

Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlovy v Praze

Katedra buněčné biologie

Biologické účinky tamoxifenu jako modulátoru estrogenní signalizace buněk mamárního karcinomu

Autor: Ing. Martin Ovčarov

Vedoucí: MUDr. Zdeněk Kleibl, PhD.

Konzultant: RNDr. Jan Brábek, PhD.

2009

Obsah:

1. KARCINOM PRSU	3
1.1. MORFOLOGIE A FYZIOLOGIE PRSNÍ ŽLÁZY	3
1.2. PŮVOD NÁDOROVĚ TRANSFORMOVANÝCH BUNĚK PRSNÍ ŽLÁZY	4
1.3. RIZIKOVÉ FAKTORY VZNIKU KARCINOMU PRSU	4
1.4. ÚLOHA HORMONÁLNÍ TERAPIE	5
2. STRUKTURA, VLASTNOSTI A SIGNALIZACE ESTROGENNÍMI RECEPTORY (ER)	7
2.1. SYNTÉZA A TRANSPORT ESTROGENŮ, FYTOESTROGENY	7
2.2. STRUKTURA A VLASTNOSTI ER	8
2.1.1 ERα	9
2.2.2 ERβ	10
2.3. ESTROGENNÍ SIGNALIZACE	10
3. TAMOXIFEN	14
3.1. FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI	14
3.2. MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY PROTINÁDOROVÉHO ÚČINKU TAMOXIFENU	15
3.3. VZNIK A PŘÍČINY REZISTENCE	17
4. DISKUZE	21
5. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	23
6. REFERENCE	24

Abstrakt:

Karcinom prsu představuje velmi nebezpečnou skupinu hormon-dependentních maligních onemocnění. Tato hormonální citlivost je prostředkována zejména estrogenními receptory, které v buněčném kontextu vstupují do složitých vazeb s ostatními systémy podílejícími se na buněčném přežití, proliferaci a apoptóze. Situaci ještě komplikují jiné typy receptorů interagující s ligandem a rozmanitost koaktivátorů a korepresorů. Modulace činnosti estrogenních receptorů přesto patří k základním léčebným modalitám. Tamoxifen patří i více než 30 let po svém objevu k nejvíce využívaným lékům v léčbě karcinomu prsu. Největším problémem spojeným s použitím tamoxifenu je vznik rezistence, jejíž molekulární podstata je v poslední době intenzivně zkoumána. Poznání příčin rezistence pak otevírá prostor k cílené léčbě, zabráňující jejímu vzniku.

Abstract:

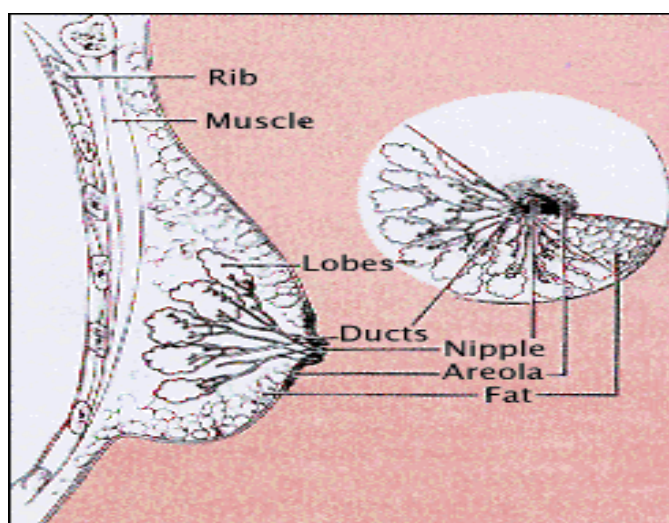
Breast carcinoma represent heterogenous group of dangerous hormone-dependent malignant diseases. This hormonal response is predominantly mediated by estrogen receptors, which are entering the complex linkages with other systems involved in cell survival, proliferation and apoptosis within the particular context. The situation is even more complicated because there are also other types of receptors interacting with the ligand and diversity of coactivators and corepressors. However, modulation of estrogen receptors activity is one of the essential therapeutic modalities. Tamoxifen is one of the most used drugs in the treatment of breast carcinoma, despite its discovery is more than 30 years old. The biggest limitation associated with the use of tamoxifen is the development of resistance, which molecular basis is recently intensively investigated. Knowledge of the causes of resistance opens up the possibilities for targeted treatment to prevent its emergence.

1. Karcinom prsu

Karcinom prsu je maligní nádorové onemocnění vznikající z buněk mléčné žlázy. Příčinami vzniku i klinickým obrazem se jedná o heterogenní skupinu chorob. Mezi nádorovými onemocněními ve vyspělých zemích je karcinom prsu u žen nejčastější příčinou úmrtí. V České republice dosahovala věkově standardizovaná incidence v roce 2005 64,12 případů na 100 000 obyvatel a mortalita 18,77 případů na 100 000 obyvatel (www.svod.cz [1]). Zatímco incidence karcinomu prsu dlouhodobě roste, mortalita zůstává na přibližně konstantní úrovni. Celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu u žen odpovídá poměru 1:12 (Clamp et al. [2]).

1.1. Morfologie a fyziologie prsní žlázy

Prsní žláza je složena ze dvou typů buněk – lumenálních a myoepitelových vznikajících diferenciací bipotentních progenitorů. Fyziologickou úlohou lumenálních buněk je tvorba a sekrece mléka v období laktace, myoepitelové buňky pak kontrakcemi zajišťují postup mléka dukty k vývodným mlékovodům. Základní morfologickou strukturou mléčné žlázy jsou lobuly (lalůčky) složené z alveol (obr.1).



Obr.1. Morfologie prsní žlázy. (Převzato z www.nci.nih.gov)

Buňky prsních žláz podléhají intenzivnímu cyklickému vývoji v závislosti na menstruačním cyklu menoaktivních žen, regulovanému zejména endokrinním systémem. Dominantní úloha spočívá ve změnách koncentrací steroidních hormonů - estrogenů a progesteronu, lipofilních molekul, jejichž účinek je zprostředkován intracelulárními receptory.

1.2. Původ nádorově transformovaných buněk prsní žlázy

Karcinom prsu vzniká maligní transformací, akumulací genetických změn a klonální expanzí buněk epitelu prsní žlázy. S transformovanými buňkami je spojena nestabilita genomu, deregulace buněčného cyklu a nebezpečí vzniku metastatického potenciálu v důsledku ztráty kontaktní inhibice. Dle v současnosti převládajícího názoru je většina nádorů odvozena od luminálních elementů, na úrovni duktálních progenitorů (Polyak [18]). V méně než 10% případů však nádory vznikají i z myoepitelových buněk – hovoříme pak o bazálních tumorech. Uvažují se dva možné modely kancerogeneze. Podle prvního z nich je prekurzorem nádorově transformovaných buněk malá skupina buněk kmenových. Podle druhého modelu jsou dalšího dělení schopny všechny transformované buňky.

1.3. Rizikové faktory vzniku karcinomu prsu

Rizikové faktory vzniku karcinomu prsu můžeme rozčlenit na genetické, v jejichž rámci jsou nejvýznamnější mutace tumor supresorových genů *BRCA1* (Breast cancer 1 – OMIM 113705) a *BRCA2* (Breast Cancer 2 – OMIM 600185) a environmentální. Nejvýznamnější negenetický faktor je pak celoživotní expozice estrogenů (viz. Tab. 1).

Pro modelování rizika vzniku karcinomu prsu bylo sestaveno několik statistických modelů, z nichž nejznámější je Gailův model sestavený pro bělošskou populaci v USA umožňující odhad absolutního individuálního rizika. Nutno dodat, že na základě národní studie provedené v letech 2000-2004 na vzorku 14556 žen v ČR se ukázalo, že pro podmínky České republiky

není původní Gailův model zcela vhodný (Novotny et al. [3]). Dalším využívaným přístupem je model Clausův, využívající spíše anamnestická data.

