



Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

mgr Monika Górską-Arcisz

**FGFR2 w regulacji współzależności p62/Keap1/Nrf-2
– znaczenie w luminalnym raku piersi**

Praca przedstawiona Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
celem uzyskania stopnia doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. Rafał Sądej, prof. GUMed

Zakład Enzymologii i Onkologii Molekularnej

Instytut Biotechnologii Medycznej i Onkologii Doświadczalnej GUMed

Praca finansowana z projektów badawczych:

grant OPUS Narodowego Centrum Nauki nr 2017/27/B/NZ3/01474

grant PRELUDIUM Narodowego Centrum Nauki nr 2020/37/N/NZ3/01401

Gdańsk 2023

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi,
Profesorowi Rafałowi Sądejowi,
za inspirację naukową, wsparcie merytoryczne i poświęcony czas.*

*Dziękuję koleżankom z Zakładu Enzymologii i Onkologii Molekularnej,
za codzienną chęć niesienia pomocy oraz przyjazną atmosferę pracy.*

*Niniejszą pracę dedykuję moim Rodzicom i Mężowi,
bo to dzięki ich bezgranicznemu wsparciu
mogę realizować swoje plany i marzenia.*

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	5
ABSTRACT	7
WYKAZ SKRÓTÓW	9
1. WSTĘP	11
1.1. Rak piersi	11
1.1.1. Epidemiologia i etiologia	11
1.1.2. Klasyfikacja i leczenie	12
1.2. Mikrośrodowisko guza	15
1.2.1. Znaczenie mikrośrodowiska guza w rozwoju nowotworów	15
1.2.2. Fibroblasty wchodzące w skład guza (CAFs)	15
1.2.3. Receptory dla czynników wzrostu fibroblastów (FGFR)	18
1.2.4. Ścieżka sygnalizacyjna FGF/FGFR	19
1.2.5. Rola FGFR2 w raku piersi	21
1.2.6. Inhibitory FGFR	24
1.3. Autofagia	26
1.3.1. Definicja, mechanizm, znaczenie	26
1.3.2. Regulacja autofagii	29
1.3.3. Rola autofagii w rozwoju nowotworów i oporności na stosowane terapię	30
1.3.4. Inhibitory autofagii	32
1.4. Czynniki transkrypcyjny Nrf-2	33
1.4.1. Budowa i funkcja	33
1.4.2. Regulacja Nrf-2	34
1.4.3. Rola Nrf-2 w transformacji nowotworowej i oporności na stosowane terapię	36
2. CEL PROJEKTU	39
3. MATERIAŁY	40
3.1. Linie komórkowe	40
3.2. Pożywki i suplementy stosowane do hodowli komórkowej	40
3.3. Bufory i odczynniki stosowane do hodowli komórkowej	40
3.4. Przeciwciała I-rzędowe	40
3.5. Przeciwciała II-rzędowe	41
3.6. Inhibitory i czynniki wzrostu	41
3.7. Plazmidy systemu lentiwirusowego	42
3.8. Sondy TaqMan	42
3.9. Inne bufory i roztwory	42

3.10. Inne odczynniki	44
3.11. Sprzęt laboratoryjny	45
4. METODY	47
4.1. Hodowle komórkowe	47
4.2. Wyprowadzenie linii komórkowych MCF7 oraz T47D z nadekspresją Nrf-2 lub wyciszeniem ekspresji p62	47
4.3. Liza komórek	48
4.4. Pomiar stężenia białka w lizatach komórkowych	49
4.5. Elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)	49
4.6. Western blotting	49
4.7. Hodowle trójwymiarowe (3D)	50
4.8. Testy proliferacyjne (MTT).....	51
4.9. Frakcjonowanie komórek	51
4.10. Test na aktywność Nrf-2	52
4.11. Ilościowa reakcja PCR (qPCR)	52
4.12. Monitorowanie procesu autofagii przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej	53
4.13. PLA (ang. Proximity Ligation Assay).....	53
4.14. Statystyka	53
4.15. Analiza <i>in silico</i>	54
5. WYNIKI.....	55
5.1. Analiza poziomu autofagii w komórkach luminalnego raka piersi z nabytą opornością na tamoksyfen.....	55
5.2. Analiza udziału sygnalizacji FGF7/FGFR2 w regulacji autofagii	57
5.3. Ocena udziału współzależności FGFR2/autofagia w odpowiedzi komórek raka piersi na leki anty-ER.....	66
5.4. Analiza FGFR2-zależnego mechanizmu molekularnego regulacji autofagii	70
5.5. Ocena wpływu sygnalizacji FGFR2-zależnej na regulację kompleksu Keap1/Nrf-2	73
5.6. Ocena wpływu FGFR2 na poziom ekspresji genu <i>NFE2L2</i> i aktywność transkrypcyjną Nrf-2	77
5.7. Ocena znaczenia współzależności FGFR2/Nrf-2 w odpowiedzi komórek raka piersi na terapię anty-ER.....	79
5.8. Ocena wartości prognostycznej zależności FGFR2/Nrf-2 w oparciu o analizy <i>in silico</i>	89
6. PODSUMOWANIE	94
7. DYSKUSJA.....	95
LITERATURA	106

STRESZCZENIE

Rak gruczołu piersiowego jest najczęściej diagnozowanym nowotworem wśród kobiet na świecie, dla którego obserwuje się ciągły wzrost wskaźników zachorowalności. Największy odsetek przypadków raka piersi (ok. 50-60%) stanowi podtyp luminalny (ER+/PR+). Te hormono-zależne nowotwory charakteryzują się stosunkowo dobrym rokowaniem pacjentek. Podstawowa opcja leczenia raków luminalnych opiera się na blokowaniu funkcji receptora estrogenowego (ER) lub syntezy estrogenów przy pomocy terapii anti-ER, głównie tamoksyfenu lub fulwestrantu. Pomimo jej wysokiej skuteczności część pacjentek nie odpowiada na lek, a u większości z nich z czasem rozwija się oporność na stosowane terapie anti-ER. Stąd zidentyfikowanie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za oporność na leczenie hormonalne stanowi ogromne wyzwanie kliniczne.

Jednym z czynników zaangażowanych w progresję nowotworów oraz odpowiedzialnych za niepowodzenie stosowanych terapii jest mikrośrodowisko guza. Liczne badania wskazują na zaangażowanie sygnalizacji FGF/FGFR zarówno w progresję raka piersi, jak i oporności na terapie anti-ER. Doniesienia literaturowe wskazują na udział ścieżki FGFR w regulacji aktywności kompleksu Keap1/Nrf-2, biorącego udział w odpowiedzi antyoksydacyjnej. Jednym z głównych regulatorów tego kompleksu jest białko p62 - marker procesu autofagii. Coraz więcej dowodów wskazuje na rolę autofagii oraz kompleksu Keap1/Nrf-2 w promowaniu progresji raka piersi i oporności na leczenie anti-ER. Nasz zespół uprzednio udokumentował, że aktywność FGFR2 chroni komórki raka piersi przed działaniem tamoksyfenu. Mając to na uwadze, niniejszy projekt doktorski miał na celu ocenę udziału FGFR2 w regulacji współzależności p62/Keap1/Nrf-2 oraz określenie jego znaczenia w luminalnym raku piersi.

Zrealizowany projekt składał się z dwóch uzupełniających się poziomów badawczych: eksperymentów *in vitro* oraz analiz klinicznych *in silico*. Analiza poziomu ekspresji markerów autofagii (LC3B i p62) oraz aktywacji szeregu białek zaangażowanych w regulację tego procesu wykazały, że sygnalizacja FGFR2 aktywuje autofagię. Otrzymane wyniki potwierdzono także monitorując dynamikę tego procesu przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej. Ponadto analizy wzrostu 3D w Matrigelu wskazały na udział FGFR2-zależnej autofagii w ochronie komórek raka piersi przed działaniem leków anti-ER. Co ważne zastosowanie inhibitora autofagii (chlorochiny) przywracało pierwotną wrażliwość komórek na te leki. Zaobserwowano także, że

sygnalizacja FGF7/FGFR2 poprzez aktywację p62 w serynie 349 promuje dysocjację kompleksu Keap1/Nrf-2, lokalizację Nrf-2 w jądrze komórkowym i aktywację zależnych od niego genów. Hodowle trójwymiarowe w Matrigelu potwierdziły, że nadekspresja czynnika transkrypcyjnego Nrf-2 znosi hamujący wzrost komórek efekt leków anty-ER. Analogicznie zahamowanie aktywności Nrf-2 przy pomocy inhibitora przywracało zniesioną przez FGFR2 wrażliwość komórek na fulwestrant i tamoksyfen. Końcowy etap pracy doktorskiej obejmował określenie wartości prognostycznej zależności FGFR2/Nrf-2 przy pomocy analiz *in silico* w oparciu o materiał kliniczny od pacjentek z luminalnym A rakiem piersi. Analiza czasu przeżycia wolnego od nawrotu choroby (RFS) wykazała, że wysoki poziom ekspresji genu *NFE2L2* (kodującego Nrf-2) wyodrębnia wśród pacjentek z wysoką ekspresją *FGFR2* podgrupę o gorszym rokowaniu. Otrzymane wyniki potwierdzają nasze wcześniejsze obserwacje wskazujące na heterogenność kohorty chorych z wysoką ekspresją *FGFR2*.

Reasumując, niniejsza praca doktorska po raz pierwszy wskazała na udział FGFR2 w regulacji współzależności p62/Keap1/Nrf-2, mającej negatywny wpływ na odpowiedź komórek luminalnego raka piersi na terapię anty-ER. Wydaje się, że Nrf-2 mógłby pełnić rolę markera wskazującego na potencjalne wdrożenie terapii anty-FGFR u chorych z luminalnym rakiem piersi, przykładowo w kombinacji z lekami anty-ER. W perspektywie kolejnych lat istotna wydaje się również ocena bezpieczeństwa inhibitorów Nrf-2 poprzedzająca określenie skuteczności klinicznej potencjalnej terapii łączącej inhibitory FGFR i Nrf-2.

ABSTRACT

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer among women worldwide, with growing incidents of morbidity. Approximately 50-60% of diagnosed cases are classified as luminal A subtype (ER+/PR+). These hormone-dependent cancers have a relatively good prognosis. The primary treatment for luminal cancers is based on blocking ER function or estrogen synthesis with anti-ER therapy, mainly tamoxifen or fulvestrant. Despite its high efficacy, some patients do not respond to the drug, and most of them develop over time resistance to applied anti-ER therapies. Hence, identifying the molecular mechanisms of anti-ER therapy resistance is a major clinical challenge.

Tumour microenvironment is one of the crucial mediators involved in cancer progression and the failure of targeted therapies. The growing number of studies indicate the involvement of FGF/FGFR signalling in breast cancer progression and resistance to anti-ER drugs. Multiple studies suggest the involvement of FGFR in regulation of Keap1/Nrf-2 complex - the master mediator of antioxidant response. p62, a marker of the autophagy process, is one of the main regulators of this complex. Increasing evidence indicates the involvement of autophagy as well as Keap1/Nrf-2 signalling in breast cancer progression. Our previous work showed that FGFR2 protects breast cancer cell from tamoxifen. Taking into account these considerations, the doctoral project aimed to evaluate the involvement of FGFR2 signalling in regulation of p62/Keap1/Nrf-2 interdependence and to determine its significance in luminal breast cancer.

The project consisted of two complementary levels of analysis: *in vitro* studies and *in silico* clinical analyses. Evaluation of the expression levels of autophagy markers (LC3B and p62) and phosphorylation of key regulators of the process showed that FGFR2 signalling activates autophagy. These results were confirmed by monitoring the dynamic of the process using fluorescence microscopy. In addition, 3D growth assay in Matrigel indicated the involvement of FGFR2-mediated autophagy in protecting breast cancer cells from anti-ER drugs. Importantly, application of an autophagy inhibitor (chloroquine) restored the cells' primary sensitivity to these drugs. It was also found that FGF7/FGFR2 signalling via activation of p62 at serine 349 promotes dissociation of the Keap1/Nrf-2 complex, followed by upregulation of Nrf-2 level in the nucleus and activation of Nrf-2-dependent genes. Three-dimensional cultures in Matrigel of Nrf-2-overexpressed cells confirmed the involvement of the Nrf-2 transcription factor in abrogation of anti-ER drugs on breast cancer cells. However, inhibition of Nrf-2 restored the FGFR2-abrogated

cells' response to these drugs, indicating its role in the development of resistance to anti-ER therapies. The final stage of the study involved the *in silico* evaluation of potential prognostic value of the FGFR2/Nrf-2 interdependence in clinical specimens from patients with luminal A breast cancer. Analysis of relapse-free survival (RFS) showed that high expression of the *NFE2L2* (gene encoding Nrf-2) exacerbates the good prognostic value of high *FGFR2* levels in patients. The results confirmed our previous observations which indicate the heterogeneity of the subgroup of patients with high *FGFR2* expression. It appears that determination of *NFE2L2* expression can be useful for identification of FGFR2-positive patients with a worse prognosis.

In summary, the described dissertation demonstrated for the first time the involvement of FGFR2 signalling in the regulation of p62/Keap1/Nrf-2 interdependence, which has a negative impact on the response of luminal A breast cancer cells to anti-ER therapies. It seems that Nrf-2 could act as a marker of the potential implementation of anti-FGFR therapy in patients with luminal breast cancer, e.g. in combination with anti-ER drugs. In the future perspective, it would be important to evaluate the safety of Nrf-2 inhibitors followed by determination of the clinical efficacy of therapy combining FGFR and Nrf-2 inhibitors.

WYKAZ SKRÓTÓW

4-OHT, ang. *4-hydroxytamoxifen*, 4-hydroksytamoksyfen

AMPK, ang. *adenosine monophosphate-activated protein kinase*

ARE, ang. *antioxidant response element*

ATCC, ang. *American Tissue Culture Collection*

ATG, ang. *autophagy-related genes*

BCa, ang. *Breast cancer*, rak gruczołu piersiowego

CAFs, ang. *Cancer-associated fibroblasts*, fibroblasty wchodzące w skład guza

CQ, ang. *chloroquine*, chlorochina

DCIS, ang. *ductal carcinoma in situ*, przewodowy rak piersi *in situ*

DFS, ang. *disease-free survival*, czas przeżycia wolny od choroby

ECM, ang. *extracellular matrix*, macierz zewnątrzkomórkowa

FDA, ang. *Food and Drug Administration*, Agencja ds. Żywności i Leków

FGFs, ang. *fibroblast growth factors*, czynniki wzrostu fibroblastów

FGFR, ang. *fibroblast growth factor receptors*, receptory dla czynników wzrostu fibroblastów

FRS2, ang. *FGFR substrate 2*

FULV, ang. *fulvestrant*, fulwestrant

HCQ, ang. *hydroxychloroquine*, hydroksychlorochina

HMOX1, ang. *Heme Oxygenase 1*

HSPGs, ang. *heparan sulfate proteoglycans*, proteoglikany siarczanu heparyny

IARC, ang. *International Agency for Research on Cancer*, Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem

IDC, ang. *invasive ductal carcinoma*, inwazyjny rak przewodowy

Keap1, ang. *Kelch-like ECH-associated protein 1*

LC3, ang. *microtubule-associated protein 1 light chain 3*

Nrf-2, ang. *Nuclear factor E2-related factor 2*

NQO1, ang. *NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1*

mTOR, ang. *mammalian target of rapamycin*

OS, ang. *overall survival*, całkowity czas przeżycia

PDGFR, ang. *platelet-derived growth factor receptor*, płytkopochodny czynnik wzrostu

PFS, ang. *progression-free survival*, czas przeżycia wolny od progresji choroby

PKC, ang. *protein kinase C*, kinaza białkowa C

PLA, ang. *Proximity Ligation Assay*

PLC γ , ang. *phospholipase C γ* , fosfolipaza C γ

Raptor, ang. *regulatory associated protein of mTOR*

RFS, ang. *relapse-free survival*, czas przeżycia wolny od nawrotu choroby

RTKs, ang. *receptor tyrosine kinases*, receptory kinaz tyrozynowych

SERD, ang. *selective estrogen receptor degraders*, związki selektywnie degradujące receptor estrogenowy

SERM, ang. *selective estrogen receptor modulators*, selektywne modulatory receptora estrogenowego

SNPs, ang. *single nucleotide polymorphisms*, polimorfizmy pojedynczego nukleotydu

sMAF, ang. *small masculoaponeurotic fibrosarcoma proteins*

SOD1, ang. *Superoxide Dismutase 1*

STAT, ang. *signal transducers and activators of transcription*

SQSTM1, ang. *sequestosome 1*

TKIs, ang. *tyrosine kinase inhibitors*, inhibitory kinaz tyrozynowych

TNBC, ang. *triple-negative breast cancer*, trójujemny rak piersi

TME, ang. *tumour microenvironment*, mikrośrodowisko guza

VEGFR, ang. *vascular-endothelial growth factor receptor*, receptor dla naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu

1. WSTĘP

1.1. Rak piersi

1.1.1. Epidemiologia i etiologia

Dane epidemiologiczne na rok 2022 pokazują, że rak gruczołu piersiowego (BCa, ang. *Breast cancer*) jest najczęściej diagnozowanym nowotworem wśród kobiet na świecie oraz drugą przyczyną zgonów związanych z nowotworami (Giaquinto et al, 2022; Siegel et al, 2022). Według Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (IARC, ang. *International Agency for Research on Cancer*) w 2020 roku odnotowano około 2,3 miliona nowych przypadków raka piersi i około 685 000 zgonów spowodowanych tą chorobą. Na podstawie globalnych prognoz demograficznych IARC przewiduje, że w 2040 roku liczba zachorowań na raka piersi wzrośnie o 40% (do ponad 3 milionów przypadków rocznie) a liczba zgonów o 50% (do ponad miliona przypadków rocznie) (Arnold et al, 2022). Najnowsze dane statystyczne polskiego Krajowego Rejestru Nowotworów przypadają na rok 2019, w którym wśród kobiet zdiagnozowano 85 659 przypadków nowotworów złośliwych, z czego rak piersi był najczęściej występującym nowotworem i stanowił 22,9% (19 620) wszystkich zachorowań. Najistotniejszym czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia raka piersi jest wiek. Choroba ta najczęściej występuje u kobiet w okresie postmenopauzalnym, w wieku powyżej 50 lat. Wśród pozostałych czynników ryzyka wyróżnia się mutacje genetyczne (najczęściej genów *BRCA1* i *BRCA2*), występowanie raka piersi w rodzinie, wysoką gęstość tkanki gruczołowej, zmiany w gospodarce hormonalnej (menstruacja we wczesnym wieku, menopauza/pierwsza ciąża w późnym wieku) czy długotrwałe stosowanie antykoncepcji hormonalnej. Wpływ na wystąpienie tej choroby może mieć także prowadzony styl życia. Wśród rekomendacji obniżających ryzyko rozwoju raka piersi wyróżnia się profilaktykę nadwagi i otyłości, aktywność fizyczną, unikanie spożywania alkoholu i palenia papierosów oraz ograniczenie hormonalnej terapii zastępczej (Jassem & Krzakowski, 2018). W związku z tym kluczowa jest poprawa świadomości społeczeństwa na temat czynników ryzyka oraz badań profilaktycznych. W Polsce metodami przesiewowej diagnostyki obrazowej raka piersi jest mammografia, skierowana szczególnie do kobiet pomiędzy 50 a 69 rokiem życia, u których prawdopodobieństwo wystąpienia tego nowotworu jest największe. Młodszym pacjentkom zaleca się badanie ultrasonograficzne (USG), a w szczególnych przypadkach wykonanie rezonansu magnetycznego (MRI).

1.1.2. Klasyfikacja i leczenie

Rozpoznanie raka piersi odbywa się za pomocą diagnostyki patomorfologicznej, w której do pobrania materiału wykorzystuje się biopsję gruboigłową. Badanie histopatologiczne pozwala na określenie stopnia zaawansowania nowotworu, ryzyka nawrotu choroby, a co najważniejsze dobranie odpowiedniego leczenia.

Rak piersi może wywodzić się z kanalików mlekowych bądź zrazików, budujących tkankę gruczołu, stąd histologicznie rozróżnia się rak przewodowy i zrazikowy. Ponadto w klasyfikacji raka piersi wyróżnia się dwie kategorie: rak przedinwazyjny, do którego należą raki przewodowe *in situ* (DCIS, ang. *ductal carcinoma in situ*) i raki zrazikowe *in situ* (LCIS, ang. *lobular carcinoma in situ*) oraz rak naciekający, rozprzestrzeniający się poza przewody oraz zraziki gruczołu. Najczęściej występującym podtypem raka naciekającego jest inwazyjny rak przewodowy (IDC, ang. *invasive ductal carcinoma*), stanowiący ok. 75% wszystkich przypadków raka piersi (Jassem & Krzakowski, 2018; Li et al, 2005; Senkus et al, 2015; Weigelt et al, 2010). Podczas klasyfikacji choroby bierze się pod uwagę szereg czynników takich jak typ histologiczny, stopień złośliwości, obecność przerzutów w węzłach chłonnych oraz opisaną poniżej ocenę immunohistochemiczną.

Rak gruczołu piersiowego charakteryzuje się wysoką heterogennością. Podstawowym kryterium jego klasyfikacji jest ocena immunohistochemiczna (IHC) poziomu ekspresji receptorów dla hormonów steroidowych – receptora estrogenowego (ER) oraz receptora progesteronowego (PR), receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER2) oraz indeksu proliferacyjnego Ki67 (określającego odsetek komórek nowotworowych będących aktywnych proliferacyjnie). Biorąc pod uwagę powyższe markery wyróżnia się cztery molekularne podtypy raka piersi: luminalny A, luminalny B, HER2-dodatni oraz trójujemny (TNBC, ang. *triple-negative breast cancer*), o różnych schematach stosowanej terapii (Tab. 1) (Eroles et al, 2012; Jassem & Krzakowski, 2018; Park et al, 2012; Yeo & Guan, 2017).

Podtyp raka piersi	Cecha				Częstotliwość	Leczenie
	ER	PR	HER2	Ki67		
Luminalny A	+	+	-	<20%	50-60%	HT
Luminalny B	+	+/-	-	≥ 20%	10-20%	HT +/- CHT
HER2-dodatni	+/-	+/-	+	Każdy	10-15%	CHT + T +/- HT
Trójjemny	-	-	-	Każdy	13-15%	CHT

HT – hormonoterapia, CHT – chemioterapia, T – trastuzumab

Tabela 1. Klasyfikacja raka piersi na podstawie oceny immunohistochemicznej czynników predykcyjnych (ER, PR, HER2 i Ki67) z uwzględnieniem stosowanego leczenia, w oparciu o (Jassem & Krzakowski, 2018).

Wśród wszystkich podtypów raka piersi około 75-80% diagnozowanych przypadków stanowi rak ER-dodatni (ER+), z czego podtyp luminalny A charakteryzujący się także obecnością PR (PR+) występuje z częstotliwością 50-60%. Wysoki poziom ekspresji ER związany jest z dobrym rokowaniem pacjentek. Pośród nowotworów ER+ raki PR- mają gorszą prognozę niż raki PR+ (Dunnwald et al, 2007).

Receptory estrogenowy i progesteronowy należą do rodziny receptorów jądrowych dla hormonów steroidowych, pełniących jednocześnie funkcję czynników transkrypcyjnych zależnych od liganda. Wyróżnia się dwie formy receptora estrogenowego: ER α (kodowany przez gen *ESR1*) oraz ER β (gen *ESR2*). ER α dominuje w gruczole piersiowym oraz komórkach nowotworowych raka piersi, stąd w dalszej części pracy skrót ER odnosił się będzie do tej formy receptora. Ligandami wiążącymi się z ER są estrogeny - głównie 17 β -estradiol (E2). Estrogeny pełnią kluczową rolę w rozwoju gruczołu piersiowego, niespodzianką nie jest więc istnienie silnej pozytywnej korelacji między ekspozycją na te hormony a ryzykiem rozwoju raka piersi (Briskin & O'Malley, 2010; Ellmann et al, 2009).

W związku z wysoką częstotliwością występowania raków luminalnych, podstawową opcją leczenia tego typu zmian jest hormonoterapia (zwana także terapią anti-ER), skierowana na blokowanie funkcji ER lub syntezy estrogenów. Pierwszą grupę leków anti-ER stanowią selektywne modulatory receptora estrogenowego (SERM, ang. *selective estrogen receptor modulators*), z których najczęściej stosowany jest tamoksyfen. Lek ten został zatwierdzony przez amerykańską Agencję ds. Żywności

i Leków (FDA, ang. *Food and Drug Administration*) pod koniec lat 70-tych ubiegłego wieku do leczenia przerzutującego luminalnego raka piersi. W zależności od tkanki, tamoksyfen może działać jako agonista lub antagonistą względem receptora estrogenowego. W przypadku raka piersi tamoksyfen działa jako antagonistą, wiążąc się bezpośrednio z ER i blokując jego aktywność transkrypcyjną. Liczne badania wykazały, że 5-letnie leczenie tamoksyfenem znacznie redukuje (nawet o około 50%) ryzyko nawrotu raka piersi i śmierci pacjentek (Cuzick et al, 2007; Fisher et al, 2005; Fisher et al, 1998; Powles et al, 2007). Drugi rodzaj leków anti-ER stanowią związki selektywnie degradujące receptor estrogenowy (SERD, ang. *selective estrogen receptor degraders*), których pierwszym zarejestrowanym przedstawicielem był fulwestrant (ICI 182,780). SERD działają poprzez zaburzenie lokalizacji jądrowej kompleksów ligand-ER oraz zwiększoną proteolityczną degradację ER. Nie wykazują one aktywności agonistycznej, dzięki czemu mogą być stosowane do leczenia zaawansowanego raka piersi zarówno u pacjentek przed-, jak i postmenopauzalnych. Unikalny mechanizm działania SERD skutkuje wysoką efektywnością kliniczną u pacjentek, u których leczenie tamoksyfenem zakończyło się niepowodzeniem (Long & Nephew, 2006; Robertson, 2001). Kolejny schemat leczenia celujący w aktywność ER polega na zablokowaniu syntezy estrogeny. W tym przypadku stosuje się inhibitory aromatazy (enzymu odpowiadającego za przekształcenie androgenów w estrogeny) takie jak anastrozol, letrozol czy eksemestan. Ich działanie ogranicza się do tkanek i narządów innych niż jajniki, stąd leki te stosowane są u kobiet po menopauzie lub przed menopauzą z jednoczesną blokadą funkcji jajników (poprzez zastosowanie analogów hormonów uwalniających gonadotropiny). Rodzaj wybranej terapii anti-ER zależy od statusu menopauzalnego pacjentki. U kobiet przed menopauzą zazwyczaj stosuje się tamoksyfen (sam lub w połączeniu z analogami hormonów uwalniających gonadotropiny) lub inhibitory aromatazy w połączeniu z analogami hormonów uwalniających gonadotropiny. U kobiet po menopauzie preferuje się terapię inhibitorami aromatazy lub tamoksyfenem, w połączeniu lub terapii sekwencyjnej.

1.2. Mikrośrodowisko guza

1.2.1. Znaczenie mikrośrodowiska guza w rozwoju nowotworów

Mikrośrodowisko guza (TME, ang. *tumour microenvironment*) jest kluczowym czynnikiem zaangażowanym w progresję nowotworu. TME stanowi bogate, heterogenne środowisko wielokomórkowe, w skład którego oprócz komórek nowotworowych wchodzi komórki zrębu, do których należą fibroblasty, komórki śródbłonka, adipocyty i komórki układu immunologicznego oraz składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*) takie jak kolagen, fibronektyny, hialuroniany czy lamininy. Parakrynną komunikacją pomiędzy komórkami nowotworowymi a TME oparta jest o czynniki wzrostu, cytokiny, mediatory stanu zapalnego oraz enzymy przebudowujące ECM. Ponadto wiele doniesień naukowych wskazuje na udział innych składników TME zaangażowanych w przekazywanie sygnałów z komórek nowotworowych takich jak krążące komórki nowotworowe (CTCs, ang. *circulating tumor cells*), egzosomy, wolny DNA (cfDNA, ang. *cell-free DNA*) czy ciała apoptotyczne (Anderson & Simon, 2020; Baghban et al, 2020; Hu & Polyak, 2008; Jin & Jin, 2020; Wang et al, 2017b). Stąd detekcja i monitorowanie poziomu wymienionych elementów w krwioobiegu może przynieść wiele cennych informacji o stanie choroby nowotworowej, a w konsekwencji poprawę wykrywania nowotworów oraz ewentualną modyfikację stosowanej terapii.

1.2.2. Fibroblasty wchodzące w skład guza (CAFs)

Fibroblasty wchodzące w skład guza (ang. *Cancer-associated fibroblasts*) są najliczniejszym komponentem TME, promującym wzrost i inwazję komórek nowotworowych z udziałem różnych mechanizmów (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011). CAFs charakteryzują się wysokim stopniem heterogenności spowodowanym ich odmiennym pochodzeniem. Uznaje się, że większość CAFs powstaje w wyniku aktywacji lokalnych fibroblastów rezydujących w tkankach, ale znane są również przykłady ich alternatywnego pochodzenia np. w wyniku odróżnicowania się adipocytów, komórek endotelialnych, perycytów czy komórek gwiaździstych. CAFs mogą wywodzić się również od mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego lub komórek nabłonka w wyniku przejścia epithelialno-mezenchymalnego (EMT) (Anderson & Simon, 2020). W powstawaniu CAFs bierze udział wiele mechanizmów molekularnych obejmujących czynniki wzrostu (FGF,

PDGF), cytokiny (IL-1, IL-6, TNF), transformujący czynnik wzrostu nowotworów beta (TGF β), kontakt między komórkami nowotworowymi i fibroblastami, stres oksydacyjny, uszkodzenia DNA (chemio- i radioterapia), przebudowa składu ECM czy microRNA (Sahai et al, 2020; Xing, 2010). Na podstawie danych immunohistochemicznych wyróżniono kilka markerów CAFs, w tym α SMA (ang. *α -smooth muscle actin*), FAP (ang. *fibroblast activation protein*), desminę, podoplaninę (PDPN), PDGFR α , PDGFR β , DDR2 (ang. *discoidin domain-containing receptor 2*) oraz FSP1/S100A4 (ang. *fibroblast-specific protein 1*). Ponieważ żaden z tych markerów nie jest specyficzny tylko dla CAFs, w celu ich identyfikacji stosuje się jednoczesną detekcję kilku białek (Kalluri, 2016; Xing, 2010). Heterogenność CAFs objawia się tym, że nawet w obrębie danego guza mogą występować różne, pełniące odmienne funkcje subpopulacje CAFs (Costa et al, 2018). W oparciu o wzajemnie wykluczającą się ekspresję PDPN i FSP1 wyróżniono dwie subpopulacje CAFs, sCAF (FSP1+) i pCAF (PDPN+). Najnowsze badania na dwóch niezależnych kohortach pacjentek (obejmujących wszystkie podtypy raka piersi) wykazały, że osoby z wyższym stosunkiem sCAF/pCAF charakteryzowały się wyższą przeżywalnością. W kohorcie TNBC wysoki stosunek sCAF/pCAF korelował nie tylko z przeżyciem, ale także z mutacjami *BRCA*. Wydaje się więc, że ewolucja fenotypu CAFs w czasie związana jest z rozwojem i progresją raka piersi. Powyższe doniesienia podkreślają znaczenie prognostyczne i terapeutyczne CAFs, wskazując na potrzebę identyfikacji i opisu ich subpopulacji, a następnie potencjalne celowanie w populację CAFs promującą progresję choroby (Friedman et al, 2020).

Różnorodność CAFs znajduje odzwierciedlenie w szeregu pełnionych przez nie funkcji. Jedną z nich jest sekrecja czynników wzrostu (FGF, VEGF), TGF- β , cytokin, czy egzosomów zaangażowanych w indukcję proliferacji oraz inwazji komórek nowotworowych, a także angiogenezę oraz modulowanie odpowiedzi komórek nowotworowych na stosowane terapie (Borriello et al, 2017; Qiao et al, 2018; Sahai et al, 2020; Özdemir et al, 2014). Produkowane przez CAFs cytokiny wpływają na układ immunologiczny, którego działanie musi zostać stłumione, aby komórki nowotworowe mogły przetrwać. Z drugiej strony sekrecja cytokin prozapalnych przez CAFs indukuje rekrutację komórek układu immunologicznego (np. makrofagów, neutrofilów czy limfocytów) do obszaru objętego nowotworem (Fearon, 2014). Makrofagi poprzez wydzielanie m.in. VEGF, IL-8, czy czynnika wzrostu hepatocytów (HGF, ang. *hepatocyte growth factor*) wpływają na zachowanie komórek zrębu (np. komórek układu immunologicznego, komórek śródbłonna czy fibroblastów), a utrzymujący się

przewlekły stan zapalny w obszarze nowotworu ułatwia proces przerzutowania. Makrofagi mikrośrodowiska guza (TAM, ang. *tumour-associated macrophages*), w zależności od stopnia zróżnicowania i przyjętego stanu polaryzacji, mogą także promować metastazę komórek nowotworowych (Asif et al, 2021; Wang et al, 2017b). Ważną funkcją CAFs jest ich wpływ na reorganizację struktury ECM poprzez produkcję białek budujących stromę, czy enzymów ją przebudowujących takich jak metaloproteiny (MMPs, ang. *matrix metalloproteinases*) (Pankova et al, 2016; Winkler et al, 2020). W warunkach fizjologicznych równowaga między MMPs a ich inhibitorami zapewnia całościową organizację ECM. Zwiększona aktywność MMPs stymulowana przez CAFs powoduje degradację ECM i ułatwia angiogenezę, co umożliwia komórkom nowotworowym inwazję i opuszczenie guza pierwotnego.

