

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko – biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Adéla Říhová

Význam estrogenového receptoru spřaženého s G proteinem (GPER) pro rakovinu prsu

Significance of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) for breast cancer

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Radek Indra, Ph.D.
Praha, 2024

Abstrakt

Rakovina prsu představuje nejčastěji diagnostikovanou formu maligního onemocnění u žen. Její progrese je ovlivněna steroidním hormonem estrogenem, který působí prostřednictvím tří receptorů, estrogenového receptoru alfa ($ER\alpha$), estrogenového receptoru beta ($ER\beta$) a estrogenového receptoru spřaženého s G proteinem (GPER). Zatímco $ER\alpha$ a $ER\beta$ jsou jaderné receptory, které regulují expresi cílových genů, tak GPER je membránový receptor, který zprostředkovává rychlé mimojaderné signalizace. Z hlediska terapie je analýza exprese estrogenových receptorů klíčová, jelikož jejich přítomnost výrazně ovlivňuje úspěšnost léčby. Zdá se, že exprese GPER v rakovinných buňkách zhoršuje prognózu. Na základě dostupné literatury jsem shrnula hlavní signální dráhy aktivované klasickými estrogenovými receptory a GPER v buňkách rakoviny prsu, a jejich vliv na proliferaci a progresi karcinomu. Dále jsem se zaměřila na různé mechanismy, kterými může GPER přispívat ke vzniku rezistence na tamoxifen, což je nejčastěji užívané léčivo proti rakovině pozitivní na estrogenový receptor.

Klíčová slova: GPER, estrogenový receptor, $ER\alpha$, $ER\beta$, karcinom prsu, receptor spřažený s G proteinem

Abstract

Breast cancer is the most commonly diagnosed form of malignant disease in women. Its progression is influenced by the steroid hormone estrogen, which acts through three receptors: estrogen receptor alpha ($ER\alpha$), estrogen receptor beta ($ER\beta$), and G protein-coupled estrogen receptor (GPER). $ER\alpha$ and $ER\beta$ are nuclear receptors that regulate the expression of target genes, while GPER is a membrane receptor that mediates rapid non-genomic signaling. From a therapeutic standpoint, analyzing estrogen receptor expression is crucial for successful treatment. The presence of estrogen receptors significantly affects treatment outcomes. The expression of GPER in cancer cells has been shown to worsen prognosis. The main signaling pathways activated by classical estrogen receptors and GPER in breast cancer cells, and their influence on proliferation and cancer progression, have been summarized based on available literature. In addition, this text focuses on the mechanisms by which GPER may contribute to the development of resistance to tamoxifen, the most commonly used drug against ER+ breast carcinomas.

Key words: GPER, estrogen receptor, $ER\alpha$, $ER\beta$, breast carcinoma, G protein-coupled receptor

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 22.dubna 2024.

.....

Adéla Říhová

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Radku Indrovi, Ph.D. za trpělivost a cenné rady při vypracování bakalářské práce.

SEZNAM ZKRATEK

AI	inhibitory aromatázy
AP1	aktivační protein 1
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CTGF	růstový faktor pojivové tkáně (z angl. connective tissue growth factor)
DAG	1,2–diacylglycerol
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru (z angl. epidermal growth factor receptor)
ER	estrogenový receptor
ER α	estrogenový receptor alfa
ER β	estrogenový receptor beta
ERE	estrogenový responzivní element
Erk1/2	extracelulárně regulovaná kináza 1 / 2
ET	endokrinní terapie
GPCR	receptor spřažený s G proteinem (z angl. G protein coupled receptor)
GPER	estrogenový receptor spřažený s G proteinem (z angl. G protein estrogen receptor)
HB–EGF	heparinem vázaný epidermální růstový faktor (z angl. heparin–binding epidermal growth factor)
HER2	receptor lidského epidermálního růstového faktoru 2 (z angl. human epidermal growth factor receptor 2)
IP3	inositol–1,4,5–trifosfát
MIR	poměr úmrtnosti k incidenci (z angl. mortality to incidence)
OHT	hydroxy–tamoxifen
PARP	poly ADP–ribóza polymeráza
PIP2	fosfatidylinositol–4,5–bifosfát
PIP3	fosfatidylinositol–3,4,5–trisfosfát
PKA	protein kináza A
PKB	protein kináza B
PKC	protein kináza C

PR	progesteronový receptor
SERDs	selektivní estrogenové receptorové downregulátory
SERMs	selektivní estrogenové receptorové modulátory
Sp1	specifický protein 1
TAM	tamoxifen
TNBC	trojitě negativní rakovina prsu (z angl. triple negative breast cancer)

Obsah

1	Úvod	1
2	Rakovina prsu	3
2.1	Typy rakoviny prsu	3
2.1.1	Dělení nádorů dle původu nádoru a typu postižených buněk	3
2.1.2	Dělení nádorů dle přítomnosti receptorů	3
2.2	Vznik rakoviny prsu	4
2.2.1	Epigenetika rakoviny prsu.....	5
2.2.2	Statistika	6
3	Diagnostika a léčba	7
3.1	Léčba (HR+) karcinomu prsu	7
3.2	Léčba HER2 karcinomu prsu	8
3.3	Léčba (HR-) karcinomu prsu	8
3.3.1	Trojité negativní karcinom prsu.....	8
4	Jaderné estrogenové receptory (ER)	11
4.1	Obecná charakteristika ER α a ER β	11
4.2	Rozdílná funkce ER α a ER β	12
5	Membránový estrogenový receptor	14
5.1	Základní struktura receptoru GPER.....	14
5.2	Výskyt a role GPER	15
6	Mechanismus signalizace GPER	16
6.1	GPER a negenomické signalizace.....	16
6.1.1	Dráha receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR)	16
6.1.2	Kinázové dráhy (PI3–kinázová/Akt, Erk1/2 MAPK)	17
6.1.3	Ostatní dráhy spojené s aktivací GPER	18
6.2	Vztah GPER a jaderného estrogenového receptoru ER	18
6.3	Vliv GPER na patofyziologii karcinomu prsu.....	19
6.3.1	Vliv estrogenového receptoru spáženého s G-protein na terapii	20
6.3.2	Tamoxifen	22
7	Závěr	23
	Seznam literatury	24

1 Úvod

Karcinom prsu je celosvětově nejčastější zhoubné nádorové onemocnění žen a zároveň je také nejčastější příčinou úmrtí žen v produktivním věku. [1] Za rok 2020, bylo rakovinou prsu diagnostikováno 2,3 milionů lidí, což představuje 11,7 % celkového počtu případů rakoviny. Z tohoto množství diagnostikovaných pacientů jich zemře 685 000, což řadí rakovinu prsu mezi rakoviny s nejvyšší mortalitou. [1] Karcinom prsu se objevuje vzácně i v mužské populaci. Zde není tak rozšířený, zato má však horší prognózu. [2] Obecně platí, tak jako u jiných zhoubných nádorů, že čím dřívější diagnostika, tím vyšší je šance na uzdravení. Primárně se u pacientek zjišťuje přítomnost estrogenových receptorů, od kterých se následně odvíjí léčba.

Pro porozumění důležitosti vlivu estrogenů na vznik rakoviny prsu je důležité znát jejich funkci v lidském organismu. Estrogeny jsou steroidní hormony (skupina C18) s podobnou funkcí a strukturou. Tato vlastnost jim umožňuje se vázat na estrogenové receptory, jen s odlišnou afinitou a odpovědí. [3–5] Mají klíčový vliv na vývin prsní tkáně, kde zodpovídají za její správný vývoj, diferenciaci a tím plnění správné funkce. [6] Vznikají prostřednictvím procesu aromatizace, který probíhá v aromatázovém komplexu z mužského pohlavního hormonu testosteronu, který je přeměněn na estrogen. U pacientek s nefunkčním aromatázovým enzymovým komplexem může být pozorována absence vývinu prsní tkáně během puberty. Existuje terapie, která nahrazuje chybějící estrogeny v těle, čímž vede k vyvolání menstruačního cyklu a normálnímu vývinu prsů. [7,8]

Estrogeny plní několik klíčových funkcí v lidském těle, včetně regulace menstruačního cyklu, správného vývoje reprodukčního systému, regulace metabolismu a mozkové funkce. [9] Jsou známé především jako ženské pohlavní hormony, ale mají také důležitou funkci u mužů, kde se významně podílí na regulaci spermatogeneze a vývoje a na zachování normálního reprodukčního systému. [10] Existují čtyři základní typy estrogenů, jejichž koncentrace se liší v průběhu života a v závislosti na věku. [3,4] Pro reprodukční období u žen je charakteristická zvýšená koncentrace 17β -estradiolu, během plodového života a těhotenství se jedná o estetrol a estriol. Estron je pak produkován během menopauzy. [4]

Estrogeny vykazují své účinky prostřednictvím estrogenových receptorů, přičemž jsou známy tři hlavní typy: estrogenový receptor α , estrogenový receptor β a estrogenový receptor spřažený s G proteinem. Zatímco pro estrogenový receptor alfa ($ER\alpha$) a estrogenový receptor beta ($ER\beta$) je typická jaderná lokalizace, tak receptor spřažený s G proteinem

(GPER) je receptor membránový a má odlišný mechanismus působení než tradiční jaderné estrogenové receptory. [4,11] Aktivace GPER může vést k různým signálním drahám a ovlivňovat buněčné procesy, včetně těch spojených s růstem a proliferací buněk. Po aktivaci estrogenového receptoru následuje genová či negenová odpověď. [4,12–15]

Kromě klasických estrogenových receptorů vykazuje většina žen s rakovinou prsu expresi progesteronových receptorů, vážící hormony progesterony, které také podporují růst a proliferaci rakovinných buněk. [16]

Poruchy regulace estrogenové signalizace mohou vést k různým patologickým stavům, a proto je důležité lépe porozumět mechanismům, které stojí za účinky estrogenů a regulaci estrogenových receptorů. Tato znalost může poskytnout základ pro vývoj cílených terapeutických strategií a léčebných postupů. Bakalářská práce se bude zabývat konkrétně úlohou estrogenového receptoru spřaženého s G proteinem s důrazem na význam a vývoj rakoviny prsu.

2 Rakovina prsu

2.1 Typy rakoviny prsu

2.1.1 Dělení nádorů dle původu nádoru a typu postižených buněk

Podle původu nádoru a typu postižených buněk dělíme nádory na karcinomy, postihující buňky epitelu, a sarkomy, které tvoří zhruba 1 % nádorů prsu a postihují pojivové tkáně prsu. Karcinomy lze rozdělit do dvou skupiny – duktální a lobulární karcinomy. Duktální karcinomy prsu jsou nejčastějším typem rakoviny prsu a mohou se vyskytovat ve více variantách. Lobulární karcinomy prsu jsou méně časté než duktální, ale mohou být diagnostikovány ve více podtypech. [17]

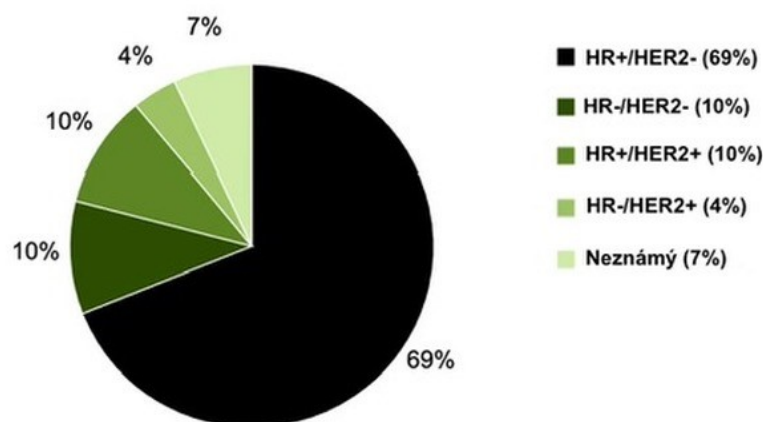
2.1.2 Dělení nádorů dle přítomnosti receptorů

Rakovinu prsu nejčastěji dělíme dle přítomnosti hormonálních receptorů do dvou základních kategorií, jedná se o hormon–receptor pozitivní a hormon–receptor negativní.