<i>Rizikové faktory</i>	
Věk ¹⁹	Riziko roste s věkem po celou dobu produktivního věku, po dosažení 50 let (pravděpodobně tedy ochranný vliv menopauzy) se riziko dále zvyšuje mnohem nižší rychlostí
Opožděná menopauza	Vliv tohoto efektu se ukazuje jako nezávislý na způsobu nástupu menopauzy – zda nastupuje přirozeně nebo jako důsledek oboustranné ovariectomie ²²
Hormonální antikoncepce a hormonální terapie menopauzy	Riziko je v průběhu užívání zvýšené jen velmi slabě, a po ukončení užívání se postupně vrací na svoji původní úroveň ²² .
Dědičné mutace v tumor supresorových genech	Jedná se zejména o geny <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>P53</i> , <i>ATM</i> , <i>PTEN</i> . Odhaduje se, že tyto faktory vysvětlují cca 10 % případů. Zároveň se uvažuje o kombinovaném účinku mnoha doposud málo charakterizovaných genů s nízkou penetrancí, vázaných na metabolismus estrogenů nebo karcinogenů, např. geny <i>CYP19</i> , <i>GSTP1</i> , <i>GSTM1</i> .
<i>Protektivní faktory</i>	
Opožděný nástup menarché	Každý rok zpoždění nástupu snižuje riziko o zhruba 5% ²⁰
Počet porodů	Krátkodobě dochází ke zvýšení incidence po porodu, avšak z dlouhodobého hlediska mají porody spíše ochranný charakter ²¹
Nižší věk prvního porodu	Podle (2) je odhadnuté relativní riziko u prvorodiček starších 30 let ve srovnání s prvorodičkami mladšími 20 let 1,9-3,5.
Celková doba kojení	Tento faktor se nezdá být příliš významný. Podle (2) je odhadnuté relativní riziko ve skupině kojících více jak 16 měsíců v porovnání s nekojícími

Tab.1.: Rizikové a protektivní faktory spojené s karcinomem prsu.

1.4. Úloha hormonální terapie

S ohledem na to, že karcinom prsu je považován za hormonálně-dependentní nádorové onemocnění má hormonální terapie důležitou úlohu v léčbě onemocnění. Hormonální terapie může být realizována několika způsoby. U premenopauzálních pacientek připadá do úvahy chirurgická ovariectomie, odstraňující hlavní endogenní zdroj estrogenů. Chemoterapeuticky lze blokovat tvorbu estrogenů nebo modulovat činnost estrogenních receptorů. Syntézu estrogenů lze inhibovat jak na centrální úrovni GnRH (gonadotropin-releasing hormone,

gonadoliberin) například goserelinem, tak i periferně v místě syntézy inhibicí aromatázy CYP19 (aromatáza OMIM 17910) , například formestanem, anastrozolem či letrozolem.

Skupina látek modulujících činnost estrogenních receptorů se nazývá antiestrogeny a můžeme je dělit na dvě skupiny. První z nich jsou tzv. čisté steroidní antiestrogeny, bez agonizujících účinků (např. Fulvestrant). Kompetitivně se vážou na receptor s podobnou afinitou jako estrogen, avšak zabraňují aktivaci signalizace. Druhá skupina látek, obvykle nesteroidní povahy – tzv. selektivní antiestrogeny SERM (selective estrogen receptor modulator), vykazuje jak agonistický tak antagonistický účinek. Tamoxifen patří do této skupiny, působí jako estrogen v kostní tkáni, CNS a kardiovaskulárním systému, naopak jako antiestrogen v prsu a děloze (Riggins et al. [32]). Avšak podobně jako při využití ovariectomie či inhibice syntézy estrogenů dochází pouze ke krátkodobému účinku.

V léčbě karcinomu prsu se však využívá několika modalit, přičemž největší důraz je kladen na chirurgickou léčbu. Dalšími modalitami jsou chemoterapie cytostatiky (cyklofosfamid, methotrexát, 5-fluorouracil, adriamycin) a v menší míře se využívá i radioterapie. Nově je nasazována cílená biologická léčba monoklonálními protilátkami proti receptorům růstových faktorů (Herceptin/trastuzumab) či dalšími molekulami cílenými proti konkrétním signálně aktivním proteinům angažovaným v etiopatogenezi karcinomu prsu.

2. Struktura, vlastnosti a signalizace estrogenními receptory (ER)

ER jsou transkripční faktory regulující širokou skupinu genů angažovaných v řadě buněčných pochodů včetně buněčné proliferace a apoptózy. Na řízení těchto procesů se ER podílí i negenomovými mechanismy. Ligandy estrogenních receptorů jsou estrogény a jejich přírodní a syntetická analoga.

2.1. Syntéza a transport estrogenů, fytoestrogeny

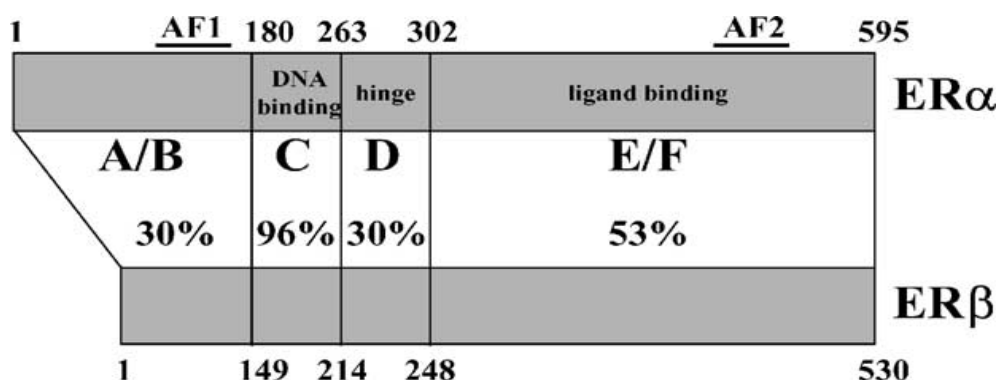
Nativními ligandy estrogenních receptorů jsou deriváty cholesterolu - estrogény (např. estradiol, estriol či estron) - vznikající z prekursoru progesteronu. Progesteron, který kromě estrogenů je i prekurzorem androgenů, je syntetizován zejména v ováriích. Estradiol, vykazující nejvýraznější biologické účinky je tvořen z 90 % v ovariálních granulomatózních buňkách pod kontrolou FSH (Folikuly stimulující hormon) konverzí androgenů produkovaných thekálními buňkami, které jsou regulovány LH (luteinizační hormon). LH i FSH jsou hypofyzární hormony uvolňované hypotalamickým GnRH. Klíčovou roli v syntéze estradiolu hrají enzymy komplexu cytochromu CYP450 - CYP17 (17- α hydroxyláza OMIM 609300) a CYP19. Hydroxyláza CYP17 konvertuje pregnolon/progesteron na prekurzory androgenů dehydroepiandrosteron/androstendion. Aromatáza CYP19 zajišťuje konečný krok biosyntézy estrogenů, konverzi C19 androgenů testosteronu/androstendionu na C18 estradiol nebo estron. Estriol je syntetizován v játrech a jeho produkce stoupá během těhotenství. Estron, hlavní estrogen postmenopauzálních žen, je produkován v ováriích jen z 10%, většina je tvořena v tukové tkáni. V malých množstvích jsou estrogény u obou pohlaví tvořeny i v kůře nadledvin.