Liczne badania wskazują na udział CAFs w promowaniu oporności na terapie przeciwnowotworowe, w tym leczenie anty-ER (Rizzolio et al, 2022). Kohodowla linii komórkowej luminalnego A raka piersi (MCF7) z CAFs indukowała oporność komórek nowotworowych zarówno na tamoksyfen, jak i fulwestrant (Martinez-Outschoorn et al, 2011). Wykazano, że CAFs modulują odpowiedź komórek na tamoksyfen poprzez aktywację ścieżki sygnalizacyjnej PI3K/Akt oraz MAPK/Erk oraz fosforylację ER α w serynie 118 (Pontiggia et al, 2012; Shekhar et al, 2007). Ponadto CAFs z hormononiezależnych guzów piersi charakteryzują się wyższą ekspresją FGF2 oraz FGFR2 (ang. *fibroblast growth factor receptor 2*), odpowiadających za aktywację PR, co prowadzi do zwiększonej aktywacji komórek nowotworowych (Giulianelli et al, 2008). Badania te sugerują, że CAFs mogą być zaangażowane we wzrost guza niezależny od hormonów steroidowych, który jest cechą charakterystyczną progresji nowotworów piersi. Znaczenie oddziaływania pomiędzy FGFR2 a PR w promowaniu raka piersi niezależnego od hormonów zostało potwierdzone w kolejnym badaniu (Cerliani et al, 2011). Wyniki naszego zespołu wykazały zaangażowanie FGFR2 w transmisję sygnałów pochodzących z CAFs, co prowadziło do aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej PI3K/Akt, fosforylacji ER oraz zniesienia hamującego proliferację efektu tamoksyfenu w komórkach raka piersi (Turczyk et al, 2017). Sugeruje się, że w odniesieniu do oporności na leki przeciwnowotworowe, różne podtypy CAFs mogą powodować odmienne efekty. Zaobserwowano, że w luminalnym raku piersi CD146-ujemne CAFs hamowały ekspresję ER, zmniejszając w ten sposób wrażliwość komórek nowotworowych na estrogen, jednocześnie promując rozwój oporności na tamoksyfen. Z kolei CD146-dodatnie CAFs

indukowały ekspresję ER, podtrzymując zależną od estrogenu proliferację guza i wrażliwość na tamoksyfen (Brechbuhl et al, 2017).

1.2.3. Receptory dla czynników wzrostu fibroblastów (FGFR)

Receptory dla czynników wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor receptors*) należą do wysoce konserwatywnej rodziny receptorów przezbłonowych o aktywności kinaz tyrozynowych (RTKs, ang. *receptor tyrosine kinases*). Cechą wspólną RTKs jest ich budowa. W strukturze tych receptorów wyróżnia się trzy immunoglobulino-podobne domeny zewnątrzkomórkowe (D1-3), domenę przezbłonową oraz domenę wewnątrzkomórkową o aktywności kinazy tyrozynowej. Wśród receptorów dla czynników wzrostu fibroblastów wyróżnia się cztery receptory (FGFR1-4) o wysokim stopniu homologii (56-71%) oraz najpóźniej zidentyfikowany FGFR5 (zwany również FGFR1), różniący się od pozostałych receptorów brakiem domeny o aktywności kinazy tyrozynowej (Lemmon & Schlessinger, 2010; Sarabipour & Hristova, 2016). W wyniku alternatywnego splicingu egzonów kodujących część domeny D3 powstają dwie izoformy FGFR1-3 (IIIb oraz IIIc) o odmiennej specyficzności wiązania liganda. Ponadto występowanie tych izoform jest tkankowo-specyficzne, z czego izoforma IIIb występuje głównie w komórkach nabłonkowych, a izoforma IIIc w komórkach mezenchymalnych. Wyjątkiem jest FGFR4, ulegający ekspresji wyłącznie w postaci izoformy IIIc (Holzmann et al, 2012; Johnson et al, 1991; Yeh et al, 2003; Zhang et al, 2006).

Ligandami dla FGFR są czynniki wzrostu fibroblastów (FGFs, ang. *fibroblast growth factors*), wśród których wyróżnia się dwie podrodziny: kanoniczną (FGF1-10, FGF16-18, FGF20) i hormono-podobną/endokrynną (FGF19, FGF21, FGF23). Ligandy te różnią się sposobem i specyficznością wiązania do receptorów. Kanoniczne FGF wiążą się z receptorami w sposób zależny od kofaktorów - proteoglikanów siarczanu heparyny (HSPGs, ang. *heparan sulfate proteoglycans*), zwiększających powinowactwo FGF do receptorów. HSPGs ograniczają dyfuzję kanonicznych FGF, stąd ligandy te po sekrecji przemieszczają się na niewielką odległość i w związku z tym działają jako czynniki autokrynne lub parakrynne (Beenken & Mohammadi, 2009; Brooks et al, 2012). Wiązanie kanonicznych FGF z FGFR aktywuje szereg procesów komórkowych związanych z przeżyciem komórki, jej metabolizmem, proliferacją i różnicowaniem. W konsekwencji sygnalizacja indukowana przez kanoniczne FGF reguluje organogenezę, metabolizm i regenerację tkanek oraz odpowiedź zapalną. Z kolei endokrynne FGF mają niskie powinowactwo do HSPGs, a funkcje ich kofaktorów spełniają białka z rodziny

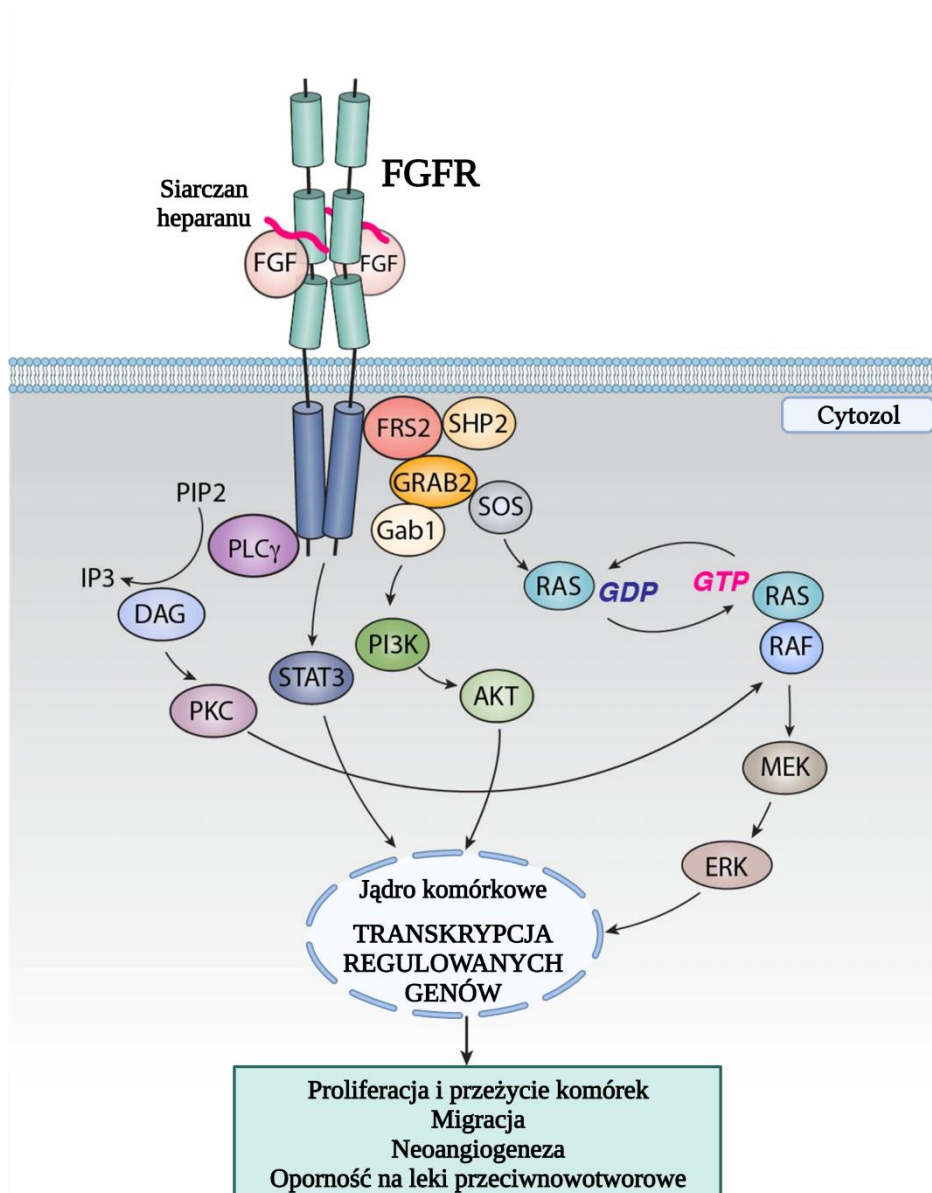
Klotho (α , β i KLPH). Hormono-podobne cechy tych ligandów sprawiają, że biorą one udział w metabolizmie kwasów żółciowych, glukozy i lipidów (Ding et al, 2012; Zheng et al, 2022). Wśród FGF wysoką specyficznością względem receptora FGFR2 charakteryzuje się podrodzina FGF7 (FGF7, FGF10 i FGF22), ulegająca ekspresji w komórkach mezenchymalnych i oddziałująca wyłącznie z izoformą IIIb tego receptora, obecną w komórkach nabłonkowych (Yeh et al, 2003).

1.2.4. Ścieżka sygnalizacyjna FGF/FGFR

Aktywacja ścieżki sygnalizacyjnej FGFR rozpoczyna się od związania FGF z nieaktywnymi monomerami FGFR w obecności HSPG, co powoduje zmiany konformacyjne w strukturze receptora, a w następstwie jego dimeryzację oraz transfosforylację wewnątrzkomórkowej domeny o aktywności kinazy tyrozynowej. Rekrutuje ona i fosforyluje dalsze cząsteczki efektorowe, co inicjuje kilka szlaków sygnalizacyjnych. Zidentyfikowano dwa główne białka adaptorowe FGFR tj. FRS2 (ang. *FGFR substrate 2*) oraz fosfolipazę $C\gamma$ – PLC γ (ang. *phospholipase C γ*). FRS2 odpowiada za aktywację ścieżek sygnalizacyjnych Ras/Raf/MAPK oraz PI3K/Akt. Z kolei fosfolipaza $C\gamma$ aktywuje serynowo-treoninową kinazę białkową C – PKC (ang. *protein kinase C*) (Ryc. 1). Ponadto do białek aktywowanych przez ścieżkę sygnalizacyjną FGFR zalicza się kinazy RSK2 i Src, a także przekaźniki sygnału i aktywatory transkrypcji – białka STAT (ang. *signal transducers and activators of transcription*) (Brooks et al, 2012; Czaplinska et al, 2016; Tiong et al, 2013; Turner & Grose, 2010; Xie et al, 2020; Zheng et al, 2022).

Precyzyjna regulacja ścieżki sygnalizacyjnej FGF/FGFR jest niezbędna dla prawidłowych procesów zachodzących w komórkach. Stąd wykształciło się kilka mechanizmów negatywnie regulujących sygnalizację FGFR, wpływających na internalizację i degradację receptorów, ich aktywność kinazową i dalsze szlaki sygnałowe. Jednymi z pierwszych poznanych negatywnych regulatorów FGFR były białka z rodziny Sprouty, które poprzez oddziaływanie z białkiem adaptorowym GRB2 (ang. *growth factor receptor-bound protein 2*) hamują ścieżkę sygnalizacyjną Ras/Raf/MAPK oraz aktywują kaskadę PI3K/Akt. Ponadto białka Sprouty regulują aktywność ligazy ubikwityny CBL (ang. *Cbl proto-oncogene E3 ubiquitin protein ligase*), która wiąże się z fosforylowanymi FRS2 i GRB2, co w odpowiedzi na stymulację FGF powoduje ubikwitynację i degradację FGFR i FRS2 (Beenken & Mohammadi, 2009; Ornitz & Itoh, 2015; Zheng et al, 2022). Kolejnym negatywnym regulatorem aktywności

FGFR jest białko transbłonowe SEF (ang. *similar expression to fgf genes*), które działa jako antagonistą sygnalizacji FGFR poprzez ścieżkę Ras/Raf/MAPK. SEF może także bezpośrednio oddziaływać z FGFR, hamując jego fosforylację (Tsang et al, 2002).



Rycina 1. Aktywacja ścieżki sygnalizacyjnej FGF/FGFR. Związanie FGF z siarczanem heparanu i FGFR powoduje dimeryzację receptora i transfosforylację domeny kinazowej, a w konsekwencji rekrutację białek adaptorskich FRS2 i PLC γ . FRS2 aktywuje ścieżkę sygnalizacyjną Ras/Raf/MAPK oraz PI3K/Akt, a PLC γ prowadzi do aktywacji białka PKC i ścieżki sygnalizacyjnej MAPK. Ścieżka sygnalizacyjna FGFR aktywuje także białka STAT3; zaadaptowano z (Chen et al, 2021), schemat powstał z wykorzystaniem programu BioRender.com.

Co ciekawe, zidentyfikowano fosfatazy z rodziny MAPK (ang. *MAPK phosphatases*) biorące udział w hamowaniu ścieżki sygnalizacyjnej FGFR (Kawakami et al, 2003).

Istotna rola ścieżki sygnalizacyjnej FGF/FGFR w procesach komórkowych sprawia, że jej zaburzenia zostały scharakteryzowane w wielu chorobach, również nowotworowych. Potwierdzono udział receptorów FGFR w procesie onkogenezy i progresji nowotworu, a także wykształcaniu mechanizmów oporności na stosowane terapie przeciwnowotworowe. Nieprawidłowa aktywacja szlaku FGF/FGFR może wiązać się ze zmianami genetycznymi, wynikiem których jest aktywacja ścieżki niezależnej od liganda. Należą do nich amplifikacje genów *FGFR*, ich mutacje, fuzje oraz występowanie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNPs, ang. *single nucleotide polymorphisms*). Ponadto deregulacja ścieżki FGFR może zachodzić w sposób zależny od ligandów poprzez zaburzenie sygnalizacji auto- i parakrynej (Xie et al, 2020).

1.2.5. Rola FGFR2 w raku piersi

FGFR2 oraz jego specyficzne ligandy pełnią ważną rolę w rozwoju i prawidłowym funkcjonowaniu gruczołu piersiowego. Kierują one funkcjami komórek nabłonkowych oraz biorą udział w formowaniu się kanalików i pęcherzyków mlecznych gruczołu piersiowego w trakcie morfogenezy (Jones et al, 2018; Lu et al, 2008; Maillieux et al, 2002; Parsa et al, 2008; Zhang et al, 2014). Zaburzenia ścieżki sygnalizacyjnej FGFR2 zostały scharakteryzowane w wielu nowotworach, w tym w raku piersi. W przypadku tego nowotworu pewne znaczenie wydają się mieć mutacje punktowe w obrębie genu kodującego FGFR2 (chromosom 10q26). Występują one jednak stosunkowo rzadko. Amplifikację genu *FGFR2* obserwuje się u mniej niż 1% wszystkich przypadków raka piersi. Amplifikację i nadekspresję *FGFR2* wykryto w około 4% przypadków trójjemnego podtypu raka piersi (Helsten et al, 2016; Turner et al, 2010). Przeprowadzone na szeroką skalę badania genomu tzw. GWAS (ang. *genome-wide association study*), podsumowujące dane od ponad 100 000 pacjentek, zidentyfikowały polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNPs), które korelują ze zwiększonym ryzykiem rozwoju raka piersi (Andersen et al, 2013; Easton et al, 2007; Hunter et al, 2007; Meyer et al, 2008). Spośród 23 poznanych wariantów intronu 2 *FGFR2* wytypowano 10 SNPs (rs1078806, rs11200014, rs1219648, rs2420946, rs2981578, rs2981579, rs2981582, rs3135718, rs10736303 i rs3750817), które były szczególnie związane z podwyższonym ryzykiem rozwoju raka piersi. Z kolei 3 SNPs (rs2981582, rs1219648 i rs2420946) promowały powstawanie luminalnego raka piersi (Cui et al,

2016; Garcia-Closas et al, 2008; Wang et al, 2013b). Zidentyfikowano także polimorfizmy zaangażowane w zmianę miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych (Runx2 i Oct-1), co prowadziło do wzrostu ekspresji genu *FGFR2* (Meyer et al, 2008).

Mimo dobrze udokumentowanej roli polimorfizmów *FGFR2* w powstawaniu raka piersi stosunkowo niewiele wiadomo o roli tego receptora w trakcie progresji choroby. Wykazano, że ścieżka sygnalizacyjna *FGFR2* reguluje aktywność receptora estrogenowego i progesteronowego, a zależności te przyczyniają się do rozwoju oporności na terapię anty-ER. Wykazano, że *FGFR2* aktywuje czynniki transkrypcyjne NFIB i YBX1, zaangażowane w represję aktywności ER. Badanie to wykazało także udział *FGFR2* w progresji raka piersi w kierunku fenotypu bazalnego, a zastosowanie inhibitorów *FGFR* zwiększyło wrażliwość komórek luminalnego raka piersi na terapię anty-ER (Campbell et al, 2018). Nasz zespół wykazał, że *FGFR2* aktywuje RSK2 (fosforylacja tyrozyny 529), co indukuje migrację komórek raka piersi. Dodatkowo ko-ekspresja *FGFR2* i ufosforylowanego RSK była związana ze zwiększonym ryzykiem nawrotu choroby nowotworowej (Czaplińska et al, 2016; Czaplińska et al, 2014). W kolejnych badaniach wykazaliśmy, że sygnalizacja *FGF7/FGFR2* promowała utratę PR i progresję luminalnego raka piersi w kierunku bardziej agresywnego fenotypu PR-ujemnego. Analiza kliniczna wykazała, że pacjentki z fenotypem RSK2(+)/PR(-) mieli większe ryzyko nawrotu choroby (Piasecka et al, 2019; Piasecka et al, 2016). Odkryliśmy również, że sygnalizacja *FGFR2*, poprzez ścieżkę sygnalizacyjną PI3K/Akt oraz regulację ekspresji białka Bcl-2, znosiła hamujący wzrost komórek luminalnego raka piersi efekt tamoksyfenu (Turczyk et al, 2017). W dalszym kroku nasz zespół podjął próbę określenia wartości prognostycznej *FGFR2* u pacjentek z rakiem piersi. Okazało się, że zależy ona od statusu receptorów dla hormonów steroidowych. Wysoki poziom ekspresji *FGFR2* związany jest z dobrym lub złym rokowaniem, odpowiednio u pacjentek o statusie ER+/PR+ lub ER+/PR-. Ponadto wartość prognostyczna *FGFR2* była niezależna od aktywności transkrypcyjnej PR (Braun et al, 2020). W kolejnej pracy wykazaliśmy, że znaczenie rokownicze *FGFR2* w grupie pacjentek luminalnego A raka piersi zależało od ich statusu menopauzalnego. Wysoka ekspresja *FGFR2* była istotnie związana z dłuższym czasem przeżycia wolnym od progresji choroby (PFS, ang. *progression-free survival*) u chorych postmenopauzalnych. W przypadku pacjentek przedmenopauzalnych efekt ten jest zaburzony, co wskazuje na istnienie podgrup, w których *FGFR2* jest dobrym lub złym czynnikiem rokowniczym. Ponadto wskazaliśmy na udział JunB (czynnika transkrypcyjnego z rodziny AP-1) w promowanej przez ścieżkę

sygnalizacyjną FGF7/FGFR2 oporności komórek raka piersi na tamoksyfen (Mieczkowski et al, 2022).

Rola ścieżki sygnalizacyjnej FGFR2 w regulacji funkcji receptorów estrogenowego i progesteronowego, progresji raka piersi i oporności na stosowane terapie anti-ER wskazuje na jej potencjał terapeutyczny w luminalnych rakach piersi (badania kliniczne NCT03344536, NCT01202591, NCT01791985, NCT03238196, NCT04024436, NCT04504331) (Francavilla & O'Brien, 2022). Jednak odpowiedź pacjentek na stosowane terapie skierowane przeciwko FGFR jest zróżnicowana i nie zależy od statusu receptorów (amplifikacji, nadekspresji czy mutacji). Utrudnia to wytypowanie pacjentek mogących odnieść korzyść z terapii anti-FGFR. Najnowsze badania zidentyfikowały liczne zmiany genetyczne w obrębie genu *FGFR2*, prowadzące do skrócenia egzonu 18 (E18) w obrębie *FGFR2* (tzw. wariant *FGFR2^{ΔE18}*). Wykazano, że delecja E18 silnie promowała onkogenezę. Co istotne, sprawdzono znaczenie tej mutacji dla odpowiedzi chorych na inhibitory FGFR. Wśród pacjentów z wariantem *FGFR2^{ΔE18}* leczonych pemigatinibem (inhibitorem FGFR zatwierdzonym w 2020 roku) ponad 80% wykazało całkowitą odpowiedź, częściową odpowiedź lub stabilizację choroby. Natomiast progresję choroby w trakcie leczenia pemigatinibem zaobserwowano u ponad 60% pacjentów bez zmian w obrębie *FGFR2*, a ich rokowanie było gorsze w porównaniu do chorych z innymi typami rearanżacji *FGFR2* (Zingg et al, 2022). To przełomowe odkrycie wskazuje, że inhibitory FGFR mogą wykazywać stabilną i wysoką skuteczność u pacjentów z określonymi wariantami *FGFR* (np. *FGFR2^{ΔE18}*). Dotychczas amplifikacje i fuzje *FGFR2* były uznawane za istotne czynniki promujące onkogenezę, jednak odpowiedź pacjentów z tymi mutacjami na inhibitory FGFR była bardzo zróżnicowana. Wykazano także, że potencjał onkogenny FGFR2 nie zależy jedynie od jego aberracji, ale również od amplifikacji genów z nim współwystępujących takich jak *MYC* lub *CCND1*. Wydaje się, że może to również skutkować opornością na terapie anti-FGFR. Podsumowując, wyniki tego badania wskazują, że selekcja pacjentów do terapii ukierunkowanej na FGFR2 nie powinna być rozpatrywana wyłącznie na podstawie statusu mutacji, fuzji lub amplifikacji *FGFR2*, ale także ekspresji onkogennych transkryptów *FGFR2* (np. *FGFR2^{ΔE18}*) i aberracji genów współwystępujących z *FGFR2*.

Obserwowane przez nasz zespół badawczy różnice w znaczeniu prognostycznym FGFR2 u pacjentek z luminalnym rakiem piersi (w zależności od ekspresji PR oraz statusu menopauzalnego chorych) wydają się być w zgodzie z sugerowaną w literaturze wewnętrzną heterogennością raków luminalnych. Kluczowa

wydaje się więc potrzeba identyfikacji dodatkowych markerów molekularnych w celu wskazania grupy pacjentek, która mogłaby odnieść korzyści z terapii ukierunkowanej na receptory FGFR.

1.2.6. Inhibitory FGFR

Dane dostępne na stronie www.clinicaltrials.gov pokazują 136 badań klinicznych (trwających lub zakończonych) dotyczących zastosowania inhibitorów FGFR w leczeniu nowotworów, z czego 14 dotyczy raka piersi.

Wśród opracowywanych potencjalnych schematów terapeutycznych skierowanych przeciwko FGFR wyróżnia się: drobnocząsteczkowe inhibitory kinaz tyrozynowych, przeciwciała monoklonalne, peptydy oraz tzw. „pułapki” liganda FGF (Chen et al, 2021; Krook et al, 2021). Działanie pierwszej generacji drobnocząsteczkowych inhibitorów kinaz tyrozynowych (TKIs, ang. *tyrosine kinase inhibitors*) opierało się na blokowaniu kieszeni wiążącej ATP w strukturze receptorów. Sprawiało to, że inhibitory działały w sposób nieselektywny wobec FGFR hamując również aktywność innych kinaz tyrozynowych np. receptorów dla naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGFR, ang. *vascular-endothelial growth factor receptor*) czy płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGFR, ang. *platelet-derived growth factor receptor*). Do inhibitorów kinaz tyrozynowych I-szej generacji ocenianych w badaniach klinicznych zalicza się derazantinib, ponatinib, lucitanib, dovitinib, lenvatinib i nintedanib. Kolejną generację drobnocząsteczkowych inhibitorów kinaz tyrozynowych stanowią selektywne inhibitory FGFR, których mechanizm opiera się na celowaniu w wewnątrzkomórkową domenę kinazową. Wysoki stopień homologii tej domeny w FGFR1, FGFR2 i FGFR3 sprawia, że takie inhibitory celują we wszystkie trzy receptory, a część z nich także w FGFR4. Na przełomie ostatnich czterech lat amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków zatwierdziła stosowanie czterech selektywnych inhibitorów FGFR. Pierwszym z nich był erdafitinib (JNJ-42756493), inhibitor FGFR1-4, stosowany w leczeniu pacjentów z przerzutującym lub lokalnie zaawansowanym rakiem pęcherza moczowego (FGFR2/FGFR3-dodatnim) (Loriot et al, 2022). Inhibitor FGFR1-3 pemigatinib (INCB054828) oraz inhibitor FGFR1-4 infigratinib (BGJ398) zostały zatwierdzone do leczenia pacjentów z nieoperacyjnym/przerzutowym rakiem dróg żółciowych z fuzją/rearanżacją FGFR2 (Javle et al, 2021; Walden et al, 2022). Dodatkowo pemigatinib został zatwierdzony w terapii pacjentów z nawracającymi lub opornymi na leczenie nowotworami

szpikowymi/limfoidalnymi z rearanżacją FGFR1. Czwartym zatwierdzonym inhibitorem FGFR1-4 jest futibatinib (TAS-120), stosowany do leczenia pacjentów z nieoperacyjnym/przerzutowym wewnątrzwartrobowym rakiem dróg żółciowych z fuzją/rearanżacją FGFR2 (Rizzo et al, 2021). Ponadto duża liczba selektywnych inhibitorów FGFR, takich jak LY2874455, ARQ-087, AZD4547, FGF401, BLU9931 czy H3B6527 jest w trakcie badań klinicznych lub przedklinicznych. Nasz zespół w ramach współpracy z firmą farmaceutyczną Celon Pharma S.A. brał udział w projekcie CELONKO pt. „Opracowanie nowoczesnych biomarkerów oraz rozwój innowacyjnego inhibitora kinaz FGFR stosowanego w terapii nowotworów” (program STRATEGMED finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (Kitowska et al, 2021; Zarczynska et al, 2021). Projekt ten dotyczył inhibitora FGFR (CPL304110), który obecnie znajduje się I fazie badań klinicznych u pacjentów z zaawansowanymi nowotworami litymi płuc, żołądka i pęcherza moczowego.

Odmienną strategią celowania w aktywność FGFR są przeciwciała monoklonalne, które hamują mechanizmy takie jak wiązanie liganda czy dimeryzacja receptora oraz przeciwciała monoklonalne anty-FGFR skoniugowane z lekami cytotoksycznymi (ADCs, ang. *antibody drug conjugates*). Przykładem ADCs, które ukończyło I fazę badań klinicznych u pacjentów z zaawansowanymi/przerzutującymi nowotworami jest LY3076226, zawierający przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko FGFR3 związane z lekiem cytotoksycznym (Kollmannsberger et al, 2021). Innym przykładem jest bemarituzumab, przeciwciało rozpoznające izoformę b FGFR2, sprawdzane w badaniu klinicznym u pacjentów z wcześniej nieleczonym, zaawansowanym gruczolakorakiem żołądka/połączenia żołądkowo-przełykowego (Wainberg et al, 2022). Odmiennym podejściem hamowania sygnalizacji FGF/FGFR jest zakłócanie wiązania ligandów FGF z ich swoistymi receptorami za pomocą tzw. „pułapek” FGF. Przykładem pułapki będącej na etapie badań klinicznych jest białko fuzyjne FP-1039 (GSK3052230). Zawiera ono zewnątrzkomórkową domenę receptora FGFR1, a co za tym idzie posiada zdolność do selektywnego wiązania i neutralizowania jego ligandów. Zaletą „pułapek” FGF jest brak toksyczności charakterystycznej dla drobnocząsteczkowych inhibitorów FGFR związanej z hiperfosfatemią, głównym skutkiem ubocznym ich stosowania (Van Brummelen et al, 2020).

Liczne badania kliniczne wykazały, że zastosowanie w terapii skojarzonej inhibitorów FGFR może poprawić skuteczność kliniczną dostępnych leków przeciwnowotworowych, a także przezwyciężyć zjawisko lekooporności. Obecnie

prowadzonych jest kilka badań dotyczących użycia inhibitorów FGFR w hormono-zależnym raku piersi, w którym stosuje się terapię endokrynną w postaci leków anti-ER (tamoksyfenu czy fulwestrantu) oraz inhibitorów aromatazy (André & Cortés, 2015; Coombes et al, 2022; Francavilla & O'Brien, 2022; Santolla & Maggiolini, 2020).

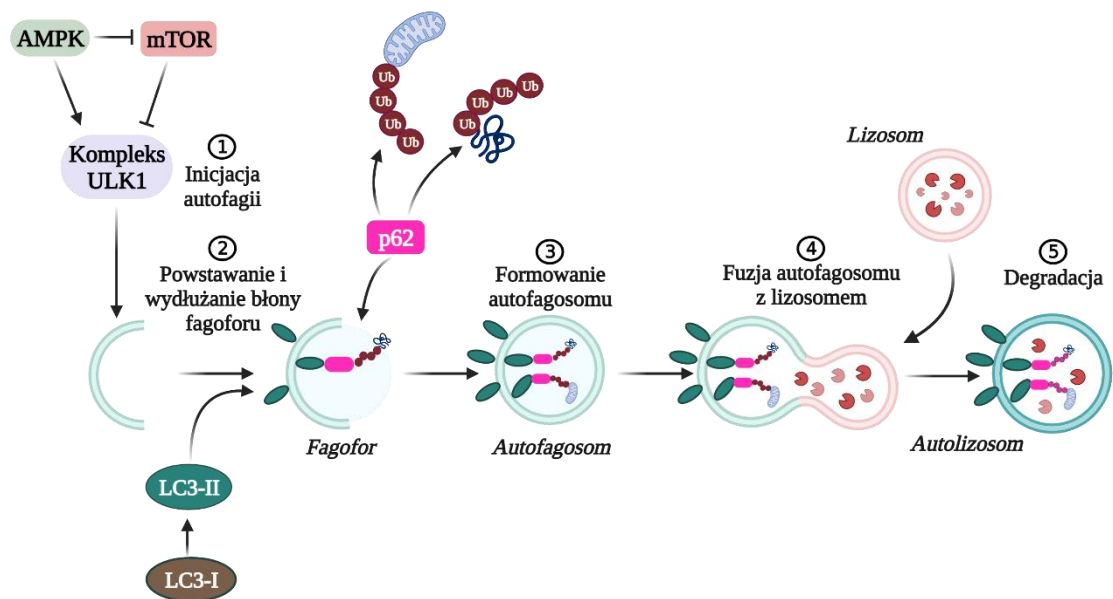
1.3. Autofagia

1.3.1. Definicja, mechanizm, znaczenie

Termin autofagia (z gr. „*samożądanie*”) został po raz pierwszy użyty w 1963 roku przez Christian'a de Duve, który zaobserwował, że komórka może niszczyć struktury wewnątrzkomórkowe poprzez otaczanie ich błonami, tworzenie swego rodzaju pęcherzyków, a następnie transportowaniu ich do organellum odpowiedzialnego za degradację, zwanego lizosomem (Glick et al, 2010). Przełom w badaniach nad procesem autofagii nastąpił na początku lat 90-tych. Yoshinori Ohsumi użył wtedy do badań drożdży piekarskich, dzięki którym wyjaśnił mechanizmy zachodzące podczas autofagii oraz zidentyfikował geny regulujące ten proces (ATG, ang. *autophagy-related genes*). Geny *ATG* mają swoje ortologi również u kręgowców (Ichimura et al, 2000). Za te odkrycia Yoshinori Ohsumi został uhonorowany w 2016 roku Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny.

