley, P., Whitfield, J. F., Vanderhyden, B. C., Tsang, B. K., and Schwartz, J. L. (1992). A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology* *131*, 1305-1312.
- Mota, A. L., Evangelista, A. F., Macedo, T., Oliveira, R., Scapulatempo-Neto, C., Vieira, R. A., and Marques, M. M. C. (2017). Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical markers. *Oncol Lett* *13*, 4708-4712.
- Moussatche, P., and Lyons, T. J. (2012). Non-genomic progesterone signalling and its non-canonical receptor. *Biochem Soc Trans* *40*, 200-204.
- Mukherjee, A., Russell, R., Chin, S. F., Liu, B., Rueda, O. M., Ali, H. R., Turashvili, G., Mahler-Araujo, B., Ellis, I. O., Aparicio, S., *et al.* (2018). Associations between genomic stratification of breast cancer and centrally reviewed tumour pathology in the METABRIC cohort. *NPJ Breast Cancer* *4*, 5.
- Mulac-Jericevic, B., Lydon, J. P., DeMayo, F. J., and Conneely, O. M. (2003). Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 9744-9749.
- Mulac-Jericevic, B., Mullinax, R. A., DeMayo, F. J., Lydon, J. P., and Conneely, O. M. (2000). Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* *289*, 1751-1754.
- Murphy, L. C., Seekallu, S. V., and Watson, P. H. (2011). Clinical significance of estrogen receptor phosphorylation. *Endocr Relat Cancer* *18*, R1-14.
- Musgrove, E. A., and Sutherland, R. L. (2009). Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer* *9*, 631-643.
- Musolino, A., Campone, M., Neven, P., Denduluri, N., Barrios, C. H., Cortes, J., Blackwell, K., Soliman, H., Kahan, Z., Bonnefoi, H., *et al.* (2017). Phase II, randomized, placebo-controlled study of dovitinib in combination with fulvestrant in postmenopausal patients with HR. *Breast Cancer Res* *19*, 18.
- Need, E. F., Selth, L. A., Trotta, A. P., Leach, D. A., Giorgio, L., O'Loughlin, M. A., Smith, E., Gill, P. G., Ingman, W. V., Graham, J. D., and Buchanan, G. (2015). The unique transcriptional

response produced by concurrent estrogen and progesterone treatment in breast cancer cells results in upregulation of growth factor pathways and switching from a Luminal A to a Basal-like subtype. *BMC Cancer* 15, 791.

Nelson, C. C., Hendy, S. C., Shukin, R. J., Cheng, H., Bruchofsky, N., Koop, B. F., and Rennie, P. S. (1999). Determinants of DNA sequence specificity of the androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors: evidence for differential steroid receptor response elements. *Mol Endocrinol* 13, 2090-2107.

Nielsen, T. O., Parker, J. S., Leung, S., Voduc, D., Ebbert, M., Vickery, T., Davies, S. R., Snider, J., Stijleman, I. J., Reed, J., *et al.* (2010). A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 16, 5222-5232.

Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., and Gustafsson, J. A. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81, 1535-1565.

Obr, A. E., and Edwards, D. P. (2012). The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 357, 4-17.

Ornitz, D. M., and Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2, REVIEWS3005.

Ornitz, D. M., and Itoh, N. (2015). The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4, 215-266.

Osborne, C. K., and Schiff, R. (2011). Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med* 62, 233-247.

Osborne, C. K., Schiff, R., Arpino, G., Lee, A. S., and Hilsenbeck, V. G. (2005). Endocrine responsiveness: understanding how progesterone receptor can be used to select endocrine therapy. *Breast* 14, 458-465.

Pallegar, N. K., and Christian, S. L. (2020). Adipocytes in the Tumour Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 1234, 1-13.

Palmieri, C., Roberts-Clark, D., Assadi-Sabet, A., Coope, R. C., O'Hare, M., Sunter, A., Hanby, A., Slade, M. J., Gomm, J. J., Lam, E. W., and Coombes, R. C. (2003). Fibroblast

growth factor 7, secreted by breast fibroblasts, is an interleukin-1beta-induced paracrine growth factor for human breast cells. *J Endocrinol* 177, 65-81.