Pro hormon–receptor pozitivní rakovinu prsu (tzn. HR+) je charakteristická přítomnost estrogenového receptoru (ER) a/ nebo progesteronového receptoru (PR). Většina diagnostikovaných rakovin bývá HR+ (obrázek 1). Tento typ rakoviny dobře odpovídá na hormonální terapii, jako jsou inhibitory aromatázy, tamoxifen a další léčiva a mívá zpravidla dobrou prognózu. [17–19] Naopak hormon–receptor negativní (tzn. HR–) karcinomy tyto receptory neexprimují, což nepříznivě ovlivňuje léčbu pacienta. [17,20]

Jak u HR+, tak u HR- karcinomů může být exprimován HER2 neboli receptor lidského epidermálního růstového faktoru 2. Tento receptor patří do rodiny tyrosinkinázových receptorů a léčba tohoto typu rakoviny byla po dlouho dobu velmi komplikovaná. V případě, že je receptor na povrchu buňky nadměrně exprimován, jedná se pak o HER2–pozitivní karcinom prsu (obrázek 1). [21]

Do HR- karcinomů řadíme trojitě negativní rakovinu prsu, jak již název napovídá, tento typ neexprimuje ani jeden ze zmíněných receptorů. [17] Tento typ nádorů není tak častý (obrázek 1), je pro něj typická agresivita a špatná prognóza přežití. [20] Detailněji se problematikou tohoto typu nádorů zabývá následující kapitola.



Obrázek 1 Kruhový graf znázorňující procentuální zastoupení jednotlivých podtypů rakoviny prsu. [převzato a upraveno z 20] HR+/ hormon receptor pozitivní. HR-/ hormon receptor negativní. HER2-/receptor epidermálního růstového faktoru negativní. HER2+/receptor epidermálního růstového faktoru pozitivní.

2.2 Vznik rakoviny prsu

Ačkoli jsou znalosti biologie karcinomu prsu na vysoké úrovni, tak stále není známý přesný mechanismus vzniku. Mezi nejčastější příčiny dědičné formy rakoviny prsu se řadí zárodečné mutace v genech BRCA1 a BRCA2, které jsou přenášeny autozomálně dominantně (tzn. potomek má 50% šanci zdědit mutace bez rozdílu na pohlaví). V důsledku časté sporadické povahy nádorů však nelze vznik rakoviny vysvětlit genetickým pozadím. [22] [23,24] Z tohoto důvodu se vědci soustředí na epigenetické pozadí nádorů, na procesy jako je metylace DNA, modifikace histonů a mikro RNA. [25–28]

Přestože nádory vznikají zatím z nejasných důvodů, jsou známy rizikové a protektivní faktory, které ovlivňují vznik karcinomu. Mezi rizikové faktory řadíme špatný životní styl (kouření, nadměrná konzumace alkoholu, obezita, fyzická neaktivita), vliv hormonů a dědičnost. [29] Rozvíjející se rakovinu prsu v těle zpravidla podporuje již jednou prodělaná léčba karcinomu. [30] Riziko vzniku karcinomu se zvyšuje i vlivem brzkého nástupu menstruace či pozdní menopauzy. [31,32] Na základě výzkumů bylo zjištěno, že časný nástup menstruace (do věku 12 let) je spojen nejčastěji s rakovinou pozitivní pro estrogenové a progesteronové receptory. [31,33] Naopak nuliparita (nulipara je žena, která doposud nerodila) a zvyšující se věk prvního porodu byl typickým znakem u pacientek s rakovinou

pozitivní pro estrogenový receptor. Nález karcinomů, které neexprimovaly ani jeden z hormonálních receptorů, se často vyskytoval u mladších pacientek s vyšší tělesnou hmotností. Naopak u starších žen byly typické progesteronově–pozitivní karcinomy prsu. [33]

Mezi protektivní faktory patří kojení, přičemž ze studií je patrné, že kojení přispívá ke snížení vzniku karcinomu prsu až o 5 %. [34,35] Nicméně prozatimní výzkumy ukazují, že protektivní vliv kojení se vztahuje pouze na rakoviny spojené s mutacemi BRCA1. [35]

2.2.1 Epigenetika rakoviny prsu

I přes skutečnost, že většina karcinomů prsu vzniká náhodně a nemá jasnou příčinu, tak ve specifických případech může být způsobená mutací v určitých genech. Významné genetické mutace zodpovídající za vývoj rakoviny prsu nejčastěji nalezneme v genech BRCA1 a BRCA2. [23] Vzhledem k této heterogenitě se setkáváme se značnými komplikacemi při hledání vhodné léčby. Na diagnostice a ovlivnění léčby rakoviny prsu se podílí epigenetické procesy, jako je DNA metylace, modifikace histonů a aktivita mikro RNA (miRNA). [25–28]

První zmínka o zapojení mikro RNA ve vývoji rakoviny prsu pochází z roku 2005 a od té doby se na tuto problematiku zaměřila řada studií. [25–27] Mikro RNA je typ krátké jednořetězcové molekuly nekódující RNA, typicky obsahující 19–25 nukleotidů. Některé studie ukazují roli miRNA v regulaci genové exprese, kdy funguje jako antisense RNA, která se naváže na příslušný úsek mRNA a následně brání translaci mnoha proteinů, mezi nimiž jsou i estrogenové receptory alfa. Mezi takové typy řadíme miR–22, miR–155 a miR–213. [25,26] Proběhly také pokusy, které nasvědčovaly tomu, že miR–206 potlačuje expresi ER α , ale toto zjištění se později již nepodařilo potvrdit. [27]

Na základě známého vztahu mezi metylací CpG ostrůvků v DNA a deacetylací histonů v rakovinných buňkách vědci zkoumali, zda by mohla být histondeacetyláza zapojena do umlčení exprese ER α v ER–negativních tumorech. V minulosti bylo zjištěno, že absence genu pro ER α je spojena s abnormální metylací. Na základě této informace se pomocí podání inhibitoru histondeacetylázy trichostatinu A zkoumalo, zdali aktivita histondeacetyláz, enzymů odstraňující acetylové skupiny z histonů a tím vedoucí k potlačení genové exprese, přispívá k inaktivaci genu ER α . Tato hypotéza byla potvrzena, jelikož po podání trichostatinu A došlo k navrácení exprese estrogenového receptoru. [28]

2.2.2 Statistika

Ve Spojených státech rostla incidence rakoviny prsu poslední čtyři desetiletí, přičemž v letech 2010–2019 stoupala ročně o 0,5 %. Tento nárůst je zde dán zejména lokalizovanými nádory a onemocněními, které vykazují hormonální receptorovou pozitivitu. Naopak míra úmrtnosti na rakovinu prsu klesala od svého vrcholu v roce 1989, a to díky časně diagnostice a pokroku ve vývoji nových léčebných postupů. [36,37] Celková úmrtnost klesla o 43 %, což představuje o 460 000 méně úmrtí na rakovinu prsu v období 1989–2020. [37]

Karcinom prsu je jednou z nejčastějších rakovin také v České republice. V roce 2021 bylo diagnostikováno přibližně 8300 nových pacientů. Z nich až 1800 případů končí smrtí. [38] Od roku 2002 funguje v České republice celostátní program, který ženám po dovršení věku 45 let umožňuje bezplatné vyšetření prsou s cílem včasného zachycení nemoci. [39]

Zatímco incidence rakoviny prsu je u žen s tmavší pletí nižší, tak jejich úmrtnost je až o 40 % vyšší než u žen se světlou pletí, s nejnižším pětiletým relativním přežitím ve srovnáním se všemi rasovými/ etnickými skupinami. [40,41]

Další analýza populace přišla se zajímavým zjištěním ohledně odlišujícího se poměru mortality vůči incidenci (MIR, mortality to incidence ratio) rakoviny prsu mezi rozvojovými zeměmi a ekonomicky vyspělými státy. [42] Překvapivě je incidence vyšší v ekonomicky vyspělých státech, ale s vyšší šancí na přežití, zatímco v rozvojových zemích je vyšší mortalita. [43,44] Vyšší incidence v ekonomicky vyspělých státech (tj. státech, které mají vyšší hodnoty HDI, tzn. index lidského rozvoje) je následkem pokročilého věku při porodu, trendu nedostatečného kojení, brzkého nástupu menstruace a pozdějšího nástupu menopauzy. [32,44–46]

Jak již bylo výše zmíněno, rakovina prsu se nevyhýbá ani mužské populaci. Celkově činí 1 % rakoviny mléčné žlázy. Mluvíme zde o incidenci 1 případ na 100 000 mužů. [47] Dle shromážděných dat ze Spojených států Amerických z let 2018 je známo, že z 2550 mužů trpících rakovinou prsu jich zemře až 480. [48] Celková úmrtnost u mužů je vyšší, zejména díky tomu, že nemoc bývá diagnostikována až ve vyšším věku. Muži nepředpokládají, že by se jich mohla rakovina prsu vůbec týkat a jelikož u nich není umožněno pravidelné bezplatné vyšetření tak jako u žen, většinou se rakovina odhalí až v pozdějším a agresivnějším stádiu. [2]

3 Diagnostika a léčba

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem u žen, proto je včasná diagnostika a léčba tohoto onemocnění klíčová. Léčba karcinomu je vysoce subjektivní, záleží na typu a stádiu nádoru. Může zahrnovat různé terapeutické postupy, včetně hormonální terapie, cílené terapie a chemoterapie. Současně se stále více klade důraz na biologii onemocnění.

První, co se zjišťuje u rakoviny prsu je exprese rozpustných (jaderných) receptorů. Pro prognózu nádorů prsu je klíčová analýza exprese estrogenového receptoru alfa (ER α), progesteronového receptoru (PR) a receptoru lidského epidermálního růstového faktoru 2 (HER2). [17]

3.1 Léčba (HR+) karcinomu prsu

Jak již bylo zmíněno výše, pokud je výsledek na přítomnost ER α pozitivní, jedná se o HR+ karcinom prsu, u kterého s největší pravděpodobností bude mít úspěch hormonální, též nazývaná endokrinní, terapie. Základním předpokladem pro léčbu rakoviny prsu je blokáce produkce estrogenu či blokáce jeho navázání na příslušné receptory v buňkách. Tento typ léčby slouží k inhibici estrogenem–zprostředkované signalizace. [17,49] Terapie využívá selektivní estrogenové receptorové modulátory (SERMs – tamoxifen, raloxifen), které prostřednictvím vazby na estrogenový receptor blokují navázání samotného estrogenu, a tím blokují jeho signální dráhy a tzn. SERDs (selektivní estrogenové receptorové downregulátory, např. fulvestrant), které snižují koncentraci estrogenu v buňce. [17]

Inhibitory aromatázy (AI), například anastrozol a letrozol, se využívají také jako jedna z efektivních možností hormonální terapie pro léčbu hormon pozitivní rakoviny (HR+). Snižují totiž produkci estrogenu v tkáních. [18] Řada výzkumů dokazuje, že anastrozol je minimálně stejně účinný jako tamoxifen a dokonce v některých případech, tj. specifických podtypech rakoviny prsu, účinnější. Ukázal se jako efektivní možnost preoperativní endokrinní terapie pro postmenopauzální pacientky s hormonálně pozitivním karcinomem prsu a pro pacientky, které neprošly chemoterapií. [18] Také další inhibitor letrozol se při porovnání s tamoxifenem prokázal být účinnějším. [50] SERMs cílí přímo na estrogenové receptory, zatímco inhibitory aromatázy účinkují nepřímě.