Obecnie autofagia jest definiowana jako wysoce konserwatywny, fizjologiczny proces, w którym składniki komórkowe (organelle, białka) są kierowane do degradacji w lizosomach, w następstwie ulegając recyklingowi do prekursorów makrocząsteczek (aminokwasów, cukrów, nukleotydów czy kwasów tłuszczowych). Jest to proces adaptacyjny, umożliwiający komórkom przetrwanie podczas niedoboru składników odżywczych czy stresu metabolicznego. W warunkach homeostazy autofagia pozostaje na stosunkowo niskim poziomie. Do jej indukcji może przyczynić się stres komórkowy wywołany stresem oksydacyjnym, uszkodzeniami DNA, stresem siateczki śródplazmatycznej, niedotlenieniem czy infekcją. Ponadto autofagia jest aktywowana podczas infekcji wirusowych i bakteryjnych, stanowiąc mechanizm obronny organizmu (Chang, 2020). Wyróżnia się trzy podstawowe rodzaje autofagii: makroautofagię, mikroautofagię oraz autofagię zależną od białek opiekuńczych - chaperonów (ang. *chaperone-mediated autophagy*). Różnią się one sposobem dostarczania składników cytozolu do degradacji w lizosomach. Makroautofagia jest najlepiej zbadanym rodzajem autofagii, w którym zawartość komórki przeznaczona do degradacji jest dostarczana do lizosomu przy pomocy specyficznych organelli otoczonych podwójną błoną, zwanych

autofagosomami. W przypadku mikroautofagii składniki komórkowe są wprowadzane bezpośrednio do lizosomu, poprzez inwaginację jego błony. Z kolei w autofagii zależnej od chaperonów substraty kierowane do degradacji tworzą kompleksy z białkami opiekuńczymi, które są rozpoznawane przez receptory znajdujące się w błonie lizosomów (Galluzzi et al, 2017a). Makroautofagia (dla uproszczenia zwana dalej autofagią) jest procesem wieloetapowym, w którym wyróżnia się: inicjację, formowanie i wydłużanie błony fagoforu (nukleację), powstawanie autofagosomu, fuzję autofagosomu z lizosomem i degradację ich zawartości (Ryc. 2).



Rycina 2. Mechanizm procesu autofagii. Wyróżnia się następujące etapy procesu: inicjację, powstawanie i wydłużanie błony fagoforu (nukleację), formowanie autofagosomu, fuzję autofagosomu z lizosomem i degradację ich zawartości. 1) Inicjacja autofagii rozpoczyna się aktywacją kompleksu ULK1, który może być pozytywnie lub negatywnie regulowany odpowiednio przez AMPK i mTOR; 2) formowanie i wydłużanie błony fagoforu prowadzi do powstawania autofagosomu; 3) białko p62 kieruje składniki komórkowe do autofagosomu poprzez oddziaływanie z LC3-II obecnym w jego błonie; 4) w wyniku fuzji autofagosomu z lizosomem powstaje autolizosom, w którym 5) degradowane są składniki komórkowe. Schemat powstał z wykorzystaniem programu BioRender.com.

Proces ten jest ściśle regulowany przez białka kodowane przez geny *ATG*. Inicjacja autofagii rozpoczyna się aktywacją kompleksu kinazy ULK1, w skład którego wchodzi białka ULK1, ULK2, ATG13, FIP200 i ATG101. Następnie dochodzi do aktywacji kompleksu kinazy 3-fosfatydyloinozytolu klasy III (PI3K-III), w którym białko beklina 1 (ang.

beclin 1) aktywuje białko VPS34. Aktywacja tej kaskady jest niezbędna do formowania i wydłużania tzw. fagoforu (zwanego także błoną izolacyjną) - błony otaczającej elementy komórkowe przeznaczone do degradacji. Wydłużanie się błony fagoforu odbywa się za pośrednictwem dwóch ubikwitynopodobnych systemów koniugacji białek, w wyniku których powstaje kompleks ATG12-ATG5 oraz ulega modyfikacji białko LC3 (homolog białka ATG8 u drożdży). LC3 (ang. *microtubule-associated protein 1 light chain 3*) jest białkiem cytozolowym, które wskutek indukcji autofagii ulega cięciu proteolitycznemu przez białko ATG4. Prowadzi to do utworzenia formy LC3-I, która przy pomocy białka ATG3 ulega fuzji z fosfatydyloetanolaminą (PE) tworząc formę lipidową LC3-II. Kompleks ATG12-ATG5 promuje rekrutację oraz integrację LC3-II do błon (wewnętrznej oraz zewnętrznej) wydłużającego się fagoforu, który po ich zamknięciu i utworzeniu pęcherzyka nazywany jest autofagosomem. Finalnie dojrzały autofagosom ulega fuzji z lizosomem, tworząc autolizosom. Dzięki obecności enzymów lizosomalnych dochodzi do strawienia zawartości autolizosomu (Glick et al, 2010; Levy et al, 2017). LC3 jest powszechnie uznawany za marker procesu autofagii (Klionsky et al, 2021a). Podczas indukcji procesu wzrasta jego poziom, dzięki czemu możliwe jest monitorowanie autofagii. Drugim markerem procesu jest białko adaptorowe p62 kodowane przez gen *SQSTM1* (ang. *sequestosome 1*). p62 (dzięki obecności domeny wiążącej ubikwitynę) wiąże się z białkami przeznaczonymi do degradacji w procesie autofagii, ale alternatywnie może również kierować białka do degradacji na drodze proteasomalnej. Swoją funkcję w procesie autofagii p62 spełnia poprzez domenę wiążącą białko LC3-II, obecne w błonie autofagosomów. Następnie ulega trawieniu w autolizosomie wraz z transportowaną przez nie zawartością. Stąd poziom białka p62 spada w końcowej fazie procesu. Monitorowanie intensywności autofagii (tzw. *autophagic flux*) poprzez badanie poziomu p62 w komórce umożliwia potwierdzenie, że proces nie został zahamowany na którymś z jego etapów. Badania wykazały nagromadzenie się białka p62 u myszy z zaburzonym procesem autofagii, co dowodzi, że białko to jest degradowane podczas procesu (Johansen & Lamark, 2011; Katsuragi et al, 2015; Liu et al, 2016). Ponadto p62 zostało zidentyfikowane jako główny regulator ścieżki sygnalizacyjnej Keap1/Nrf-2, odpowiedzialnej za mechanizm obronny komórki wobec stresu oksydacyjnego i elektrofilowego (Kageyama et al, 2021; Komatsu et al, 2010).

1.3.2. Regulacja autofagii

W związku z tym, że autofagia umożliwia komórkom przetrwanie w warunkach niedoboru składników odżywczych, proces ten jest regulowany przez ścieżki sygnalizacyjne wrażliwe na zmiany środowiskowe. Kinaza mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*) jest białkiem, którego aktywacja zachodzi w odpowiedzi na zmiany w poziomie energii oraz ilości aminokwasów, czynników wzrostu czy tlenu. Jest ona jednym z głównych regulatorów wzrostu oraz metabolizmu komórek. Ponadto kinaza ta hamuje proces autofagii w komórkach, które znajdują się w środowisku bogatym w składniki odżywcze. Zachodzi to poprzez oddziaływanie białka mTOR z kompleksem ULK1 (niezbędnym do powstawania fagoforu) i fosforylację kinazy ULK1 w serynie 757, co skutkuje zahamowaniem jej aktywności (Chang, 2020; Rabinowitz & White, 2010). Kolejnym sposobem negatywnej regulacji autofagii przez mTOR jest zahamowanie oddziaływania ULK1 z kinazą AMPK (ang. *adenosine monophosphate-activated protein kinase*). AMPK aktywowana przez zwiększony stosunek AMP (adenozyno-5'-monofosforanu)/ATP (adenozyno-5'-trifosforanu) reguluje homeostazę energetyczną komórki. AMPK indukuje proces autofagii poprzez różne mechanizmy. Jednym z nich jest udział w formowaniu kompleksu ULK1 poprzez fosforylację kinazy ULK1 m.in. w serynie 555. Dodatkowo AMPK może znosić hamujący aktywność autofagii efekt mTOR, poprzez aktywację kompleksu TSC (ang. *tuberous sclerosis complex*), który z kolei hamuje aktywność mTOR. AMPK może także fosforylować białko Raptor (ang. *regulatory associated protein of mTOR*) w serynie 792, co redukuje fosforylację mTOR (Russell et al, 2014). Raptor pełni kluczową rolę w zachodzeniu dalszej sygnalizacji od kinazy mTOR, poprzez oddziaływanie z tym białkiem i aktywację jego substratów (Kim et al, 2002). Fosforylacja Raptor w serynie 792 powoduje zahamowanie aktywności mTOR. Wykazano, że fosforylacja ta jest indukowana przez kinazę AMPK α (Gwinn et al, 2008). Indukcja autofagii regulowana jest również przez inne kluczowe białko tego procesu – beclinę 1. W warunkach fizjologicznych beclina 1 występuje w kompleksie z białkami antyapoptycznymi takimi jak Bcl-2 lub Bcl-XL, które hamują jej aktywność. Rozpad tego kompleksu i inicjacja autofagii może zachodzić przy udziale białek proapoptycznych (np. Bad i Bax) lub poprzez fosforylację białka Bcl-2. Wiele niezależnych badań potwierdziło istnienie interakcji pomiędzy procesem autofagii a apoptozą. Z jednej strony autofagia może być wykorzystywana przez komórki nowotworowe jako mechanizm adaptacyjny, chroniący je przed śmiercią komórkową

w wyniku zahamowania apoptozy. Z drugiej strony autofagia może stanowić alternatywną ścieżkę śmierci komórkowej (Chen et al, 2019; Levine et al, 2008; Maiuri et al, 2007).

Wymienione mechanizmy regulacji autofagii są dość dobrze zbadane. Mimo to oczywiste jest, że proces ten jest dużo bardziej złożony i nadal intensywnie badany. Poznanie ścieżek sygnalizacyjnych biorących udział w regulacji autofagii umożliwi jej lepsze kontrolowanie, a zaindukowanie bądź zahamowanie procesu może zwiększyć efektywność stosowanych terapii przeciwnowotworowych.

1.3.3. Rola autofagii w rozwoju nowotworów i oporności na stosowane terapie

Zaburzenia procesu autofagii zostały scharakteryzowane w wielu jednostkach chorobowych, takich jak choroby neurodegeneracyjne, immunologiczne, zakaźne, a także dysfunkcje narządów wewnętrznych np. serca, wątroby oraz płuc. Przez wiele lat badano również znaczenie autofagii w onkogenezie. Okazało się, że pełni ona złożoną rolę, zarówno hamującą jak i promującą rozwój nowotworu (Chavez-Dominguez et al, 2020; Dikic & Elazar, 2018; Klionsky et al, 2021b; White & DiPaola, 2009; Yang & Klionsky, 2020). We wczesnych stadiach choroby autofagia zapobiega wzrostowi guza poprzez hamowanie powstawania uszkodzeń, w tym zmian w DNA. Zachodzi to dzięki usuwaniu uszkodzonych organelli i nieprawidłowo pofałdowanych białek oraz redukcji stresu oksydacyjnego. Z kolei w bardziej zaawansowanych stadiach nowotworu autofagia spełnia funkcję ochronną przed stresem metabolicznym oraz wywołanym przez stosowane leczenie przeciwnowotworowe. Komórki nowotworowe intensywnie się dzieląc, mają zwiększone zapotrzebowanie na substancje odżywcze, których źródłem jest m.in. proces autofagii.

Rola autofagii w hamowaniu wczesnych etapów rozwoju raka piersi jest dość dobrze udokumentowana. W zdrowym gruczole piersiowym zaobserwowano zwiększony poziom ekspresji genów *ATG*. Z kolei rozwój raka piersi związany był z utratą ekspresji tych genów (Tavera-Mendoza et al, 2017). Wykazano, że delecja monoalleliczna *BECN1* (bekliny 1) zachodzi w 40-75% wszystkich nowotworów, w tym w raku piersi, jajników oraz prostaty (Aita et al, 1999; Li et al, 2010). Z kolei heterozygotyczna delecja *BECN1* u myszy prowadzi do zwiększonej częstotliwości występowania spontanicznych nowotworów, w tym raka piersi o fenotypie bazalnym (Qu et al, 2003; Yue et al, 2003). Ponowne wprowadzenie bekliny 1 do linii komórkowej

MCF7, która wykazywała heterozygotyczną utratę genu kodującego to białko, zredukowało proliferację tych komórek (Wijshake et al, 2021). Niski poziom *ATG7* występował w potrójnie ujemnym raku piersi w porównaniu do tkanki nienowotworowej (Li et al, 2019). Niniejsze doniesienia wskazują, że mutacje genów regulujących autofagię, prowadzące do zaburzeń tego procesu mogą przyczyniać się do rozwoju raka piersi.

Sytuacja wygląda odwrotnie w późniejszych stadiach onkogenezy, w których autofagia pełni funkcję pronowotworową. Mikrośrodowisko guza, a w szczególności związane z progresją nowotworów CAFs, promują proces autofagii. Zaobserwowano zwiększony poziom ekspresji bekliny 1 oraz zwiększoną konwersję białka LC3-II/-I w CAFs w porównaniu do normalnych fibroblastów. Autofagia indukowana przez CAFs stymulowała z kolei migrację, inwazję i proliferację komórek potrójnie ujemnego raka piersi (Wang et al, 2017a).

Wstępne badania na komórkach luminalnego raka piersi (MCF7) wykazały, że autofagia hamuje wzrost nowotworu (Liang et al, 1999). Z drugiej strony zaobserwowano, że leki anty-ER (tamoksyfen oraz fulwestrant) indukują proces autofagii, co przyczynia się do śmierci komórek luminalnego raka piersi (Bursch et al, 1996). Bardziej aktualne badania wykazały, że w populacji komórek MCF7 (około 70%), które przeżyły leczenie tamoksyfenem wzrastała liczba powstających autofagosomów (Samaddar et al, 2008). Wywnioskowano więc, że wpływ autofagii na przeżycie bądź śmierć komórek nowotworowych może zależeć od liczby autofagosomów.

Ponadto został udowodniony udział autofagii w oporności na stosowane terapie przeciwnowotworowe, w tym leki anty-ER (Bhutia et al, 2013; Levy et al, 2017; Yang et al, 2011). Potwierdzono także, że wyciszenie ekspresji genów odpowiedzialnych za aktywację autofagii (*ATG5*, *ATG7*, *BECN1*) lub zastosowanie inhibitorów autofagii w liniach luminalnego raka piersi przywracało odpowiedź komórek na leczenie anty-ER (Cook et al, 2011; Cook et al, 2014; Duan et al, 2014; Lee et al, 2018; Qadir et al, 2008; Sun et al, 2021). Co ciekawe, najbardziej obiecujący efekt w przywracaniu odpowiedzi na terapię anty-ER miało jednoczesne zastosowanie shRNA skierowanego na *BECN1* oraz inhibitora Bcl-2 (YC137) (Crawford et al, 2010). Zatem podwójne celowanie w synergistyczne szlaki molekularne może być korzystne dla ponownego uwrażliwienia komórek raka piersi opornych na leczenie anty-ER. Felzen i in. odkryli, że ER w sposób niekanoniczny (niezależny od jego aktywności transkrypcyjnej i wiązania do miejsc ERE, ang. *estrogen response element*) indukuje proces autofagii, w którego aktywacji bierze

udział białko BAG3 (ang. *Bcl2-associated athanogene 3*). Zarówno zahamowanie autofagii, jak i wyciszenie ekspresji BAG3 zmniejszyło oporność komórek luminalnego raka piersi na stres oksydacyjny wywołany leczeniem anty-ER (Felzen et al, 2015). Ten niekanoniczny szlak autofagii może być interesującym celem dla medycyny spersonalizowanej i leczenia luminalnego raka piersi, który nie odpowiada na terapię anty-ER. Ostatnie badania zasugerowały również udział lizosomów w rozwoju oporności na terapię anty-ER. Lizosomy biorą udział w degradacji elementów komórkowych m.in. w procesie autofagii. Ponadto wskazano na udział lizosomów w ochronie komórek nowotworowych przed działaniem chemioterapeutyków w wyniku akumulacji leków wewnątrz lizosomów, a następnie ich usuwaniu z komórki na drodze egzocytozy. Zaobserwowano, że komórki traktowane tamoksyfenem charakteryzują się mniejszą zdolnością do przerwania ciągłości błony lizosomalnej (LMP, ang. *lysosomal membrane permeabilization*). LMP jest jednym z procesów prowadzących do różnych form śmierci komórki np. apoptozy. W związku z tym wywnioskowano, że zależna od autofagii zmiana integralności lizosomów jest jedną z przyczyn oporności na tamoksyfen (Actis et al, 2021; Hultsch et al, 2018). Udowodniono także udział autofagii i aktywującej ją kinazy AMPK w powstawaniu oporności na tamoksyfen oraz inny SERM – endoksyfen (Duan et al, 2021). Wymienione powyżej doniesienia naukowe wskazują potencjalne mechanizmy molekularne mogące brać udział w powstawaniu oporności na terapię anty-ER z udziałem autofagii. Zatem wysuwa się wniosek, że zahamowanie procesu autofagii może być skuteczną strategią w przywracaniu wrażliwości na leczenie anty-ER.

1.3.4. Inhibitory autofagii

Liczne badania przedkliniczne i kliniczne wykazały, że zahamowanie autofagii zwiększa skuteczność stosowanych terapii przeciwnowotworowych. Złożoność tego procesu sprawia, że autofagia może być zahamowana na różnych etapach. Najbardziej obiecującym celem wydaje się być jej końcowy etap - blokowanie fuzji autofagosomu z lizosomem. Potwierdzono, że inhibitory PI3K (3-metyloadenina, wortmanina i LY294002) mogą hamować autofagię na jej wczesnym etapie, gdyż PI3K klasy III pełnią kluczową rolę w formowaniu autofagosomu (Wu et al, 2010; Yang et al, 2013). Najlepiej zbadanymi i jedynymi zatwierdzonymi przez FDA inhibitorami autofagii są chlorochina (CQ) i jej pochodna hydroksychlorochina (HCQ). Pierwotnie leki te stosowano w leczeniu malarii. Początkowo myślano, że CQ i HCQ, tak jak inne inhibitory autofagii (bafilomycyna A1 oraz inhibitory lizosomu), prowadzą do inaktywacji

enzymów lizosomalnych poprzez zwiększanie wartości pH lizosomu (Galluzzi et al, 2017b; Lim et al, 2021). Najnowsze badania wskazują, że mechanizm działania CQ i HCQ polega na hamowaniu fuzji autofagosomu z lizosomem (Mauthe et al, 2018). Badania przedkliniczne pokazały, że CQ wykazuje ograniczoną aktywność jako pojedynczy lek. Z kolei HCQ charakteryzuje się bardzo dużą dystrybucją tkankową, co skutkuje jej wysokim stężeniem wewnątrz guza. Nadal istnieje jednak ryzyko, że CQ lub HCQ mogą nie być wystarczająco silne, aby wykazać skuteczność kliniczną w leczeniu nowotworów w dawkach tolerowanych przez pacjentów. Stąd podjęto intensywne próby otrzymania związków pochodnych o zwiększonej skuteczności. Jednym z nich jest Lys05, który blokuje autofagię poprzez wzrost wartości pH lizosomu i charakteryzuje się 10-krotnie większą cytotoxycnością niż HCQ (Abdel-Aziz et al, 2022; McAfee et al, 2012).

Skuteczność inhibitorów autofagii w przywracaniu wrażliwości komórek opornych na stosowaną terapię anti-ER została opisana w poprzednim podrozdziale niniejszej pracy. Badania wskazują również, że jednoczesne stosowanie terapii anti-ER i inhibitorów autofagii może przyczynić się do uniknięcia wykształcania oporności na stosowane leczenie. Z drugiej strony zastosowanie inhibitorów autofagii w komórkach opornych na terapię anti-ER spowodowało przywrócenie jej efektywności. Według danych dostępnych na stronie www.clinicaltrials.gov 115 badań (trwających lub zakończonych) dotyczy zastosowania hydroksychlorochiny w leczeniu nowotworów. W przypadku raka piersi obecnie prowadzonych jest 5 badań klinicznych, z czego w 4 z nich HCQ występuje w kombinacji z innymi lekami takimi jak inhibitor kinazy mTOR (ewerolimus), inhibitor aromatazy (letrozol) i/lub inhibitory CDK4/6 (palbocycylib, abemacyclicylib) (NCT03774472, NCT04316169, NCT04523857, NCT04841148, NCT03032406) (Komarla et al, 2023).

1.4. Czynniki transkrypcyjne Nrf-2

1.4.1. Budowa i funkcja

Czynnik transkrypcyjny Nrf-2 (ang. *Nuclear factor E2-related factor 2*, kodowany przez gen *NFE2L2*) należy do rodziny czynników CNC (ang. *cap'n'collar*). W strukturze tych czynników występuje motyw zamka leucynowego. Nrf-2 posiada 7 konserwatywnych domen (Neh1-7). Domena Neh1 odpowiada za jego aktywność transkrypcyjną i wiązanie się do DNA. Neh2 jest główną domeną regulującą aktywność Nrf-2, w której wyróżnia się dwa motywy (ETGE i DLG) niezbędne do oddziaływania

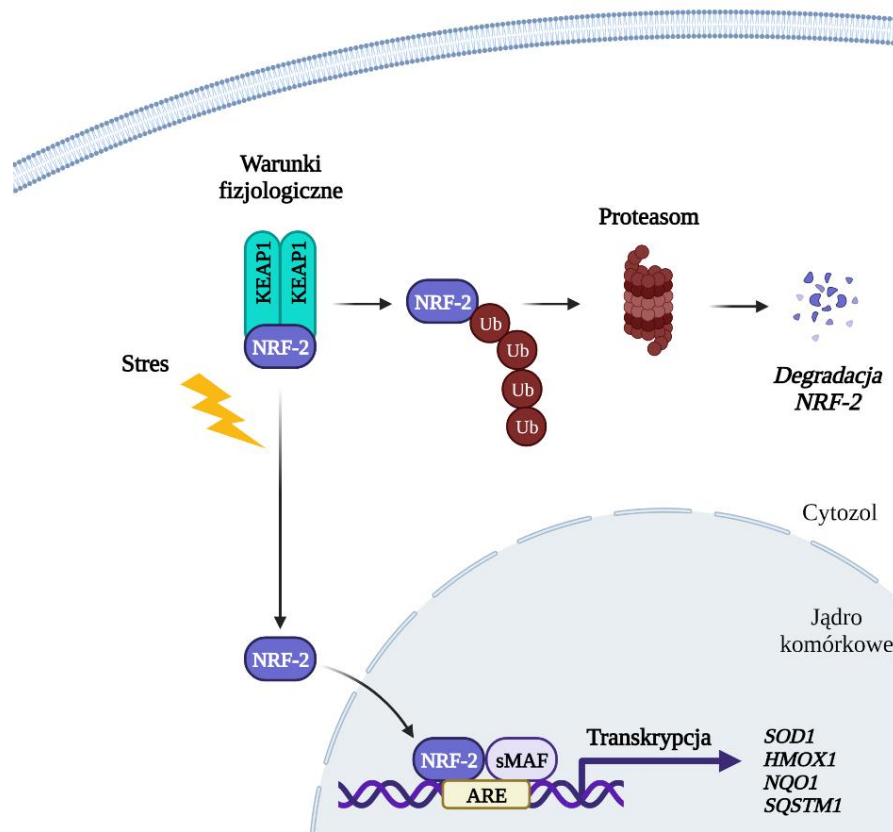
z białkiem Keap1 (ang. *Kelch-like ECH-associated protein 1*). Domeny Neh3, Neh4 oraz Neh5 wiążą koaktywatory transkrypcji. Obecność domen Neh6 i Neh7 umożliwia potranslacyjną (negatywną) regulację aktywności Nrf-2. Domena Neh6 zawiera reszty bogate w serynę, które mogą być fosforylowane przez kinazę syntazy glikogenu-3 β (GSK-3 β), a domena Neh7 pośredniczy w wiązaniu receptora retinoidowego X alfa (RXR- α) (Kaspar et al, 2009; Rada et al, 2011; Wang et al, 2013a).

Nrf-2 jest powszechnie uważany za czynnik transkrypcyjny istotnie zaangażowany w obronę komórki przed stresem oksydacyjnym i elektrofilowym. Czynnik ten reguluje ekspresję około 250 genów, z czego większość z nich koduje enzymy zaangażowane w utrzymanie homeostazy redoks, metabolizm i wydalanie leków, czy metabolizm energetyczny komórki. Geny te charakteryzują się obecnością sekwencji ARE (ang. *antioxidant response element*) w regionach regulatorowych promotora. Wiele badań naukowych skupia również uwagę na udziale Nrf-2 w regulacji procesów biologicznych takich jak proliferacja, różnicowanie, autofagia, apoptoza, degradacja białek, naprawa DNA oraz metabolizm żelaza, których zaburzenia prowadzą do powstawania chorób (np. nowotworów) (Kozieł et al, 2021; Panieri et al, 2020; Rojo De La Vega et al, 2018). Nrf-2 ulega ekspresji we wszystkich typach komórek, z czego w warunkach homeostazy poziom białka Nrf-2 jest stosunkowo niski.

1.4.2. Regulacja Nrf-2

Wyróżnia się dwie główne ścieżki regulujące aktywność transkrypcyjną oraz poziom ekspresji Nrf-2: ścieżkę kanoniczną (Keap1-zależną) oraz alternatywną (Keap1-niezależną). W ścieżce kanonicznej Nrf-2 jest negatywnie regulowany poprzez oddziaływanie z białkiem Keap1, pełniącym funkcję inhibitora Nrf-2 (Ryc. 3). Keap1 występuje w cytoplazmie i jest białkiem adaptorowym kompleksu E3 ligazy ubikwityny. W skład tego kompleksu wchodzi białka Cul3 (ang. Cullin 3) oraz RBX1 (ang. ring box 1). Kompleks Keap1/Cul3/RBX1 kieruje Nrf-2 do degradacji proteasomalnej. Homodimery Keap1 oddziałują z motywami ETGE i DLG Nrf-2. W wyniku ekspozycji komórki na działanie czynników indukujących stres oksydacyjny lub elektrofilowy dochodzi do zmian konformacyjnych w cząsteczce Keap1 (modyfikacji reszt cysteiny), co prowadzi do dysocjacji kompleksu Keap1/Nrf-2. Następnie Nrf-2 ulega stabilizacji i translokacji do jądra komórkowego, w którym tworzy heterodimer z białkami SMAF (ang. *small masculoaponeurotic fibrosarcoma proteins*). Jego powstanie umożliwia przyłączenie się do miejsca ARE w regionie promotora genów regulowanych przez

Nrf-2. Co ciekawe, Nrf-2 posiada sekwencję ARE w obrębie własnego promotora, przez co może regulować swoją transkrypcję, a w rezultacie wzmacniać odpowiedź obronną komórki (Pillai et al, 2022).



Rycina 3. Keap1-zależna ścieżka regulacji aktywności Nrf-2. W warunkach fizjologicznych Nrf-2 występuje w cytozolu w kompleksie z białkiem Keap1. Keap1 kieruje Nrf-2 do degradacji proteasomalnej. W wyniku ekspozycji komórki na warunki stresowe dochodzi do dysocjacji kompleksu Keap1/Nrf-2. W następstwie tego Nrf-2 ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie oddziałuje z białkami sMAF, co umożliwia przyłączenie się do miejsca ARE w rejonie promotorowym regulowanych genów np. *SOD1*, *HMOX1*, *NQO1* oraz *SQSTM1*.

Z biegiem lat odkryto kilka innych alternatywnych ścieżek regulujących aktywność Nrf-2 niezależnie od białka Keap1. Ścieżki te działają na poziomie transkrypcyjnym jak i potranslacyjnym, poprzez wpływ na stabilność białka Nrf-2, jego transport jądrowy czy degradację (Bryan et al, 2013). Jednym z dobrze poznanych inhibitorów aktywności Nrf-2 jest białko GSK-3 β . GSK-3 β fosforyluje Nrf-2, przez co jest on rozpoznawany przez białko β -TrCP (ang. *beta-transducin repeat-containing protein*) wchodzące w skład kompleksu E3 ligazy ubikwityny. W następstwie tego Nrf-2 jest kierowany do degradacji proteasomalnej. GSK-3 β może również regulować

aktywność Nrf-2 w sposób pośredni, poprzez fosforylację białka Fyn (należącego do rodziny kinaz tyrozynowych Src). Fyn promuje eksport jądrowy Nrf-2, jego ubikwitynację i degradację (Chowdhry et al, 2013; Tonelli et al, 2018).

Zależność pomiędzy autofagią, a kompleksem Keap1/Nrf-2 została odkryta przez kilka niezależnych zespołów badawczych (Fan et al, 2010; Komatsu et al, 2010; Lau et al, 2010). Integracja ta zachodzi na poziomie białka p62, wspomnianego wcześniej markera procesu autofagii. p62 posiada w swojej strukturze domenę KIR z motywem STGE, który umożliwia wiązanie do białka Keap1. Motyw STGE jest strukturalnie podobny do motywu ETGE Nrf-2. Charakteryzuje się jednak niższym powinowactwem wiązania do Keap1 niż motyw ETGE. Podczas procesu autofagii p62 jest fosforylowane w serynie 403, co umożliwia jego oddziaływanie z komponentami komórki kierowanymi do degradacji na drodze autofagii. Następnie p62 jest fosforylowany w serynie 349 przez kompleks mTOR. Zwiększa to powinowactwo motywu STGE p62 w stosunku do motywu ETGE Nrf-2, co powoduje wyparcie Nrf-2 z kompleksu z Keap1. Niezwiązany Nrf-2 ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego. Z kolei Keap1 związany przez p62 kierowany jest do degradacji w procesie autofagii. Stąd p62 indukuje aktywność Nrf-2. Co ciekawe, zidentyfikowano motyw ARE w obrębie promotora genu *SQSTM1* (kodującego białko p62), co jest dowodem na istnienie pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego w regulacji aktywności Nrf-2 (Jain et al, 2010). Podsumowując, p62 aktywuje Nrf-2, który jako czynnik transkrypcyjny wiąże się do ARE i aktywuje transkrypcję genu kodującego p62. Aktywacja tej pętli w odpowiedzi na stres oksydacyjny i elektrofilowy prowadzi do przedłużonej aktywacji Nrf-2.

1.4.3. Rola Nrf-2 w transformacji nowotworowej i oporności na stosowane terapie

Powszechnie wiadomo, że kompleks Keap1/Nrf-2 jest jednym z głównych wewnątrzkomórkowych mechanizmów obronnych przed stresem oksydacyjnym i elektrofilowym. W związku z tym Nrf-2 promuje przeżycie komórek i chroni je przed transformacją nowotworową. Rola Nrf-2 w utrzymaniu homeostazy komórki opiera się na jego zdolności do eliminowania reaktywnych form tlenu (ROS), kancerogenów i innych czynników uszkadzających DNA (Milkovic et al, 2017; Sova & Saso, 2018).

Coraz więcej dowodów wskazuje, że Nrf-2 może odgrywać znaczącą rolę w inicjacji kancerogenezy, promowaniu przeżycia, tworzeniu przerzutów i rozwoju

oporności na stosowane terapie (Denicola et al, 2011; Galan-Cobo et al, 2019; Lu et al, 2016; Ohta et al, 2008; Pillai et al, 2022). Pronowotworowa aktywność Nrf-2 w raku piersi została dobrze udowodniona. Liczne badania wykazały nieprawidłową aktywację Nrf-2 w różnych liniach komórkowych tego raka, wpływającą na ich proliferację, migrację i inwazję (Zhang et al, 2016; Zhang et al, 2019). Wykazano, że estrogen (E2) aktywuje Nrf-2 poprzez szlak PI3K/Akt/GSK-3 β i indukuje ekspresję genów kodujących białka o funkcjach antyoksydacyjnych zależnych od Nrf-2 w luminalnym raku piersi (Gorrini et al, 2014; Wu et al, 2014). Wiele niezależnych zespołów badawczych wywnioskowało, że wysoki poziom ekspresji Nrf-2 był skorelowany z wyższą agresywnością guza i gorszym rokowaniem pacjentek z rakiem piersi (Almeida et al, 2020; Bekele et al, 2016; Bocci et al, 2019; Cha et al, 2017; Guo & Shen, 2017; Onodera et al, 2014; Wolf et al, 2016). Almeida i in. przeprowadzili meta-analizę danych, która podsumowała wyniki kilku wcześniejszych badań. Wykazano, że wyższy poziom ekspresji Nrf-2 u pacjentek z rakiem piersi wiązał się z krótszym czasem przeżycia całkowitego (OS) oraz czasem przeżycia wolnego od choroby (DFS, ang. *disease-free survival*) (Almeida et al, 2020). Inny zespół badawczy zidentyfikował sygnaturę 16 genów zależnych od Nrf-2, których zwiększona ekspresja korelowała z gorszym rokowaniem pacjentek z luminalnym rakiem piersi (Wolowczyk et al, 2022). Zebrane dane jednoznacznie wskazują, że ekspresja Nrf-2 jest złym czynnikiem prognostycznym, a hamowanie aktywności Nrf-2 przy pomocy specyficznych inhibitorów może poprawić skuteczność leczenia pacjentek z rakiem piersi.