V krevním oběhu jsou estrogény ze 60% vázány na transportní glykoprotein SHBG (sex-hormone binding globulin), z 20% jsou vázány na albumin a z 20% se vykytují volně. Estrogény zřejmě mohou pronikat ve volné formě přes cytoplazmatickou membránu. Byl však popsán i aktivní transportní mechanismus, využívající jako přenašeče megalin a cubulin, který transportuje komplex estrogenu s navázaným SHBG (Lin et al. [23]). Po endocytóze následuje hydrolýza SHBG v lysozomu a uvolnění estrogenu do cytoplazmy buňky.

Kromě endogenní syntézy, mohou být estrogény přijímány i exogenně, ve formě fytoestrogenů, přijímaných s rostlinnou stravou, zejména pak potravinami vyrobenými ze sóji (Tawakalitu et al. [31]). Hlavními fytoestrogény jsou genistein, daidzein a glycitein patřící k isoflavonidům, avšak slabé estrogény můžeme najít i v celozrnných produktech ve formě ligninů. Slabé estrogenní účinky mají i stilbeny.

2.2. Struktura a vlastnosti ER

Estrogény v organismu hrají velmi různorodou roli, jejich působení je navíc tkáňově specifické. Estrogény vykonávají svojí fyziologickou úlohu především aktivací ER. Rozeznáváme dvě hlavní formy ER – ER α a ER β , které se odlišují jak molekulární strukturou, lokalizací v různých genových lokusech, tak i tkáňově specifickou expresí. Oba ER vykazují strukturní podobnost s jinými steroidními receptory, do stejné receptorové rodiny patří i progesteronový receptor. ER α je společně s ER β exprimován v prsu, mozku, kardiovaskulárním systému a kostní tkáni (Pearce et al [33]). V ženském reprodukčním systému (děloze) a játrech převažuje ER α , zatímco v mužském reprodukčním systému (prostatě) a střevech ER β . Oba estrogenní receptory jsou často lokalizovány i v odlišných buněčných typech v rámci jedné tkáně. V prsní žláze je vysoká koncentrace ER α v duktálních buňkách, zatímco v myoepiteliálních je nízká. Ve většině případů invazivního karcinomu prsu je úroveň exprese ER β značně snížena, naopak úroveň exprese ER α je obvykle vyšší oproti zdravé tkáni.



Obr.2.: Struktura ER α a ER β . Procenta udávají stupeň homologie. (Převzato z Pearce et al. [33])

2.1.1 ER α

ER α je intracelulární receptor složený z 525 aminokyselin s molekulovou hmotností 66 kDa. Je kódovaný genem *ESR1* (OMIM 133420) skládajícím se z osmi exonů a nachází se na šestém chromozomu, v lokusu 6q25.1. S výjimkou exonu osm na poly A konci může být jakýkoliv exon vystřižen s následkem ztráty funkce, jejíž úsek kóduje. Je známo větší množství sestřihových variant a zřejmě existuje i rozdíl v jejich expresi mezi zdravou a maligní tkání (Ishunina et al. [15]). Delece jednoho exonu jsou typické především pro zdravé tkáně, zatímco v maligním stavu se vyskytují spíše mnohačetné delece. Koncentrace různých sestřihových variant jsou tkáňově specifické.

ER α má šest funkčních domén, standardně značených A-F, značeno od N-konce k C-konci (Klinge [16]). V oblasti domén A a B se nachází transaktivační doména (TAD) AF1, jejíž funkce není závislá na přítomnosti ligandu. Doména C zahrnuje DBD (DNA Binding Domain), obsahující dva Zn²⁺ prsty, které za spoluúčasti reziduí tzv. P-boxu jsou zodpovědné za specifickou vazbu na DNA. V rámci domény C nalezneme i tzv. D-box, který má podíl na dimerizaci receptoru. Doména D (tzv. Hinge region) je zodpovědná zejména za vazbu koaktivačních proteinů a dimerizaci receptorů. Na karboxyterminálních doménách E a F nalezneme úsek vázající estrogenu LBD (Ligand binding domain) s aktivační doménou AF2. V těchto doménách se rovněž nacházejí úseky pro vazbu některých koaktivátorů a jaderný lokalizační signál. Domény AF1 a AF2 jsou pro různé transkripční účely využívány jednak samostatně, jindy je nutná aktivace obou domén.

Vysoká exprese ER α (můžeme ji pozorovat u více než jedné poloviny případů karcinomu prsu) pozitivně koreluje s dobrou prognózou průběhu onemocnění a také s vyšší pravděpodobností odpovědi na hormonální terapii. V těchto případech zvýšené exprese ER α dochází k odpovědi na hormonální léčbu až v 70% případů (Petráková et al. [4]). Vysoké hladiny ER α ve zdravé tkáni jsou na druhé straně významným rizikovým faktorem vzniku onemocnění a jeho progresi. (Hiscox et al. [35])

2.2.2 ER β

K objevu ER β došlo teprve v roce 1996, zhruba 10 let po objevu ER α , jemuž je strukturně velmi podobný. Nejhomolognější je úsek C (96%), nejvíce odlišný je úsek F (18%) (Klinge [16]). ER β je kódován genem *ESR2* (OMIM 601663) nacházejícím se na 14 chromozómu, v lokusu 14q. Obsahuje 530 aminokyselin s molekulovou hmotností kolem 50 kDa. Úloha ER β je doposud charakterizována pouze částečně. Je známo několik různých sestřihových forem tohoto receptoru. Například forma ER β cx, postrádá část systému pro vazbu ligandu, a vůbec se neváže na estrogény, zato preferenčně dimerizuje s ER α , čímž snižuje jeho efektivní koncentraci v buňce a inhibuje potenciální působení estrogenů (Palmieri et al. [7]). Je tedy možné, že hlavní funkce ER β je inhibice transkripčních aktivit ER α parciálním agonismem, neboť některé formy ER β spouští transkripci stejných genů jako ER α avšak s nižší efektivitou. Je známo ale i několik genů, které jsou pod výhradní transkripční kontrolou ER β . Momentální stav znalostí o funkcích ER β jej staví do role tumor-supresoru s proapoptickými účinky (Helguero et al. [10]).

2.3. Estrogenní signalizace

Mechanismy účinku estrogenů můžeme rozčlenit do několika skupin. Klasická genomová cesta zahrnuje transkripční regulaci ER a spočívá v přímé interakci aktivovaného ER s DNA. Neaktivované estrogenní receptory jsou obvykle navázány na chaperonovou molekulu HSP90 (heat shock protein – OMIM 140571), která udržuje molekulu receptoru v cytoplasmě. HSP90 se na molekulu ER váže v blízkosti LBD domény. Po navázání estrogenu HSP90 z vazby s ER disociuje a indukovaná změna konformace receptoru pak odkryje vazebná místa umožňující interakci ER s dalšími molekulami podílejícími se na estrogenní signalizaci a jaderný lokalizační signál. V důsledku těchto změn dojde k dimerizaci receptoru a translokaci do jádra. V jádře se naváže na specifické motivy DNA určené pro estrogenní signalizaci ERE (estrogen responsivní elementy) skládající se ze dvou inverzních hexanukleotidů 5'-AGGTCAnnnTGACCT-3' a spustí transkripci různorodé skupiny genů, včetně genů regulujících proliferaci stimulací buněčného cyklu.