Ovšem u ER α pozitivních pacientek může po čase dojít ke vzniku rezistence na endokrinní léčbu anebo dokonce jsou známy případy, kdy pacienti na léčbu neodpovídají již od začátku. [17,49] Přesný mechanismus, který vede k vzniku této rezistence, není zcela jasný, avšak existuje řada studií, které dokazují existenci extranukleární formy ER α , jejíž exprese

u HR+/HER2- pacientek koleruje se sníženou pravděpodobností pozitivní odpovědi při léčbě tamoxifenem. [49]

Víme, že znalost přítomnost progesteronového receptoru (PR) je klinicky důležitá. Karcinomy prsu ER+/PR+/HER2 mají lepší přežití, ať už jsou léčeny tamoxifenem či nikoli, zatímco karcinomy typu ER+/PR-/HER2 mají horší vlastnosti i prognózu. Nepřítomnost progesteronového receptoru může sloužit jako biomarker signalizující poruchu signálních drah růstových faktorů, což by mohlo souviset s rezistencí na léčbu tamoxifenem. [51,52]

Dá se tedy říci, že nejdůležitější faktor prognózy je přítomnost ER a/ nebo PR. Pokud pacient trpí hormon–pozitivní rakovinou prsu, očekává se, že bude dobře reagovat na hormonální léčbu. U pacientů, kteří neexprimují jeden či oba z těchto dvou receptorů, hormonální terapii nelze využít a mají zpravidla horší prognózu. [53]

Klinické studie naznačují, že pacientky s karcinomem prsu, který je pozitivní pro estrogenový receptor alfa (ER α) a GPER, hůře odpovídají na léčbu než ty s nádory, které jsou ER α –pozitivní a GPER negativní. Jak se zdá, absence GPER zlepšuje prognózu pacientek léčených tamoxifenem, léčivem užívaným k terapii ER α –pozitivního karcinomu prsu. [54]

3.2 Léčba HER2 karcinomu prsu

K léčbě HER2+ rakoviny prsu se využívá cílené terapie prostřednictvím monoklonálních protilátek (trastuzumab), i tyrosinkinázových inhibitorů (TKI). Jedná se o léčiva jako jsou lapatinib, neratinib a tucatinib. [17,55,56] Oba typy terapií jsou sice zaměřeny na HER2, ale jejich působení na receptor může být odlišné, což je klíčové při vzniku rezistence rakovinných buněk na trastuzumab. U pacientů, kteří neodpovídají na léčbu trastuzumabem se využívá terapie pomocí inhibitorů tyrosinkinázy, a to buď samostatně nebo ve spojení s trastuzumabem. [21,57] Vědci se zabývali myšlenkou, zdali se mutace v HER rodině kináz podílí na vzniku rezistence. V roce 2014 došlo k potvrzení této domněnky. [58] Z toho závěru lze konstatovat, že HER2+ rakoviny prsu jsou obvykle spojeny s horší prognózou než HER2 – typy.

3.3 Léčba (HR-) karcinomu prsu

3.3.1 Trojitě negativní karcinom prsu

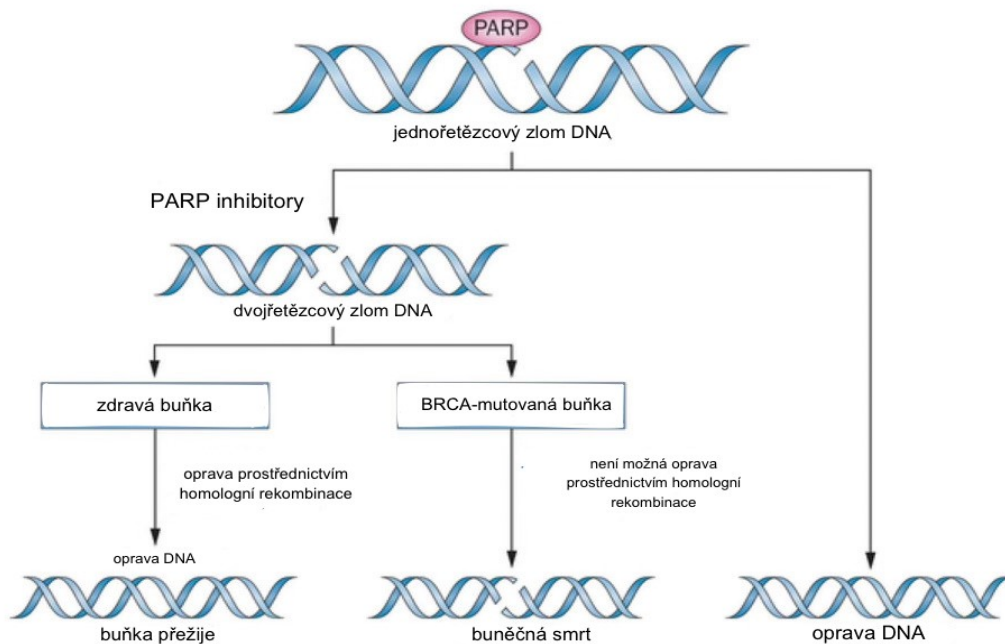
Trojitě negativní karcinom prsu (TNBC) je specifický podtyp rakoviny prsu, charakterizovaný absencí exprese ER, PR a HER2. [51] TNBC se obvykle vyskytuje především u mladších žen a vyznačuje se vyšší agresivitou s horší prognózou. [59,60] Celkově tvoří

přibližně 10–17 % všech případů rakoviny prsu (obrázek 1). [61] V léčbě tohoto typu nádoru prsu je často využívána chemoterapie, jelikož hormonální terapie není vzhledem k absenci receptorů účinná. Tímto způsobem je léčebný postup přizpůsoben biologickým vlastnostem nádoru a specifickým charakteristikám jednotlivých pacientek. [62]

Trojité negativní karcinom prsu souvisí s BRCA1 mutacemi. Gen BRCA1 je tumorový supresorový gen, který je zásadní v opravě DNA. Pokud je tento gen mutován, může to zvýšit riziko vzniku rakoviny vaječníků a rakoviny prsu, včetně TNBC. [63]. Mutace v BRCA1 je obvykle spojena s mladším věkem. [64]. Ženy se zárodečnou mutací v BRCA1 mají zvýšené riziko vzniku TNBC oproti ženám bez této mutace. [65] Většina tumorů spojených s BRCA1 je trojitě negativní, ale ne všechny případy TNBC nesou mutace BRCA1, což naznačuje složitost tohoto podtypu rakoviny. Díky heterogenitě TNBC bývá zpravidla obtížné najít účinnou terapii. [66]

Pro terapii trojitě negativního karcinomu byly testovány různé chemoterapeutické látky na bázi platiny, například cisplatina. [67] Kromě těchto látek byly zkoumány inhibitory poly ADP–ribóza polymerázy (PARP), enzymu hrajícího významnou roli při opravě jednořetězcových zlomů DNA (obrázek 2). Inhibitory PARP využívají narušených mechanismů oprav DNA a toho, že buňka, která nese současně BRCA mutaci nebude schopna nashromážděné jednořetězcové a dvořetězcové zlomy opravit, což ve výsledku vede ke smrti buňky (obrázek 2). [68]

Pro zvolení optimální terapie se využívá testování na přítomnost různých biomarkerů, jako jsou například výše zmíněné BRCA1 geny, dále pak EGFR, Src tyrosinkinázy, PTEN a kaveolin–1. [65] Jako potenciální biomarker pro TNBC byl roku 1997 týmem vedeným Carmeci et al představen estrogenový membránový receptor nazývaný GPER. [11]



Obrázek 2 Obrázek zachycující důležitost správné funkce PARP enzymů. [převzato a upraveno z 68] PARP enzymy jsou klíčové při opravě poškozené molekuly DNA, tím že se váží na vzniklé jednořetězcové zlomy a signalizují další opravné mechanismy. Pokud neproběhne oprava jednořetězcových zlomů díky tomu, že jsou PARP enzymy inhibované, mohou se z nich stát dvojřetězcové zlomy. V normální buňce to nepředstavuje problém, tyto zlomy DNA jsou opravené na základě homologní rekombinace. Problém nastává u jedinců, kteří nesou mutaci v BRCA genech, protože buňka není schopná zlomy opravit, což vede ke chromozomové nestabilitě a ve výsledku mitochondriálně zprostředkované apoptóze buňky. [68]

Tento typ nádorů obvykle nadměrně exprimuje receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) a membránově vázaný estrogenový receptor (GPER). [69] Vědci zkoumali využití EGFR–inhibiční látky gefitinibu, zdali snižuje exprese GPER a tímto receptorem vyvolanou signalizační dráhu v rakovinných buňkách. Výsledky jasně naznačují, že dochází ke snížení exprese GPER, čímž gefetinib představuje slibnou terapeutickou léčbu TNBC. [70]

4 Jaderné estrogenové receptory (ER)

Estrogenový receptor (ER) představuje jednu z klíčových složek rodiny jaderných receptorů, který po navázání ligandu funguje jako transkripční faktor, který ovlivňuje expresi genů a prostřednictvím toho reguluje různé fyziologické procesy. [71] Mezi jeho hlavní ligandy patří steroidní hormony nazývané estrogeny. S nejvyšší afinitou se k estrogenovému receptoru váží v tomto pořadí: estradiol (E2), estriol (E3) a estron (E1). [72,73] Estrogenové receptory mohou být ovlivněny i jinými látkami, které mohou působit jako agonisté nebo antagonisté, což zvyšuje komplexnost regulace estrogenové signalizace. Jaderné ER se nacházejí v cytoplazmě v neaktivním stavu. Po navázání estrogenu se celý komplex přesune do jádra buňky, kde interaguje s tzv. estrogenními responsivními elementy (ERE) v DNA. [9]

Existují dva hlavní typy estrogenového receptoru, alfa a beta, které jsou exprimované v různých tkáních, včetně vaječníků, dělohy, kostní a tukové tkáně, centrálního nervového systému a cévního systému. [74–78] Estrogenové receptory související s rozvojem rakoviny prsu, mohou mít vliv také na vývoj neurodegenerativních onemocnění, jako jsou Alzheimerova a Parkinsonova choroba. [79,80]

4.1 Obecná charakteristika ER α a ER β

Původně byl ER α považován za jediný hlavní proteinový receptor regulující účinky estrogenů na cílové tkáně. [76] Je známo více podtypů tohoto receptoru, přičemž jednotlivé varianty se od sebe číselně odlišují. Gen pro ER α (ESR1) se nachází na chromozomu 6, na dlouhém raménku na pozici 6q25.1 ER α je zodpovědný za proliferaci a přežívání buněk. [71,81]

O pár let později tým pod vedením Gustafssona při zkoumání jaderných receptorů v tkáni prostaty myši objevil protein s charakteristikami estrogenového receptoru, který byl označen jako ER β . [73,76] Gen pro ER β (ESR2) je lokalizován na chromozomu 14, na pozici 14q23.2. Je známo, že ER β je schopen regulovat aktivitu ER α . [82] Oba tyto receptory jsou nyní známy jako klasické neboli jaderné, estrogenové receptory.