Park, Y. R., Lee, J., Jung, J. H., Kim, W. W., Park, C. S., Lee, R. K., Chae, Y. S., Lee, S. J., Park, J. Y., and Park, H. Y. (2020). Absence of estrogen receptor is associated with worse oncologic outcome in patients who were received neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Asian J Surg* 43, 467-475.

Parker, J. S., Mullins, M., Cheang, M. C., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., *et al.* (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 27, 1160-1167.

Parl, F. F., Schmidt, B. P., Dupont, W. D., and Wagner, R. K. (1984). Prognostic significance of estrogen receptor status in breast cancer in relation to tumor stage, axillary node metastasis, and histopathologic grading. *Cancer* 54, 2237-2242.

Parsa, S., Ramasamy, S. K., De Langhe, S., Gupte, V. V., Haigh, J. J., Medina, D., and Bellusci, S. (2008). Terminal end bud maintenance in mammary gland is dependent upon FGFR2b signaling. *Dev Biol* 317, 121-131.

Peppercorn, J., Perou, C. M., and Carey, L. A. (2008). Molecular subtypes in breast cancer evaluation and management: divide and conquer. *Cancer Invest* 26, 1-10.

Perez-Garcia, J., Muñoz-Couselo, E., Soberino, J., Racca, F., and Cortes, J. (2018). Targeting FGFR pathway in breast cancer. *Breast* 37, 126-133.

Perkins, M. S., Louw-du Toit, R., and Africander, D. (2018). Hormone Therapy and Breast Cancer: Emerging Steroid Receptor Mechanisms. *J Mol Endocrinol* 61, R133-R160.

Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752.

Piasecka, D., Braun, M., Kitowska, K., Mieczkowski, K., Kordek, R., Sadej, R., and Romanska, H. (2019). FGFs/FGFRs-dependent signalling in regulation of steroid hormone receptors - implications for therapy of luminal breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 38, 230.

- Piasecka, D., Kitowska, K., Czaplinska, D., Mieczkowski, K., Mieszkowska, M., Turczyk, L., Skladanowski, A. C., Zaczek, A. J., Biernat, W., Kordek, R., *et al.* (2016). Fibroblast growth factor signalling induces loss of progesterone receptor in breast cancer cells. *Oncotarget*.
- Pollock, P. M., Gartside, M. G., Dejeza, L. C., Powell, M. A., Mallon, M. A., Davies, H., Mohammadi, M., Futreal, P. A., Stratton, M. R., Trent, J. M., and Goodfellow, P. J. (2007). Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. *Oncogene* 26, 7158-7162.
- Polyak, K., Haviv, I., and Campbell, I. G. (2009). Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet* 25, 30-38.
- Pond, A. C., Bin, X., Batts, T., Roarty, K., Hilsenbeck, S., and Rosen, J. M. (2013). Fibroblast growth factor receptor signaling is essential for normal mammary gland development and stem cell function. *Stem Cells* 31, 178-189.
- Prat, A., and Perou, C. M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* 5, 5-23.
- Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., Díez, M., Viladot, M., Arance, A., and Muñoz, M. (2015). Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast* 24 Suppl 2, S26-35.
- Puhalla, S., Bhattacharya, S., and Davidson, N. E. (2012). Hormonal therapy in breast cancer: a model disease for the personalization of cancer care. *Mol Oncol* 6, 222-236.
- Qiu, M., and Lange, C. A. (2003). MAP kinases couple multiple functions of human progesterone receptors: degradation, transcriptional synergy, and nuclear association. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85, 147-157.
- Qiu, M., Olsen, A., Faivre, E., Horwitz, K. B., and Lange, C. A. (2003). Mitogen-activated protein kinase regulates nuclear association of human progesterone receptors. *Mol Endocrinol* 17, 628-642.
- Qiu, S. Q., Waaijer, S. J. H., Zwager, M. C., de Vries, E. G. E., van der Vegt, B., and Schröder, C. P. (2018). Tumor-associated macrophages in breast cancer: Innocent bystander or important player? *Cancer Treat Rev* 70, 178-189.