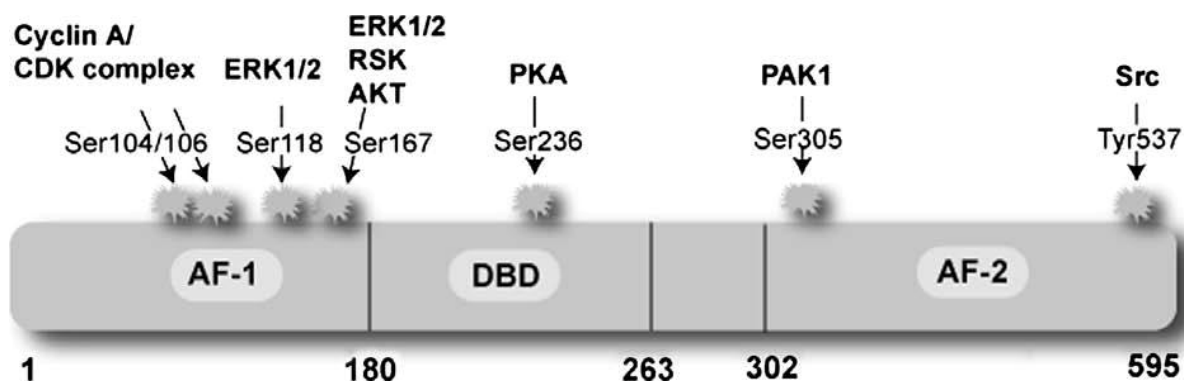
Buněčný cyklus je kontrolován především různou expresí jeho hlavních regulátorů - cyklinů. Jejich účinek je zprostředkován vazbou na CDK kinázy (Cyklin-dependentní kinázy). Během G1 fáze buněčného cyklu je syntetizován zejména cyklin D, který po vazbě na CDK4/CDK6

umožňuje překonání restriktivního bodu G1 regulovaného proteinem pRB (Retinoblastoma protein). Vstup do následující S fáze je zprostředkován zahájením exprese cyklinu E, který se váže na CDK2. Estrogenní signalizace způsobuje přímou transaktivaci genu pro cyklin D1 *CCND1* (OMIM 168461) (Sicinski et al. [36]).

Buněčná proliferace v závislosti na estrogenní stimulaci může být ovlivněna i mezibuněčnou komunikací odlišných buněčných typů. Podle jedné z hypotéz v epitelu přítomné ER α + buňky v reakci na přítomnost estrogenu neproliferují, avšak parakrinně indukují proliferaci okolních ER α - buněk sekrecí růstových faktorů (Polyak [18]). V imunohistochemických studiích totiž ER α + buňky nevykazují proliferační markery jako je cyklin A či KI-67 (Levin[7]). Toto pozorování je v kontrastu s nádorovými buněčnými liniemi, které exprimují ER α a proliferují v odpovědi na estrogen. Jiná hypotéza vysvětluje tato pozorování tak, že ER α je sice nezbytný pro spuštění proliferace, avšak z nějakého důvodu je neslučitelný s postupem buňky dalšími fázemi buněčného cyklu a musí být následně degradován, například ubiquitinovou cestou.

Estrogen způsobuje transaktivaci protiapoptotického proteinu Bcl-2 (B-Cell Lymphoma 2 – OMIM 151430), který inhibuje intrinsickou cestu aktivace apoptózy na úrovni uvolnění cytochromu c z mitochondrie. (Levin[5]). Tento efekt je zesílen účinkem na JNK (c-jun N-terminal kinase), která fosforylací inaktivuje Bcl-2. Aktivovaný ER α působí na JNK inhibičně, ER β aktivačně. Vzhledem k tomu, že ER α je v průběhu kancerogeneze obvykle přítomen ve vyšších koncentracích než ER β , převládá inhibiční efekt.

Aktivita ER jako transkripčního faktoru je regulována jeho fosforylací, často kinázami spojenými s transdukcí signálu od receptorových tyrosinkináz (obr. 3). Při expozici estrogenem dochází k fosforylaci ER nejčastěji na serinu 118, s následkem konstitutivní aktivity ER (Lannigan [8]). Naopak fosforylace na Serinu 236 katalyzovaná PKA (proteinkináza A – OMIM 176911) má prokazatelně inhibiční účinek, zabraňující dimerizaci ER. Na rozdíl od ostatních fosforylací tedy představuje negativní kontrolní mechanismus.



Obr.3 : Místa fosforylací ER α a zodpovědné kinázy. (Převzato z Riggins et al [32])

Oproti výše uvedeným přímým transkripčním účinkům estrogenní signalizace využívá i jiných signalizačních prostředků. V rámci „neklasických“ genomových účinků může ER sloužit jako pomocný aktivátor a protein-proteinovými interakcemi regulovat jiné transkripční faktory (např. FOS/JUN komplex) bez přímé interakce s DNA (Hiscox et al. [35]).

Stimulace estrogenem aktivuje i G-proteinové signální kaskády, charakteristické pro membránové receptory, lze proto předpokládat existenci membránové formy ER (ERM) (Levin [5]). ERM zatím nebyl izolován, ale vzhledem k tomu, že protilátky proti různým epitopům jaderného ER se vážou do tzv. kalveol - domén cytoplazmatické membrány s abnormální koncentrací signalizačních systémů, je možné že struktura ERM bude velmi podobná struktuře jaderných ER, avšak využívající adaptorové proteiny kalveol k signalizaci jiného typu, než jaká je realizována klasickou cestou. Lokalizace receptoru by pak byla hlavní determinantou jeho účinku. Přesný mechanismus působení ERM nebyl doposud popsán, avšak byla prokázána syntéza IP3 (inositol trifosfát), cAMP (cyklické AMP) a influx Ca^{2+} v důsledku estrogenní stimulace.

Další signální dráha stimulovaná estrogenem zahrnuje G-proteinový receptor GPR30 (G-Protein Coupled Receptor 30 – OMIM 601805) aktivující MAPK kinázy (mitogen activated protein kinases) a způsobující influx Ca^{2+} z endoplazmatického retikula do cytoplazmy (Prossnitz et al. [24]) . GPR30 je lokalizovaný nejspíše na membráně endoplazmatického retikula. Estrogen je tedy schopen spustit signalizační kaskádu i bez přítomnosti ER.

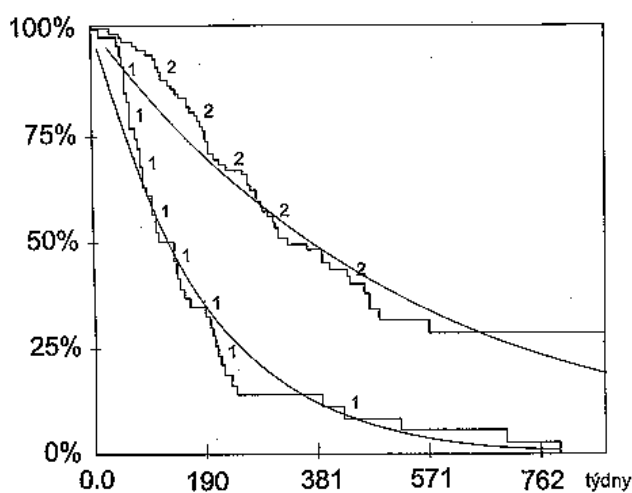
Interakce ER s DNA je ovlivňovaná i jinými molekulami, podílejícími se na transdukcii signálu. Pokud tyto molekuly přenos signálu zesilují, eventuálně vůbec umožňují, označujeme je jako koaktivátory, v opačném případě jako korepresory. Navázání estrogenu na ER či jeho fosforylace pak způsobuje změnou konformace vyšší afinitu ke koaktivátorům a nižší afinitu ke korepresorům (Sommer et al. [9], Lannigan [8]). Heterogenita koaktivátorů a korepresorů, jejich vzájemné interakce a rozdílné zastoupení mezi buněčnými typy má velký podíl na specifitě účinku estrogenů. Jejich rozsáhlý výčet lze nalézt např. v (Klinge [16], Sommer et al [9]). Některé vybrané koaktivátory a korepresory včetně jejich funkce shrnuje tabulka 2. Různorodý účinek estrogenů v odlišných tkáních však může být vysvětlen i jinými mechanismy, například poměrem koncentrací ER α / ER β .