Analizowano także wpływ Nrf-2 na wykształcanie oporności na terapie stosowane w raku piersi. Wykazano, że Nrf-2 był głównym czynnikiem odpowiedzialnym za oporność na chemioterapię w komórkach MCF7 (Syu et al, 2016). Udowodniono również, że Nrf-2 zmniejsza działanie tamoksyfenu, a wysoka ekspresja i aktywność Nrf-2 (odzwierciedlona podwyższoną ekspresją genów zależnych od Nrf-2) została zaobserwowana w liniach komórkowych raka piersi opornych na tamoksyfen. Na podstawie uzyskanych wyników zasugerowano, że wysoki poziom i aktywność Nrf-2 może służyć jako marker predykcyjny w terapii raka piersi opartej na tamoksyfenie (Bekele et al, 2016; Kim et al, 2008). Najnowsze doniesienia potwierdzają zwiększony poziom ekspresji Nrf-2 (zarówno białka jak i mRNA dla kodującego go genu) w komórkach luminalnego raka piersi opornych na tamoksyfen oraz w tkankach nowotworowych pacjentów leczonych przedoperacyjnie tamoksyfenem. Wykazano, że komórki odporne na tamoksyfen były także krzyżowo odporne na radioterapię, za co

odpowiedzialny był Nrf-2. Zastosowanie jego inhibitora ponownie uwrażliwiało komórki odporne na tamoksyfen na działanie radioterapii (Naumann et al, 2023). Wydaje się więc, że inhibicja Nrf-2 może przynieść korzyści pacjentkom z rakiem piersi. Obecnie jednak brakuje specyficznych inhibitorów Nrf-2, które zostały przetestowane klinicznie (Pouremamali et al, 2022).

Zaburzenia osi p62/Keap1/Nrf-2 zostały zidentyfikowane w procesie onkogenezy (Garufi et al, 2021; Hsu et al, 2022; Ichimura et al, 2000; Inami et al, 2011; Jiang et al, 2020; Kang et al, 2021; Komatsu et al, 2010; Li et al, 2020; Ni et al, 2014). Saito i in. wykazali, że ufosforylowany p62 prowadzi do aktywacji Nrf-2, który indukuje proliferację komórek raka wątrobowokomórkowego (HCC) oraz zapewnia tolerancję na leki przeciwnowotworowe (Saito et al, 2016). Ponadto przy pomocy testów przesiewowych zidentyfikowali nowy inhibitor Nrf-2 (nazwany K67). Hamuje on interakcję pomiędzy ufosforylowanym p62 a Keap1. Inkubacja komórek HCC z K67 zahamowała ich proliferację i zmniejszyła tolerancję na środki przeciwnowotworowe, co wskazuje na potencjał przeciwnowotworowy tego inhibitora. Jednak ze względu na jego niską rozpuszczalność niezbędne jest opracowanie związków o lepszej rozpuszczalności dla poprawy efektu farmakologicznego w terapii pacjentów.

2. CEL PROJEKTU

Doniesienia literaturowe wskazują na udział ścieżki FGFR w regulacji aktywności kompleksu Keap1/Nrf-2, biorącego udział w odpowiedzi antyoksydacyjnej. Jednym z głównych regulatorów tego kompleksu jest białko p62 - marker procesu autofagii. Coraz więcej dowodów wskazuje na rolę autofagii oraz kompleksu Keap1/Nrf-2 w promowaniu progresji raka piersi i oporności na leczenie anty-ER. Nasz zespół wskazał na rolę FGFR2 w ochronie komórek raka piersi przed działaniem leku anty-ER (tamoksyfenu). Mając to na uwadze, niniejszy projekt doktorski miał na celu **ocenę udziału FGFR2 w regulacji współzależności p62/Keap1/Nrf-2 oraz określenie jej znaczenia w luminalnym raku piersi.**

Zrealizowany projekt składał się z dwóch wzajemnie uzupełniających się etapów badawczych: eksperymentów *in vitro* oraz analiz klinicznych *in silico*. Doświadczenia w warunkach *in vitro* zostały przeprowadzone na modelowych liniach komórkowych luminalnego A raka piersi: MCF7, T47D oraz CAMA-1. Poszczególne etapy projektu miały na celu:

- 1) ocenę udziału FGFR2 w regulacji procesu autofagii,
- 2) poznanie FGFR2-zależnego mechanizmu molekularnego regulacji autofagii,
- 3) ocenę współzależności FGFR2/autofagia dla wzrostu i odpowiedzi komórek raka piersi na leki anty-ER (tamoksyfen oraz fulwestrant),
- 4) zbadanie wpływu sygnalizacji FGFR2-zależnej na regulację kompleksu Keap1/Nrf-2,
- 5) ocenę współzależności FGFR2/Nrf-2 dla wzrostu i odpowiedzi komórek raka piersi na terapię anty-ER,
- 6) oszacowanie potencjalnej wartości prognostycznej zależności FGFR2/Nrf-2 przy pomocy analiz *in silico* w oparciu o materiał kliniczny pochodzący od pacjentek z luminalnym A rakiem piersi.

3. MATERIAŁY

3.1. Linie komórkowe

- CAMA-1 – ludzka linia komórkowa luminalnego raka gruczołu piersiowego (ATCC)
- MCF7 – ludzka linia komórkowa luminalnego raka gruczołu piersiowego (ATCC)
- T47D – ludzka linia komórkowa luminalnego raka gruczołu piersiowego (DSMZ)
- 293T – ludzka linia komórkowa embrionalnych komórek nerki, linia „pakująca” w systemach lenti-/retrowirusowych (ATCC)

3.2. Pożywki i suplementy stosowane do hodowli komórkowej

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Corning lub HyClone)
- MEM (Minimum Essential Medium) (Corning lub HyClone)
- FBS (płodowa surowica bydlęca, ang. *Fetal Bovine Serum*) (Biowest)
- Antybiotyki: penicylina, streptomycyna (HyClone)

3.3. Bufory i odczynniki stosowane do hodowli komórkowej

- PBS (sól fizjologiczna buforowana fosforanami, ang. *Phosphate Buffered Saline*) (Sigma-Aldrich)
- Trypsyna-EDTA (Biowest)

3.4. Przeciwciała I-rzędowe

- anty- β -aktyna (AC-15) – mysie przeciwciała monoklonalne (Sigma-Aldrich, nr kat. A5441)
- anty-AMPK α (D63G4) – królicze przeciwciała monoklonalne (Cell Signaling Technology, nr kat. 5832)
- anty-fosfo-AMPK α (Thr172) (40H9) – królicze przeciwciała monoklonalne (Cell Signaling Technology, nr kat. 2535)
- anty-Keap1 (P586) – królicze przeciwciała poliklonalne (Cell Signaling Technology, nr kat. 4678)
- anty-Keap1 (G-2) – mysie przeciwciała monoklonalne (Santa Cruz Biotechnology, nr kat. sc-365626)
- anty-Lamina B1 (D9V6H) – królicze przeciwciała monoklonalne (Cell Signaling Technology, nr kat. 13435)

- anty-LC3B – królicze przeciwciała poliklonalne (Cell Signaling Technology, nr kat. 2775)
- anty-mTOR (7C10) – królicze przeciwciała monoklonalne (Cell Signaling Technology, nr kat. 2983)
- anty-fosfo-mTOR (Ser2448) (D9C2) – królicze przeciwciała monoklonalne (Cell Signaling Technology, nr kat. 5536)
- anty-Nrf-2 (EP1808Y) – królicze przeciwciała monoklonalne (Abcam, nr kat. ab62352)
- anty-SQSTM1/p62 (D5L7G) – mysie przeciwciała monoklonalne (Cell Signaling Technology, nr kat. 88588)
- anty-fosfo-SQSTM1/p62 (Ser349) (E7M1A) – królicze przeciwciała monoklonalne (Cell Signaling Technology, nr kat. 16177)
- anty-fosfo-SQSTM1/p62 (Ser403) – królicze przeciwciała monoklonalne (Cell Signaling Technology, nr kat. 39786)
- anty-Raptor (24C12) – królicze przeciwciała monoklonalne (Cell Signaling Technology, nr kat. 2280)
- anty-fosfo-Raptor (Ser792) – królicze przeciwciała poliklonalne (Cell Signaling Technology, nr kat. 2083)
- anty-ULK1 (D8H5) – królicze przeciwciała monoklonalne (Cell Signaling Technology, nr kat. 8359)
- anty-fosfo-ULK1 (Ser555) (D1H4) – królicze przeciwciała monoklonalne (Cell Signaling Technology, nr kat. 5869)
- anty-Winkulina (E1E9V) – królicze przeciwciała monoklonalne (Cell Signaling Technology, nr kat. 13901)

3.5. Przeciwciała II-rzędowe

- Kozie anty-królicze przeciwciała IRDye (Li-Cor)
- Ośle anty-mysie przeciwciała IRDye (Li-Cor)

3.6. Inhibitory i czynniki wzrostu

- FGF7 (Czynnik wzrostu fibroblastów 7, ang. fibroblast growth factor 7) (PeproTech)
- Tamoksyfen (4-OHT, 4-hydroksytamoksyfen) (Selleckchem)
- Chlorochina (Sigma-Aldrich)

- FMK (Axon Medchem)
- Fulwestrant (ICI-182780) (Selleckchem)
- K67 (Sigma-Aldrich)
- MG132 (Selleckchem)
- SB202190 (Selleckchem)
- SP600125 (Sigma-Aldrich)
- SU6656 (Sigma-Aldrich)
- U0126 (Selleckchem)

3.7. Plazmidy systemu lentiwirusowego

- pHAGE-NFE2L2 (Nrf-2) (Addgene)
- pLKO.1 TRC Lentiviral Human SQSTM1 (p62) shRNA (konstrukt 1: RHS3979-201739509, konstrukt 2: RHS3979-201739510) (Horizon Discovery)
- pMD2.G (Addgene)
- psPAX (Addgene)

3.8. Sondy TaqMan

ACTB (Hs99999903_m1) (Life Technologies)

GAPDH (Hs02786624_g1) (Life Technologies)

HMOX1 (Hs01110250_m1) (Life Technologies)

NFE2L2 (Hs00975960_m1) (Life Technologies)

NQO1 (Hs00168547_m1) (Life Technologies)

SOD1 (Hs00533490_m1) (Life Technologies)

SQSTM1 (Hs00177654_m1) (Life Technologies)

3.9. Inne bufor i roztwory

Bufor PBS, pH 7,4 (10 x stężony roztwór wodny, 1000 ml)

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

Bufor TBS pH 8,2 (Tris-buffer solution) (10 x stężony roztwór wodny, 1000 ml)

- 60,3 g Tris-HCl

- 87,6 g NaCl

TBS-T

- TBS + 0,1% Tween 20

Bufor Laemmli (2 x stężony)

- 20% glicerol
- 4% SDS
- 0,125 M Tris-HCl
- 20% β-merkaptoetanol (opcjonalnie)
- błękit bromofenolowy (opcjonalnie)

Bufor do zbierania komórek (w PBS)

- Inhibitory proteaz (Sigma-Aldrich)
 - 5 mM EGTA
 - 1 mM EDTA
 - 2 mM PMSF (fluorek fenylometylosulfonylu)
 - 10 µg/ml aprotynina
 - 10 µg/ml leupeptyna
- Inhibitory fosfataz i kinaz (Sigma-Aldrich)
 - 2 mM Na₄P₂O₇
 - 5 mM NaF
 - 5 mM Na₃VO₄

Bufor lizujący (bufor Laemmli 2 x stężony)

- Inhibitory proteaz (Sigma-Aldrich)
 - 5 mM EGTA
 - 1 mM EDTA
 - 2 mM PMSF (fluorek fenylometylosulfonylu)
 - 10 µg/ml aprotynina
 - 10 µg/ml leupeptyna
- Inhibitory fosfataz i kinaz (Sigma-Aldrich)
 - 2 mM Na₄P₂O₇

- 5 mM NaF
- 5 mM Na₃VO₄

Bufor do elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) (10 x stężony roztwór wodny, 1000 ml)

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

Bufor do elektrotransferu (1000 ml roztwór wodny)

- 14,43 g Glicyna
- 3,03 g Tris-HCl
- 10% Metanol

3.10. Inne odczynniki

- APS (nadsiarazan amonu), 10% roztwór wodny (Sigma-Aldrich)
- β-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich)
- Błękit bromofenolowy (Roth)
- Brij® (Sigma-Aldrich)
- BSA (albumina surowicy bydlęcej, ang. *Bovine Serum Albumine*) (Roth)
- DMSO (dimetylosulfotlenek) (Roth)
- IGEPAL CA-630 (Sigma-Aldrich)
- LunaScript® RT SuperMix Kit (New England Biolabs) – zestaw do przeprowadzenia odwrotnej transkrypcji
- Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs) – zestaw do przeprowadzenia reakcji qPCR
- Matrigel® (Corning) – o zredukowanym stężeniu czynników wzrostu
- MTT – 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (Sigma-Aldrich)
- Nrf2 Transcription Factor Assay Kit (Abcam)
- TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine) (Sigma-Aldrich)
- Perfect Tricolor Protein Ladder – marker białkowy, zakres 11-245 kDa (EurX)

- Polybrene (Sigma-Aldrich)
- Premo™ Autophagy Tandem Sensor RFP-GFP-LC3B Kit (ThermoFisher)
- Protein G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology)
- Puromycyna (Gibco)
- DC Protein Assay (Bio-Rad) – zestaw do oznaczania stężenia białka metodą Lowry’ego:
 - Protein Assay Reagent A
 - Protein Assay Reagent B
 - Protein Assay Reagent S
- Odczynniki do Proximity Ligation Assay (PLA) (Sigma-Aldrich):
 - Duolink® In Situ Wash Buffers, Fluorescence
 - Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Rabbit MINUS
 - Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Mouse PLUS
 - Duolink® In Situ Detection Reagents Orange
- Rotiphorese Gel 30 (37, 5:1), 30% akrylamid z bis-akrylamidem (Roth)
- TriPure (Roche)
- TurboFect (ThermoFisher) – odczynnik do transfekcji *in vitro*
- Tween 20 (Sigma-Aldrich)
- 4% paraformaldehyd
- VECTASHIELD Vibrance® Antifade Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories)
- Membrana nitrocelulozowa (Cytiva)

3.11. Sprzęt laboratoryjny

- Aparat do elektroforezy i elektrotransferu Trans-Blot (Bio-Rad)
- Czytnik płytek (BioTek)
- Inkubator do hodowli komórkowych – HERAccl VIOS 160i (Thermo Scientific)
- Komora laminarna – MSC Advantage 1.8 (Thermo Scientific)
- Laserowy system detekcji i analizy obiektów fluorescencyjnych w podczerwieni – Odyssey Clx (LI-COR)
- Mieszadło obrotowe – SB2 Rotator (Stuart)
- Mikroskop świetlny – ZEISS PrimoVert z oprogramowaniem ZEN 3.0

- Mikroskop fluorescencyjny – OLYMPUS IX83
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Termoblok (VWR)
- Termocykler CFX96 (Bio-Rad)
- Wirówka – Eppendorf Centrifuge 5410
- Wirówka – Sigma 2-16KL
- Wirówka – Eppendorf Mini Spin plus
- Wyrząsarka o ruchu okrężnym PSU-20i (Grant-Bio)
- Wyrząsarka o ruchu kołyskowym SSL4 (Stuart)
- Zestaw pipet – Eppendorf

4. METODY

4.1. Hodowle komórkowe

Linie komórkowe CAMA-1 oraz MCF7 pozyskano z banku komórkowego ATCC (ang. *American Tissue Culture Collection*), a T47D z DSMZ (ang. *German Collection of Microorganisms*). Wszystkie linie posiadają odpowiednie certyfikaty. Komórki MCF7 oraz T47D hodowano w pożywce DMEM suplementowanej 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS). Komórki CAMA-1 hodowano w pożywce MEM z dodatkiem 10% FBS. Komórki linii MCF7 oraz T47D z wyciszeniem ekspresji genu kodującego FGFR2 (dostępne w repozytorium laboratorium) hodowano w pożywce DMEM z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej oraz antybiotyku selekcyjnego - puromycyny (0,5 µg/ml). Wariant MCF7 w wyprowadzoną opornością na tamoksyfen (MCF7 4-OHT^R, dostępny w repozytorium laboratorium) hodowano w pożywce DMEM suplementowanej 10% FBS oraz 4-hydroksytamoksyfenem (1 µM). Ponadto, do pożywek wszystkich wymienionych linii komórkowych dodawano antybiotyki: penicylinę (100 U/ml) oraz streptomycynę (100 µg/ml). W zależności od specyfikacji danej linii oraz tempa jej wzrostu, pożywkę hodowlaną zmieniano co 3-4 dni, a komórki hodowano do osiągnięcia stopnia konfluencji ok. 90%. Pasaż prowadzono przy użyciu jednokrotnie stężonego roztworu trypsyny z dodatkiem EDTA. Komórki hodowano w inkubatorze, w temp. 37°C, 5% atmosferze wilgotnej oraz 5% wysycenia CO₂. Wszystkie linie komórkowe były rutynowo sprawdzane pod kątem zakażenia mykoplazmą, a maksymalny czas hodowli od momentu rozmrożenia wynosił 4 miesiące.

4.2. Wyprowadzenie linii komórkowych MCF7 oraz T47D z nadekspresją Nrf-2 lub wyciszeniem ekspresji p62

Aby wyprowadzić linie komórkowe MCF7 i T47D z nadekspresją Nrf-2 lub wyciszeniem ekspresji p62 wykorzystano system lentiwirusowego transferu materiału genetycznego. Linie „pakującą” 293T wysiewano na płytce 60 mm tak, aby konfluencja komórek w dniu transfekcji wynosiła ok. 40%. Następnego dnia, co najmniej godzinę przed transfekcją, komórkom zmieniano pożywkę na świeżą. Transfekcję przeprowadzano z użyciem wektorów z systemu lentiwirusowego: pMD2.G (0,4 µg) oraz psPAX2 (1,1 µg). Do wyprowadzenia komórek z nadekspresją Nrf-2 wykorzystano plazmid pHAGE-NFE2L2 (1,4 µg), a do nadekspresji p62 pLKO.1 TRC Lentiviral Human SQSTM1 shRNA (1,4 µg). Mieszaninę transfekcyjną przygotowano w 200 µl pożywki DMEM bez dodatku surowicy, do której dodano odpowiednie ilości wektorów

z systemu lentiwirusowego, plazmidu warunkującego nadekspresję Nrf-2 lub wyciszenie p62 oraz 4 μ l odczynnika transfekcyjnego TurboFect (stosunek ilości DNA do Turbofectu – 1:2). Następnie po uprzednim delikatnym zamieszaniu, mieszaninę transfekcyjną inkubowano 20 minut w temperaturze pokojowej, po czym równomiernie rozprowadzano na płytkę z komórkami poprzez delikatne nakrapianie. Kolejnego dnia komórkom zmieniano pożywkę na świeżą, którą po ok. 36 godzinach (czas potrzebny do „produkcji” wirusa) zbierano do probówki 15 ml. Do pożywki dodawano odczynnik zwiększający wydajność infekcji (Polybrene, 5 μ g/ml), filtrowano ją przez filtr strzykawkowy PVDF (0,22 μ m) i przeprowadzano infekcję linii docelowych – MCF7 oraz T47D. Następnego dnia pożywkę zmieniano na świeżą, a procedurę infekcji powtórzono tzw. reinfekcja. W przypadku nadekspresji p62 przeprowadzono selekcję komórek z wykorzystaniem puromycyny. Jako kontrolę selekcji zastosowano wariant dziki linii MCF7 i T47D. Otrzymane linie komórkowe z potwierdzoną nadekspresją p62 były rutynowo hodowane w pożywce z dodatkiem puromycyny (0,5 μ g/ml). W przypadku plazmidu na nadekspresję Nrf-2, niosącego gen białka zielonej fluorescencji (GFP), wydajność procedury weryfikowano przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej. Ponadto nadekspresję danego białka potwierdzano przy pomocy analizy Western blotting. Jako kontrole zastosowano komórki nieinfekowane oraz transdukowane „pustym” wektorem.

4.3. Liza komórek

Do przygotowania lizatów komórkowych wykorzystywano komórki wysiane na płytkach o średnicy 60 mm, których stopień konfluencji nie przekraczał 80-90%. Cała procedura była wykonywana na lodzie. Po usunięciu pożywki hodowlanej komórki dwukrotnie płukano buforem PBS a następnie dodawano 1 ml schłodzonego buforu do zbierania komórek. Komórki mechanicznie usuwano z płytki przy pomocy skrobaczki, a otrzymaną zawiesinę przenoszono do probówek 1,5 ml i wirowano (wirówka Eppendorf Mini Spin plus) przez 1 minutę przy maksymalnej prędkości (14 100 x g). Po usunięciu supernatantu osad zawieszano w buforze do lizy (120–150 μ l) i dokładnie rozpipetowywano. Tak przygotowane próbki inkubowano w termobloku w temp. 90°C przez 10 minut, wortexowano i mrożono w temp. -20°C. Procedurę powtarzano dwu- lub trzykrotnie, do całkowitego rozpuszczenia się osadu. Tak przygotowane lizaty przechowywano w temp. -20°C.

4.4. Pomiar stężenia białka w lizatach komórkowych

Do wyznaczenia stężenia białka w lizatach komórkowych wykorzystywano zestaw odczynników DC Protein Assay (Bio-Rad) oparty na metodzie Lowry'ego. Przygotowano odczynnik A', mieszając Protein Assay Reagent S oraz Protein Assay Reagent A w stosunku 20 μ l : 1000 μ l. Na płytkę 96-dołkową nanoszono w trzech powtórzeniach 2,5 μ l lizatu komórkowego, 25 μ l odczynnika A' oraz 200 μ l odczynnika Protein Assay Reagent B, a następnie płytkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15-60 minut i wykonywano pomiar absorbancji przy użyciu czytnika płytek (BioTek) przy długości fali $\lambda = 650$ nm. Stężenie białka w przygotowanych lizatach określano z wykorzystaniem krzywej wzorcowej zależności stężenia białka od absorbancji. Na tej podstawie przygotowywano próbki o równym stężeniu białka (zwykle w zakresie stężenia ok. 1 μ g białka/1 μ l) poprzez odpowiednie rozcieńczenie lizatów w buforze Laemmli 4 x stężonym (z dodatkiem β -merkaptoetanolu i błękitu bromofenolowego).

4.5. Elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Do przeprowadzenia rozdzielania elektroforetycznego używano żeli poliakrylamidowych składających się z 8-15% żelu rozdzielającego (dolnego) oraz 5% żelu zagęszczającego (górnego). Procentowość żelu rozdzielającego wybierano z uwzględnieniem masy cząsteczkowej oznaczanych białek. Do studzienek nanoszono próbki zawierające równą ilość białka (30 μ g). Stosowano marker białkowy (Perfect Tricolor Protein Ladder). Elektroforezę pionową prowadzono w aparacie firmy Bio-Rad, wypełnionym buforem do elektroforezy, przy napięciu prądu 90-110 V.

4.6. Western blotting

Do elektrotransferu białek z żelu poliakrylamidowego na membranę nitrocelulozową wykorzystywano metodę całonocnego transferu „mokrego”, przeprowadzoną w aparacie firmy Bio-Rad przy stałym napięciu prądu 35V, w temp. 4°C. Następnie membrany płukano w roztworze TBS-T, blokowano w roztworze 5% odtłuszczonego mleka w proszku w TBS-T oraz ponownie płukano w TBS-T. Kolejnym krokiem była całonocna inkubacja membran z odpowiednimi przeciwciałami I-rzędowymi (przygotowanymi w 3% roztworze albuminy surowicy bydlęcej w TBS-T z dodatkiem 5% azydku sodu) w temp. 4°C. Kolejnego dnia membrany płukano trzykrotnie w roztworze TBS-T, inkubowano przez 60 minut z przeciwciałami

II-rzędowymi znakowanymi fluorescencyjnie (przygotowanymi w buforze do blokowania), ponownie płukano, a następnie suszono. Detekcji sygnału fluorescencyjnego dokonywano przy użyciu laserowego systemu detekcji w podczerwieni Odyssey Clx (LI-COR).

4.7. Hodowle trójwymiarowe (3D)

Hodowle komórek T47D oraz CAMA-1 w warunkach trójwymiarowych prowadzono w Matrigelu na płytce 12-dołkowej. Komórki trypsynizowano i zliczano w komorze Neubauera, a następnie wysiewano w ilości $1,5 \times 10^3$ komórek T47D oraz 3×10^3 komórek CAMA-1 w postaci kropli Matrigelu o objętości 40 μ l (rozcieńczenie Matrigelu z pożywką hodowlaną w stosunku 1:1). W każdym dołku płytki umieszczano po 2 krople Matrigelu. W celu zapewnienia warunków do polimeryzacji Matrigelu płytkę z komórkami inkubowano przez 45 minut w 37°C. Po inkubacji do dołków dodawano 800 μ l pożywki hodowlanej suplementowanej FGF7 (50 ng/ml) i heparyną (50 ng/ml) i/lub odpowiednimi inhibitorami. Pożywkę zmieniano co trzeci dzień, a hodowla była prowadzona przez 12-16 dni w zależności od tempa proliferacji charakterystycznego dla danej linii komórkowej. Na zakończenie eksperymentu wykonywano reprezentatywne zdjęcia przy użyciu mikroskopu świetlnego ZEISS PrimoVert wyposażonego w kamerę (AxioCam ERc 5s) oraz oprogramowanie ZEN 3.0. Do oceny wzrostu komórek wykorzystywano oprogramowanie ImageJ, w którym mierzono wielkość kolonii (średnicę) co najmniej 50 kolonii z każdego warunku. Do obliczenia istotności statystycznej wykorzystywano test t-Studenta.

W przypadku linii MCF7, która nie tworzy regularnych sferoidów w kroplach Matrigelu zastosowano hodowlę komórek na „poduszce” z Matrigelu. W tym celu używano ośmiokomorowych szkiełek mikroskopowych (ang. *chamber-slides*), przeznaczonych do hodowli komórek w warunkach *in vitro*, które opłaszczano 100 μ l Matrigelu i inkubowano przez 20-30 minut w temp 37°C, aż do momentu polimeryzacji i utworzenia tzw. „poduszki”. W tym czasie komórki MCF7 trypsynizowano, zliczano w komorze Neubauera, a następnie wysiewano w ilości 5×10^3 komórek/komorę w objętości 200 μ l pożywki i ponownie inkubowano przez 20-30 minut w temp 37°C. Po tym czasie do każdej komory dodawano po 200 μ l pożywki hodowlanej z dodatkiem Matrigelu, którego końcowe stężenie w pożywce wynosiło 4%. Ponadto do pożywki dodawano odpowiednio FGF7 (50 ng/ml) i/lub odpowiednie inhibitory. Pożywkę

zmieniano co 3 dni, a hodowlę prowadzono 10-12 dni. Na koniec hodowli wykonywano reprezentatywne zdjęcia oraz mierzono wielkość kolonii.

4.8. Testy proliferacyjne (MTT)

Komórki w ilości (5×10^3) wysiewano na płytkę 96-dołkową w trzech powtórzeniach dla każdego warunku. Po 24 godzinach pożywkę hodowlaną zmieniano na świeżą, suplementowaną odpowiednio FGF7 (50 ng/ml) i/lub fulwestrantem (0,1 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M). Po upływie 72 godzin do każdego dołka dodawano 24 μ l MTT i prowadzono inkubację przez 2 godziny w temp. 37°C. Po upływie tego czasu usuwano pożywkę a powstałe kryształy formazanu rozpuszczano w 50 μ l DMSO. Żywotność komórek oceniano na podstawie pomiaru spektrofotometrycznego przy długości fali $\lambda = 570$ nm.

4.9. Frakcjonowanie komórek

Komórki wysiewano na płytki 100 mm, tak aby w dniu frakcjonowania osiągały 80-90% konfluencji. Następnego dnia komórki traktowano przez 24 godziny pożywką suplementowaną FGF7 (50 ng/ml). Jako kontrolę używano komórki rosnące w pożywce hodowlanej, bez dodatku czynnika wzrostu. Po upływie 24 godzin usuwano pożywkę, a komórki płukano schłodzonym buforem PBS. Następnie komórki zbierano i przenoszono do probówki w 1 ml buforu PBS (jak w przypadku przygotowywania lizatów komórkowych) oraz wirowano przez 5-10 sekund ($10\,000 \times g$). Po zlaniu supernatantu osad zawieszano w 900 μ l schłodzonego buforu PBS z dodatkiem inhibitorów proteaz i fosfataz oraz 0,1% detergentu IGEPAL CA-630 (NP-40). Zawiesinę delikatnie rozpipetowywano i ponownie wirowano przez 5-10 sekund ($10\,000 \times g$), następnie przenoszono do nowej probówki 300 μ l supernatantu (frakcja cytoplazmatyczna). Pozostały supernatant usuwano, a osad zawieszano w 1 ml buforu PBS z dodatkiem inhibitorów proteaz i fosfataz oraz 0,1% NP-40. Powtarzano delikatne rozpipetowywanie i ponownie wirowano przez 5-10 sekund ($10\,000 \times g$), zlewano supernatant, otrzymany osad zawieszano w 150 μ l 1 x stężonego buforu Laemmli (frakcja jądrowa), a następnie inkubowano w termobloku w temp. 90°C przez 1 minutę. Dokonywano pomiaru stężenia białka w otrzymanych próbkach, do których kolejno dodawano odpowiednią ilość 4 x stężonego buforu Laemmli. Tak przygotowane próbki były następnie rozdzielane w trakcie elektroforezy SDS-PAGE. Jako kontrolę frakcji jądrowej zastosowano przeciwciała anti-Lamina B1 a frakcji cytoplazmatycznej anti-Winkulina.

4.10. Test na aktywność Nrf-2

Aktywność Nrf-2 mierzono przy pomocy komercyjnie dostępnego testu kolorymetrycznego Nrf-2 Transcription Factor Assay Kit (Abcam), opartego na metodzie immunoenzymatycznej ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*). W teście wykorzystywano płytkę 96-dołkową opłaszczoną specyficznym oligonukleotydem, wiążącym jedynie aktywny Nrf-2. Na taką płytkę nanoszono 20 µg ekstraktu jądrowego wyizolowanego zgodnie z procedurą opisaną w sekcji Frakcjonowanie komórek i inkubowano przez 60 minut w temp. pokojowej, łagodnie wytrząsając (100 x g). Następnie dołki trzykrotnie płukano i inkubowano z przeciwciałami anty-Nrf-2 (dołączonymi do zestawu) przez 60 minut w temp. pokojowej. Ponownie płukano i inkubowano w tych samych warunkach z przeciwciałami II-rzędowymi, dołączonymi do zestawu. Przed wywołaniem testu wykonywano płukanie, a następnie mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 450$ nm, na podstawie której oceniano aktywność Nrf-2.

4.11. Ilościowa reakcja PCR (qPCR)

W celu przeprowadzenia łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym komórki wysiewano na płytkach 60 mm. Przed stymulacją FGF7 (50 ng/ml) komórki inkubowano przez noc w pożywce bezsurowiczej (tzw. „głodzenie”). Izolację RNA wykonywano za pomocą odczynnika TriPure (Roth), zgodnie z zaleceniami producenta. Stężenie oraz czystość wyizolowanego RNA określano na podstawie pomiaru spektrofotometrycznego (NanoDrop ND-1000). Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano przy użyciu 1 µg wyizolowanego RNA oraz zestawu LunaScript® RT SuperMix Kit (New England Biolabs). Do reakcji PCR stosowano zestaw Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs) oraz sondy TaqMan (wymienione w sekcji materiały). Każdą próbkę nanoszono na płytkę 96-dołkową w dwóch powtórzeniach, a eksperyment powtarzano co najmniej 3 razy. Analizę poziomu ekspresji genów przeprowadzano w programie CFX Manager (Bio-Rad) z wykorzystaniem metody $\Delta\Delta CT$ z normalizacją do poziomu ekspresji genów referencyjnych - *ACTB* i *GAPDH*. W każdym eksperymencie zastosowano kontrolę negatywną, pozbawioną materiału genetycznego oraz kontrolę sprawdzającą obecność DNA w próbce wyizolowanego RNA.