Quail, D. F., and Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 19, 1423-1437.

Quirke, V. M. (2017). Tamoxifen from Failed Contraceptive Pill to Best-Selling Breast Cancer Medicine: A Case-Study in Pharmaceutical Innovation. *Front Pharmacol* 8, 620.

Radde, B. N., Ivanova, M. M., Mai, H. X., Salabei, J. K., Hill, B. G., and Klinge, C. M. (2015). Bioenergetic differences between MCF-7 and T47D breast cancer cells and their regulation by oestradiol and tamoxifen. *Biochem J* 465, 49-61.

Reintjes, N., Li, Y., Becker, A., Rohmann, E., Schmutzler, R., and Wollnik, B. (2013). Activating somatic FGFR2 mutations in breast cancer. *PLoS One* 8, e60264.

Reis-Filho, J. S., and Pusztai, L. (2011). Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet* 378, 1812-1823.

Richardson, A. E., Hamilton, N., Davis, W., Brito, C., and De León, D. (2011). Insulin-like growth factor-2 (IGF-2) activates estrogen receptor- α and - β via the IGF-1 and the insulin receptors in breast cancer cells. *Growth Factors* 29, 82-93.

Richer, J. K., Jacobsen, B. M., Manning, N. G., Abel, M. G., Wolf, D. M., and Horwitz, K. B. (2002). Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 277, 5209-5218.

Riggs, B. L., and Hartmann, L. C. (2003). Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med* 348, 618-629.

Rossouw, J. E., Anderson, G. L., Prentice, R. L., LaCroix, A. Z., Kooperberg, C., Stefanick, M. L., Jackson, R. D., Beresford, S. A., Howard, B. V., Johnson, K. C., *et al.* (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288, 321-333.

Rowan, B. G., and O'Malley, B. W. (2000). Progesterone receptor coactivators. *Steroids* 65, 545-549.

Ruohola, J. K., Viitanen, T. P., Valve, E. M., Seppänen, J. A., Loponen, N. T., Keskitalo, J. J., Lakkakorpi, P. T., and Härkönen, P. L. (2001). Enhanced invasion and tumor growth of

fibroblast growth factor 8b-overexpressing MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* *61*, 4229-4237.

Russnes, H. G., Lingjærde, O. C., Børresen-Dale, A. L., and Caldas, C. (2017). Breast Cancer Molecular Stratification: From Intrinsic Subtypes to Integrative Clusters. *Am J Pathol* *187*, 2152-2162.

Safe, S., and Kim, K. (2008). Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol* *41*, 263-275.

Sahai, E., Astsaturov, I., Cukierman, E., DeNardo, D. G., Egeblad, M., Evans, R. M., Fearon, D., Greten, F. R., Hingorani, S. R., Hunter, T., *et al.* (2020). A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer* *20*, 174-186.

Samaan, N. A., Buzdar, A. U., Aldinger, K. A., Schultz, P. N., Yang, K. P., Romsdahl, M. M., and Martin, R. (1981). Estrogen receptor: a prognostic factor in breast cancer. *Cancer* *47*, 554-560.

Santen, R. J., Santner, S. J., Pauley, R. J., Tait, L., Kasetta, J., Demers, L. M., Hamilton, C., Yue, W., and Wang, J. P. (1997). Estrogen production via the aromatase enzyme in breast carcinoma: which cell type is responsible? *J Steroid Biochem Mol Biol* *61*, 267-271.

Sever, R., and Glass, C. K. (2013). Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *5*, a016709.

Shatnawi, A., Tran, T., and Ratnam, M. (2007). R5020 and RU486 act as progesterone receptor agonists to enhance Sp1/Sp4-dependent gene transcription by an indirect mechanism. *Mol Endocrinol* *21*, 635-650.

Shekhar, M. P., Santner, S., Carolin, K. A., and Tait, L. (2007). Direct involvement of breast tumor fibroblasts in the modulation of tamoxifen sensitivity. *Am J Pathol* *170*, 1546-1560.

Shen, T., Horwitz, K. B., and Lange, C. A. (2001). Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol Cell Biol* *21*, 6122-6131.