Klasické estrogenové receptory (ER α a ER β) nalezneme převážně v jádře buněk, jejich zastoupení v cytoplazmě a plazmatické membráně sice není tak hojné, ale má svůj význam. [83] Signalizace po navázání estrogenu je zprostředkována jaderným estrogenovým receptorem ER α 66 a ER β , které mají typickou strukturu estrogenových receptorů [84] Jeden z podtypů ER α , konkrétně ER α 36, byl popsán roku 2005 prostřednictvím imunohistochemického vyšetření v plazmatické membráně a cytoplazmě buněk rakoviny prsu. Jeho exprese v jádře

byla minimální. Receptor ER α 36 má pravděpodobně odlišnou funkci než ER α 66, jelikož postrádá transkripční aktivační domény (AF-1 a AF-2), ale má zachovanou DNA vazebnou doménu. [85] Díky přítomnosti DNA vazebné domény má schopnost se vázat na DNA a tím může ovlivňovat transkripci ER α 66. [84]

Po navázání ligandu se estrogenové receptory alfa (ER α) a beta (ER β) podílí na aktivaci nebo inhibici exprese cílových genů v jádře buňky. Tento proces je doprovázen konformačními změnami. Dochází k dimerizaci komplexu a v závislosti na podmínkách se tvoří homodimery (např. ER α – ER α) anebo heterodimery (ER α – ER β). [71,86] V dimerizované formě se komplexy váží na specifické úseky DNA. Vazba na DNA může probíhat buď přímo prostřednictvím estrogenových responsivních elementů (ERE) nebo nepřímo pomocí dalších transkripčních faktorů jako je aktivační protein 1 (AP1) nebo specifický protein 1 (Sp1). Tato vazba se nachází v blízkosti genů, jejichž exprese je následně přítomností komplexu regulovaná. [9,71]

4.2 Rozdílná funkce ER α a ER β

V prsu jsou za normálních podmínek přítomny oba typy estrogenových receptorů (ER), každopádně dostupná data naznačují, že neplní identickou funkci. Důkazem jsou pokusy na „knock-out“ myších pro gen ER α . U těchto myší byl pozorován normální fetální vývoj, avšak chyběl postnatální vývoj prsní žlázy. [75,87] Naopak u „knock-out“ myší pro gen ER β nebyly zaznamenány žádné odlišnosti v prepubertálním a pubertálním vývoji ve srovnání s jedinci, kteří normálně exprimují ER β . Tato data nasvědčují tomu, že v tomto období vývinu hraje rozhodující úlohu estrogenový receptor alfa. [75] Hypotéza o rozdílné funkci receptorů byla podpořena i studií Forster et al., kdy se prokázalo, že u myší s „knock-out“ genem pro ER β hraje přítomnost estrogenového receptoru beta (ER β) klíčovou rolí až ve finální diferenciaci a lobuloalveolárním vývoji prsu během těhotenství a laktace, tzn. prsní žláza se vyvíjí normálně do pubertálního období i bez přítomnosti ER β . [88] Zdá se, že ER β má o něco nižší afinitu k estrogenům než ER α . [89]

Hladina estrogenového receptoru alfa (ER α) v buňkách karcinomu prsu je výrazně vyšší než ER β , tato skutečnost naznačuje, že právě ER α je klíčovým faktorem v patogenezi rakoviny prsu. [90] ER α pozitivně ovlivňuje růstovou rychlost rakovinných buněk prostřednictvím interakce s cyklinem D1, který reguluje přechod buněčného cyklu z G1 do S fáze. Tento typ interakce je považován za důležitý mechanismus zvyšování rychlosti růstu rakovinných buněk. [91] Aktivita ER α ovlivňuje expresi a aktivitu tumorového supresoru p53, který je klíčový

při regulaci buněčného cyklu, opravě DNA a indukci apoptózy. [92,93] Při rakovině prsu, může dojít ke snížení hladiny ER α a následně ke ztrátě funkce p53, což má za následek agresivní růst nádoru a horší prognózu. [93] Inhibice ER α vede k aktivaci genu BRCA1 a současně k potlačení proliferace nádorových buněk. [94]

Jak již bylo zmíněno výše, estrogenové receptory alfa (ER α) a beta (ER β) mají odlišné účinky. Zvýšená exprese ER α při ER–pozitivní rakovině prsu je spojena s podporou růstu nádoru, tak u ER–negativní rakoviny prsu je hladina ER β snížena. Snížení exprese ER β vede ke zvýšení mitogenních účinků estrogenů (normálně působí anti–mitogenně). [95] Vědci se domnívají, že ER β může mít inhibiční vliv na tumorogenezi. Tuto hypotézu podpořila studie vedená týmem Gwendal et al. [96]

V souvislosti s rychlými fyzickými reakcemi na estrogenem–indukovanou signalizaci, bylo zjištěno, že ER α 36, receptor lokalizovaný mimo jádro, hraje roli v negenomickém signálním mechanismu, spojeném s proliferací buněk prostřednictvím aktivace dráhy EGFR/Src/ERK1/2 v buněčných liniích rakoviny prsu, které neexprimují ER α 66. [76,97]

5 Membránový estrogenový receptor

Ačkoli jsou ER α a ER β považovány za klasické jaderné estrogenové receptory účastnící se poměrně rychlých genomických odpovědí, existuje ještě další forma estrogenových receptorů, které jsou lokalizovány v membráně a jejich signalizace je mnohem rychlejší.

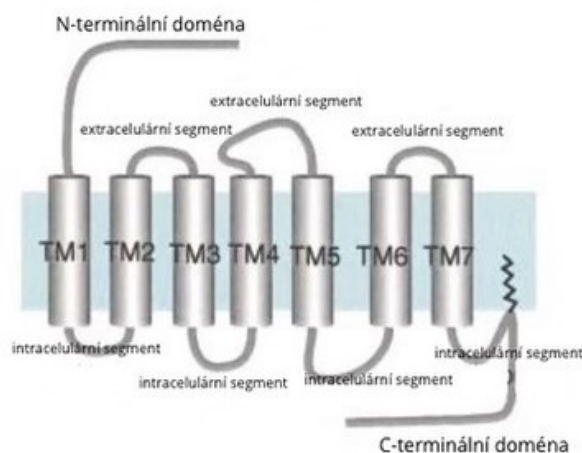
Estrogenový receptor spřažený s G proteinem, známý také jako GPER či GPR30, má heptahelikální transmembránovou strukturu spojenou s membránou buňky a zprostředkovává nengenomickou signální dráhu. [11,98]

V roce 2000 bylo zjištěno, že estrogenem aktivovaná dráha Erk1/2 vyžaduje přítomnost GPER a pravděpodobně je nezávislá na přítomnosti jaderných receptorů. [13] Nicméně až roku 2005 Revankar a jeho tým ustanovily existenci nového estrogenového receptoru, GPER, jehož přirozeným ligandem je 17 β -estradiol. [99] Při vazbě agonisty na receptor dochází k aktivaci tohoto heterotrimerního G proteinu, naopak antagonisty aktivaci inhibuje. [100]

5.1 Základní struktura receptoru GPER

Gen pro GPER, membránově vázaný estrogenový receptor, se nachází na chromozomu 7, přesněji řečeno na krátkém raménku chromozomu 7 na pozici 7p22.3. Gen kóduje protein, jehož sekvenční struktura zahrnuje 375 aminokyselin a který má molekulární hmotnost přibližně 41 kDa. [11]

Stejně jako typický receptor spřažený s G proteinem i receptor GPER obsahuje extracelulární N-terminální doménu, 7 transmembránových α -helikálních jednotek, 3 extracelulární a 3–4 intracelulární segmenty. Směrem do cytoplazmy směřuje C-terminální doména (obrázek 3). Každá ze 7 hydrofobních transmembránových domén je tvořena z 20–27



Obrázek 3: Struktura membránového receptoru GPER [převzato a upraveno z 100] Extracelulární a intracelulární segmenty. 7 transmembránových domén (TM1-7). C- a N-terminální doména.

aminokyselin. [100] Ve srovnání s jinými estrogenovými receptory má významně nižší afinitu k estriolu a estronu, ale naopak vykazuje vysokou specifitu k estradiolu. [101,102]

5.2 Výskyt a role GPER

GPER, nacházející se v mnoha různých tkáních, včetně nervové a tukové tkáně, jater, oběhového systému a imunitních buněk, je spojován s indukcí apoptózy T-buněk a inhibicí zánětu. [103–105] Výskytu GPER v prsní tkáni a jeho vlivu na rakovinu prsu je věnovaná samostatná kapitola.

Široké rozšíření receptoru naznačuje jeho možnou spojitost s různými onemocněními, včetně rakoviny reprodukční soustavy, problémů s plodností, obezity, osteoporózy, hypertenze a autoimunitních onemocnění. [104,105] Podobně jako jiné receptory spřažené s G proteinem vykazuje i GPER rychlý negenomický vliv na buněčné funkce a růst. [106]

Výzkumy naznačují, že receptor GPER má důležitou roli v genderově specifických aspektech selhání srdce. U myší, které neexprimovali GPER, byla pouze u sameček pozorována porucha funkce levé srdeční komory, přičemž zde docházelo k jejímu zvětšení. Dále byla snížena kontraktilita i relaxační kapacita levé komory srdce. Tato změna vedla ke zvýšení enddiastolického tlaku (tzn. tlaku na konci diastoly) v levé komoře. [107]

Pohlavně rozdílnou funkci receptoru podpořila i další studie pod vedením Mårtensson et al, která dokazuje, že GPER je důležitý pro estradiolem indukovanou produkci inzulínu, jak u samic, tak u sameček myší, zatímco výskyt receptoru je zásadní pro udržení glukózové homeostázy pouze u samic. Na rozdíl od myší s absencí estrogenového receptoru alfa (ER α), myši s nedostatkem GPER nevykazují reprodukční deficity, a reakce prsu na estrogen u nich odpovídá pozorováním u divokých myších. Přesto myši bez genu pro GPER projevují absenci několika estrogenem řízených efektů, včetně narušené tolerance glukózy, sníženého růstu kostí, zvýšeného krevního tlaku a ztráty estrogenem stimulovaného uvolňování inzulínu u samic. [108]

6 Mechanismus signalizace GPER

6.1 GPER a negenomické signalizace

Signalizace pomocí GPER se po navázání estrogenu na receptor projevívá v řádech sekund či minut a zahrnuje procesy jako je aktivace adenylát cyklázy, protein kinázových drah, fosfoinositol–3 kinázy anebo mobilizace intracelulárního vápníku. [12–15] Spouští se tak signální dráhy uvnitř buňky, které mohou ovlivňovat buněčné procesy, jako je buněčný růst a migrace. GPER může interagovat i s dalšími membránovými proteiny a aktivovat další signální dráhy, které ovlivňují buněčné odpovědi na estrogeny. [106]