4.12. Monitorowanie procesu autofagii przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej

Do monitorowania procesu autofagii wykorzystywano komercyjnie dostępny zestaw Premo™ Autophagy Tandem Sensor RFP-GFP-LC3B Kit (ThermoFisher), procedurę wykonywano zgodnie z zaleceniami producenta. Komórki wysiewano na ośmiokomorowe szkiełka mikroskopowe w liczbie 3×10^4 komórek/dolek. Następnego dnia komórki transdukowano bakulowirusem zawierającym konstrukt LC3-GFP-RFP i inkubowano przez całą noc. Kolejnego dnia zmieniano pożywkę na świeżą z dodatkiem 50 ng/ml FGF7 i inkubowano przez 24 godziny. Po tym czasie pożywkę usuwano, komórki przepłukiwano PBS, a preparat utrwalano przy pomocy 4% paraformaldehydu. Jądra komórkowe barwiono przy pomocy barwnika fluorescencyjnego DAPI (VECTASHIELD Vibrance® Antifade Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories). Tak przygotowany preparat analizowano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (OLYMPUS IX83). Ilość czerwonych i zielonych punktów zliczano przy pomocy programu ImageJ. Analizowano co najmniej 100 komórek na dany warunek.

4.13. PLA (ang. Proximity Ligation Assay)

Metodą PLA sprawdzano interakcję Keap1/Nrf-2. W tym celu komórki MCF7 i T47D wysiewano na 8-komorowe szkiełka mikroskopowe (ang. *chamber-slides*) w liczbie 4×10^4 komórek/dolek. Następnie komórki głodzono przez noc w pożywce bezsurowiczej, po czym inkubowano przez 60 minut z FGF7 (50 ng/ml). Po tym czasie komórki płukano buforem PBS, zarówno przed jak i po utrwaleniu przy użyciu 4% roztworu paraformaldehydu, a następnie przeprowadzano permabilizację błon komórkowych za pomocą 0,1% Triton X-100 w temp. 4°C. Po przepłukaniu preparatów przy użyciu PBS inkubowano je w roztworze 3% BSA i 3% FBS w PBS aby zapobiec niespecyficznym oddziaływaniom przeciwciał. Po nocnej inkubacji z przeciwciałami anti-Nrf-2 i anti-Keap1 w 4°C i płukaniach PBS, preparaty inkubowano w 37°C z przeciwciałami drugorzędowymi (anti-mysimi oraz anti-króliczymi) skoniugowanymi z oligonukleotydami.

4.14. Statystyka

Wszystkie doświadczenia *in vitro* zostały powtórzone co najmniej trzykrotnie dla każdego badanego warunku. Wyniki z testów 3D w Matrigelu, testów proliferacyjnych czy Western blottingu przedstawiono w postaci reprezentatywnych

zdjęć odzwierciedlających obserwowane tendencje. Prezentowane dane przedstawiono jako średnie wartości \pm odchylenie standardowe (SD). Analizę statystyczną wykonano za pomocą testu t-Studenta. Wartości $*p < 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

4.15. Analiza *in silico*

Analizę *in silico* przeprowadzono z wykorzystaniem publicznie dostępnej bazy danych (kohorta METABRIC [Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium] z cBioPortal™)(Curtis et al, 2012; Pereira et al, 2016), z której pozyskano informacje na temat ekspresji genów *FGFR2* i *NFE2L2* (kodującego Nrf-2), oznaczanych metodą mikromacierzy ekspresyjnych oraz cech kliniczno-patologicznych pacjentek. Kryteria włączenia obejmowały chore z wcześniej nieleczonym, inwazyjnym rakiem piersi ER+/PR+ (n=825), dostępnymi informacjami na temat ich statusu menopauzalnego oraz danymi z obserwacji przebiegu choroby (ang. *follow up*). Klasyfikacji guzów do grup o niskim/wysokim poziomie ekspresji badanego genu dokonano w oparciu o odciętą w postaci mediany (*NFE2L2*) lub pierwszej tercji (*FGFR2*) wartości ekspresji w całej grupie (n=825). Analizę korelacji ekspresji genów wykonano testem tau b-Kendalla, Spearmana i Pearsona. Rozkład zmiennych ciągłych pomiędzy grupami porównano testem Manna-Whitneya-Wilcoxon. Przeżycie wolne od nawrotu choroby (RFS) przedstawiono za pomocą krzywej Kaplana-Meiera a analizę przeżycia przeprowadzono przy użyciu modelu regresji proporcjonalnego hazardu Cox'a.

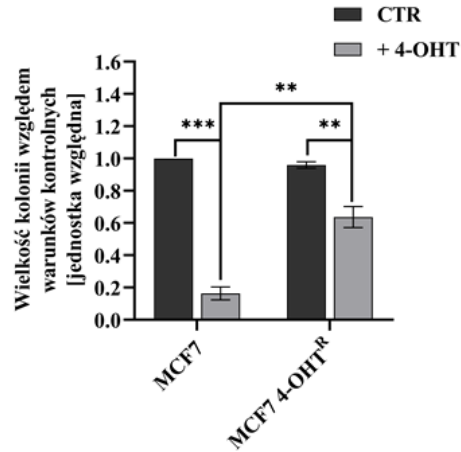
5. WYNIKI

5.1. Analiza poziomu autofagii w komórkach luminalnego raka piersi z nabytą opornością na tamoksyfen

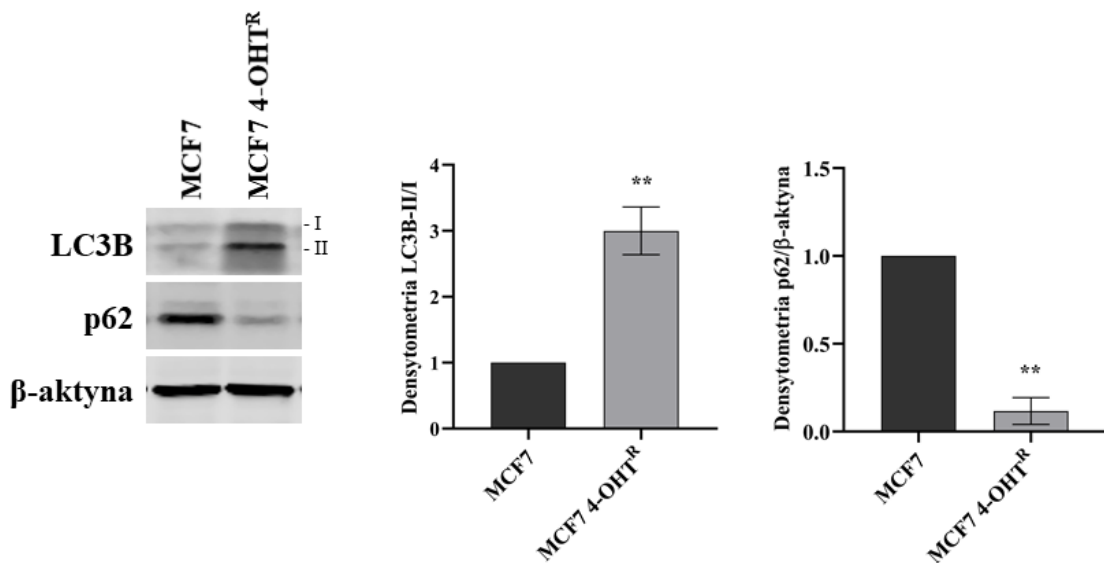
Dane literaturowe dostarczają mocnych dowodów na udział autofagii w przeżyciu komórek nowotworowych traktowanych lekami anti-ER (tamoksyfenem czy fulwestrantem) oraz wykształcaniu mechanizmów oporności na te leki (Crawford et al, 2010; Samaddar et al, 2008; Schoenlein et al, 2009). Wykazano, że zahamowanie autofagii (przy pomocy inhibitorów lub wyciszenia ekspresji genów kluczowych dla tego procesu) przywracało pierwotną wrażliwość komórek nowotworowych na działanie leków anti-ER (Cook et al, 2014; Duan et al, 2014; Felzen et al, 2015; Lee et al, 2018; Qadir et al, 2008; Sun et al, 2021). Z drugiej strony zwiększony poziom autofagii zaobserwowano w liniach komórkowych luminalnego raka piersi z wyprowadzoną opornością na tamoksyfen. W związku z tym pierwszy etap projektu obejmował sprawdzenie poziomu autofagii w komórkach MCF7 (jednej z modelowych linii luminalnego raka piersi) oraz jej wariancie MCF7 4-OHT^R z wyprowadzoną opornością na tamoksyfen (dostępny w repozytorium laboratorium) (Ryc. 4A). Przy pomocy analizy Western blot sprawdzono poziom białkowy dwóch powszechnie uznawanych markerów autofagii – LC3B oraz p62. Zaobserwowano wzrost poziomu LC3B-II (forma błonowa) w stosunku do LC3B-I (forma cytoplazmatyczna) w wariancie z wyprowadzoną opornością na tamoksyfen (Ryc. 4B). Może to świadczyć o indukcji procesu autofagii i zwiększonej ilości autofagosomów, z drugiej strony zaś podwyższony poziom LC3B-II może być spowodowany zahamowaniem procesu na jego późniejszym etapie. Wytyczne dotyczące stosowania i interpretacji testów do monitorowania autofagii zalecają jednoczesne sprawdzanie kilku markerów (Klionsky et al, 2021a). W komórkach białko p62 jest degradowane na końcowym etapie tego procesu. Monitorowanie spadku poziomu tego białka pozwala potwierdzić, że nie doszło do zahamowania autofagii. Zaobserwowano, że komórki MCF7 4-OHT^R miały znacznie niższy poziom ekspresji p62 w porównaniu do komórek MCF7.

Otrzymane wyniki sugerują zgodnie z licznymi danymi literaturowymi zwiększony poziom autofagii w komórkach MCF7 4-OHT^R, co wskazuje na potencjalne zaangażowanie procesu w wykształcanie się oporności komórek na działanie tamoksyfenu.

A.



B.



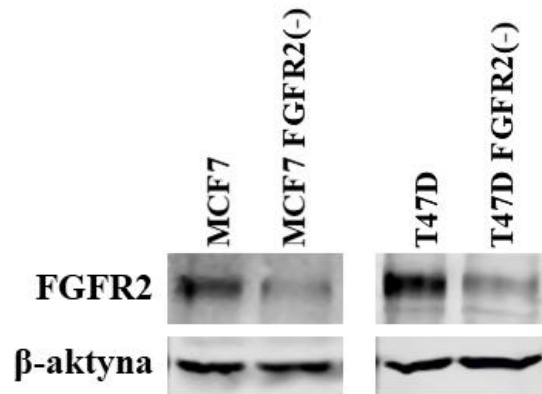
Rycina 4. Poziom LC3B oraz p62 w komórkach linii MCF7 i wariacie z wyprowadzoną opornością na tamoksyfen - MCF7 4-OHT^R. (A) Odpowiedź komórek MCF7 i MCF7 4-OHT^R na działanie 4-hydroksytamoksyfenu (4-OHT, 1 μ M) sprawdzono w teście 3D w Matrigelu. Warunki kontrolne (CTR) stanowiła pełna pożywka hodowlana. Wielkość kolonii zmierzono przy pomocy programu ImageJ, po czym wykonano analizę statystyczną. (B) Poziom markerów autofagii oceniono przy pomocy metody Western blot. Wykresy przedstawiają pomiary densytometryczne poziomu poszczególnych białek względem β -aktyny (dla p62) oraz stosunek LC3-II do LC3-I; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; $n = 3$.

5.2. Analiza udziału sygnalizacji FGF7/FGFR2 w regulacji autofagii

W naszych wcześniejszych badaniach wykazaliśmy, że sygnalizacja FGFR2 znosiła działanie tamoksyfenu na wzrost komórek luminalnego raka piersi (Mieczkowski et al, 2022; Turczyk et al, 2017). Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje oraz dostępne dane literaturowe potwierdzające zaangażowanie autofagii w wykształcaniu oporności przez komórki raka piersi na leki anty-ER, w kolejnym etapie projektu postanowiono ocenić udział sygnalizacji FGFR2 w regulacji procesu autofagii. W związku z tym w badaniach *in vitro* większość analiz wykonano wykorzystując dwie modelowe linie luminalnego raka piersi, MCF7 oraz T47D. W testach sprawdzających wzrost komórek w środowisku trójwymiarowym (3D) w Matrigelu model *in vitro* poszerzono o trzecią linię komórkową luminalnego raka piersi – CAMA-1. Co ważne, wszystkie zastosowane linie stanowiące model badawczy w prezentowanym projekcie wykazują ekspresję FGFR2.

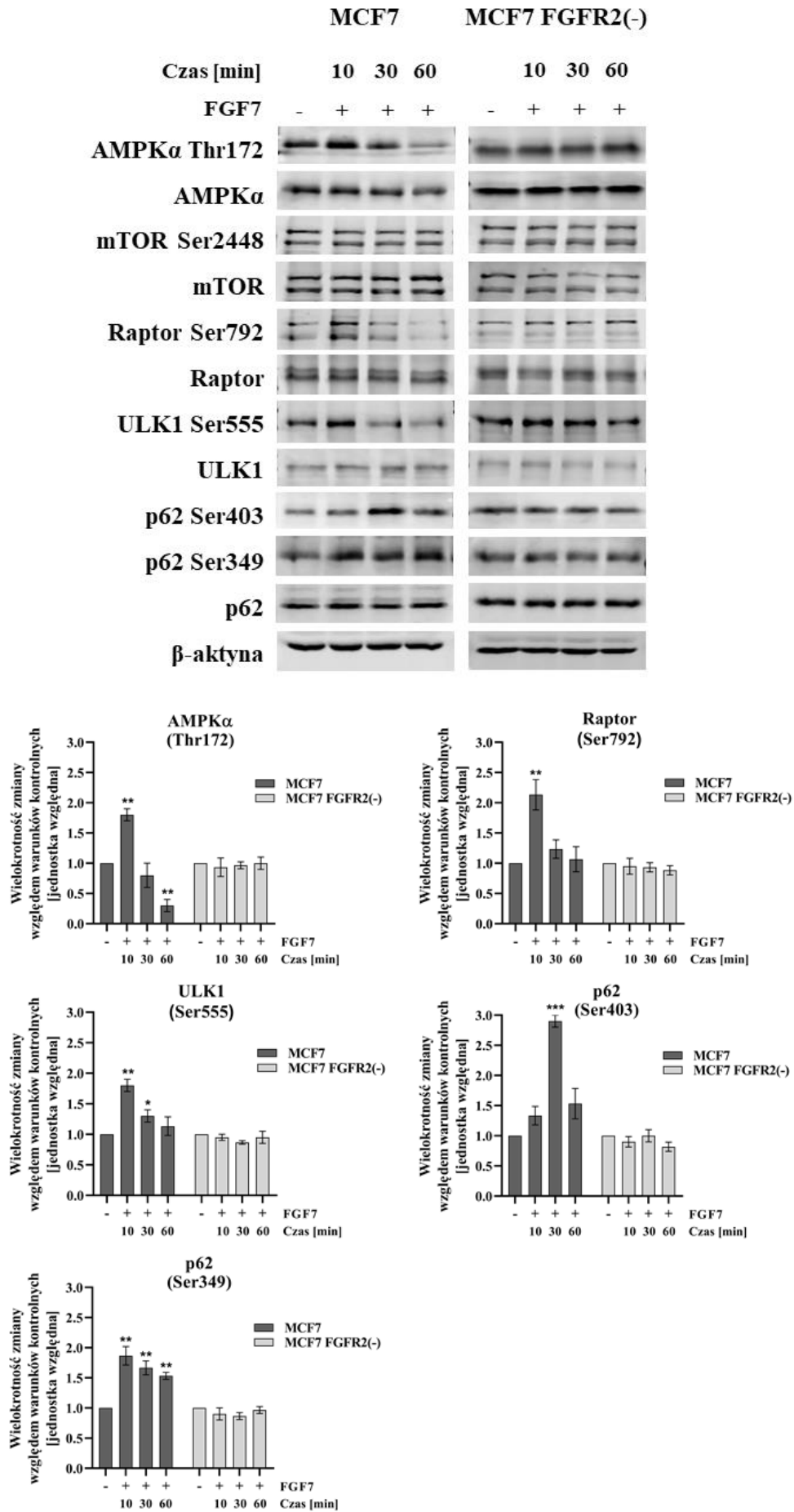
W celu oceny zaangażowania FGFR2-zależnej sygnalizacji w regulacji autofagii, komórki MCF7 i T47D oraz ich FGFR2-ujemne warianty (z wyciszoną ekspresją FGFR2, tj. MCF7 FGFR2(-) oraz T47D FGFR2(-), dostępne w repozytorium laboratorium) traktowano FGF7 (50 ng/ml) - ligandem tego receptora o najwyższym powinowactwie przez 10, 30 i 60 minut. Wykorzystanie wariantów linii MCF7 oraz T47D z wyciszoną ekspresją FGFR2 (Ryc. 5) umożliwiło potwierdzenie, że zaobserwowane efekty są zależne od sygnalizacji FGFR2. Analiza Western blot poziomu ekspresji i aktywacji białek zaangażowanych w indukcję (AMPK α , ULK1 i p62) i hamowanie (kinaza mTOR) autofagii wykazała, że stymulacja FGF7 (mimo pewnych różnic w kinetyce) indukuje fosforylację treoniny 172 AMPK α , seryny 555 ULK1 oraz seryny 792 Raptor zarówno w linii MCF7 (Ryc. 6A), jak i T47D (Ryc. 6B). Ponadto w obydwu liniach zaobserwowano fosforylację białka p62 w serynie 403 (odpowiadającej za inicjację autofagii) oraz w serynie 349 (prowadzącej do dysocjacji kompleksu Keap1/Nrf-2, a w konsekwencji aktywacji czynnika transkrypcyjnego Nrf-2). Nie zaobserwowano natomiast fosforylacji mTOR w serynie 2448. Co istotne, w przypadku komórek MCF7 FGFR2(-) oraz T47D FGFR2(-) nie zaobserwowano FGF7-zależnych zmian w poziomie fosforylacji badanych białek (AMPK α , ULK1, p62, mTOR, Raptor). Uzyskane wyniki pokazują, że sygnalizacja FGF7/FGFR2 aktywuje białka AMPK α i ULK1, odpowiedzialne za indukcję procesu autofagii, oraz białko p62 (marker autofagii i aktywator czynnika transkrypcyjnego Nrf-2). Wyciszenie ekspresji FGFR2 znosi efekty

FGF7 względem obserwowanych fosforylacji, dowodząc ich specyficzności względem ścieżki FGF7/FGFR2.

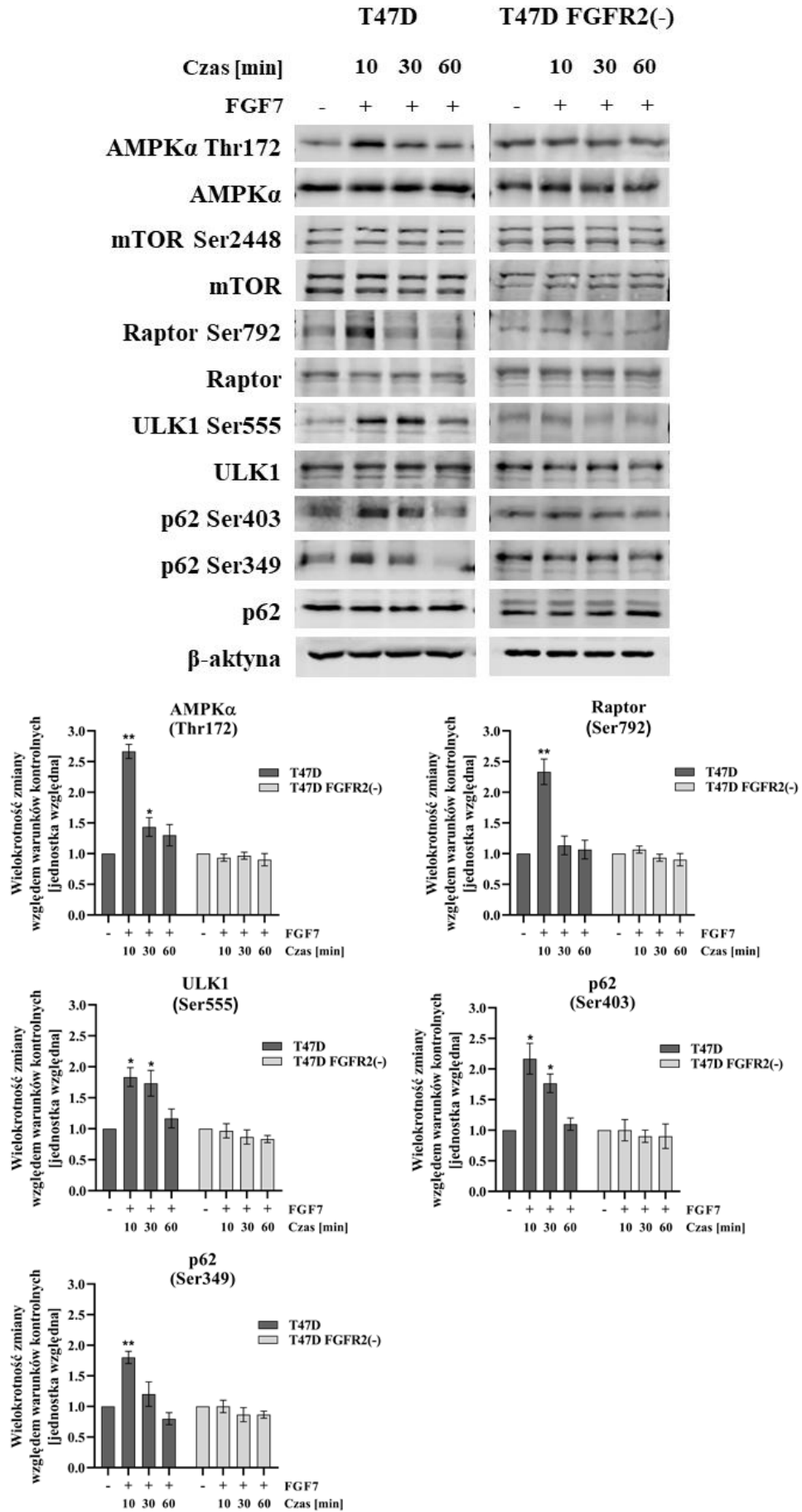


Rycina 5. Komórki MCF7 FGFR2(-) oraz T47D FGFR2(-) posiadają niższy poziom białka FGFR2 niż ich warianty macierzyste (MCF7, T47D). Wydajność wyciszenia ekspresji FGFR2 sprawdzono metodą Western blot.

A.



B.

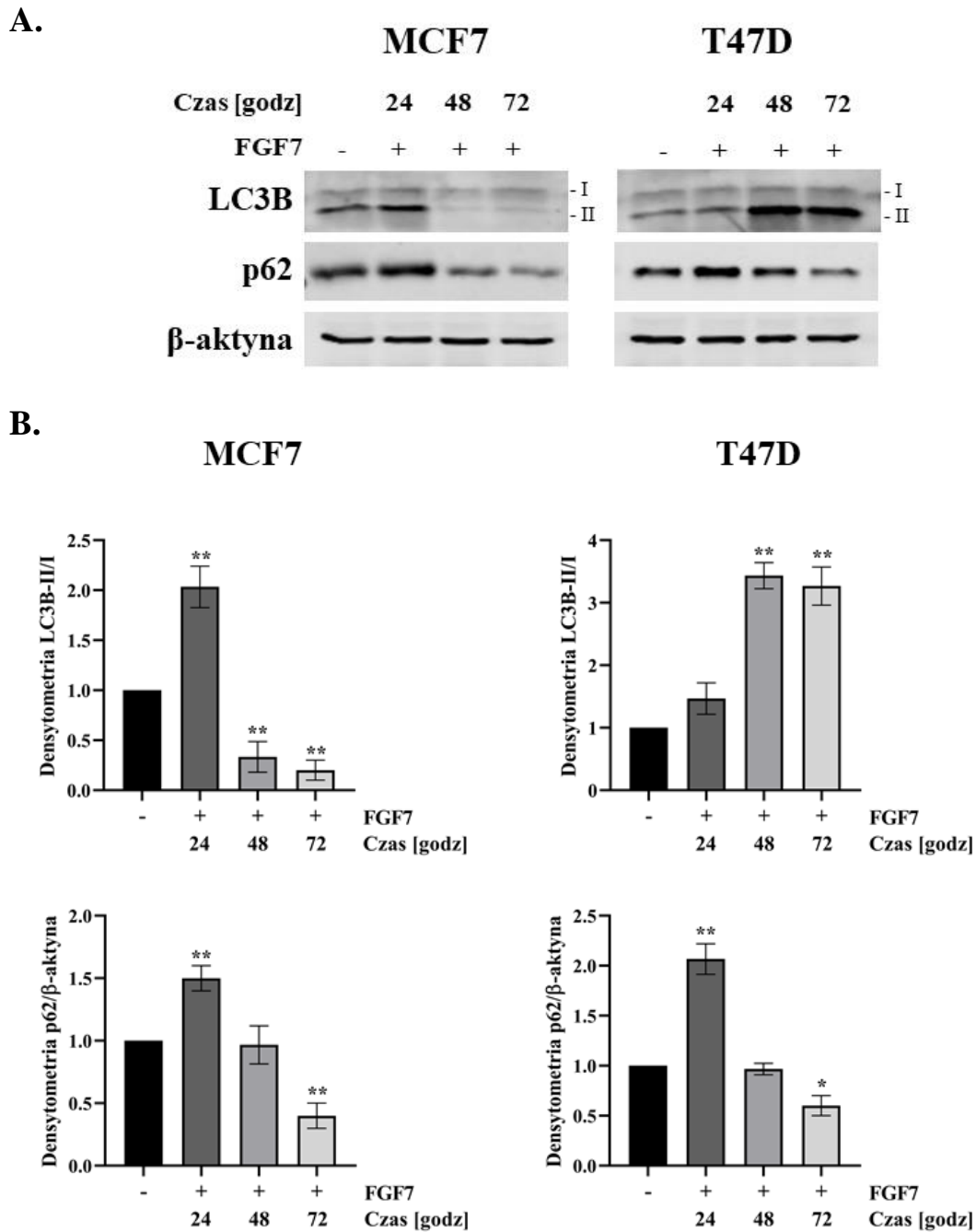


Rycina 6. Ścieżka sygnalizacyjna FGF7/FGFR2 aktywuje białka odpowiadające za indukcję autofagii (AMPK α , ULK1, p62 Ser403) oraz czynnika transkrypcyjnego Nrf-2 (p62 Ser349).

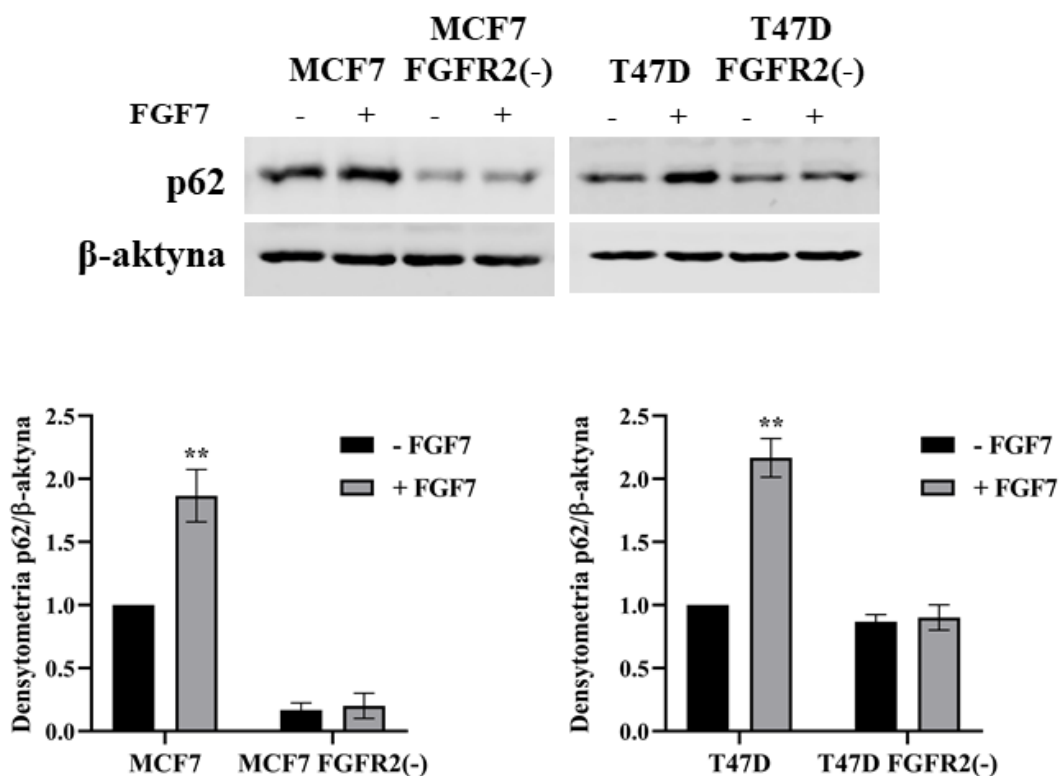
(A) Komórki linii MCF7 i MCF7 FGFR2(-) oraz (B) linii T47D i T47D FGFR2(-) inkubowano z FGF7 (50 ng/ml) przez 10, 30 i 60 minut. Analizę poziomu ekspresji i fosforylacji AMPK α , mTOR, Raptor, ULK1 i p62 wykonano przy pomocy metody Western blot. Wykresy przedstawiają pomiary densytometryczne poziomu poszczególnych białek względem β -aktyny w warunkach kontrolnych; * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001; n=3.

Następnie sprawdzono poziom ekspresji LC3B oraz p62. Wzrost poziomu białka LC3B-II, wskazujący na indukcję autofagii, zaobserwowano po 24 godzinach inkubacji z FGF7 w komórkach MCF7 oraz 48 godzinach w linii T47D (Ryc. 7A). W obydwu liniach komórkowych odnotowano lekki wzrost poziomu p62 po 24 godzinach inkubacji z FGF7. Jak wskazują dane literaturowe, początkowy wzrost poziomu ekspresji p62 może świadczyć o rekrutacji tego białka do autofagosomów (Klionsky et al, 2021a). Co istotne, spadek poziomu ekspresji p62 odzwierciedlający końcowy etap całego procesu autofagii zaobserwowano po 48 lub 72 godzinach (zależnie od linii) inkubacji z FGF7 (Ryc. 7B). Aby potwierdzić zależność obserwowanych zmian względem FGFR2 ponownie wykorzystano linie MCF7 i T47D z wyciszoną ekspresją tego receptora, które inkubowano z FGF7 przez 24 godziny. Był to czas, po którym obserwowano wzrost poziomu ekspresji w wariantach dzikich tych linii. W przypadku wariantów linii FGFR2-ujemnych nie zaobserwowano różnic w poziomie białka p62 będących efektem traktowania komórek FGF7 (Ryc. 8). Zastanawiający jednak był spadek poziomu ekspresji p62 w MCF7 FGFR2(-) w porównaniu do wariantu dzikiego. Być może wyciszenie ekspresji FGFR2 w tej linii spowodowało aktywację mechanizmu kompensacyjnego, odpowiedzialnego za obserwowany spadek. W każdym razie stymulacja FGF7 tej linii komórkowej nie powodowała zmian w poziomie ekspresji p62.

Uzyskane wyniki potwierdzają więc, że autofagia może być m.in. indukowana ścieżką sygnalizacyjną FGF7/FGFR2.