- Shi, Y. J., Tsang, J. Y., Ni, Y. B., Chan, S. K., Chan, K. F., and Tse, G. M. (2016). FGFR1 is an adverse outcome indicator for luminal A breast cancers. *Oncotarget* 7, 5063-5073.
- Shyamala, G. (1999). Progesterone signaling and mammary gland morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4, 89-104.
- Shyamala, G., Schneider, W., and Guiot, M. C. (1992). Estrogen dependent regulation of estrogen receptor gene expression in normal mammary gland and its relationship to estrogenic sensitivity. *Receptor* 2, 121-128.
- Siersbæk, R., Kumar, S., and Carroll, J. S. (2018). Signaling pathways and steroid receptors modulating estrogen receptor α function in breast cancer. *Genes Dev* 32, 1141-1154.
- Simpson, E. R., and Davis, S. R. (2001). Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis--some new perspectives. *Endocrinology* 142, 4589-4594.
- Sisti, J. S., Collins, L. C., Beck, A. H., Tamimi, R. M., Rosner, B. A., and Eliassen, A. H. (2016). Reproductive risk factors in relation to molecular subtypes of breast cancer: Results from the nurses' health studies. *Int J Cancer* 138, 2346-2356.
- Smith, L. M., Wise, S. C., Hendricks, D. T., Sabichi, A. L., Bos, T., Reddy, P., Brown, P. H., and Birrer, M. J. (1999). cJun overexpression in MCF-7 breast cancer cells produces a tumorigenic, invasive and hormone resistant phenotype. *Oncogene* 18, 6063-6070.
- Stauber, D. J., DiGabriele, A. D., and Hendrickson, W. A. (2000). Structural interactions of fibroblast growth factor receptor with its ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 49-54.
- Stingl, J. (2011). Estrogen and progesterone in normal mammary gland development and in cancer. *Horm Cancer* 2, 85-90.
- Sun, Y. (2016). Tumor microenvironment and cancer therapy resistance. *Cancer Lett* 380, 205-215.
- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P. P., and Zhu, H. P. (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci* 13, 1387-1397.

- Sørbye, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., *et al.* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10869-10874.
- Tamaru, N., Hishikawa, Y., Ejima, K., Nagasue, N., Inoue, S., Muramatsu, M., Hayashi, T., and Koji, T. (2004). Estrogen receptor-associated expression of keratinocyte growth factor and its possible role in the inhibition of apoptosis in human breast cancer. *Lab Invest* 84, 1460-1471.
- Taraborrelli, S. (2015). Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstet Gynecol Scand* 94 *Suppl* 161, 8-16.
- Thien, C. B., and Langdon, W. Y. (2001). Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 294-307.
- Tian, J. M., Ran, B., Zhang, C. L., Yan, D. M., and Li, X. H. (2018). Estrogen and progesterone promote breast cancer cell proliferation by inducing cyclin G1 expression. *Braz J Med Biol Res* 51, 1-7.
- Tiong, K. H., Mah, L. Y., and Leong, C. O. (2013). Functional roles of fibroblast growth factor receptors (FGFRs) signaling in human cancers. *Apoptosis* 18, 1447-1468.
- Totta, P., Pesiri, V., Marino, M., and Acconcia, F. (2014). Lysosomal function is involved in 17 β -estradiol-induced estrogen receptor α degradation and cell proliferation. *PLoS One* 9, e94880.
- Tournier, C. (2013). The 2 Faces of JNK Signaling in Cancer. *Genes Cancer* 4, 397-400.
- Trueb, B. (2011). Biology of FGFR1, the fifth fibroblast growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci* 68, 951-964.
- Trédan, O., Galmarini, C. M., Patel, K., and Tannock, I. F. (2007). Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst* 99, 1441-1454.
- Tung, L., Abdel-Hafiz, H., Shen, T., Harvell, D. M., Nitao, L. K., Richer, J. K., Sartorius, C. A., Takimoto, G. S., and Horwitz, K. B. (2006). Progesterone receptors (PR)-B and -A regulate

transcription by different mechanisms: AF-3 exerts regulatory control over coactivator binding to PR-B. *Mol Endocrinol* 20, 2656-2670.