<i>Vybrané koaktivátory</i>		
Jméno	Doména ER α	Funkce
p68	LBD	Zvyšuje transkripční aktivitu ER α s navázaným estrogenem či tamoxifenem
RAP46	Hinge domain	Negativně ovlivňuje apoptózu vyvolanou glukokortikoidy
SRC1	AF1 / AF2	Stimuluje transkripci
SRC2	LBD, helix 12	Stimuluje transkripci
SRC3/AIB1	LBD	Stimuluje transkripci, zvyšuje transkripční aktivitu ER α oproti ER β , zvyšuje transkripci HER2, HAT aktivita
<i>Vybrané korepresory</i>		
NCoR	Hinge domain	Tlumí bazální transkripci, reprimuje agonistické efekty SERM.
REA	LBD	Zvyšuje účinnost antiestrogenů a snižuje účinnost estrogenů
SMRT	LBD	Snižuje schopnost antiestrogenů iniciovat transkripci genů pod kontrolou estrogenů

Tab. 2.: Vybrané koaktivátory a korepresory ER

3. Tamoxifen

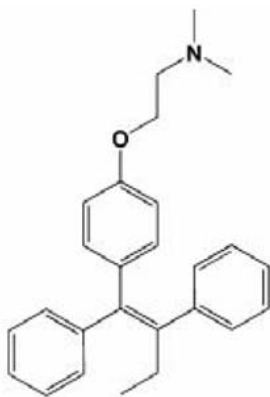
Tamoxifen byl objeven A.L. Walpolem v roce 1962 a dodnes zůstává jedním ze základních pilířů hormonální terapie karcinomu prsu, ač původně byl vyvíjen a neúspěšně testován jako antikoncepční přípravek (Craig [34]). Tamoxifen byl registrován ve Velké Británii v roce 1973 a v USA v roce 1977 pro léčbu pokročilých karcinomu prsu. Efektivitu léčby tamoxifenem dokumentuje obrázek 5



Obr. 5 Kaplan-Meierovy křivky přežití pacientek odpovídajících na hormonální léčbu tamoxifenem (2) oproti pacientkám na léčbu tamoxifenem neodpovídajících (1). Analýza provedena na souboru 148 českých pacientek s disseminovaným či inoperabilním karcinomem prsu. (převzato z Medková et al. [29]).

3.1. Farmakologické vlastnosti

Tamoxifen ((Z)-2-[4-(1,2-difenylybut-1-enyl)fenoxy]-N,N-dimethyl-ethanamin, CAS 10540-29-1) je lipofilní molekula o molekulové hmotnosti 371 Da (obr. 4). Je snadno absorbovatelná ve střevu bez chemických modifikací a v krevním oběhu se váže na albumin. V játrech je metabolizována enzymy komplexu cytochromu P450 CYP3A4, CYP2C9 a CYP2D6 na málo aktivní formu N-desmethyltamoxifen a dvě aktivní formy, 4-hydroxytamoxifen a endoxifen.



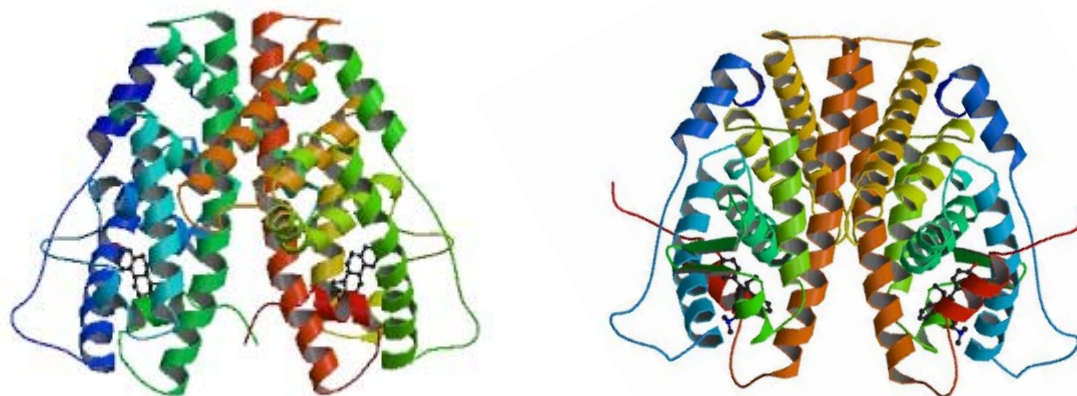
Obr.4.: Chemická struktura tamoxifenu. (Převzato z <http://en.wikipedia.org/wiki/Tamoxifen>)

Maximální sérová koncentrace je dosahována po 4-7 hodinách od podání, stabilní hladiny (300 ng/ml) po zhruba 4 týdnech při administraci 40mg tamoxifenu denně. Vylučován je především ve stolici s biologickým poločasem 5-7 dnů.

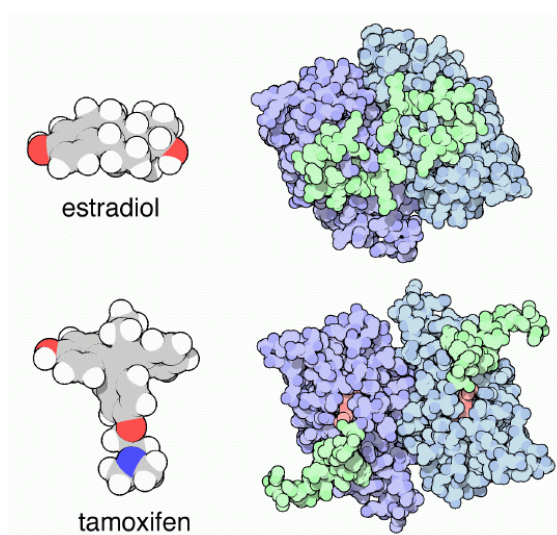
3.2. Molekulární mechanismy protinádorového účinku tamoxifenu

Tamoxifen působí agonistickým efektem na AF1 doménu ER a antagonistickým efektem na AF2 doménu ER (Sommer et al. [9]). Hlavní účinek v transformovaných buňkách karcinomu prsu je nejspíše zprostředkován jeho antagonistickým působením na ER α , čímž dochází k bloádě estrogeny indukované proliferace a protiapoptotických účinků.

Po navázání estrogenu na ER dochází k posunu helixu 12, klíčové komponenty AF2 domény, který změnou své konformace umožňuje navázání koaktivátorů a ztěžuje navázání korepresorů. Navázání tamoxifenu pak vede k posunu helixu 12 do jiné orientace (obr. 6 a 7), což interferuje s vazbou některých koaktivátorů. Oproti volnému ER nebo ER s navázaným estrogenem má také ER s navázaným tamoxifenem mnohem vyšší afinitu ke korepresorům, např. k NCoR (Nuclear receptor corepressor – OMIM 600849).



Obr.6.: LBD ER α s navázaným estrogenem (vlevo) a LBD ER α s navázaným tamoxifenem (vpravo). (Převzato z www.pdb.org – 1qku vs.3ert)



Obr 7.: Odlišné konformace ER po navázání estradiolu a tamoxifenu (zeleně vybarveno).
(Převzato z http://en.wikipedia.org/wiki/Estrogen_receptor)

Tamoxifen inhibuje buněčný cyklus ve fázi G1 snížením exprese cyklinů D a E (Riggins et al. [32]). Cyklin D je nadměrně syntetizován ve zhruba 50% případech karcinomu prsu. Komplexy cyklinů a CDK jsou inhibovány negativními regulátory, proteiny p21^{WAF1} (Wildtype p53 activated fragment 1 – OMIM 116899) a p27^{KIP1} (Cyclin dependent kinase inhibitor 1B – OMIM 600778), jejichž koncentrace tamoxifen zvyšuje.