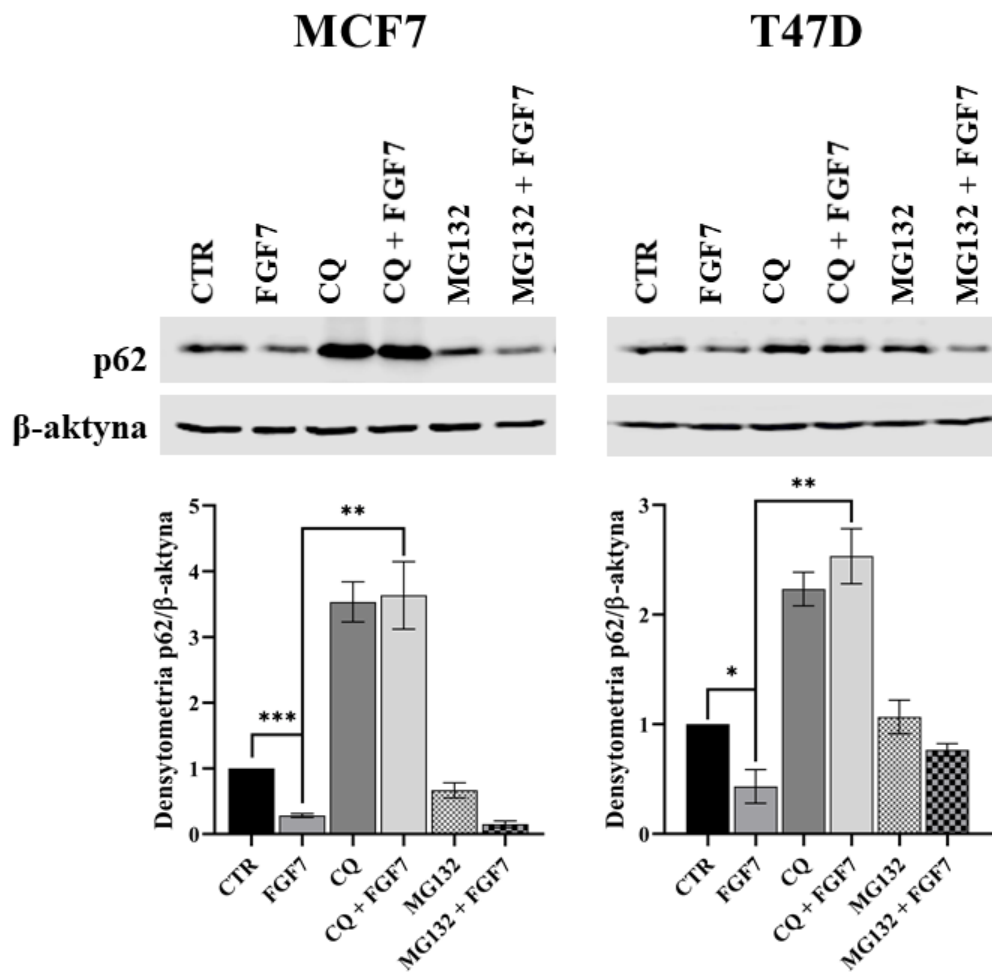
Rycina 7. Sygnalizacja FGFR2 reguluje poziom markerów autofagii – LC3B i p62.
 (A) Komórki linii MCF7 i T47D hodowano w obecności FGF7 (50 ng/ml) przez 24, 48 i 72 godziny. Analizę poziomu ekspresji markerów autofagii wykonano przy pomocy metody Western blot. (B) Wykresy przedstawiają pomiary densytometryczne poziomu poszczególnych białek względem β -aktyny w warunkach kontrolnych; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; $n = 3$.



Rycina 8. FGFR2-zależna regulacja poziomu p62 w liniach MCF7 i T47D. Analiza poziomu ekspresji LC3B oraz p62 w komórkach linii MCF7 i T47D oraz ich FGFR2-ujemnych wariantach - MCF7 FGFR2(-) oraz T47D FGFR2(-) przy pomocy metody Western blot. Komórki inkubowano z FGF7 (50 ng/ml) przez 24 godziny. Wykresy przedstawiają pomiary densytometryczne poziomu poszczególnych białek względem β-aktyny w warunkach kontrolnych; ** p<0,01; n=3.

Literatura specjalistyczna dotycząca badania autofagii zaleca monitorowanie procesu w obecności jego inhibitora (Klionsky et al, 2021a). W celu potwierdzenia degradacji p62 na drodze lizosomalnej w procesie autofagii użyto chlorochiny (CQ), najlepiej zbadanego i weryfikowanego w badaniach klinicznych inhibitora autofagii. Jego mechanizm działania obejmuje końcowy etap procesu - blokowanie fuzji autofagosomu z lizosomem (Mauthe et al, 2018). p62 w procesach innych niż autofagia może być degradowany również na drodze proteasomalnej, stąd też użyto inhibitora tego procesu – MG132. Zastosowanie wyżej wymienionych inhibitorów pozwoliło na ocenę ścieżki sygnalizacyjnej zaangażowanej w FGFR2-zależną utratę p62. Komórki linii MCF7 i T47D hodowano w obecności FGF7 przez 72 godziny – był to czas, po którym w poprzednim doświadczeniu zaobserwowano spadek poziomu ekspresji p62 odzwierciedlający końcowy etap autofagii. W przypadku CQ zaobserwowano znaczny

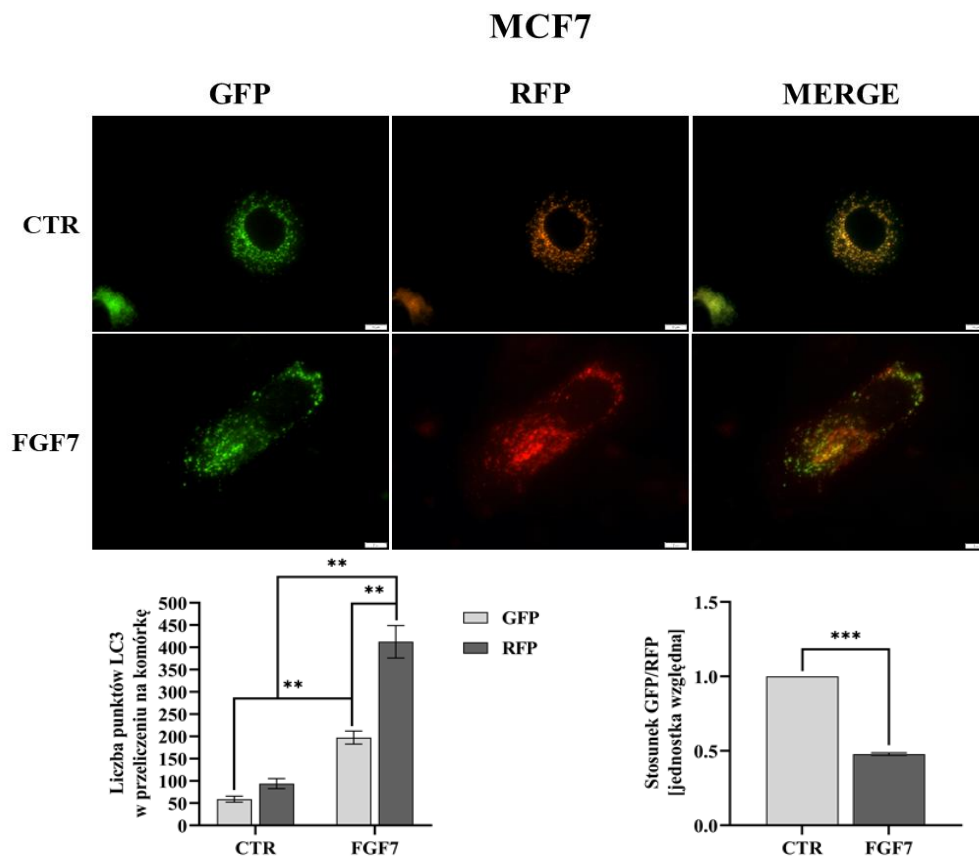
wzrost w poziomie p62 w stosunku do warunków kontrolnych w obydwu testowanych liniach komórkowych (Ryc. 9). Tego efektu nie wykazano w przypadku inhibitora MG132. Zahamowanie ścieżki lizosomalnej, w przeciwieństwie do proteasomalnej, znosiło więc efekt aktywności FGF7/FGFR2 obejmujący utratę p62. Podsumowując, sygnalizacja FGFR2 kieruje białko p62 do degradacji na drodze lizosomalnej w procesie autofagii.



Rycina 9. FGF7 indukują utratę p62 na drodze lizosomalnej. Komórki MCF7 (lewy panel) i T47D (prawy panel) hodowano w obecności FGF7 (50 ng/ml) i/lub chlorochiny (CQ, 1 μ M), MG132 (2 μ M). Analizę poziomu ekspresji p62 wykonano przy pomocy metody Western blot. Wykresy przedstawiają pomiary densytometryczne poziomu poszczególnych białek względem β -aktyny w warunkach kontrolnych; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; $n = 3$.

Aby dodatkowo zweryfikować udział FGFR2 w regulacji autofagii zastosowano komercyjnie dostępny zestaw Premo™ Autophagy Tandem Sensor RFP-GFP-LC3B Kit. W metodzie tej używa się białko fuzyjne-LC3B sprzężone z białkami zielonej (GFP) oraz czerwonej (RFP) fluorescencji, które różnią się stabilnością w kwaśnym środowisku.

Pozwala to na monitorowanie powstawania autofagosomów i autolizosomów przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej. Autofagosomy są obserwowane jako żółte punkty powstałe ze wspólnego świecenia GFP oraz RFP. Ponieważ białko GFP nie jest stabilne w kwaśnym środowisku lizosomu, obserwowane czerwone punkty wskazują na lokalizację LC3B w autolizosomach. Komórki MCF7 hodowano w obecności FGF7 (50 ng/ml) przez 24 godziny. Po tym czasie zaobserwowano znaczny wzrost zarówno ilości autofagosomów, jak i autolizosomów w porównaniu do warunków kontrolnych (Ryc. 10). Przyrost ilości autofagosomów pod wpływem FGF7 świadczy o aktywacji procesu autofagii. Z kolei większa ilość autolizosomów w porównaniu do autofagosomów w obecności FGF7 świadczy o fuzji autofagosomów z lizosomami, co potwierdza, że proces zaszedł całkowicie i nie był zahamowany na jednym z jego etapów. Intensywność autofagii wyrażono również jako stosunek sygnału GFP/RFP. Jego spadek pod wpływem FGF7 świadczy o zwiększonym natężeniu procesu autofagii.



Rycina 10. Sygnalizacja FGFR2 indukuje tworzenie się autofagosomów i autolizosomów. Komórki MCF7 transdukiowane bakulowirusem zawierającym konstrukcję LC3-GFP-RFP inkubowano w obecności FGF7 (50 ng/ml) przez 24 godziny. Zliczono liczbę punktów LC3/komórkę oraz obliczono stosunek sygnału GFP/RFP. Prezentowane dane są średnimi wartościami \pm SD z co najmniej 100 ocenianych komórek; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; $n=3$.

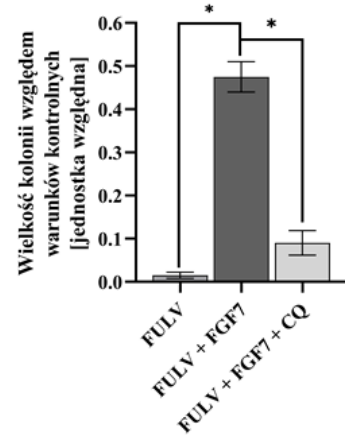
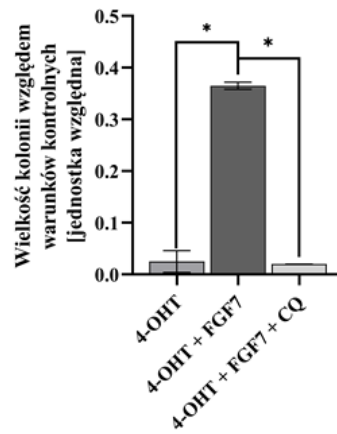
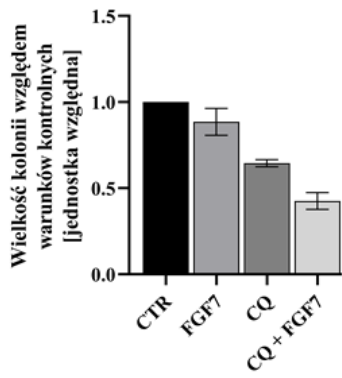
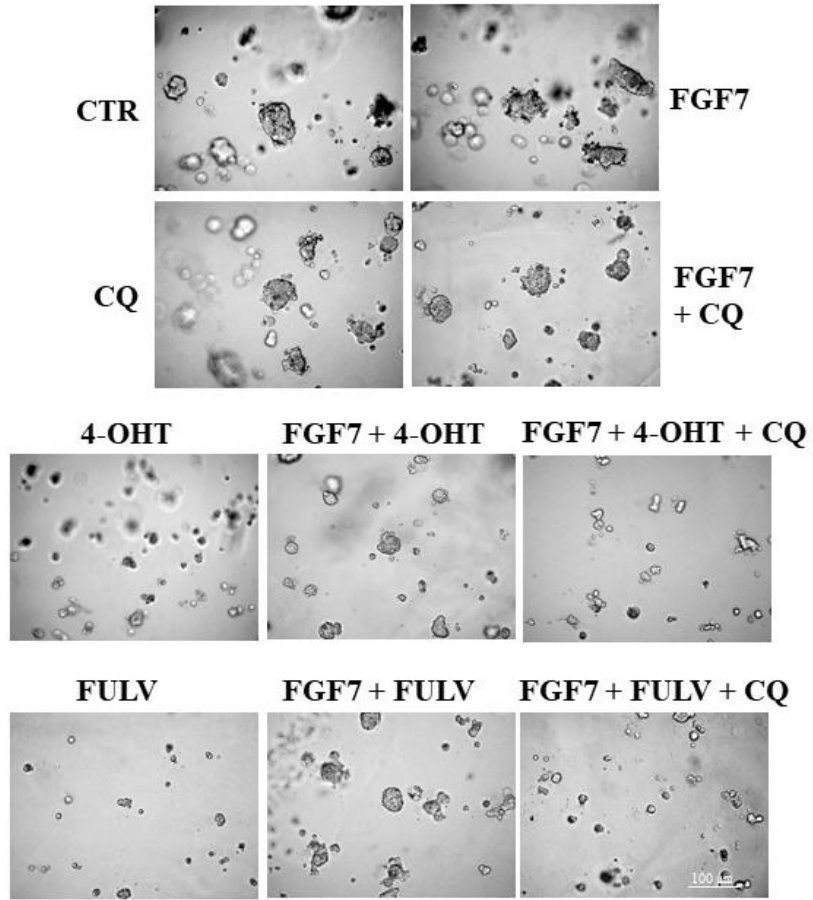
Podsumowując, wykonane analizy Western blot i doświadczenie z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej jednoznacznie potwierdzają, że sygnalizacja FGF7/FGFR2 aktywuje proces autofagii.

5.3. Ocena udziału współzależności FGFR2/autofagia w odpowiedzi komórek raka piersi na leki anty-ER

Kolejny etap niniejszego projektu obejmował analizę udziału FGFR2-indukowanej autofagii w odpowiedzi komórek raka piersi na leki anty-ER (tamoksyfen oraz fulwestrant). W tym celu wykonano doświadczenia w środowisku trójwymiarowym (3D) z wykorzystaniem Matrigelu, który lepiej odzwierciedla warunki panujące *in vivo* (w tkance gruczołu piersiowego) niż standardowe hodowle dwuwymiarowe. Testy wzrostu 3D przeprowadzono na trzech liniach komórkowych luminalnego raka piersi – MCF7, T47D oraz CAMA-1. Komórki hodowano w obecności FGF7 (50 ng/ml) i/lub tamoksyfenu (1 μ M), fulwestrantu (100 nM), a także inhibitora autofagii – chlorochiny. Wielkość kolonii komórek MCF7 w obecności FGF7 była zbliżona do warunków kontrolnych (Ryc. 11A). W przypadku komórek linii T47D (Ryc. 11B) oraz CAMA-1 (Ryc. 11C) zaobserwowano zgodnie z oczekiwaniami, że sam dodatek FGF7 znacznie stymulował wzrost w porównaniu do warunków kontrolnych. Potwierdzono, że dodatek FGF7 chroni wszystkie badane komórki raka piersi przed działaniem tamoksyfenu, podobnie jak we wcześniejszych pracach naszego zespołu (Turczyk et al, 2017). Analogicznie w przypadku fulwestrantu zaobserwowano efekt ochronny FGF7 na wzrost komórek T47D, CAMA-1 i MCF7. Aby ocenić, czy FGFR2-zależna autofagia jest zaangażowana w zaobserwowane efekty ochronne wobec leków anty-ER zastosowano inhibitor tego procesu. Dodatek CQ znosił ochronne efekty FGF7 wobec tamoksyfenu i fulwestrantu. Otrzymane wyniki wskazują na udział współzależności FGFR2/autofagia w promocji oporności komórek raka piersi wobec leków anty-ER.

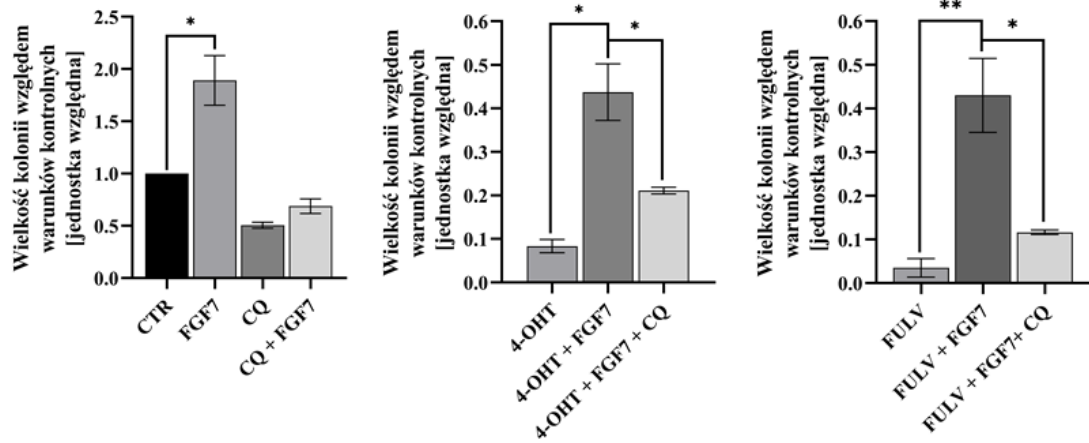
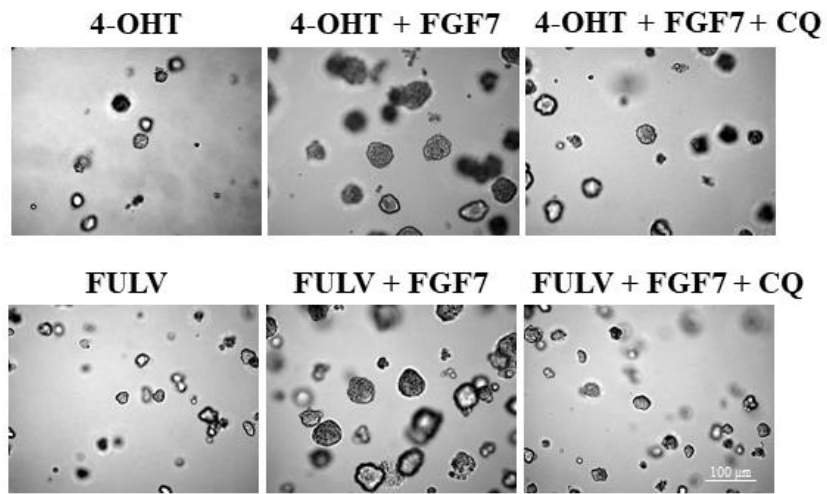
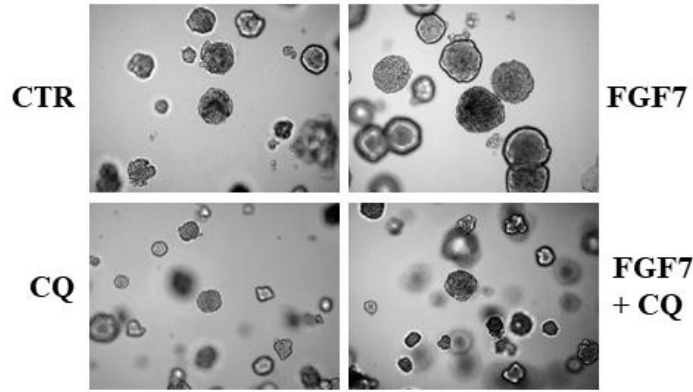
A.

MCF7

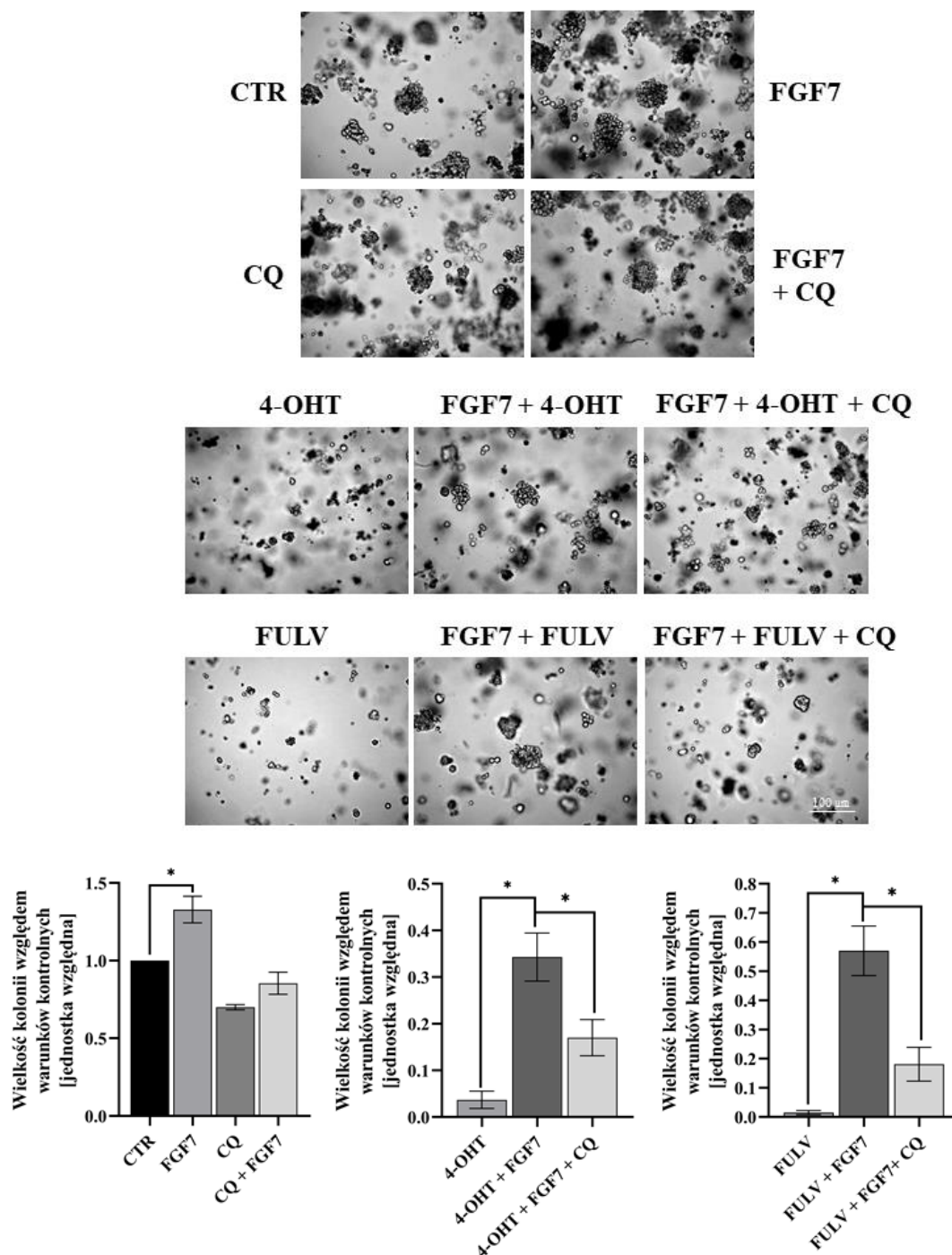


B.

T47D



C. CAMA-1

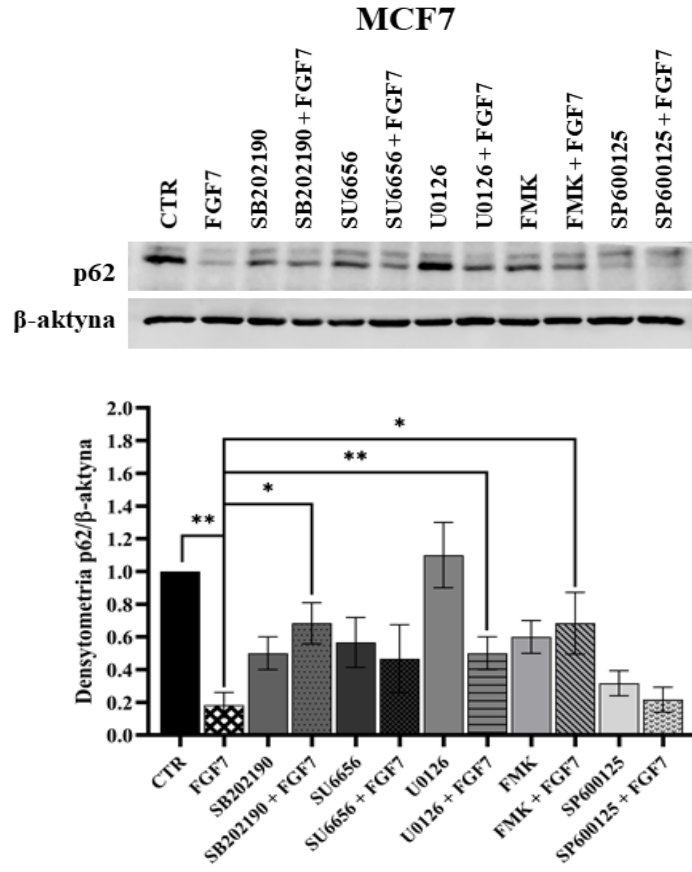


Rycina 11. Inhibicja autofagii znosi efekt ochronny FGF7 wobec leków anti-ER (tamoksyfenu i fulwestrantu). Komórki linii MCF7 (A), T47D (B) oraz CAMA-1 (C) zawieszono w Matrigelu i hodowano w pełnej pożywce z dodatkiem FGF7 (50 ng/ml) i/lub 4-hydroksytamoksyfenu (4-OHT, 1 μ M), fulwestrantu (FULV, 100 nM) lub chlorochiny (1 μ M). Warunki kontrolne (CTR) stanowiła pełna pożywka hodowlana. Zdjęcia wykonano po 12-16 dniach hodowli (powiększenie 100-krotne). Wielkość kolonii zmierzono przy pomocy programu ImageJ; prezentowane dane są średnimi wartościami \pm SD (n = 3); * p < 0,05, ** p < 0,01.

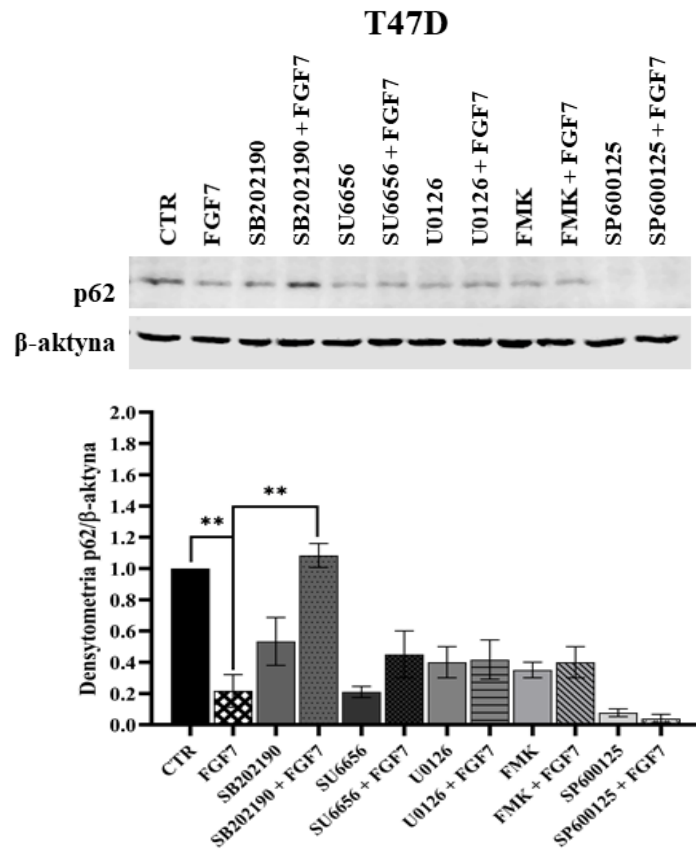
5.4. Analiza FGFR2-zależnego mechanizmu molekularnego regulacji autofagii

Sygnalizacja FGFR inicjuje szereg kaskad sygnalizacyjnych, wśród których wyróżnia się kinazy MAPK, PI3K/Akt, PKC czy białka STAT (Turner & Grose, 2010; Zheng et al, 2022). W związku z zaobserwowaną aktywacją autofagii przez FGF7/FGFR2 oraz udziale autofagii w promowanej przez FGFR2 oporności na leki anti-ER, postanowiono zidentyfikować ścieżkę sygnalizacyjną zależną od FGFR2, odpowiedzialną za indukcję tego procesu. Do niniejszego doświadczenia wybrano następujące inhibitory: SB202190 (inhibitor p38; 10 uM), SU6656 (inhibitor Src; 10 uM), U0126 (inhibitor ERK1/2; 5 uM), FMK (inhibitor RSK2; 10 uM) oraz SP600125 (inhibitor JNK; 10 uM). Komórki MCF7 i T47D hodowano przez 72 godziny w obecności samego FGF7 (50 ng/ml) lub z dodatkiem odpowiedniego inhibitora. Metodą Western blot sprawdzono poziom ekspresji białka p62. Do dalszych badań poszukiwano inhibitora, którego dodatek do FGF7 będzie zniósł indukowany przez ten czynnik wzrostu spadek poziomu p62 (hamował indukowaną przez FGF7 autofagię). W przypadku linii MCF7 zwiększony poziom ekspresji p62 zaobserwowano m.in. w obecności inhibitora p38 (SB202190), ERK1/2 (U0126) oraz RSK2 (FMK) (Ryc. 12A). Z kolei w komórkach T47D znoszenie FGF7-zależnego spadku poziomu p62 zaobserwowano tylko w przypadku zastosowania inhibitora p38 (Ryc. 12B). Stąd też do dalszych analiz wybrano inhibitor p38 (SB202190).

A.

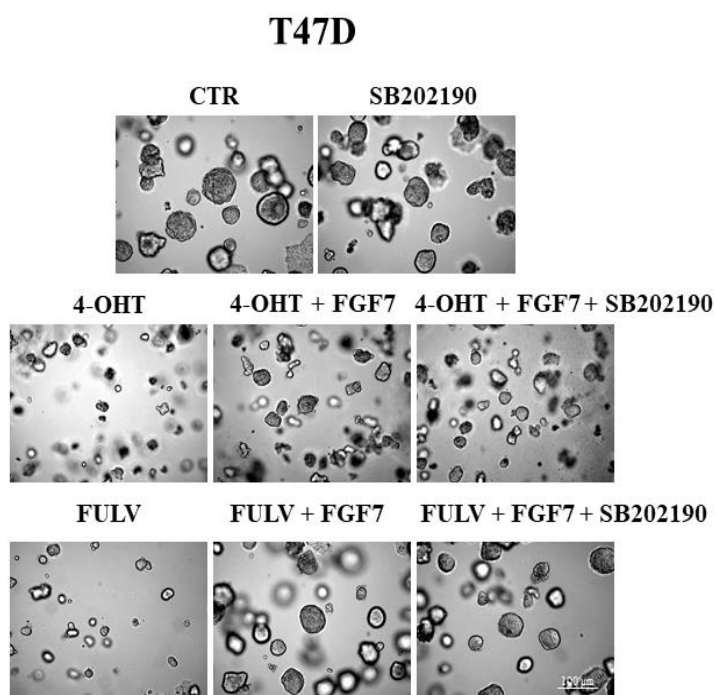


B.



Rycina 12. Identyfikacja ścieżki sygnalizacyjnej zaangażowanej w FGFR2-zależną indukcję autofagii. Komórki linii MCF7 (A) i T47D (B) przez 72 godziny hodowano w obecności FGF7 (50 ng/ml) lub z dodatkiem inhibitorów: SB202190 (10 uM), SU6656 (10 uM), U0126 (5 uM), FMK (10 uM) oraz SP600125 (10 uM). Analizę ekspresji p62 na poziomie białka wykonano metodą Western blot. Wykresy przedstawiają pomiary densytometryczne poziomu poszczególnych białek względem β -aktyny w warunkach kontrolnych; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; $n = 3$.