Turczyk, L., Kitowska, K., Mieszkowska, M., Mieczkowski, K., Czaplinska, D., Piasecka, D., Kordek, R., Skladanowski, A. C., Potemski, P., Romanska, H. M., and Sadej, R. (2017). FGFR2-Driven Signaling Counteracts Tamoxifen Effect on ER α -Positive Breast Cancer Cells. *Neoplasia* 19, 791-804.

Turner, N., Lambros, M. B., Horlings, H. M., Pearson, A., Sharpe, R., Natrajan, R., Geyer, F. C., van Kouwenhove, M., Kreike, B., Mackay, A., *et al.* (2010). Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets. *Oncogene* 29, 2013-2023.

Vainikka, S., Partanen, J., Bellosta, P., Coulier, F., Birnbaum, D., Basilico, C., Jaye, M., and Alitalo, K. (1992). Fibroblast growth factor receptor-4 shows novel features in genomic structure, ligand binding and signal transduction. *EMBO J* 11, 4273-4280.

Vignon, F., Bardon, S., Chalbos, D., and Rochefort, H. (1983). Antiestrogenic effect of R5020, a synthetic progestin in human breast cancer cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 56, 1124-1130.

Visvanathan, K., Fabian, C. J., Bantug, E., Brewster, A. M., Davidson, N. E., DeCensi, A., Floyd, J. D., Garber, J. E., Hofstatter, E. W., Khan, S. A., *et al.* (2019). Use of Endocrine Therapy for Breast Cancer Risk Reduction: ASCO Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* 37, 3152-3165.

Walker, C., Mojares, E., and Del Río Hernández, A. (2018). Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. *Int J Mol Sci* 19.

Wang, H., Yang, Z., and Zhang, H. (2013). Assessing interactions between the associations of fibroblast growth factor receptor 2 common genetic variants and hormone receptor status with breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 137, 511-522.

Wargon, V., Riggio, M., Giulianelli, S., Sequeira, G. R., Rojas, P., May, M., Polo, M. L., Gorostiaga, M. A., Jacobsen, B., Molinolo, A., *et al.* (2015). Progestin and antiprogestin responsiveness in breast cancer is driven by the PRA/PRB ratio via AIB1 or SMRT recruitment to the CCND1 and MYC promoters. *Int J Cancer* 136, 2680-2692.

- Webb, P., Nguyen, P., Valentine, C., Lopez, G. N., Kwok, G. R., McInerney, E., Katzenellenbogen, B. S., Enmark, E., Gustafsson, J. A., Nilsson, S., and Kushner, P. J. (1999). The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol Endocrinol* 13, 1672-1685.
- Weber, C. E., Kothari, A. N., Wai, P. Y., Li, N. Y., Driver, J., Zapf, M. A., Franzen, C. A., Gupta, G. N., Osipo, C., Zlobin, A., *et al.* (2015). Osteopontin mediates an MZF1-TGF- β 1-dependent transformation of mesenchymal stem cells into cancer-associated fibroblasts in breast cancer. *Oncogene* 34, 4821-4833.
- Wesche, J., Haglund, K., and Haugsten, E. M. (2011). Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem J* 437, 199-213.
- Wilking, N., Rutqvist, L. E., Nordenskjöld, B., and Skoog, L. (1989). Steroid receptor levels in breast cancer. Relationships with age and menopausal status. *Acta Oncol* 28, 807-810.
- Wisdom, R. (1999). AP-1: one switch for many signals. *Exp Cell Res* 253, 180-185.
- Wu, Q., Li, B., Li, Z., Li, J., and Sun, S. (2019). Cancer-associated adipocytes: key players in breast cancer progression. *J Hematol Oncol* 12, 95.
- Wyckoff, J., Wang, W., Lin, E. Y., Wang, Y., Pixley, F., Stanley, E. R., Graf, T., Pollard, J. W., Segall, J., and Condeelis, J. (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* 64, 7022-7029.
- Yamashita, H., Nishio, M., Kobayashi, S., Ando, Y., Sugiura, H., Zhang, Z., Hamaguchi, M., Mita, K., Fujii, Y., and Iwase, H. (2005). Phosphorylation of estrogen receptor alpha serine 167 is predictive of response to endocrine therapy and increases postrelapse survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 7, R753-764.
- Yau, C., Fedele, V., Roydasgupta, R., Fridlyand, J., Hubbard, A., Gray, J. W., Chew, K., Dairkee, S. H., Moore, D. H., Schittulli, F., *et al.* (2007). Aging impacts transcriptomes but not genomes of hormone-dependent breast cancers. *Breast Cancer Res* 9, R59.
- Yersal, O., and Barutca, S. (2014). Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol* 5, 412-424.