Účinek tamoxifenu může být také zprostředkován represí HER2, případně zabráněním metastatické invazi snížením transkripce estrogenem regulovaných proteáz (Hurtado et al. [27]). Avšak i agonistický účinek tamoxifenu se může podílet na jeho protinádorovém účinku. Bylo prokázáno, že tamoxifen indukuje expresi genu *MASPIN* (Protease inhibitor 5 – OMIM 154790) - tumor supresorového genu inhibujícího růst nádoru, jeho invazivitu a metastatické procesy (Lin et al. [17]). Tato indukce je pak vyvolávána interakcí s ER α a je nezávislá na ER β .

3.3. Vznik a příčiny rezistence

Přítomnost ER α v nádorových buňkách je indikací k podání tamoxifenu jako léku první volby v léčbě karcinomu prsu. Pokud se rezistence maligních buněk na tamoxifen projeví ihned od počátku expozice, hovoříme o rezistenci *de novo*. Ta zahrnuje přibližně 30% ER α + tumorů (Riggins et al [32]). Avšak i na počátku citlivé nádory mohou po nějaké době rezistenci na tamoxifen získat, pak hovoříme o rezistenci získané (Petráková et al. [4]). K relapsu dochází zhruba po 9-12 měsících a to i u řady nádorů, kde je exprimován ER α . Po vzniku rezistence na tamoxifen však může být zachována odpověď na jiné modality hormonální terapie (např. na Fulvestrant).

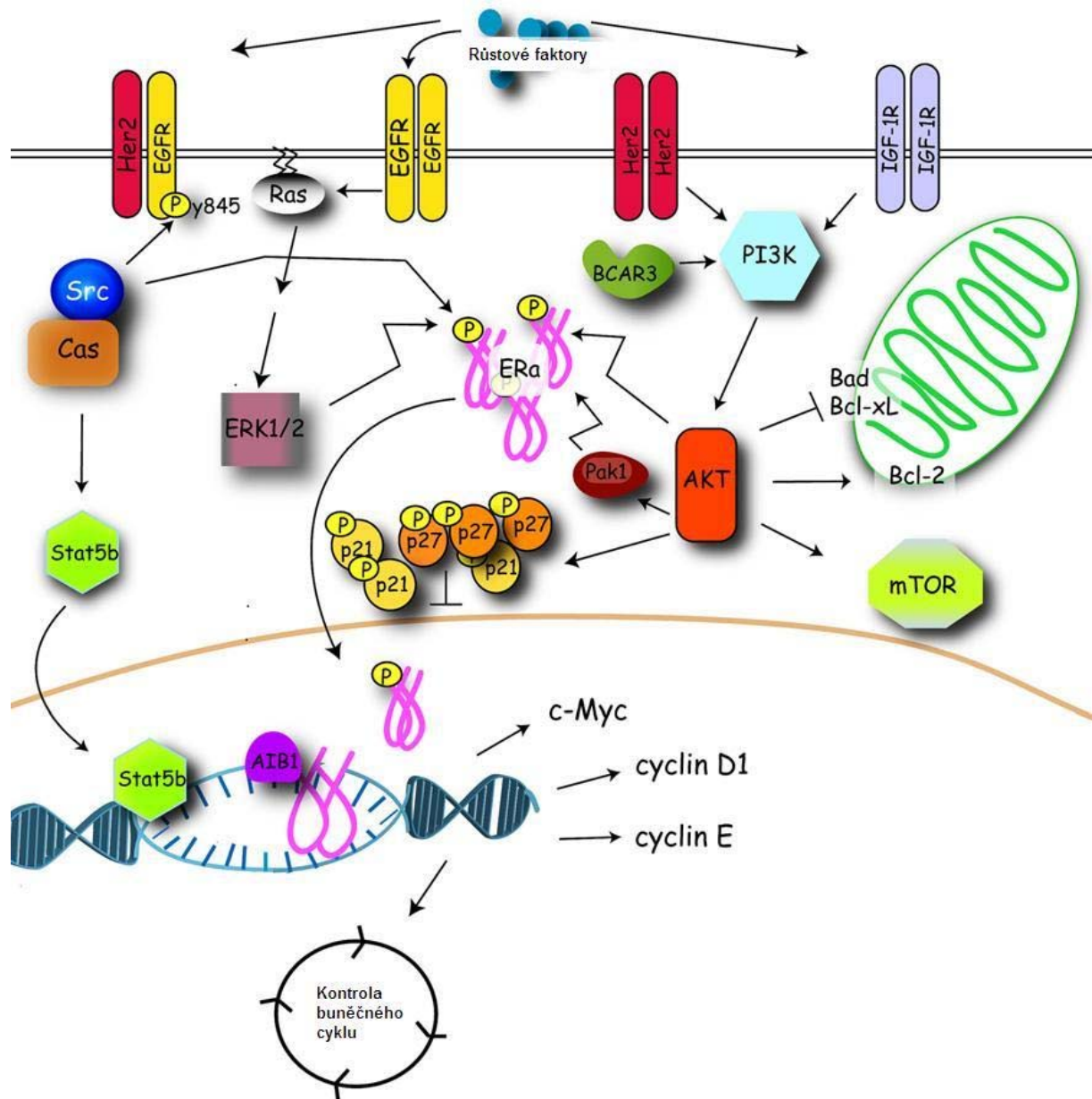
V průběhu léčby tamoxifenem dochází k poklesu exprese ER, ale i progesteronového receptoru (Arpino et al. [6]). Z hlediska vzniku rezistence je špatným prognostickým znakem nepřítomnost progesteronového receptoru na buňkách exprimujících estrogenový receptor (ER+/PR-), tento fenotyp je asociován obecně s agresivnějšími nádory. Dosavadní údaje naznačují, že rezistence na tamoxifen není způsobená mutacemi v ER (Petráková et al. [4]). Její vznik je takřka výhradně indukován u pacientů s pokročilým nebo metastatickým onemocněním, většinou nevzniká u pacientů s mikroskopickým ložiskem.

Mechanismy vzniku rezistence na tamoxifen můžeme klasifikovat do následujících kategorií:

1) Receptorové tyrosinkinázy - aktivace a exprese receptorů růstových faktorů (EGFR, HER2, IGFR), molekul účastnících se transdukce signálu z receptorů, nadměrná exprese některých transkripčních faktorů či ztráta negativních regulátorů výše uvedených kategorií molekul. Obrázek 8 schematicky zachycuje tyto vzájemné interakce. Rezistence pak spočívá v nahrazení estrogení signalizace kaskádou řízenou receptory růstových faktorů.

2) Nádorové mikroprostředí – vzájemné interakce mezi transformovanými buňkami a okolní tkání, zvláště pak s fibroblasty, makrofágy a extracelulární matrix (Hiscox et al. [35]). Tyto faktory se projevují zejména v průběhu kancerogeneze, avšak některé molekuly (růstové faktory, cytokiny) sekretované okolními buňkami mohou ke vzniku rezistence přispívat.