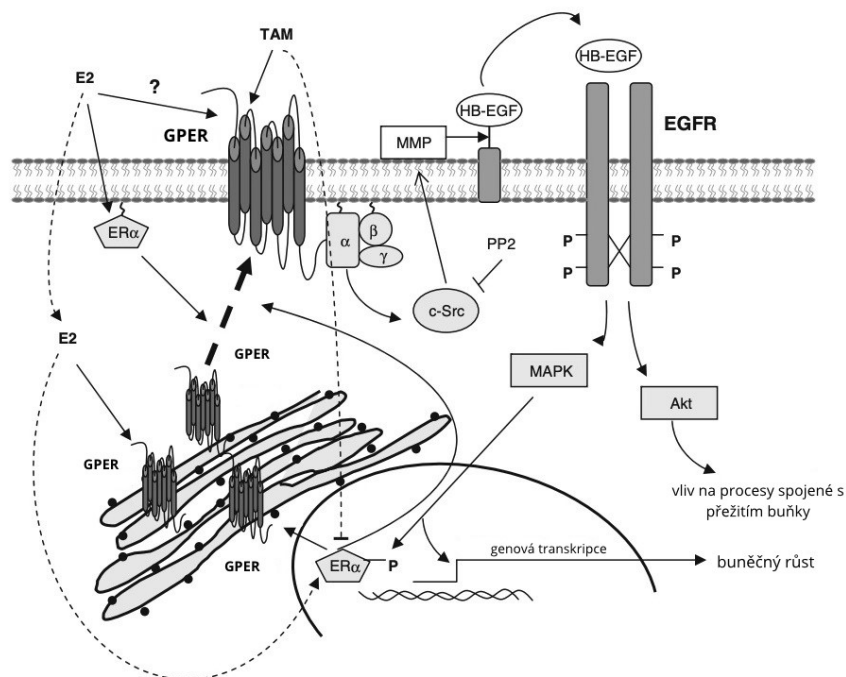
Estrogen (17 β –estradiol) interaguje s GPER, čímž dochází k jeho aktivaci. Tato aktivace vede k zvýšení produkce cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), zvýšení intracelulární hladiny iontů vápníku (Ca²⁺), a syntéze fosfatidylinositol–3,4,5–trisfosfátu (PIP3). [102,109] Zvýšení intracelulární cAMP hladiny a koncentrace vápníku je následkem aktivace podjednotky G α_s , zatímco za aktivaci Src tyrosin-kinázové dráhy jsou zodpovědné podjednotky G $\beta\gamma$ (obrázek 4). [102,110] Dále dochází k transaktivaci receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR) a aktivaci signálních drah, včetně dráhy fosfoinositidu–3–kinázy/Ak (PI3K/Akt) a dráhy extracelulárními signály regulované kinázy 1/2 (Erk1/2 MAPK) (obrázek 4). [12,13,54,111,112] GPER také aktivuje fosfolipázu C. [109] Z toho jasně vyplývá, že membránové receptory hrají zásadní roli při negenomické signalizaci.

6.1.1 Dráha receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR)

Jak již bylo zmíněno, aktivace receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR) je spjata se signalizací zprostředkovanou GPER, je to jedna z ukázek toho, jak komplikovaný systém regulace se pojí s receptorem GPER.

Jakmile dojde k estrogenem–zprostředkované aktivaci GPER, dochází k uvolnění heparinem vázaného epidermálního růstového faktoru (HB–EGF) (obrázek 4). [113] Do procesu uvolnění molekuly HB–EGF se zapojuje ještě Src kináza, která je zodpovědná za uvolnění matrixových metaloproteináz (MMP) odpovídajících za uvolnění HB–EGF (obrázek 4). [13,49,114]

Po uvolnění a aktivaci se HB–EGF váže na svůj receptor, tím následně dochází k fosforylaci a dimerizaci EGFR (obrázek 4). Receptor v této dimerizované podobě je aktivní a spouští řadu signálních drah. K tomu dochází prostřednictvím fosforylace tyrosinových zbytků cílových proteinů. [12,15]



Obrázek 4 Propojení receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR) a GPER [převzato a upraveno z 115]

6.1.2 Kinázové dráhy (PI3–kinázová/Akt, Erk1/2 MAPK)

Několik studií se shodlo, že estrogenem–indukovaná aktivace GPER může vést k aktivaci Erk1/2 (MAP kináza) signální dráhy. [13,15] Jak již bylo řečeno v podkapitole výše, pokud je receptor růstového epidermálního faktoru (EGFR) dimerizovaný – tzn. je aktivní, může následně dojít k fosforylaci mitogenně aktivované protein kinázy Erk1/2 (obrázek 4). [13] Aktivovaná kináza Erk 1/2 je prostřednictvím zvyšování koncentrace oxidu dusnatého (NO) zodpovědná za vasodilataci cév. [116]

K aktivaci PI3–kinázová/Akt signalizační dráhy dochází stejným mechanismem (obrázek 4). Aktivovaná PI3K fosforyluje fosfatidylinositol–4,5–bifosfát (PIP2) na fosfatidylinositol–3,4,5–trifosfát (PIP3), což je molekula, která má důležitou roli jako sekundární posel. [117] Akt kináza, známá také jako protein kináza B, je fosforylována prostřednictvím aktivity PIP3 a následně zaktivována dalšími kinázami (např. fosfát-dependentní kinázou 1 – PDK1). [12] Plně funkční kináza Akt může vést k fosforylaci cílových proteinů, zejména těch, které ovlivňují přežívání buněk (reguluje cytoskelet a apoptózu), růst a proliferaci. [118–120] Například bylo dokázáno, že aktivace PI3K/Akt dráhy vede k rychlejšímu přechodu rakovinných buněk do S fáze buněčného cyklu, tudíž, k rychlejší

proliferaci a agresivitě. [12] Tato dráha také reguluje aktinový a mikrotubulární cytoskelet a tím může podporovat buněčnou migraci, a podílet se na invazi rakoviny. [118,121]

6.1.3 Ostatní dráhy spojené s aktivací GPER

Fosfolipáza C (PLC) je hydrolytický enzym, který štěpí fosfaidylinositol-4,5-bifosfát (PIP₂) na inositol-1,4,5-trifosfát (IP₃) a 1,2-diacylglycerol (DAG), tyto dvě molekuly fungují jako sekundární poslové. IP₃ svou vazbou ovlivňuje propustnost kanálů na endoplazmatickém retikulu, tím způsobuje vylití Ca²⁺ a tak dochází ke zvýšení koncentrace intracelulární hladiny Ca²⁺. DAG aktivuje protein kinázu C (PKC), která je zodpovědná za fosforylaci cílových molekul. Je dokázán vztah mezi cAMP systémem produkujícím protein kinázu A (PKA) a touto drahou, PKA je totiž stejně tak jako PKC schopná fosforylovat IP₃. [122]

6.2 Vztah GPER a jaderného estrogenového receptoru ER

Problematika týkající se spřažení signálních drah membránového estrogenového receptoru a jaderného estrogenového receptoru je v současné době předmětem aktivního bádání a její objasnění by mohlo přinést slibný výsledek pro terapii mnoha typů rakovin.

Data týkající se proliferace buněk rakoviny prsu s expresí ER α /GPER nepřímo ukazují na možnou vzájemnou interakci mezi GPER a ER α , jelikož estrogen je schopný aktivovat Erk-1 a Erk-2 signalizační dráhu nejen v buněčné linii MCF-7, která exprimuje ER α i ER β , ale také v SKBR3 buněčné linii rakovinných buněk prsu, která neexprimuje klasické receptory, ale exprimuje GPER. [13] U klasických estrogenových receptorů je negenomická signalizace zprostředkovaná díky ER α 36. [97]

Exprese ER α 36 v buňkách rakoviny prsu může být podmíněná GPER, neboť se ukázalo, že v buněčné linii SKBR3 s knockout genem GPER, došlo i ke snížení exprese ER α 36. To by mohlo naznačovat určitou spojitost mezi těmito dvěma receptory. [97,123] ER α 36 hraje roli při působení tamoxifenu a vyvolání reakcí, jako je aktivace MAPKs a signálních drah PI3K/Akt. [124].

Dalším důkazem o existujícím vztahu GPER a ER α 36 je studie, která potvrdila, že s G proteinem spřažený estrogenový receptor může indukovat expresi c-fos, což je gen spojený s jadernými receptory. Je totiž známo, že exprese c-fos obvykle závisí na estrogenem-indukované aktivaci ER α 36. [125]

V buňkách nádoru prsu, které jsou odolné vůči běžně užívanému léčivu ER+ rakoviny prsu, tamoxifenu, se projevuje snížená exprese ER α 46, což přispívá k endokrinní rezistenci.

Opětovná exprese tohoto podtypu estrogenového receptoru vede k inhibici proliferace buněk citlivých na estrogen, což naznačuje, že by mohl působit jako negativní modulátor aktivity ER α . [124,126] Na základě známého působení receptoru GPER na endokrinní rezistenci by v této souvislosti bylo možné jisté propojení, které prozatím není známé z dostupné literatury. V dnešní době také není známa interakce mezi GPER a ER β .

6.3 Vliv GPER na patofyziologii karcinomu prsu

Přesný vliv, jaký GPER sehrává ve vývoji karcinomu prsu je do dnešní doby stále předmětem aktivních diskusí. Dřívější výzkumy naznačují, že aktivace GPER prostřednictvím agonistické látky tohoto receptoru označované jako G1, vede k inhibici růstu rakovinných buněk u ER–negativní rakoviny prsu. Děje se tomu tak prostřednictvím zadržení buněk v G2/M fázi buněčného cyklu, downregulací cyklinu B i kontrolního bodu v G2 fázi a indukci apoptózy. Léčba prostřednictvím agonistické látky G1 představuje potenciální účinnou terapii, jelikož sloučenina G1 působí jako inhibitor proliferace buněk a vede k upregulaci proteinu p53, což zvyšuje přežití pacientů. [127]

U trojitě negativních nádorů prsu (TNBC) je špatná prognóza spojena s nadměrnou expremací receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR). Předpokládá se, že růst těchto nádorů je stimulován 17 β –estradiolem přes GPER. Tím pádem by snížení exprese GPER představovalo slibný léčebný přístup. [70] Terapie pomocí malých sloučenin, například gefitinibu, léčiva vázajícího se na kinázovou doménu EGFR a tím zabraňující fosforylaci jeho cytosolické domény a následné signalizaci, se zdá být slibná. [128]

Významný přínos k pochopení role GPER v karcinomu prsu přinesla studie od Marjon et al. Základem studie byla knockout myš pro GPER. Raný vývoj nádoru byl podobný mezi wild–type myšmi a těmi s mutací GPER, ale tumory u těchto zvířat byly menší a méně proliferující než u wild–type myši v období 12–13 týdnů. Tumory u myši s knockout genem pro GPER byly histologicky nižšího stupně a u těchto zvířat bylo pozorováno méně plicních metastáz než u wild–type myši. Tato studie je důkazem toho, že myši s knockout genem pro GPER vyvíjejí méně agresivní nádory prsu, přesně tak, jak by se očekávalo. [101]

Na základě dostupných dat, byl GPER navržen jako vhodný prediktor malignity a agresivity, jelikož jeho exprese souvisí s nižší mírou přežití nejen u karcinomu prsu, ale i v jiných typech nádorů, jako například u rakoviny vaječníků. [129]

Ligandem–indukovaná aktivace GPER může vést k aktivaci PI3–kinázové/Akt signalizační dráhy, která se může podílet na progresi rakoviny prsu. Je známo, že tato dráha je