Yu, S., Kim, T., Yoo, K. H., and Kang, K. (2017). The T47D cell line is an ideal experimental model to elucidate the progesterone-specific effects of a luminal A subtype of breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 486, 752-758.

Yu, W. C., Leung, B. S., and Gao, Y. L. (1981). Effects of 17 beta-estradiol on progesterone receptors and the uptake of thymidine in human breast cancer cell line CAMA-1. *Cancer Res* 41, 5004-5009.

Yuan, J., Liu, M., Yang, L., Tu, G., Zhu, Q., Chen, M., Cheng, H., Luo, H., Fu, W., Li, Z., and Yang, G. (2015). Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype in the tamoxifen-resistant breast cancer cell: a new role for G protein-coupled estrogen receptor in mediating tamoxifen resistance through cancer-associated fibroblast-derived fibronectin and β 1-integrin signaling pathway in tumor cells. *Breast Cancer Res* 17, 69.

Yusoff, P., Lao, D. H., Ong, S. H., Wong, E. S., Lim, J., Lo, T. L., Leong, H. F., Fong, C. W., and Guy, G. R. (2002). Sprouty2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of Raf. *J Biol Chem* 277, 3195-3201.

Zeke, A., Misheva, M., Reményi, A., and Bogoyevitch, M. A. (2016). JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiol Mol Biol Rev* 80, 793-835.

Zhang, M. H., Man, H. T., Zhao, X. D., Dong, N., and Ma, S. L. (2014a). Estrogen receptor-positive breast cancer molecular signatures and therapeutic potentials (Review). *Biomed Rep* 2, 41-52.

Zhang, X., Ibrahimi, O. A., Olsen, S. K., Umemori, H., Mohammadi, M., and Ornitz, D. M. (2006). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem* 281, 15694-15700.

Zhang, X., Martinez, D., Koledova, Z., Qiao, G., Streuli, C. H., and Lu, P. (2014b). FGF ligands of the postnatal mammary stroma regulate distinct aspects of epithelial morphogenesis. *Development* 141, 3352-3362.

Zhang, X., Nie, D., and Chakrabarty, S. (2010). Growth factors in tumor microenvironment. *Front Biosci (Landmark Ed)* 15, 151-165.

- Zhang, X., Qiao, G., and Lu, P. (2014c). Modulation of fibroblast growth factor signaling is essential for mammary epithelial morphogenesis. *PLoS One* *9*, e92735.
- Zhang, Y., Lu, H., Ji, H., Lu, L., Liu, P., Hong, R., and Li, Y. (2017). Association between rs11200014, rs2981579, and rs1219648 polymorphism and breast cancer susceptibility: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* *96*, e9246.
- Zhou, L., Yao, F., Luan, H., Wang, Y., Dong, X., Zhou, W., and Wang, Q. (2012). Three novel functional polymorphisms in the promoter of FGFR2 gene and breast cancer risk: a HuGE review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* *136*, 885-897.
- Zhou, W., and Slingerland, J. M. (2014). Links between oestrogen receptor activation and proteolysis: relevance to hormone-regulated cancer therapy. *Nat Rev Cancer* *14*, 26-38.
- Ziani, L., Chouaib, S., and Thiery, J. (2018). Alteration of the Antitumor Immune Response by Cancer-Associated Fibroblasts. *Front Immunol* *9*, 414.