3) Epigenetické změny - jedním z mechanismů, jakým buňka reguluje úroveň genové exprese jsou epigenetické změny, které zahrnují hypermetylace promotorových oblastí DNA či modifikací histonů. Hypermethylace CpG ostrovů promotorových oblastí metyltransferázami vede k umlčení transkripce daného úseku DNA. Acetylace histonů je prováděna histonacetyltransferázami (HAT), jejich deacetylace histondeacetylázami (HDAC). Histony mají kladný náboj způsobený aminoskupinami argininu a lysinu. Ten způsobuje těsnější kontakt s DNA, která má záporný náboj díky fosfátové kostře. Po acetylaci je pak kladný náboj histonů neutralizován, DNA je více rozvolněna z vazby na nukleosomy, což usnadňuje transkripci. HDAC pak mají opačný vliv – jejich činností dojde k umlčení transkripce. Některé HAT, respektive proteiny s HAT aktivitou (např CBP/P300) jsou koaktivátory ER, umožňující remodelaci chromatinu estrogenem ovládaných genů. Epigenetické změny mohou jednak posílit či spustit expresi molekul zodpovědných za rezistenci nebo reprimovat expresi negativních regulátorů vzniku rezistence. Například exprese ER může být těmito mechanismy umlčena s následkem vzniku rezistence a některé práce poukazují na možnost obnovení citlivosti k tamoxifenu reaktivací exprese ER inhibitory HDAC či demetylačními činidly. (Kawai et al. [14]).



Obr. 8: Některé molekuly hypoteticky se podílejí při vzniku rezistence na tamoxifen, vázané na růstové faktory. (Převzato z Riggins et al [32])

Při vzniku rezistence na tamoxifen se zdá být klíčová úloha signálních kaskád receptorů růstových faktorů. Ta spočívá v produkci promitotických impulsů a je zprostředkována dvěma hlavními signálními kaskádami, jednak přes MAPK, ale také přes proteinkinázu B (PKB/AKT). Pokud je experimentálně blokována funkce těchto receptorů protilátkami či inhibitory tyrosin kináz, v buňce dojde k apoptóze (Gee et al. [11]). Při jejich aktivaci v buňkách naopak dochází k nadměrné expresi protiapoptických molekul jako je Bcl-2 či hyperaktivaci AKT fosforylací.

Mezi receptorovými tyrosin kinázami a ER probíhá intenzivní komunikace (Yang et al. [12]). Aktivace signalizační kaskády EGFR/HER2 vede ke snížení exprese ER, chemickým modifikacím ER (například fosforylace), ale také ke změnám koaktivátorů a korepresorů. Tento antagonismus je symetrický, neboť ER s navázaným tamoxifenem ale i estrogenem má inhibiční vliv na expresi HER2 (Bates et al. [28]). Oproti tomu rezistentní nádorové buněčné linie obvykle vykazují vyšší míru exprese HER2 (Osborne et al. [26]). Zároveň při nadměrné expresi HER2 dochází ke kumulaci cytoplazmatického ER a k poklesu ER přítomného v jádře, což by mohlo znamenat že ER reguluje EGFR nějakou další negenomovou funkcí (Yang et al. [12]).

Jedna z možných cest vzniku rezistence na tamoxifen je potlačení represivního účinku estrogení signalizace na expresi HER2. To může být způsobeno přímo klasickým genomovým účinkem ER, neboť jeden z ERE je lokalizován v genu kódujícím HER2 (Hurtado et al. [27]). Podstatnou roli v tomto procesu hraje protein PAX2 (Paired box gene 2, OMIM 167409). PAX2 je obvykle chápán jako transkripční aktivátor, avšak v estrogení signalizaci může hrát roli transkripčního represoru. ER s navázaným tamoxifenem totiž za účasti proteinu PAX2 reprimuje syntézu HER2. PAX2 kompetuje o vazebné místo na ER s koaktivátorem AIB1 (Amplified in breast cancer 1 – OMIM 601937), který expresi HER2 aktivuje. Rezistence by tedy mohla být způsobena vysokou expresí AIB1, nebo naopak represí PAX2. Kromě výše uvedeného mechanismu existují i další represory transkripce HER2, které nejsou mediovány ER, jako příklady mohou sloužit např. FOXP3 (Forkhead box P3 – OMIM 300292) či GATA4 (GATA-binding protein 4 – OMIM 600576).

Při vzniku rezistence kromě receptorů růstových faktorů mohou významnou roli sehrát i jiné molekuly účastníci se přenosu signálu. Mezi takové cytoplazmatické proteiny patří CAS (CRK-Associated Substrate – OMIM 602941), který ve zdravé tkáni plní úlohy týkající se proliferace, přežití a buněčné adheze (Riggins et al. [32]). Tento protein aktivuje c-Src (Cytoplasmic Tyrosine kinase – OMIM 124095) kinázu, jejíž katalytická činnost může vést k nekontrolovatelné proliferaci. Inhibice c-Src vede k větší účinnosti tamoxifenu, ale buňky dlouhodobě vystavené jeho účinku zpravidla vykazují větší aktivitu CAS/c-Src. CAS však může iniciovat rezistenci interakcemi i s jinými molekulami než c-Src, mimo jiné například s BCAR3 (Breast cancer antiestrogen resistance 3 – OMIM 604704). Tento protein vykazuje

široké spektrum účinků, měnící aktivitu, expresi a intracelulární lokalizaci řady proteinů, včetně MAPK.

Další molekula, zprostředkující přenos signálu od receptorů růstových faktorů a podílející se na vzniku rezistence na tamoxifen je proteinkináza AKT (Riggins et al. [32]). Ta je aktivována fosforylací PI3K a defosforylována fosfatázou PTEN (Phosphatase and tensin homolog – OMIM 601728). Primární úloha AKT spočívá v aktivaci proliferace a inhibici apoptózy, avšak může také fosforylovat ER α , který je pak konstitutivně aktivní a nejspíše i reprimovat syntézu ER (Hiscox et al. [35]). AKT však zároveň stimuluje expresi ER β a jeho koaktivátorů (Faridi et al. [13]). Hyperstimulace AKT vede k rezistenci na tamoxifen, zatímco její inhibice citlivost na tamoxifen zvyšuje.

Příčiny vzniku rezistence na tamoxifen mohou být různorodé a zůstává otázkou zda mechanismy již identifikované jsou schopny vznik rezistence bezesbytku vysvětlit nebo zda některé další mechanismy na své objevení teprve čekají.

4. Diskuze

Molekulární interakce estrogenních signálních kaskád jsou mimořádně komplikované a nejspíše též odlišné mezi jednotlivými pacienty. Tato proměnlivost však může být pozorována i v průběhu času u jednoho pacienta. Dosavadní údaje naznačují, že nejspíš není možné najít jeden univerzální mechanismus zodpovědný za účinek hormonální terapie při léčbě karcinomu prsu či vznik rezistence. Ta představuje hlavní limitaci této léčebné modalit. Úspěšná léčba tak bude muset nejspíše být použita individuálně pro situaci konkrétního pacienta po intenzivní diagnostice molekulárního pozadí daného případu.

Podstatný vliv v procesu vzniku rezistence hrají signální kaskády receptorů růstových faktorů, které jsou často vůči estrogenní signalizaci v antagonistickém vztahu. Je možné, že karcinom prsu prochází obecně dvěma hlavními vývojovými stadii. Původně vzniká v důsledku proliferace buněk způsobené hyperaktivací estrogenní signalizace. V průběhu dalšího vývoje pak hlavní stimulaci k proliferaci přebírají receptory růstových faktorů (*de novo* a získaná rezistence by se pak lišily jen stadiem, ve kterém byla nemoc zachycena). Otázkou je, zda by

tento přechod mohl být způsoben hyperaktivací estrogenní signalizace. Některé práce se problematikou podmínění vzniku rezistence na hormonální léčbu touto léčbou samou skutečně zabývají (Hiscox et al. [35])

Budoucí hormonální terapie by se mohla vyhnout vzniku rezistence bloádou signálních kaskád receptorů receptorových tyrosinkináz na všech stupních této kaskády. Tedy využitím kombinace hormonální terapie s represí EGFR/HER2, CAS, AKT, AIB1 či naopak indukci PAX2. Problémem je, že tyto mechanismy hrají podstatnou roli i ve zdravých tkáních, a tak je nutné hledat cesty jak tuto terapii zacílit primárně na transformované buňky.