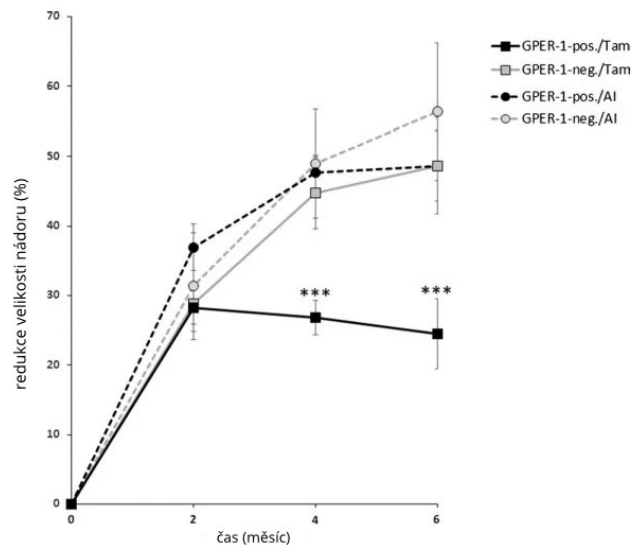
zásadní pro stabilizaci mikrotubulů v cytoskeletu buňky. [118] Výzkumy naznačují, že typické vlastnosti rakoviny, jako je invaze a migrace by mohly mít spojitost s touto drahou, díky indukování tvorby lamellipodií, které jsou součástí cytoskeletu a fungují jako výrůstky směrem k místu migrace. [121]

6.3.1 Vliv estrogenového receptoru spřaženého s G-protein na terapii

V posledních letech je stále zřejmější, že G–proteinové estrogenové receptory hrají klíčovou roli ve vývoji rakoviny a neúspěšnosti léčby některých typů karcinomu prsu. Velice zajímavý je jejich vliv na účinnost terapií, jako je například použití tamoxifenu, který je považován již několik let za standart v léčbě rakoviny pozitivní na estrogenový receptor.

Jak již bylo zmíněno, antihormonální léčba tamoxifenem je častou strategií v boji proti hormonálně citlivým karcinomům, zejména karcinomu prsu s estrogenovým receptorem (ER+). [17] Z mnoha studií vyplývá, že přítomnost GPER v rakovinných buňkách může hrát roli v rezistenci na antihormonální léčbu a tímto způsobem zvyšovat agresivitu nádorových buněk. [13,55,115,130,131]

U skupin GPER–negativních pacientek, u kterých nezávisle na terapii tamoxifenem či aromatázovými inhibitory, byla zaznamenána významná redukce velikosti nádoru během 6 měsíců léčby (obrázek 5). Naopak u GPER pozitivních skupin, které byly léčeny tamoxifenem docházelo ke zmenšování nádoru pouze první 2 měsíce léčby, v průběhu 4. a 6. měsíce byl zaznamenán pokles účinku tamoxifenu, dokonce v některých případech došlo ke zvětšení velikosti nádoru. U skupin pacientek s pozitivní expresí GPER, které byly léčeny aromatázovými inhibitory, byl také zaznamenán pokles účinku léčby, který byl mírnější než při léčbě tamoxifenem (obrázek 5). Celkově tedy studie naznačuje, že přítomnost GPER negativně ovlivňuje průběh léčby a může sloužit jako potenciální ukazatel účinnosti tamoxifenu u pacientek s hormonálně citlivým karcinomem prsu. [130]



Obrázek 5 Odpověď na léčbu tamoxifenem (TAM) a aromatázovými inhibitory (AI) v období 6 měsíců [převzato a upraveno z 130]

Bylo zjištěno, že dlouhodobá léčba tamoxifenem pro GPER pozitivní rakovinu prsu vede ke zvýšení exprese těchto receptorů a ke snížení pravděpodobnosti přežití pacienta, jelikož vede ke zvýšené proliferaci rakovinných buněk. [13,54] Dlouhodobá léčba touto látkou vede jak ke zvýšení intracelulární koncentrace iontů vápníku, tak i zvýšené signalizaci prostřednictvím vápníku a jeho mobilizaci. Tento jev je následkem hustější exprese receptorů. [54] Tuto hypotézu podpořila i studie vedená Ignatov et al., která se také přiklání k závěru, že exprese GPER je zodpovědná za rezistenci vůči tamoxifenu [115]

V rakovinných buňkách, které byly vystaveny tamoxifenu po prodlouženou dobu, nebyla pozorována žádná změna v expresi estrogenového receptoru alfa ($ER\alpha$), jak bylo očekáváno. [54] Naopak, pozoruhodným zjištěním bylo zvýšení exprese receptoru kininu B1 (kinin B1R), receptoru spadajícího do rodiny G protein spřažených receptorů, při dlouhodobém expozici tamoxifenu. Aktivace kinin B1R vedla dokonce k větší proliferaci buněk než v případě stimulace klasickými estrogenovými receptory. [54,132]

Aktivací GPER prostřednictvím OH-tamoxifenu, hlavního metabolitu tamoxifenu, dochází ke zvýšení exprese růstového faktoru pojivové tkáně (CTGF), která se nejspíše pojí s agresivnější formou karcinomu prsu. [133,134]

6.3.2 Tamoxifen

Tamoxifen je antiestrogenové léčivo, které se řadí mezi nejčastěji využívané látky při endokrinní terapii. Svým působením blokuje vazbu estrogenu na ER α a tím i další signalizaci, v tomto případě tedy působí antagonisticky. Tamoxifen a jeho metabolit, OH-tamoxifen, jsou zároveň agonistou pro GPER. [133] Vazba tamoxifenu na GPER má za následek zvýšení exprese tohoto receptoru a kratší dlouhodobější přežití pacientů. [115]

Agonistické účinky (stimulační) tamoxifenu na GPER mají za následek aktivaci Gs proteinu, zvýšení aktivity adenylát cyklázy, což vede ke zvýšení koncentrace cAMP. Tato kaskáda událostí vede k aktivaci signalizačních drah jako je fosfatidylinositol 3–kináza/ protein kináza B (PI3K/Akt), ERK1/2 mitogenně-aktivovaná protein kinázová dráha (MAPK) a EGFR transaktivace. [135] Autoři studií pracují s myšlenkou, že alespoň některé z odpovědí ER α jsou vyvolané signálními drahami GPER a tyto receptory tedy do jisté míry komunikují. [12] Dráha EGFR/ERK1/2 je zodpovědná za expresi EGR-1, který se uplatňuje při transkripci CTGF a cyklinu D1. Tyto dva geny jsou zodpovědné za regulaci růstu buněk. [54,136] Navázání tamoxifenu má také za následek zvýšení proliferace endometriálních buněk, tito pacienti se vyznačují zpravidla horší prognózou. [54,137]

Na buněčné linii karcinomu prsu MCF–7 byly provedeny experimenty, kdy se zjistilo, že kontinuální vystavení tamoxifenu vedlo k vysoké intracelulární mobilizaci vápníku a zvýšené buněčné proliferaci. Důležitým závěrem byla informace, že zatímco dlouhodobá léčba tamoxifenem nezpůsobuje zvýšenou expresi ER α , tak je zodpovědná za zvýšenou expresi jak GPER, tak i kininového receptoru B1 (další typ GCPR), který by mohl být pravděpodobně zodpovědný za proliferaci rakovinných buněk. To vedlo k závěru, že za vznikem tamoxifenové rezistence pravděpodobně nestojí ER α . [54]

7 Závěr

Rakovina prsu je velmi časté a závažné onemocnění postihující jak ženskou, tak i mužskou populaci, jenž má stěžejní vliv na naši společnost. Mnoho lidí v našem okolí má s tímto onemocněním přímou zkušenost, ať již onemocněním trpí oni samotní či jiní rodinní příslušníci.

V klinické praxi se klade důraz zejména na přítomnost klasických estrogenových receptorů ER α , ER β , které jsou lokalizovány v jádře a zodpovídají za genomické reakce, zatímco s G-proteinem spřažený estrogenový receptor (také GPER, GPR30) a ER α 36 jsou lokalizovány v cytoplazmě a plazmatické membráně a zprostředkovávají rychlé genomické signalizace, prostřednictvím G proteinů a dalších sekundárních signalizačních molekul.

GPER je běžně rozšířený receptor s mnoha funkcemi. Najdeme ho v mnoha orgánech a obvykle bývá nadměrně exprimován v buňkách rakoviny prsu. O zapojení PI3-kinázové/Akt signalizační dráhy do progresu rakoviny prsu svědčí studie, které potvrzují, že tato dráha vede k rychlejšímu přechodu rakovinných buněk do S fáze buněčného cyklu, zároveň reguluje aktinový a mikrotubulární cytoskelet, čímž může přispívat k invazi rakoviny. Z nashromážděných dat také jasně vyplývá, že přítomnost GPER komplikuje léčbu pacientů. Je to obvykle způsobeno díky získané rezistenci na tamoxifen.

Ačkoli je mechanismus působení receptoru GPER velmi složitý a dodnes pravděpodobně neznáme všechny dráhy, tak jejich pochopení by mohlo vést k výraznému zlepšení terapie karcinomu prsu.

Díky modernizaci dnešního světa, jako je pozdější věk prvního porodu, nuliparita a další faktory, bude pravděpodobně v budoucnosti případů rakoviny prsu stále přibývat. V posledních letech je stále zřejmější vliv GPER receptorů v rozvoji a agresivitě rakoviny, proto bude studium signalizačních drah tohoto receptoru, jak samotného, tak ve spojitosti s nově objevenými variantami jako je například ER α 36 i nadále atraktivním předmětem bádání.

Seznam literatury

(* sekundární citace)

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71:209–49.
2. Greif JM, Pezzi CM, Klimberg VS, Bailey L, Zuraek M. Gender Differences in Breast Cancer: Analysis of 13,000 Breast Cancers in Men from the National Cancer Data Base. *Ann Surg Oncol.* 2012;19:3199–204.
3. *Watson CS, Jeng Y-J, Kochukov MY. Nongenomic actions of estradiol compared with estrone and estrinol in pituitary tumor cell signaling and proliferation. *FASEB J.* 2008;22:3328.
4. *Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2019;116:135–70.
5. *Larsen PR, Williams RH, editors. *Williams textbook of endocrinology.* 10. ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2003.
6. Bocchinfuso WP, Lindzey JK, Hewitt SC, Clark JA, Myers PH, Cooper R, et al. Induction of Mammary Gland Development in Estrogen Receptor- α Knockout Mice. *Endocrinology.* 2000;141:2982–94.
7. Conte FA, Grumbach MM, Ito Y, Fisher CR, Simpson ER. A syndrome of female pseudohermaphroditism, hypergonadotropic hypogonadism, and multicystic ovaries associated with missense mutations in the gene encoding aromatase (P450arom). *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78:1287–92.
8. Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:3689–98.
9. Schultz JR, Petz LN, Nardulli AM. Cell-and ligand-specific regulation of promoters containing activator protein-1 and Sp1 sites by estrogen receptors α and β . *J Biol Chem.* 2005;280:347–54.
10. *Cooke PS, Nanjappa MK, Ko C, Prins GS, Hess RA. Estrogens in Male Physiology. *Physiol Rev.* 2017;97:995–1043.
11. Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ. Identification of a Gene (GPR30) with Homology to the G-Protein-Coupled Receptor Superfamily Associated with Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer. *Genomics.* 1997;45:607–17.
12. Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, et al. PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J.* 2001;20:6050–9.
13. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR. Estrogen-Induced Activation of Erk1 and Erk-2 Requires the G Protein-Coupled Receptor Homolog, GPR30, and Occurs via TransActivation of the Epidermal Growth Factor Receptor through Release of HB-EGF. 2000;14.
14. Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91:8517–21.

15. Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E, et al. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.* 1996;15:1292–300.
16. Rhodes A, Jasani B, Balaton A, Barnes D, Miller K. Frequency of oestrogen and progesterone receptor positivity by immunohistochemical analysis in 7016 breast carcinomas: correlation with patient age, assay sensitivity, threshold value, and mammographic screening. *J Clin Pathol.* 2000;53:688–96.
17. *Coufal O, Fait V, Čoupek P, Foretová L, Hynková L, Hýža P, et al. *Chirurgická léčba karcinomu prsu.* Grada; 2011.
18. Cataliotti L, Buzdar AU, Noguchi S, Bines J, Takatsuka Y, Petrakova K, et al. Comparison of anastrozole versus tamoxifen as preoperative therapy in postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer. *Cancer.* 2006;106:2095–103.
19. *Nardone A, De Angelis C, Trivedi MV, Osborne CK, Schiff R. The changing role of ER in endocrine resistance. *The Breast.* 2015;24:S60–6.
20. NIH. Cancer stat facts: female breast cancer subtypes. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program; 2022.
21. Murthy RK, Loi S, Okines A, Paplomata E, Hamilton E, Hurvitz SA, et al. Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2020;382:597–609.
22. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. *Am J Hum Genet.* 2003;72:1117–30.
23. Mersch J, Jackson MA, Park M, Nebgen D, Peterson SK, Singletary C, et al. Cancers associated with BRCA 1 and BRCA 2 mutations other than breast and ovarian. *Cancer.* 2015;121:269–75.
24. Chen S, Iversen ES, Friebel T, Finkelstein D, Weber BL, Eisen A, et al. Characterization of BRCA1 and BRCA2 Mutations in a Large United States Sample. *J Clin Oncol.* 2006;24:863–71.
25. Iorio MV, Ferracin M, Liu C-G, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. *Cancer Res.* 2005;65:7065–70.
26. Pandey DP, Picard D. miR-22 Inhibits Estrogen Signaling by Directly Targeting the Estrogen Receptor α mRNA. *Mol Cell Biol.* 2009;29:3783–90.
27. Adams BD, Furneaux H, White BA. The Micro-Ribonucleic Acid (miRNA) miR-206 Targets the Human Estrogen Receptor- α (ER α) and Represses ER α Messenger RNA and Protein Expression in Breast Cancer Cell Lines. *Mol Endocrinol.* 2007;21:1132–47.
28. Yang X, Ferguson AT, Nass SJ, Phillips DL, Butash KA, Wang SM, et al. Transcriptional activation of estrogen receptor α in human breast cancer cells by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res.* 2000;60:6890–4.
29. *Brychta M. Karcinom mléčné žlázy. *Onkologie.* 2018;12:68–73.
30. Zhang Y, Zhou Y, Mao F, Yao R, Sun Q. Ki-67 index, progesterone receptor expression, histologic grade and tumor size in predicting breast cancer recurrence risk: A consecutive cohort study. *Cancer Commun.* 2020;40:181–93.

31. Huang W-Y, Newman B, Millikan RC, Schell MJ, Hulka BS, Moorman PG. Hormone-related Factors and Risk of Breast Cancer in Relation to Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Status. *Am J Epidemiol.* 2000;151:703–14.
32. Kato I, Tominaga S, Suzuki T. Factors related to late menopause and early menarche as risk factors for breast cancer. *Jpn J Cancer Res.* 1988;79:165–72.
33. Yang XR, Chang-Claude J, Goode EL, Couch FJ, Nevanlinna H, Milne RL, et al. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103:250–63.
34. Cancer CG on HF in B. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease. *The lancet.* 2002;360:187–95.
35. Kotsopoulos J, Lubinski J, Salmena L, Lynch HT, Kim-Sing C, Foulkes WD, et al. Breastfeeding and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. 2012;
36. Berry DA, Fryback DG, Mandelblatt JS, Feuer EJ. Effect of Screening and Adjuvant Therapy on Mortality from Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2005;
37. Giaquinto AN, Sung H, Miller KD, Kramer JL, Newman LA, Minihan A, et al. Breast Cancer Statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022;72:524–41.
38. Dušek Ladislav, Mužík Jan, Kubásek Miroslav, Koptíková Jana, Žaloudík Jan, Vyzula Rostislav. SVOD [Internet]. [cited 2024 Apr 4]. Available from: <https://www.svod.cz/>
39. *mamo.cz - Breast cancer [Internet]. [cited 2024 Mar 30]. Available from: <https://www.mamo.cz/en/public/breast-cancer/>
40. Metcalfe KA, Poll A, Royer R, Llacuachaqui M, Tulman A, Sun P, et al. Screening for Founder Mutations in *BRCA1* and *BRCA2* in Unselected Jewish Women. *J Clin Oncol.* 2010;28:387–91.
41. McDowell S. Breast Cancer Death Rates Are Highest for Black Women—Again. American Cancer Society, Atlanta, GA, USA; 2022.
42. Sharma R. Breast cancer incidence, mortality and mortality-to-incidence ratio (MIR) are associated with human development, 1990–2016: evidence from Global Burden of Disease Study 2016. *Breast Cancer.* 2019;26:428–45.
43. Ghoncheh M, Mirzaei M, Salehiniya H. Incidence and Mortality of Breast Cancer and their Relationship with the Human Development Index (HDI) in the World in 2012. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;16:8439–43.
44. Goodarzi E, Beiranvand R, Naemi H, Pordanjani SR, Khazaei Z. Geographical distribution incidence and mortality of breast cancer and its relationship with the human development index (HDI): An ecology study in 2018. *World Cancer Res J.* 2020;7:12.
45. Hoyt-Austin A, Dove MS, Abrahão R, Kair LR, Schwarz EB. Awareness That Breastfeeding Reduces Breast Cancer Risk: 2015–2017 National Survey of Family Growth. *Obstet Gynecol.* 2020;136:1154–6.
46. Fioretti F, Tavani A, Bosetti C, Vecchia CL, Negri E, Barbone F, et al. Risk factors for breast cancer in nulliparous women. *Br J Cancer.* 1999;79:1923–8.
47. *Giordano SH. Breast Cancer in Men. Longo DL, editor. *N Engl J Med.* 2018;378:2311–20.
48. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68:7–30.

49. Guo, Tada, Kitamura, Hamada, Miyashita, Harada-Shoji, et al. Automated Quantification of Extranuclear ER α using Phosphor-integrated Dots for Predicting Endocrine Therapy Resistance in HR+/HER2- Breast Cancer. *Cancers*. 2019;11:526.
50. Group BIG (BIG) 1-98 C. A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:2747–57.
51. Kaplan HG, Malmgren JA. Impact of Triple Negative Phenotype on Breast Cancer Prognosis. *Breast J*. 2008;14:456–63.
52. Arpino G, Weiss H, Lee AV, Schiff R, De Placido S, Osborne CK, et al. Estrogen Receptor-Positive, Progesterone Receptor-Negative Breast Cancer: Association With Growth Factor Receptor Expression and Tamoxifen Resistance. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2005;97:1254–61.
53. Mahmood H, Faheem M, Mahmood S, Sadiq M, Irfan J. Impact of Age, Tumor Size, Lymph Node Metastasis, Stage, Receptor Status and Menopausal Status on Overall Survival of Breast Cancer Patients in Pakistan. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16:1019–24.
54. Molina L, Bustamante F, Ortloff A, Ramos I, Ehrenfeld P, Figueroa CD. Continuous exposure of breast cancer cells to tamoxifen upregulates GPER-1 and increases cell proliferation. *Front Endocrinol*. 2020;11:563165.
55. Geyer CE, Chan S, Jagiello-Gruszfeld A, Kaufman B, Davidson N, Rubin SD. Lapatinib plus Capecitabine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2006;
56. Saura C, Oliveira M, Feng Y-H, Dai M-S, Chen S-W, Hurvitz SA, et al. Neratinib Plus Capecitabine Versus Lapatinib Plus Capecitabine in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Previously Treated With ≥ 2 HER2-Directed Regimens: Phase III NALA Trial. *J Clin Oncol*. 2020;38:3138–49.
57. Xu X, De Angelis C, Burke KA, Nardone A, Hu H, Qin L, et al. HER2 reactivation through acquisition of the HER2 L755S mutation as a mechanism of acquired resistance to HER2-targeted therapy in HER2+ breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23:5123–34.
58. Boulbes DR, Arold ST, Chauhan GB, Blachno KV, Deng N, Chang W-C, et al. HER family kinase domain mutations promote tumor progression and can predict response to treatment in human breast cancer. *Mol Oncol*. 2015;9:586–600.
59. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007;13:4429–34.
60. Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, Theriault RL, Edge SB, Wong Y-N, et al. Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer*. 2012;118:5463–72.
61. *Reis-Filho JS, Tutt ANJ. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*. 2008;52:108–18.
62. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. *Clin Cancer Res*. 2007;13:2329–34.
63. *Varol U, Kucukzeybek Y, Alacacioglu A, Somali I, Altun Z, Aktas S, et al. Brca genes: brca 1 and brca 2. apoptosis. 2018;13:19.
64. Steiman J, Peralta EA, Louis S, Kamel O. Biology of the estrogen receptor, GPR30, in triple negative breast cancer. *Am J Surg*. 2013;206:698–703.

65. *Kurebayashi J. Possible treatment strategies for triple-negative breast cancer on the basis of molecular characteristics. *Breast Cancer*. 2009;16:275–80.
66. Southey MC, Ramus SJ, Dowty JG, Smith LD, Tesoriero AA, Wong EEM, et al. Morphological predictors of BRCA1 germline mutations in young women with breast cancer. *Br J Cancer*. 2011;104:903–9.
67. Torrisi R, Balduzzi A, Ghisini R, Rocca A, Bottiglieri L, Giovanardi F, et al. Tailored preoperative treatment of locally advanced triple negative (hormone receptor negative and HER2 negative) breast cancer with epirubicin, cisplatin, and infusional fluorouracil followed by weekly paclitaxel. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008;62:667–72.
68. *Sonnenblick A, De Azambuja E, Azim Jr HA, Piccart M. An update on PARP inhibitors—moving to the adjuvant setting. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12:27–41.
69. Park HS, Jang MH, Kim EJ, Kim HJ, Lee HJ, Kim YJ, et al. High EGFR gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer. *Mod Pathol*. 2014;27:1212–22.
70. Girgert R, Emons G, Gründker C. 17 β -estradiol-induced growth of triple-negative breast cancer cells is prevented by the reduction of GPER expression after treatment with gefitinib. *Oncol Rep*. 2017;37:1212–8.
71. *Khan MZI, Uzair M, Nazli A, Chen J-Z. An overview on estrogen receptors signaling and its ligands in breast cancer. *Eur J Med Chem*. 2022;241:114658.
72. Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi J-P, Larrea F, Muhn P, et al. Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem Pharmacol*. 2006;71:1459–69.
73. Kuiper GG, Enmark EVA, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci*. 1996;93:5925–30.
74. Wang H, Tranguch S, Xie H, Hanley G, Das SK, Dey SK. Variation in commercial rodent diets induces disparate molecular and physiological changes in the mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102:9960–5.
75. Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β . *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95:15677–82.
76. *Molina L, Figueroa CD, Bhoola KD, Ehrenfeld P. GPER-1/GPR30 a novel estrogen receptor sited in the cell membrane: therapeutic coupling to breast cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2017;21:755–66.
77. Iafrati MD, Karas RH, Aronovitz M, Kim S, Sullivan Jr TR, Lubahn DB, et al. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor α -deficient mice. *Nat Med*. 1997;3:545–8.
78. Shughrue PJ, Lubahn DB, Negro-Vilar A, Korach KS, Merchenthaler I. Responses in the brain of estrogen receptor α -disrupted mice. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94:11008–12.
79. Baraka AM, Korish AA, Soliman GA, Kamal H. The possible role of estrogen and selective estrogen receptor modulators in a rat model of Parkinson's disease. *Life Sci*. 2011;88:879–85.
80. Ishunina TA, Fischer DF, Swaab DF. Estrogen receptor α and its splice variants in the hippocampus in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2007;28:1670–81.

81. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert J-M, Argos P, et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*. 1986;320:134–9.
82. Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien KAJ, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, et al. Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:4258–65.
83. Pelletier G, El-Alfy M. Immunocytochemical localization of estrogen receptors α and β in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:4835–40.
84. Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- α 36, a novel variant of human estrogen receptor- α 66. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;336:1023–7.
85. Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF. A variant of estrogen receptor- α , hER- α 36: Transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103:9063–8.
86. Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG. Estrogen receptors α and β form heterodimers on DNA. *J Biol Chem*. 1997;272:19858–62.
87. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci*. 1993;90:11162–6.
88. Förster C, Mäkela S, Wärrä A, Kietz S, Becker D, Hultenby K, et al. Involvement of estrogen receptor β in terminal differentiation of mammary gland epithelium. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99:15578–83.
89. Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, et al. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor β . *Mol Endocrinol*. 1997;11:353–65.
90. Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH, Murphy LC. Altered estrogen receptor α and β messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res*. 1998;58:3197–201.
91. Lin S-Y, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y, et al. β -catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97:4262–6.
92. Troester MA, Herschkowitz JI, Oh DS, He X, Hoadley KA, Barbier CS, et al. Gene expression patterns associated with p53 status in breast cancer. *BMC Cancer*. 2006;6:276.
93. Berger CE, Qian Y, Liu G, Chen H, Chen X. p53, a Target of Estrogen Receptor (ER) α , Modulates DNA Damage-induced Growth Suppression in ER-positive Breast Cancer Cells. *J Biol Chem*. 2012;287:30117–27.
94. Fan S, Wang J-A, Yuan R, Ma Y, Meng Q, Erdos MR, et al. BRCA1 Inhibition of Estrogen Receptor Signaling in Transfected Cells. *Sci New Ser*. 1999;284:1354–6.
95. Roger P, Sahla ME, Mäkelä S, Gustafsson JÅ, Baldet P, Rochefort H. Decreased expression of estrogen receptor β protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res*. 2001;61:2537–41.
96. Lazennec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C, Vignon F. ER β Inhibits Proliferation and Invasion of Breast Cancer Cells. *Endocrinology*. 2001;142:4120–30.

97. *Wang Z-Y, Yin L. Estrogen receptor alpha-36 (ER- α 36): A new player in human breast cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;418:193–206.
98. Owman C, Blay P, Nilsson C, Lolait SJ. Cloning of Human cDNA Encoding a Novel Heptahelix Receptor Expressed in Burkitt's Lymphoma and Widely Distributed in Brain and Peripheral Tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;228:285–92.
99. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. *Science.* 2005;307:1625–30.
100. *Ji TH, Grossmann M, Ji I. G protein-coupled receptors: I. diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem.* 1998;273:17299–302.
101. Marjon NA, Hu C, Hathaway HJ, Prossnitz ER. G protein-coupled estrogen receptor regulates mammary tumorigenesis and metastasis. *Mol Cancer Res.* 2014;12:1644–54.
102. Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology.* 2005;146:624–32.
103. Torres-López L, Olivas-Aguirre M, Villatoro-Gómez K, Dobrovinskaya O. The G-Protein-Coupled Estrogen Receptor Agonist G-1 Inhibits Proliferation and Causes Apoptosis in Leukemia Cell Lines of T Lineage. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:811479.
104. *Prossnitz ER, Barton M. The G protein-coupled oestrogen receptor GPER in health and disease: an update. *Nat Rev Endocrinol.* 2023;19:407–24.
105. Haas E, Bhattacharya I, Brailoiu E, Damjanović M, Brailoiu GC, Gao X, et al. Regulatory role of G protein-coupled estrogen receptor for vascular function and obesity. *Circ Res.* 2009;104:288–91.
106. *Gether U, Kobilka BK. G protein-coupled receptors: II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem.* 1998;273:17979–82.
107. Delbeck M, Golz S, Vonk R, Janssen W, Hucho T, Isensee J, et al. Impaired left-ventricular cardiac function in male GPR30-deficient mice. *Mol Med Rep.* 2011;4:37–40.
108. Mårtensson UEA, Salehi SA, Windahl S, Gomez MF, Swärd K, Daszkiewicz-Nilsson J, et al. Deletion of the G Protein-Coupled Receptor 30 Impairs Glucose Tolerance, Reduces Bone Growth, Increases Blood Pressure, and Eliminates Estradiol-Stimulated Insulin Release in Female Mice. *Endocrinology.* 2009;150:687–98.
109. Le Mellay V, Grosse B, Lieberherr M. Phospholipase C β and Membrane Action of Calcitriol and Estradiol. *J Biol Chem.* 1997;272:11902–7.
110. Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton Jr AR, Bland KI. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol.* 2002;16:70–84.
111. Albanito L, Sisci D, Aquila S, Brunelli E, Vivacqua A, Madeo A, et al. Epidermal Growth Factor Induces G Protein-Coupled Receptor 30 Expression in Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer Cells. *Endocrinology.* 2008;149:3799–808.
112. Ma L, Lan F, Zheng Z, Xie F, Wang L, Liu W, et al. Epidermal growth factor (EGF) and interleukin (IL)-1 β synergistically promote ERK1/2-mediated invasive breast ductal cancer cell migration and invasion. *Mol Cancer.* 2012;11:1–11.

113. Quinn JA, Graeber CT, Frackelton AR, Kim M, Schwarzbauer JE, Filardo EJ. Coordinate Regulation of Estrogen-Mediated Fibronectin Matrix Assembly and Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation by the G Protein-Coupled Receptor, GPR30. *Mol Endocrinol.* 2009;23:1052–64.
114. Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, et al. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature.* 1999;402:884–8.
115. Ignatov A, Ignatov T, Roessner A, Costa SD, Kalinski T. Role of GPR30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;123:87–96.
116. Park JS, Lee GH, Jin SW, Pham TH, Thai TN, Kim JY, et al. G protein-coupled estrogen receptor regulates the KLF2-dependent eNOS expression by activating of Ca²⁺ and EGFR signaling pathway in human endothelial cells. *Biochem Pharmacol.* 2021;192:114721.
117. *Carnero A, Paramio JM. The PTEN/PI3K/AKT pathway in vivo, cancer mouse models. *Front Oncol.* 2014;4:252.
118. Onishi K, Higuchi M, Asakura T, Masuyama N, Gotoh Y. The PI3K-Akt pathway promotes microtubule stabilization in migrating fibroblasts. *Genes Cells.* 2007;12:535–46.
119. Li F, Yu X, Szykarski CK, Meng C, Zhou B, Barhoumi R, et al. Activation of GPER Induces Differentiation and Inhibition of Coronary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation. Kirchmair R, editor. *PLoS ONE.* 2013;8:e64771.
120. Wang X-W, Yuan L-J, Yang Y, Zhang M, Chen W-F. IGF-1 inhibits MPTP/MPP⁺-induced autophagy on dopaminergic neurons through the IGF-1R/PI3K-Akt-mTOR pathway and GPER. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* 2020;319:E734–43.
121. Jiménez C, Portela RA, Mellado M, Rodríguez-Frade JM, Collard J, Serrano A, et al. Role of the Pi3k Regulatory Subunit in the Control of Actin Organization and Cell Migration. *J Cell Biol.* 2000;151:249–62.
122. *Berridge MJ. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J.* 1984;220:345–60.
123. Kang L, Wang Z. Breast cancer cell growth inhibition by phenethyl isothiocyanate is associated with down-regulation of oestrogen receptor- α 36. *J Cell Mol Med.* 2010;14:1485–93.
124. Klinge CM, Riggs KA, Wickramasinghe NS, Emberts CG, McConda DB, Barry PN, et al. Estrogen receptor alpha 46 is reduced in tamoxifen resistant breast cancer cells and re-expression inhibits cell proliferation and estrogen receptor alpha 66-regulated target gene transcription. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;323:268–76.
125. Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, et al. The G Protein-coupled Receptor GPR30 Mediates c-fos Up-regulation by 17 β -Estradiol and Phytoestrogens in Breast Cancer Cells. *J Biol Chem.* 2004;279:27008–16.
126. Denger S, Reid G, Koš M, Flouriot G, Parsch D, Brand H, et al. ER α gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins. *Mol Endocrinol.* 2001;15:2064–77.
127. Wei W, Chen ZJ, Zhang KS, Yang XL, Wu YM, Chen XH, et al. The activation of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) inhibits proliferation of estrogen receptor-negative breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1428–e1428.

128. Wakeling AE, Guy SP, Woodburn JR. ZD1839 (Iressa) : An Orally Active Inhibitor of Epidermal Growth Factor Signaling with Potential for Cancer Therapy.
129. Smith HO, Arias-Pulido H, Kuo DY, Howard T, Qualls CR, Lee S-J, et al. GPR30 predicts poor survival for ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2009;114:465–71.
130. Ignatov T, Treeck O, Kalinski T, Ortmann O, Ignatov A. GPER-1 expression is associated with a decreased response rate to primary tamoxifen therapy of breast cancer patients. *Arch Gynecol Obstet.* 2020;301:565–71.
131. Ignatov T, Claus M, Nass N, Haybaeck J, Seifert B, Kalinski T, et al. G-protein-coupled estrogen receptor GPER-1 expression in hormone receptor-positive breast cancer is associated with poor benefit of tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat.* 2019;174:121–7.
132. Molina L, Matus CE, Astroza A, Pavicic F, Tapia E, Toledo C, et al. Stimulation of the bradykinin B1 receptor induces the proliferation of estrogen-sensitive breast cancer cells and activates the ERK1/2 signaling pathway. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;118:499–510.
133. Pandey DP, Lappano R, Albanito L, Madeo A, Maggiolini M, Picard D. Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *EMBO J.* 2009;28:523–32.
134. Ren J, Guo H, Wu H, Tian T, Dong D, Zhang Y, et al. GPER in CAFs regulates hypoxia-driven breast cancer invasion in a CTGF-dependent manner. *Oncol Rep.* 2015;33:1929–37.
135. Chan Y-T, Lai AC-Y, Lin R-J, Wang Y-H, Wang Y-T, Chang W-W, et al. GPER-induced signaling is essential for the survival of breast cancer stem cells. *Int J Cancer.* 2020;146:1674–85.
136. Pisano A, Santolla MF, De Francesco EM, De Marco P, Rigracciolo DC, Perri MG, et al. GPER, IGF-IR, and EGFR transduction signaling are involved in stimulatory effects of zinc in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts. *Mol Carcinog.* 2017;56:580–93.
137. Zhang L, Li Y, Lan L, Liu R, Wu Y, Qu Q, et al. Tamoxifen has a proliferative effect in endometrial carcinoma mediated via the GPER/EGFR/ERK/cyclin D1 pathway: A retrospective study and an in vitro study. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;437:51–61.