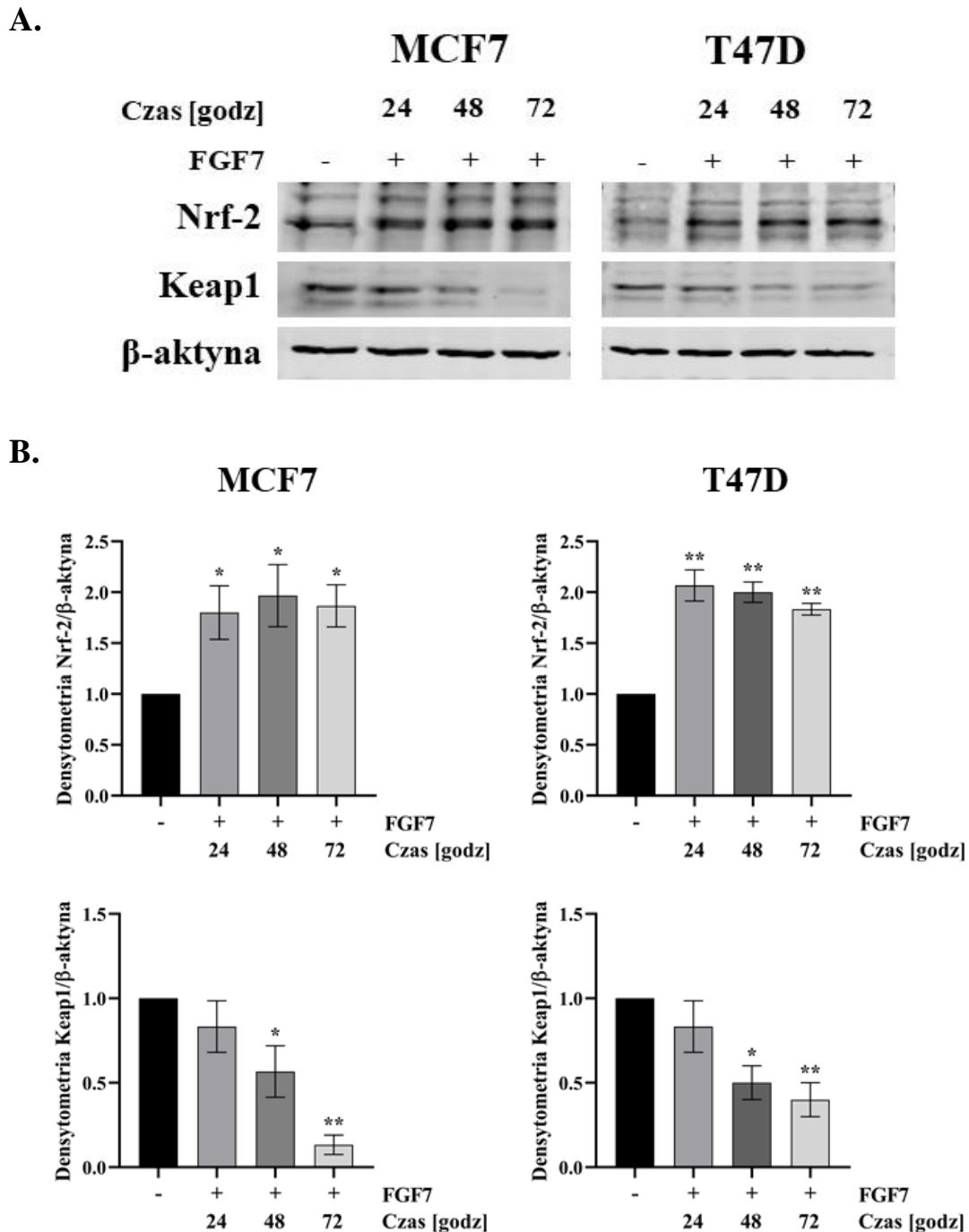
Kolejny etap pracy obejmował sprawdzenie, czy zahamowanie p38 przez SB202190 (10 uM) znieśie promujący wzrost komórek efekt FGF7 w środowisku 3D w obecności tamoksyfenu. Dodatek SB202190 do FGF7 i tamoksyfenu nie zniósł ochronnego efektu FGF7 wobec tego leku anty-ER (Ryc. 13). Na podstawie tego doświadczenia można przypuszczać, że aktywność p38 nie jest zaangażowana w FGFR2-zależną indukcję autofagii, a tym samym jej udział w promowanej przez FGFR2 oporności na leki anty-ER.



Rycina 13. p38 nie bierze udziału w promowanej przez FGFR2 oporności na leki anty-ER. Komórki linii T47D zawieszono w Matrygelu i hodowano w pełnej pożywce z dodatkiem 10 uM SB202190, a także FGF7 (50 ng/ml) i/lub 4-hydroksytamoksyfenu (4-OHT, 1 μ M), fulwestrantu (FULV, 100 nM). Warunki kontrolne (CTR) stanowiła pełna pożywka. Zdjęcia wykonano po 12-16 dniach hodowli (powiększenie 100-krotne).

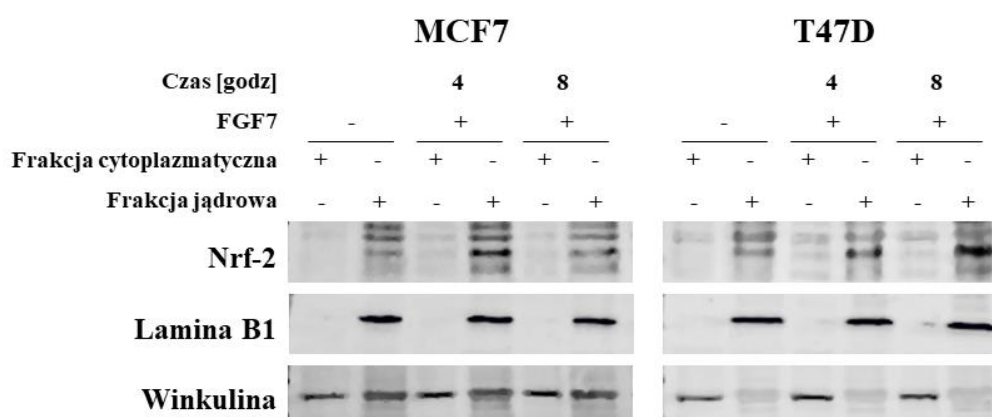
5.5. Ocena wpływu sygnalizacji FGFR2-zależnej na regulację kompleksu Keap1/Nrf-2

Podjęta w poprzednich doświadczeniach próba wyznaczenia FGFR2-zależnego mechanizmu molekularnego odpowiedzialnego za indukcję autofagii nie przyniosła oczekiwanych rezultatów. Wykazano, że p38 nie bierze udziału w promowanej przez FGFR2 oporności na leki anty-ER. Założono więc, że istnieje inny mechanizm zaangażowany w obserwowane efekty. Wiele doniesień wskazuje na istnienie zależności pomiędzy autofagią a ścieżką sygnalizacyjną Keap1/Nrf-2 (Kageyama et al, 2021; Komatsu et al, 2010). Oba te procesy łączy białko p62, będące jednocześnie markerem autofagii i głównym regulatorem kompleksu Keap1/Nrf-2. Z kolei udział Nrf-2 w powstawaniu oporności na terapie anty-ER został udokumentowany w wielu pracach (Bekele et al, 2016; Kim et al, 2008; Naumann et al, 2023). Z racji zanotowanej na początkowym etapie projektu fosforylacji białka p62 w serynie 349, odpowiadającej za dysocjację kompleksu Keap1/Nrf-2 i aktywację czynnika transkrypcyjnego Nrf-2, sprawdzono poziom ekspresji tych białek metodą Western blot. Komórki MCF7 i T47D hodowano w obecności FGF7 przez 24, 48 i 72 godziny. W przypadku obydwu linii komórkowych zaobserwowano, że aktywacja FGFR2 promuje wzrost poziomu ekspresji czynnika transkrypcyjnego Nrf-2 z równoczesną utratą poziomu Keap1 (Ryc. 14). Sugeruje to zaangażowanie ścieżki FGFR2 w dysocjację tego kompleksu. Nrf-2 niezwiązany z Keap1 może ulegać translokacji do jądra komórkowego, gdzie pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego i reguluje zależne mu geny (Rojo De La Vega et al, 2018).



Rycina 14. Sygnalizacja FGFR2 reguluje ekspresję Keap1 i Nrf-2. (A) Komórki linii MCF7 i T47D hodowano w obecności FGF7 (50 ng/ml) przez 24, 48 i 72 godziny. Analizę poziomu ekspresji Keap1 i Nrf-2 wykonano przy pomocy metody Western blot. (B) Wykresy przedstawiają pomiary densytometryczne poziomu poszczególnych białek względem β -aktyny w warunkach kontrolnych (B); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; $n=3$.

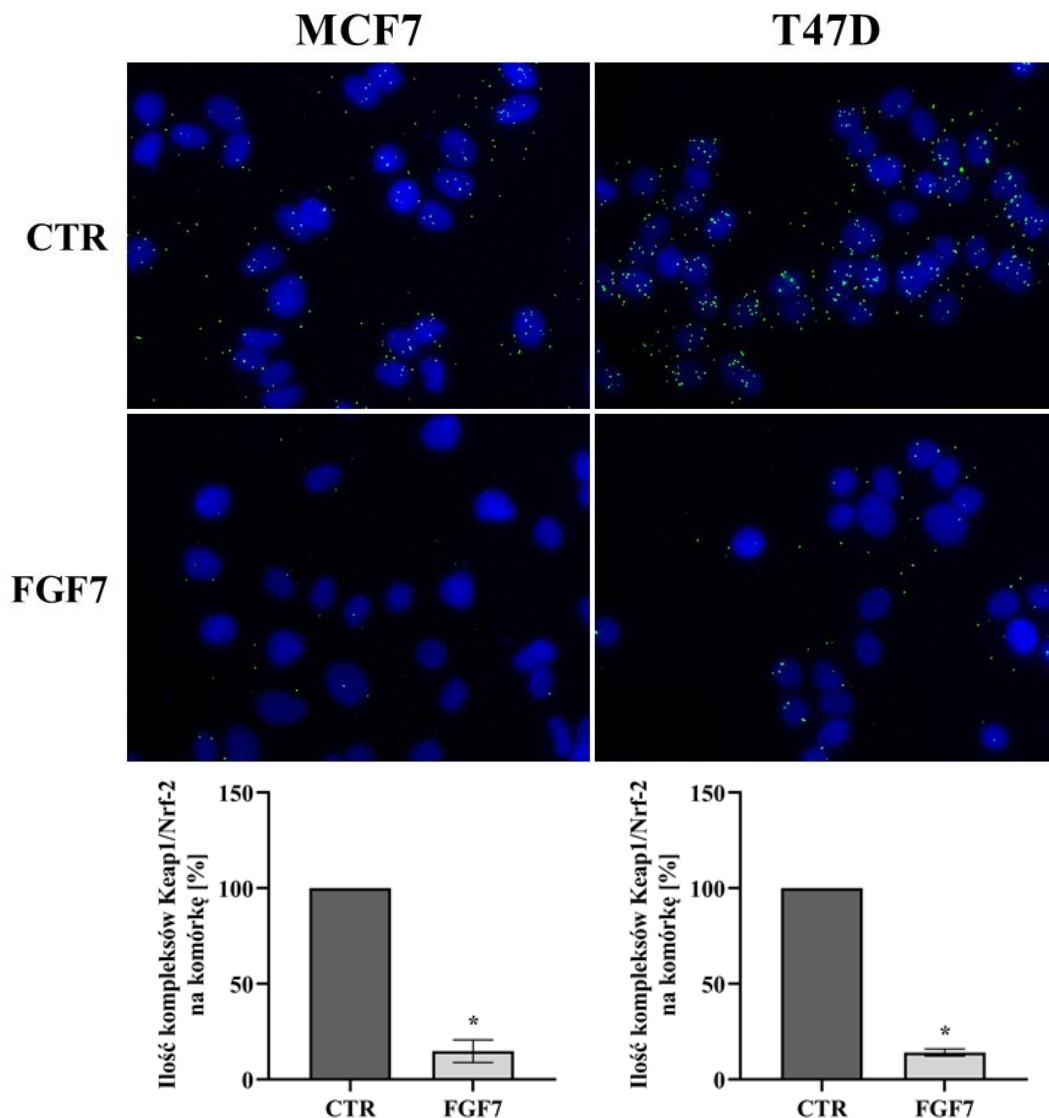
Dlatego też następnie sprawdzono, czy pod wpływem aktywacji FGFR2 zmienia się komórkowa lokalizacja Nrf-2. W tym celu wykonano frakcjonowanie lizatów komórkowych linii MCF7 i T47D po 4 i 8 godzinach ich traktowania FGF7 (50 ng/ml). Jako kontrolę frakcji cytoplazmatycznej zastosowano białko Winkulinę, a frakcji jądrowej Laminę B1. W przypadku obu linii komórkowych zaobserwowano przyrosty poziomu Nrf-2 we frakcji jądrowej (po 4 godzinach dla MCF7 i 4-8 godzinach dla T47D) indukowane stymulacją FGF7 (Ryc. 15). Zarówno MCF7, jak i T47D charakteryzowały się stosunkowo niskim poziomem ekspresji Nrf-2 we frakcjach cytoplazmatycznych. Zaobserwowane po stymulacjach FGF7 wzbogacenie frakcji jądrowej (białkiem Nrf-2) sugeruje, że sygnalizacja FGFR2-zależna może uczestniczyć w jego translokacji do jądra komórkowego.



Rycina 15. Sygnalizacja FGFR2 promuje przyrost Nrf-2 w jądrze komórkowym. Komórki linii MCF7 (lewy panel) i T47D (prawy panel) hodowano w obecności FGF7 (50 ng/ml) przez 4 i 8 godzin. Wyizolowano frakcje cytoplazmatyczną oraz jądrową. Poziom ekspresji Nrf-2 sprawdzono metodą Western blot. Jako kontrolę frakcji cytoplazmatycznej zastosowano Winkulinę, a frakcji jądrowej Laminę B1; n=3.

Jedną ze stosunkowo specyficznych i czułych metod badania interakcji białko-białko jest PLA (ang. *Proximity Ligation Assay*). Jest to metoda immunocytochemiczna, która łączy specyficzność testu ELISA z czułością PCR. Polega ona na wykorzystaniu dwóch sond, w skład których wchodzi drugorzędowe przeciwciało skoniugowane z syntetycznym oligonukleotydem, pełniącym rolę reportera. Sondy te rozpoznają przeciwciała pierwszorzędowe przyłączone do białek znajdujących się w kompleksie, efektem czego jest powstawanie sygnału fluorescencyjnego. W celu potwierdzenia

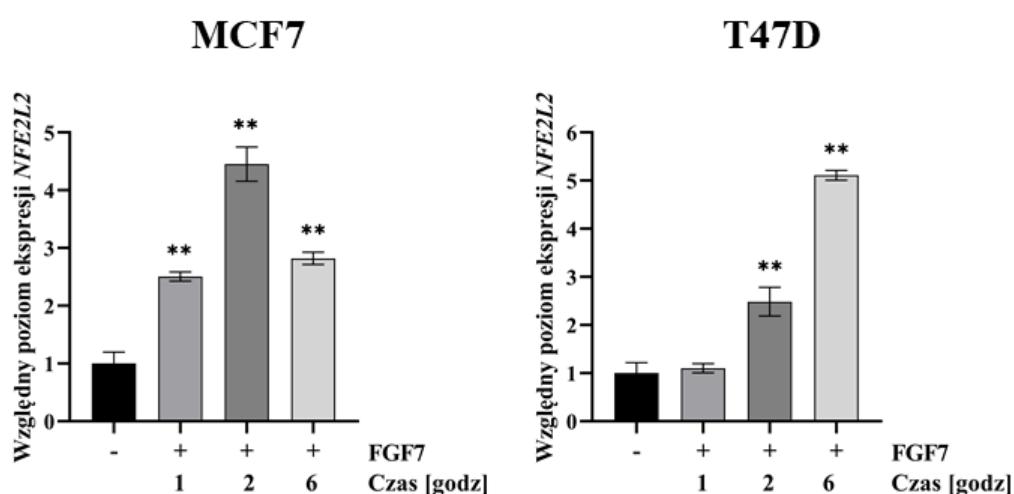
FGFR2-promowanej dysocjacji kompleksu Keap1/Nrf-2 użyto przeciwciała pierwszorzędowe rozpoznające oba białka. Komórki MCF7 i T47D traktowano FGF7 (50 ng/ml) przez 60 minut. Pomędzy wykorzystanymi liniami komórkowymi zaobserwowano różnice w ilości występowania kompleksów Keap1/Nrf-2 (widocznych jako fluorescencyjne punkty) w warunkach kontrolnych (Ryc. 16), w linii T47D było ich znacznie więcej. Kompleksy były zlokalizowane zarówno w cytoplazmie jak i jądrze komórkowym. Co istotne dodatek FGF7 do pożywki hodowlanej spowodował znaczną redukcję ilości kompleksów w obydwu liniach komórkowych. Uzyskane wyniki wskazują więc, że sygnalizacja FGFR2 bierze udział w dysocjacji kompleksu Keap1/Nrf-2.



Rycina 16. Sygnalizacja FGFR2 prowadzi do dysocjacji kompleksu Keap1/Nrf-2. Komórki MCF7 (lewy panel) i T47D (prawy panel) inkubowano z FGF7 (50 ng/ml) przez 60 minut. Detekcji kompleksów Keap1/Nrf-2 dokonano przy pomocy metody PLA; * $p < 0.05$; $n = 3$.

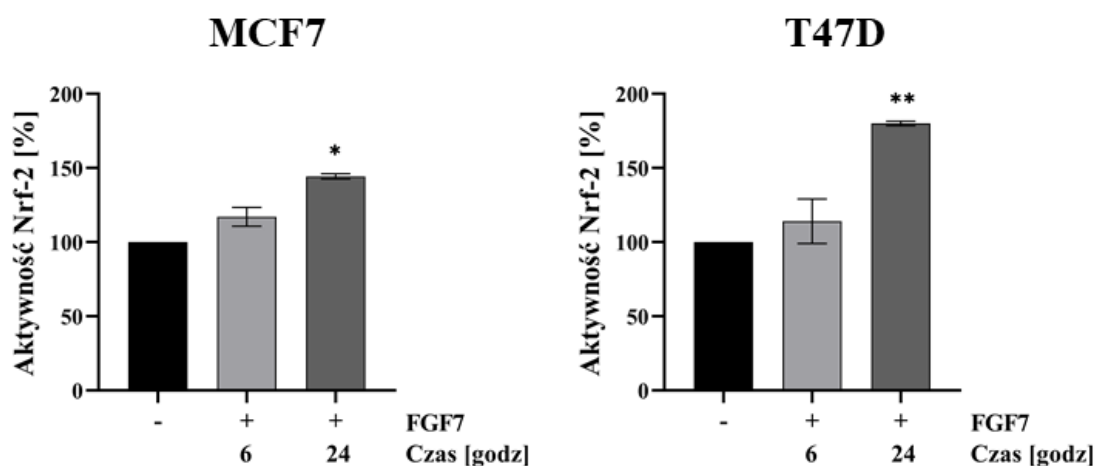
5.6. Ocena wpływu FGFR2 na poziom ekspresji genu *NFE2L2* i aktywność transkrypcyjną Nrf-2

W związku z wykazanym udziałem ścieżki FGFR2 w promocji dysocjacji kompleksu Keap1/Nrf-2, w kolejnym etapie projektu sprawdzono, czy sygnalizacja FGFR2 reguluje poziom ekspresji genu *NFE2L2* (kodującego Nrf-2). W tym celu zastosowano metodę qPCR. Zaobserwowano, że dodatek FGF7 (1-6 godzin) indukował ekspresję mRNA dla *NFE2L2* obu badanych linii komórkowych (Ryc. 17). Podsumowując dotychczas otrzymane wyniki, sygnalizacja FGFR2 reguluje ekspresję Nrf-2 zarówno na poziomie białka, jak i mRNA.



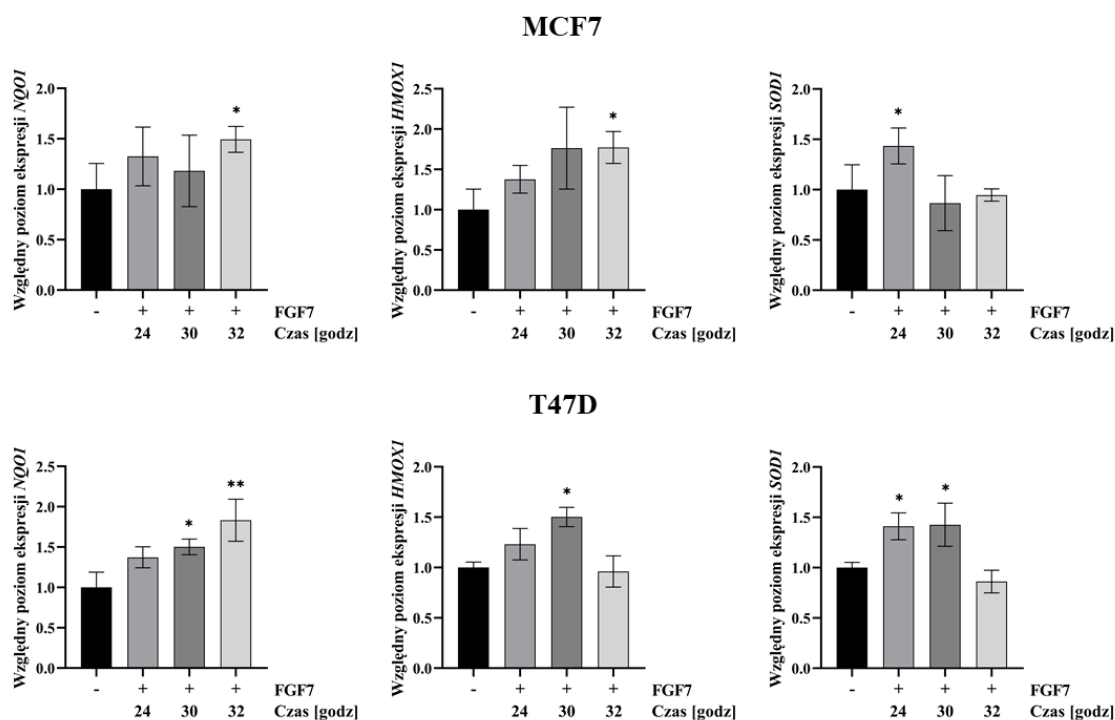
Rycina 17. Sygnalizacja FGFR2 reguluje poziom ekspresji genu kodującego Nrf-2 (*NFE2L2*). Komórki linii MCF7 (lewy panel) i T47D (prawy panel) hodowano w obecności FGF7 (50 ng/ml) przez 1, 2 i 6 godzin. Analizę względnego poziomu ekspresji genu *NFE2L2* wykonano metodą qPCR; ** $p < 0,01$; $n = 3$.

Kolejne doświadczenie służyło weryfikacji udziału sygnalizacji FGFR2 w regulacji aktywności transkrypcyjnej Nrf-2 przy pomocy testu kolorymetrycznego, opartego na metodzie immunoenzymatycznej ELISA. W tym celu zastosowano płytki opłaszczone specyficznym oligonukleotydem, wiążącym jedynie aktywny transkrypcyjnie Nrf-2. Komórki MCF7 i T47D inkubowano z FGF7 (50 ng/ml) przez 6 i 24 godziny. Zaobserwowano, że aktywność Nrf-2 po 24 godzinach inkubacji z FGF7 była wyższa o prawie 50% i 80%, odpowiednio dla linii MCF7 i T47D w porównaniu do warunków kontrolnych (Ryc. 18).



Rycina 18. Sygnalizacja FGFR2 zwiększa aktywność Nrf-2. Komórki linii MCF7 (lewy panel) i T47D (prawy panel) hodowano w obecności FGF7 (50 ng/ml) przez 6 i 24 godziny. Ocenę aktywności Nrf-2 wykonano przy użyciu testu kolorymetrycznego, opartego na metodzie immunoenzymatycznej ELISA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; $n=3$.

Zweryfikowano również, czy FGFR2 wpływa na poziom ekspresji genów Nrf-2-zależnych. Czynniki transkrypcyjny Nrf-2 reguluje aktywność ponad 200 genów (głównie antyoksydacyjnych i detoksykacyjnych), zawierających w obrębie promotora motyw ARE. Na podstawie literatury wytypowano 3 geny najczęściej sprawdzane w kontekście aktywności transkrypcyjnej Nrf-2, do których należą *NQO1* (ang. *NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1*), *HMOX1* (ang. *Heme Oxygenase 1*) i *SOD1* (ang. *Superoxide Dismutase 1*). Wyniki doświadczenia wskazują, że aktywacja FGFR2 indukuje ekspresję wszystkich trzech genów (*NQO1*, *HMOX1*, *SOD1*) zależnych od Nrf-2 w obu liniach komórkowych (Ryc. 19).



Rycina 19. Sygnalizacja FGFR2 reguluje aktywność transkrypcyjną genów zależnych od Nrf-2. Komórki linii MCF7 (górny panel) i T47D (dolny panel) hodowano w obecności FGF7 (50 ng/ml) przez 24, 30 i 32 godziny. Analizę względnego poziomu ekspresji genów *NQO1*, *HMOX1* i *SOD1* wykonano metodą qPCR; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; $n = 3$.

Otrzymane wyniki potwierdzają udział ścieżki sygnalizacyjnej FGFR2 w regulacji poziomu ekspresji genu *NFE2L2* i aktywności transkrypcyjnej Nrf-2. FGFR2-zależna aktywacja transkrypcji genów antyoksydacyjnych i detoksykacyjnych może świadczyć o zaangażowaniu tego receptora w ochronę komórek nowotworowych przed stresem oksydacyjnym i elektrofilowym, spowodowanym stosowaniem leków przeciwnowotworowych takich jak leki anti-ER.

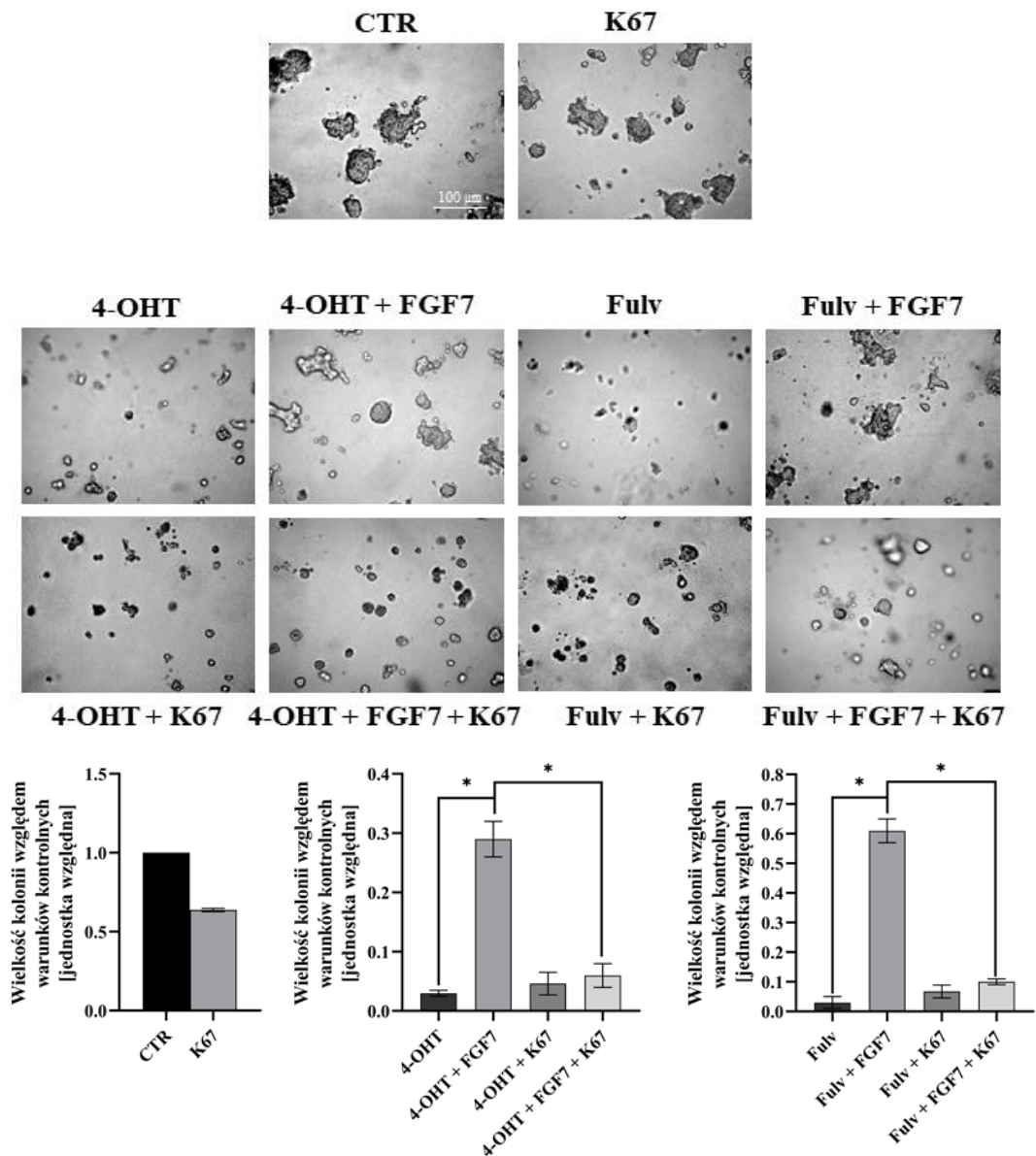
5.7. Ocena znaczenia współzależności FGFR2/Nrf-2 w odpowiedzi komórek raka piersi na terapię anti-ER

Do tej pory w projekcie potwierdzono udział FGFR2 w indukcji procesu autofagii oraz dysocjacji kompleksu Keap1/Nrf-2, a co za tym idzie aktywacji czynnika transkrypcyjnego Nrf-2. Ogniwem łączącym te dwie ścieżki jest białko p62, marker procesu autofagii i jeden z głównych regulatorów kompleksu Keap1/Nrf-2. Otrzymane wyniki zasugerowały również udział autofagii w FGFR2-zależnej ochronie komórek przed działaniem leków anti-ER. Kolejny etap pracy obejmował sprawdzenie, czy Nrf-2 jest również zaangażowany w odpowiedź komórek raka piersi na terapię anti-ER. W tym

celu przeprowadzono hodowle 3D w Matrigelu w obecności FGF7 (50 ng/ml) i/lub tamoksyfenu (1 μ M), fulwestrantu (100 nm) oraz inhibitora Nrf-2 - K67 (500 nM), blokującego interakcję pomiędzy ufosforylowanym p62 a Keap1. Wynikiem tego jest zahamowanie dysocjacji kompleksu Keap1/Nrf-2 i kierowanie Nrf-2 przez Keap1 do degradacji proteasomalnej (Saito et al, 2016). W przypadku testowanych linii komórkowych (MCF7, T47D oraz CAMA-1) zaobserwowano, że dodatek K67 znosił ochronny efekt FGF7 na działanie zarówno tamoksyfenu, jak i fulwestrantu (Ryc. 20A, B i C). Niniejsze wyniki sugerują, że czynnik transkrypcyjny Nrf-2 wydaje się być zaangażowany w FGFR2-zależną ochronę komórek raka piersi przed działaniem leków anti-ER.

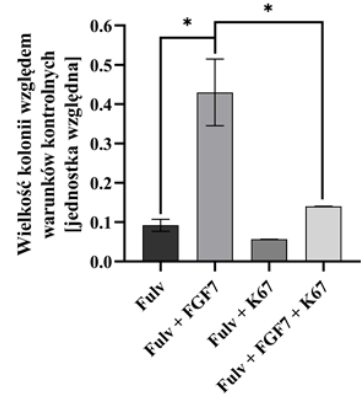
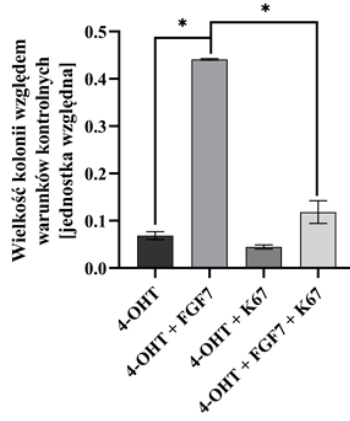
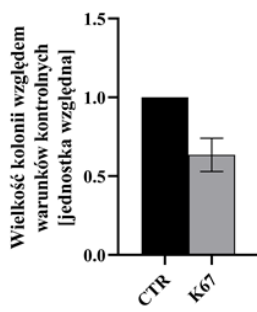
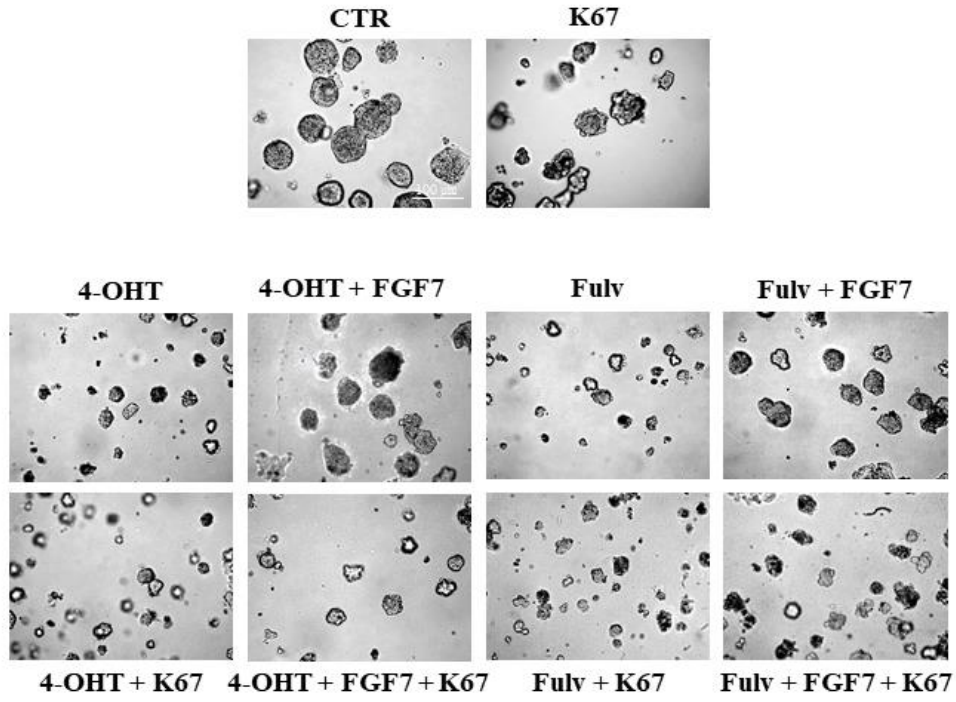
A.