5. Seznam použitých zkratek

AIB1	Amplified in breast cancer 1
BCAR3	Breast cancer antiestrogen resistance 3
B-cl 2	B-cell lymphoma 2
BRCA1	Breast cancer 1
BRCA2	Breast cancer 2
CAS	CRK associated substrate
CCND1	Cyclin D1
CDK	Cyclin dependent dinase
cSRC	Cytoplasmic tyrosin dinase
CYP17	17- α hydroxylase
CYP19	Aromatase
DBD	DNA binding domain
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ER	Estrogen receptor
ERE	Estrogen responsive element
ERM	Membrane estrogen receptor
ESR1	Estrogen receptor 1
ESR2	Estrogen receptor 2
FOXP3	Forkhead box P3
FSH	Follicle stimulating hormone
GATA4	Gata binding protein 4
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
GPR30	G-Protein coupled receptor 30
HAT	Histon acetytransferase
HDAC	Histon deasetylase
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HSP90	Heat shock protein 90
IGFR	Insulin like growth factor receptor
JNK	c-JUN N-terminal kinase
LBD	Ligand binding domain

LH	Luteinizing hormone
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MASPIN	Protease inhibitor 5
NCoR	Nuclear receptor corepressor
p21 ^{WAF1}	Wildtype p53 activated fragment 1
p27 ^{KIP1}	Cyclin dependent kinase inhibitor 1
PAX2	Paired box gene 2
PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase
PKA	Protein kinase A
pRB	Retinoblastoma protein
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
SERM	Selective estrogen receptor modulator
TAD	Transactivation domain

6. Reference

1. <http://www.svod.cz>
2. Clamp A, Danson S, Clemons M: Hormonal risk factors for breast cancer: Identification, chemoprevention, and other intervention strategies. *The Lancet Oncology*, 3 (2002), 611-619
3. Novotný J, Pecan L, Petrželka L: Identifikace žen se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu. http://www.koc.cz/pro_lekare/identifikace_zen_s_rizikem_karcinomu_prsu.html
4. Petráková J, Nenutil R, Grell P, Svoboda M, Fabián P, Palácová M, Vyzula R.: Mechanismy rezistence na tamoxifen, *Klinická onkologie* 6 (2007), 369-376.
5. Levin ER.: Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids* 67 (2002), 471-475.
6. Arpino G, Weiss H, Lee AV, Schiff R, De Placido S, Osborne CK, Elledge RM: Estrogen receptor-positive, Progesteron receptor-negative Breast cancer: Association with growth factor receptor expression and Tamoxifen resistance. *Journal of the national Cancer institute*, 97 (2005), 1254-1261
7. Palmieri et al.: ERβ in breast cancer. *Endocrine-related Cancer* 9 (2002), 1-13, www.endocrinology.org
8. Lannigan, DA.: Estrogen Receptor phosphorylation. *Steroids* 68 (2003), 1-9.
9. Sommer S, Fuqua S.: Estrogen receptor and breast cancer. *Seminars in cancer biology*, 11 (2001), 339-352
10. Helguero LA, Faulds MH, Gustafsson JA, Haldosen LA: Estrogen receptors alpha (ER alpha) and beta (ER beta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11, *Oncogene* 24 (2005), 6605-6616
11. Gee JM, Harper ME, Hutcheson IR, Madlen TA, Barrow D, Knowlden JM et al: The anti-epidermal growth factor receptor agent gefitinib (ZD1839/Iressa) improves anti-hormone response and prevents development of resistance in breast cancer in vitro. *Endocrinology* 144 (2003), 5105–5117

12. Yang Z, Barnes CJ, Kumar R: Human epidermal growth factor receptor 2 status modulates subcellular localization of and interaction with estrogen receptor alpha in Breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 10 (2004), 3621–3628.
13. Faridi J, Wang L, Endemann G, Roth RA, Expression of constitutively active AKT-3 in MCF-7 breast cancer cells reverses the estrogen and tamoxifen responsiveness of these cells in vivo, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003), 2933–2939.
14. Kawai H, Li H, Avraham S: Overexpression of histone deacetylase HDAC1 modulates breast cancer progression by negative regulation of estrogen receptor alpha. *Int. J. Cancer* 107 (2003), 353–358.
15. Ishunina TA, Swaab DF.:Estrogen receptor- α splice variants in human brain. *Gynecological Endocrinology*, 24 (2008), 93-98.
16. Klinge CM.:Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65 (2000), 227-251
17. Liu Z, Shi HY, Nawaz Z, Zhang M.: Tamoxifen induces the expression of maspin through estrogen receptor- α . *Cancer letters* 209 (2004), 55-65.
18. Polyak K.: Breast Cancer, Origins and Evolution. *The Journal of Clinical Investigation*, 117 (2007), 3155-3163
19. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer: Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52 705 women with breast cancer and 108 411 women without breast cancer. *Lancet* 350 (1997); 1047–1059.
20. Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO: Non-dietary factors as risk factors for breast cancer, and as effect modifiers of the association of fat intake and risk of breast cancer. *Cancer Causes Control* 8 (1997); 49–56.
21. Beral V, Reeves G. Childbearing, oral contraceptive use, and breast cancer. *Lancet* 341 (1993); 1102-1117
22. Key VJ, Verkasalo PK, Banks E: Epidemiology of Breast cancer. *Lancet Oncology*, 2 (2001), 133-140
23. Lin BC, Scanlan SC.: Few things in life are „free“ – cellular uptake of steroid hormones by an active transport mechanism. *Molecular Interventions* 5 (2005), 338-340
24. Prossnitz ER, Arterburn JB, Sklar LA.: GPR30 – A G protein coupled receptor for estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 265 (2007), 138-142
25. Speirs V, Carder PJ, Lane S, Dodwell D, Lansdown M, Hanby AM.:Oestrogen receptor β : What it means for patients with breast cancer, *Lancet Oncology*, 5 (2005), 174-181
26. Osborne, CK et al. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *Journal of National Cancer Institute*, 95 (2003), 353–361.
27. Hurtado A et al.: Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor PAX2 determines response to tamoxifen. *Nature*, 456 (2008), 663-667
28. Bates, NP ,Hurst, HC.:An intron 1 enhancer element mediates oestrogen induced suppression of ERBB2 expression. *Oncogene* 15 (1997), 473–481.
29. Medková V, Vaňásek J, Filip S.: Zkušenosti s hormonální léčbou u pokročilého karcinomu prsu. http://www.linkos.cz/vzdelavani/2_00/05.php
30. Felty Q, Roy D.: Estrogen, mitochondria and growth of cancer and non-cancer cells. *Journal of Carcinogenesis* 4 (2005) 17-32
31. Tawakalitu O, Rohani P, Pyle J, Jordan VC: Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens. *Planta Med.*, 7 (2008), 1656-1665
32. Riggins RB, Schrecengost RS, Guerrero MS, Bouton AH.: Pathways to tamoxifen resistance. *Cancer Letters* 256 (2007) 1-24
33. Pearce ST, Jordan VC.: The biological role of estrogen receptor α and β in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Haematology* 50 (2004), 3-22

34. Jordan VC.: Tamoxifen a personal retrospective. *Lancet oncology* 1 (2001), 43-49
35. Hiscox S, Gee J, Nicholson RI (eds): *Therapeutic resistance to anti-hormonal drugs in breast cancer*, Springer Science and Business Media, 2009
36. Sicinski et al.: Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and the Breast, *Cell* 82 (1995) , 621-630