MCF7



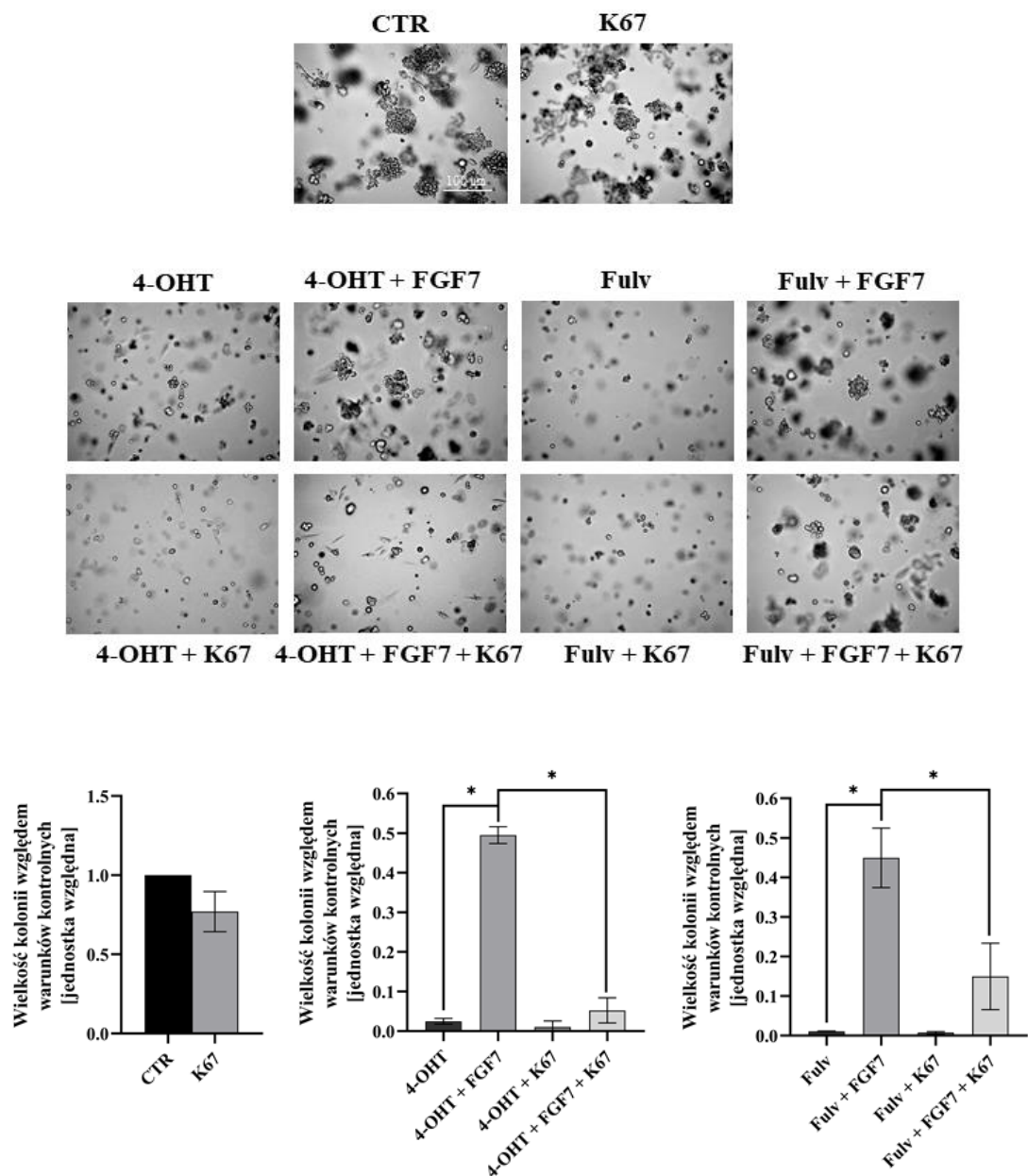
B.

T47D



C.

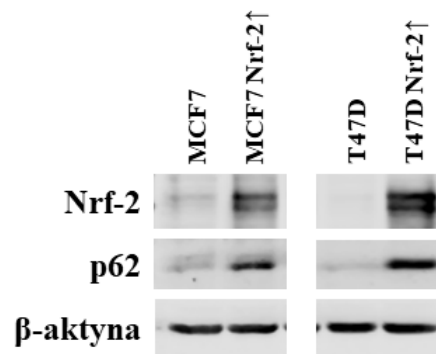
CAMA-1



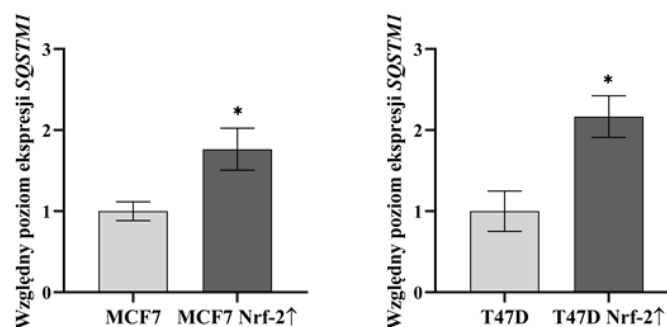
Rycina 20. Zahamowanie aktywności Nrf-2 znosi efekt ochronny FGF7 na działanie leków anti-ER (tamoksyfenu i fulwestrantu). Komórki linii MCF7 (A), T47D (B) oraz CAMA-1 (C) zawieszono w Matrigelu i hodowano w pełnej pożywce z dodatkiem FGF7 (50 ng/ml) i/lub 4-hydroksytamoksyfenu (4-OHT, 1 μ M), fulwestrantu (FULV, 100 nM), czy K67 (500 nM). Warunki kontrolne (CTR) stanowiła pełna pożywka hodowlana. Zdjęcia wykonano po 12-16 dniach hodowli (powiększenie 100-krotne). Wielkość kolonii zmierzono przy pomocy programu ImageJ, po czym wykonano analizę statystyczną. Prezentowane dane są średnimi wartościami \pm SD (n = 3); * p<0,05.

Aby jednoznacznie potwierdzić wpływ Nrf-2 na odpowiedź komórek raka piersi na stosowane leki anty-ER wyprowadzono warianty linii MCF7 i T47D z nadekspresją tego białka (MCF7 Nrf-2 \uparrow i T47D Nrf-2 \uparrow). Co ciekawe wykazano, że sam fakt nadekspresji Nrf-2 skutkowało wzrostem poziomu białka p62 w obu liniach komórkowych (Ryc. 21A). Dane literaturowe pokazują, że Nrf-2 może regulować poziom mRNA genu kodującego p62 (sekwencja ARE występuje w obrębie promotora genu *SQSTM1*). Konsekwencją tego jest zwiększenie ekspresji białka p62, prowadzące do dysocjacji kompleksu Keap1/Nrf-2, a tym samym aktywacji Nrf-2 (Jain et al, 2010). Dlatego oceniono również jak Nrf-2 wpływa na poziom mRNA genu kodującego p62 (*SQSTM1*) przy pomocy qPCR. W przypadku obydwu wariantów linii z nadekspresją Nrf-2 zaobserwowano podwyższony poziom mRNA genu *SQSTM1* (Ryc. 21B). Otrzymane obserwacje sugerują, że na drodze tzw. pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego Nrf-2 reguluje swoją własną aktywność transkrypcyjną.

A.



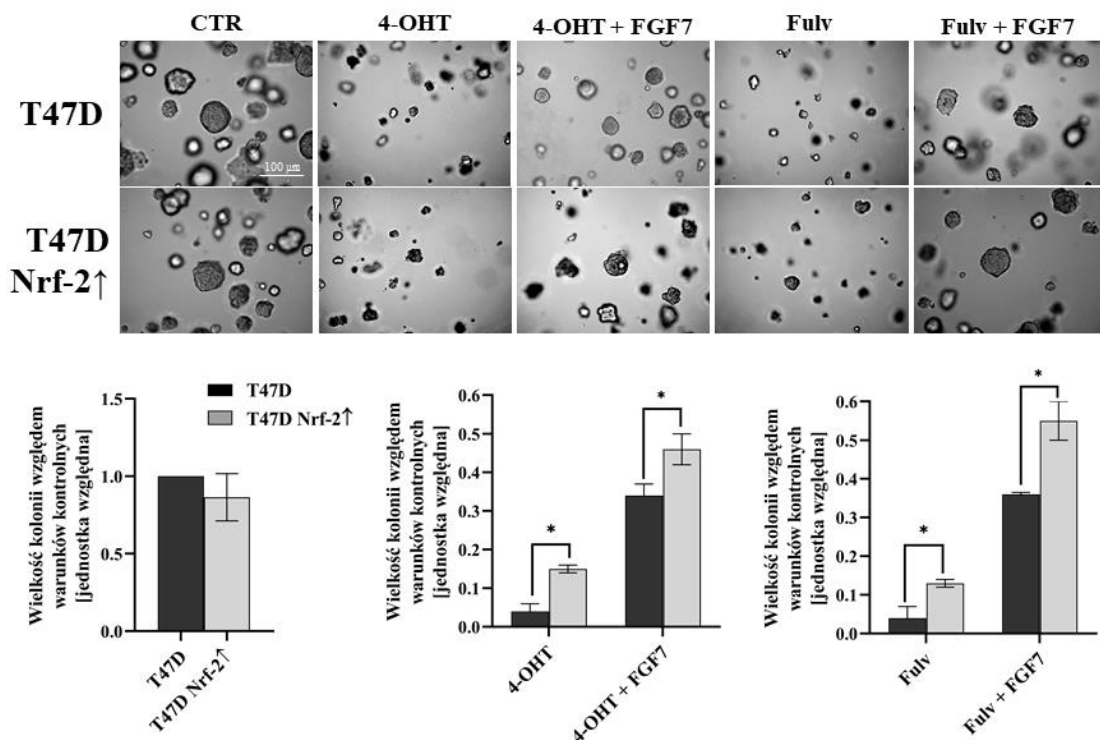
B.



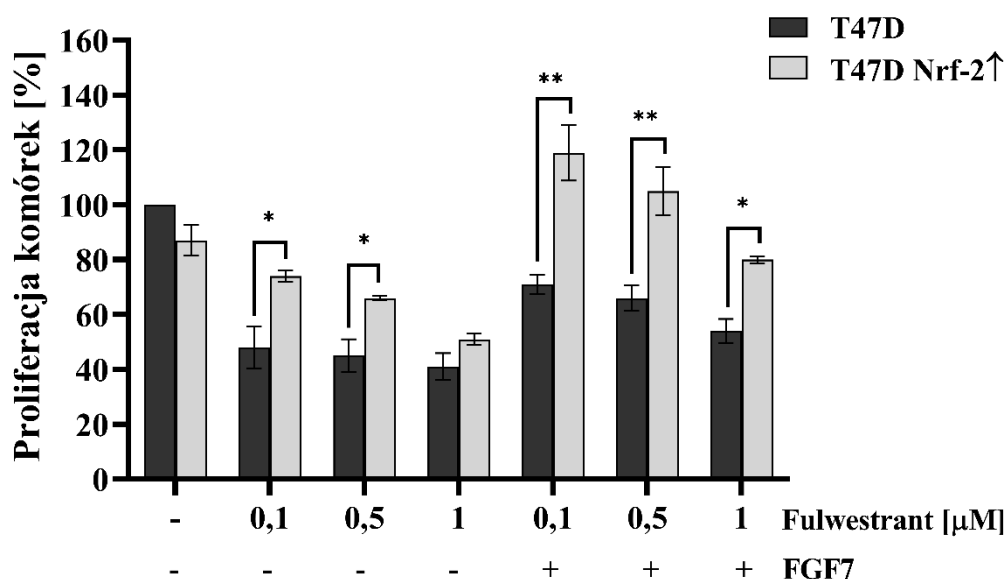
Rycina 21. Nadekspresja Nrf-2 zwiększa ekspresję p62. (A) Analiza Western blot poziomu ekspresji Nrf-2 oraz p62 w komórkach linii MCF7, T47D i ich wariantach ze stabilną nadekspresją Nrf-2. (B) Analiza względnego poziomu ekspresji genu *SQSTM1* wykonano przy pomocy techniki qPCR; * $p < 0,05$; $n = 3$.

W kolejnym etapie badań podjęto próbę oceny udziału Nrf-2 w odpowiedzi komórek raka piersi na leki anti-ER. Do tego celu wykorzystano wariant linii T47D z nadekspresją Nrf-2 (T47D Nrf-2 \uparrow), który hodowano w obecności samego tamoksyfenu (1 μ M) lub fulwestrantu (100 nM) z dodatkiem FGF7 (50 ng/ml). Zaobserwowano, że nadekspresja Nrf-2 osłabiała negatywny efekt tamoksyfenu i fulwestrantu (Ryc. 22A). Ponadto nadekspresja Nrf-2 wzmacniała efekt ochronny FGF7 wobec leków anti-ER. W przypadku komórek MCF7 zaobserwowano analogiczne efekty, jednak nadekspresja Nrf-2 spowodowała zmianę morfologii tych komórek, przez co niemożliwe było zmierzenie kolonii oraz wykonanie analizy statystycznej. Otrzymane wyniki znalazły potwierdzenie w klasycznym teście oceniającym proliferację 2D (MTT) komórek T47D (Ryc. 22B). Zgodność wyników uzyskanych w teście 3D w Matrigelu oraz teście proliferacyjnym MTT jednoznacznie wskazuje na zaangażowanie Nrf-2 w regulację odpowiedzi komórek raka piersi na leki anti-ER.

A.



B.



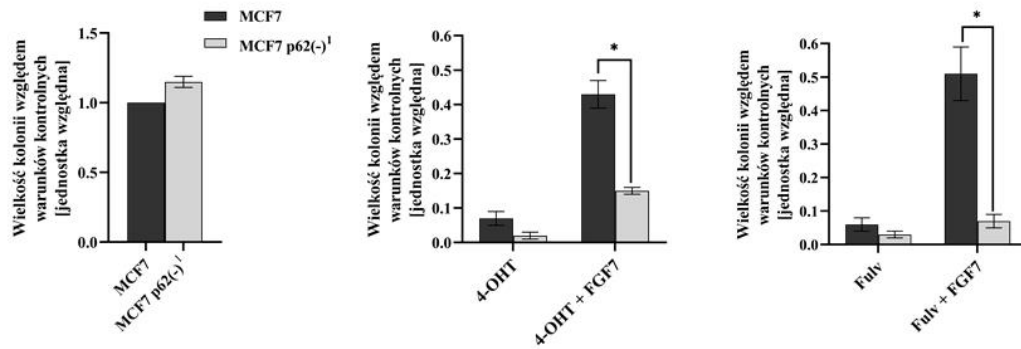
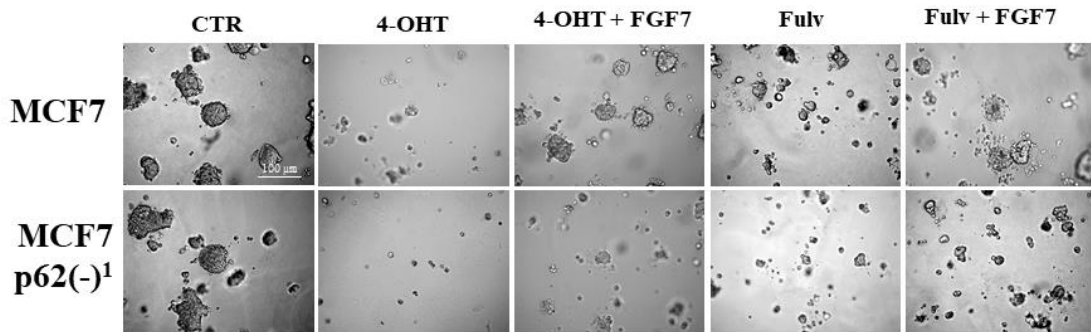
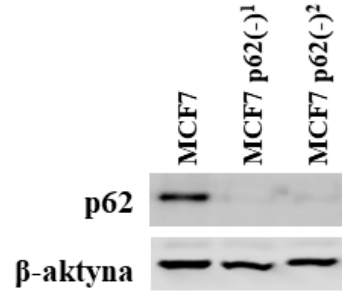
Rycina 22. Komórki z nadekspresją Nrf-2 słabiej odpowiadają na działanie leków anti-ER.

(A) Komórki linii T47D i T47D Nrf-2[↑] zawieszono w Matrygelu i hodowano w pełnej pożywce hodowlanej z dodatkiem FGF7 (50 ng/ml) i/lub 4-hydroksytamoksyfenu (4-OHT, 1 μM), fulwestrantu (FULV, 100 nM). Warunki kontrolne (CTR) stanowiła pełna pożywka hodowlana. Zdjęcia wykonano po 12-16 dniach hodowli (powiększenie 100-krotne). Wielkość kolonii zmierzono przy pomocy programu ImageJ, po czym wykonano analizę statystyczną. (B) Proliferacja komórek T47D i ich wariantu z nadekspresją Nrf-2 traktowanych przez 72 godziny FGF7 (50ng/ml) i/lub różnymi stężeniami fulwestrantu (0,1; 0,5 i 1 μM) sprawdzona przy pomocy testu MTT. Prezentowane dane są średnimi wartościami ± SD (n = 3); * p<0,05, ** p<0,01.

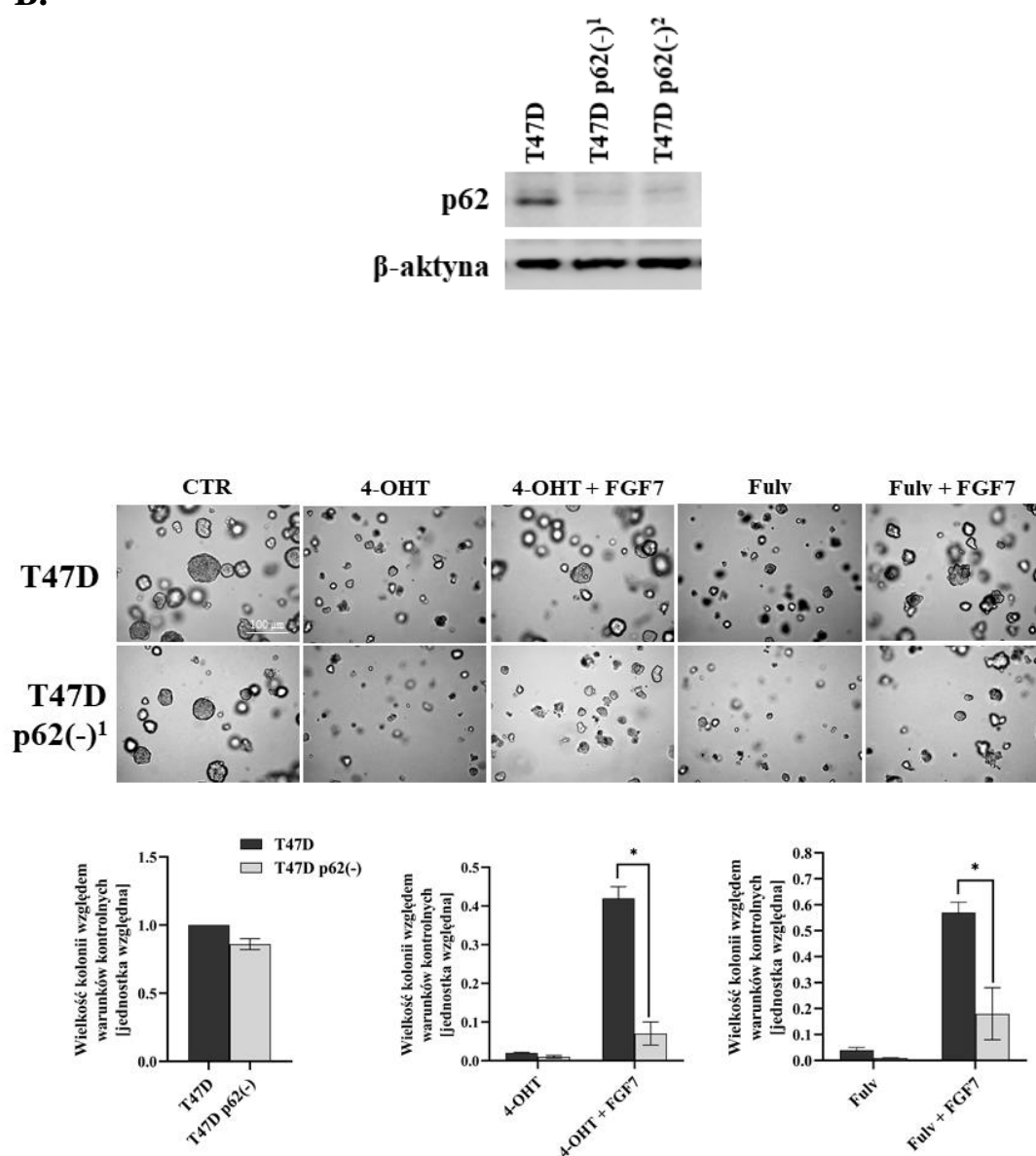
Aby ocenić czy indukowana przez p62 aktywacja Nrf-2 bierze udział w ochronie komórek raka piersi przed działaniem leków anti-ER wyprowadzono warianty linii MCF7 i T47D z wyciszoną ekspresją p62. Zastosowano 2 konstrukty shRNA i otrzymano dwa warianty z wyciszoną ekspresją p62 w obydwu liniach komórkowych, T47D oraz MCF7. W przeprowadzonej ocenie wzrostu 3D komórek w Matrygelu warianty MCF7 p62(-)¹ (Ryc. 23A) i T47D p62(-)¹ (Ryc. 23B) wykazywały nieznacznie większą wrażliwość na działanie leków anti-ER - efekt ten nie był jednak istotny statystycznie. Co ważne, wyciszenie ekspresji p62 silnie znosiło efekt ochronny FGF7 wobec tamoksyfenu i fulwestrantu w obu liniach komórkowych. Analogiczne wyniki otrzymano w teście proliferacyjnym MTT. Zaobserwowano lepszą odpowiedź komórek

MCF7 p62(-)¹ na działanie fulwestrantu w porównaniu do komórek dzikich (Ryc. 24) oraz zniesienie FGFR2-zależnej ochrony komórek przed tym lekiem anti-ER.

A.

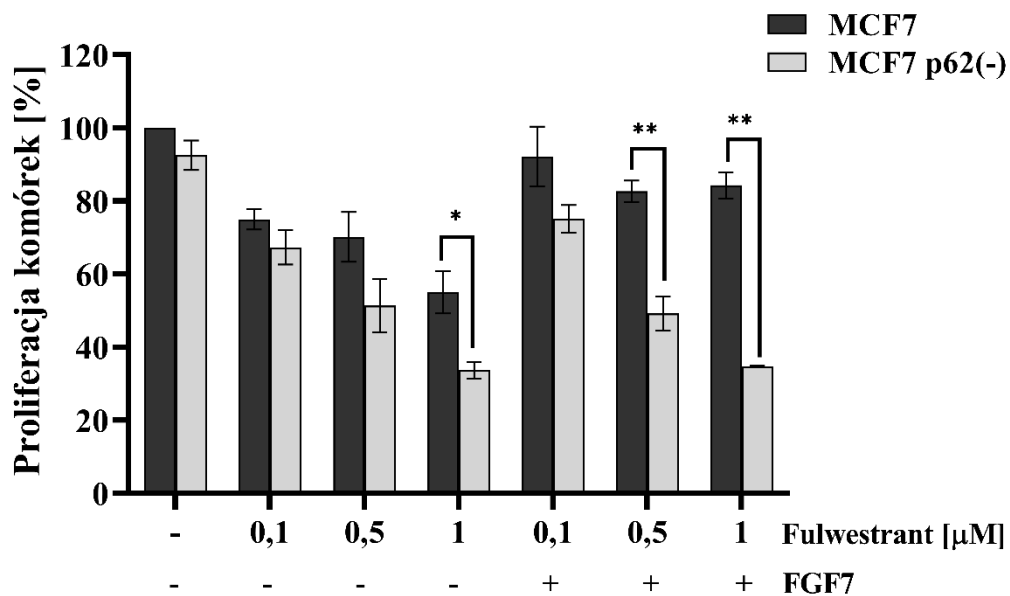


B.



Rycina 23. Wyciszenie ekspresji p62 przywraca wrażliwość na działanie leków anti-ER.

Komórki MCF7 (A) i T47D (B) oraz ich warianty z wyciszoną ekspresją p62 zawieszono w Matrigelu i hodowano w pełnej pożywce z dodatkiem FGF7 (50 ng/ml) i/lub 4-hydroksytamoksyfenu (4-OHT, 1 μ M), fulwestrantu (FULV, 100 nM). Warunki kontrolne (CTR) stanowiła pełna pożywka hodowlana. Zdjęcia wykonano po 12-16 dniach hodowli (powiększenie 100-krotne). Wielkość kolonii zmierzono przy pomocy programu ImageJ, po czym wykonano analizę statystyczną. Wyciszenie ekspresji p62 potwierdzono metodą Western blot. Prezentowane dane są średnimi wartościami \pm SD (n = 3); * p < 0,05.



Rycina 24. Wyciszenie ekspresji p62 zmniejsza proliferację komórek w obecności fulwestrantu. Komórki MCF7 i ich wariant z wyciszoną ekspresją p62 hodowano w obecności FGF7 (50ng/ml) i/lub różnych stężeń fulwestrantu (0,1; 0,5 i 1 μM) przez 72 godziny. Prezentowane dane są średnimi wartościami ± SD (n = 3); * p<0,05, ** p<0,01.

Przeprowadzone analizy wzrostu komórek raka piersi wskazują, że sygnalizacja FGFR2/p62/Nrf-2 wydaje się być zaangażowana w rozwój oporności na leki anty-ER.

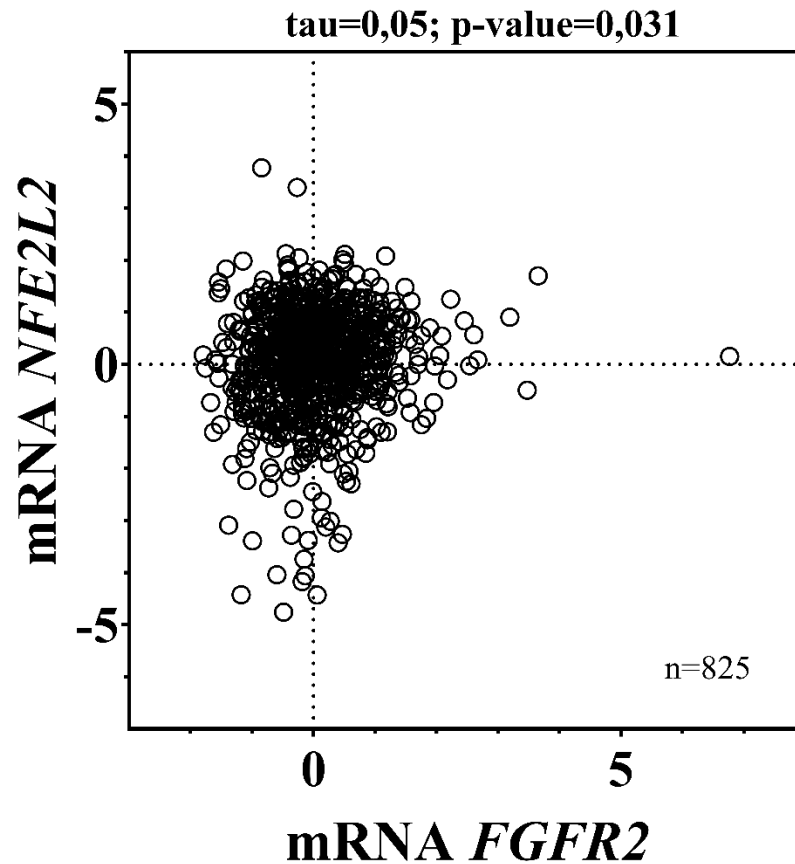
5.8. Ocena wartości prognostycznej zależności *FGFR2/Nrf-2* w oparciu o analizy *in silico*

Ostatnim etapem przedstawionego projektu doktorskiego była ocena potencjalnej wartości prognostycznej zależności *FGFR2/Nrf-2* w materiale klinicznym. W tym celu zostały wykonane analizy *in silico* na danych kohorty METABRIC z cBioPortal™, do których zakwalifikowano 825 chorych z luminalnym A rakiem piersi. Kryteria włączenia obejmowały chore z wcześniej nieleczonym, inwazyjnym rakiem piersi, o fenotypie ER+/PR+, ze znanym statusem menopauzalnym oraz dostępnymi danymi z obserwacji przebiegu choroby (ang. *follow-up*). Ta sama kohorta chorych z bazy danych METABRIC została użyta w naszych wcześniejszych pracach do określenia wartości prognostycznej *FGFR2*. Przedstawione analizy były wykonane we współpracy z dr Martą Popędą (Katedra i Zakład Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego) oraz dr n. med. Marcinem Braunem (Zakład Patologii Katedry Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi).

W naszych ostatnich pracach określiliśmy wartość prognostyczną *FGFR2* u pacjentek z rakiem piersi (Braun et al, 2020; Mieczkowski et al, 2022). Analiza danych klinicznych wykazała, że wysoki poziom ekspresji *FGFR2* w guzie był związany z lepszym rokowaniem pacjentek z luminalnym A (ER+/PR+) rakiem piersi, natomiast w grupie chorych z rakiem typu luminalnego B (ER+/PR-) nie zaobserwowano takiej zależności. Ponadto wysoka ekspresja *FGFR2* była istotnie związana z dłuższym czasem przeżycia wolnym od progresji choroby (PFS) u chorych ER+/PR+ postmenopauzalnych. W przypadku pacjentek przedmenopauzalnych efekt ten jest tracony, co wskazuje na istnienie podgrup, w których *FGFR2* jest dobrym lub złym czynnikiem rokowniczym. Liczne dane literaturowe wskazują na złą wartość prognostyczną *Nrf-2* w raku piersi (Almeida et al, 2020). Wysoki poziom ekspresji *Nrf-2* u pacjentek z rakiem piersi wiązał się z krótszym czasem przeżycia całkowitego (OS) oraz czasem przeżycia wolnego od choroby (DFS). Kontynuując wyniki z doświadczeń *in vitro* wskazujące na zależność *FGFR2/Nrf-2* sprawdzono, czy *Nrf-2* wpłynie na dobrą wartość rokowniczą *FGFR2* u chorych z luminalnym A rakiem piersi.

W pierwszej kolejności oceniono, czy istnieje korelacja pomiędzy poziomem mRNA *FGFR2* i *NFE2L2* w tkankach pochodzących od wymienionej wcześniej grupy pacjentek z luminalnym A rakiem piersi (n=825). Test b-Kendalla wykazał brak zależności pomiędzy ekspresją genów *FGFR2* i *NFE2L2* ($\tau=0,05$; $p\text{-value}=0,031$)

(Ryc. 25), co zostało potwierdzone także przy pomocy testu korelacji Spearmana ($R=0,08$; p-value 0,031) i Pearsona ($R=0,09$; p-value 0,014).



Rycina 25. Brak korelacji pomiędzy ekspresją genów *NFE2L2* i *FGFR2*. Analiza korelacji między poziomem mRNA *FGFR2* a mRNA *NFE2L2* w materiale klinicznym 825 pacjentek z luminalnym A rakiem piersi (kohorta METABRIC z cBioPortal™) wykonana przy pomocy testu b-Kendalla.

Aby sprawdzić ewentualne znaczenie prognostyczne zależności *FGFR2*/*Nrf-2*, dalszą analizę materiału klinicznego ograniczono do grupy z wysokim poziomem ekspresji genu *FGFR2* (tzw. *FGFR2-high*) w guzie. Spośród 825 chorych 550 zaklasyfikowano do grupy *FGFR2-high* (Tab. 2). Klasyfikacji guzów wg poziomu ekspresji genu *NFE2L2* dokonano z zastosowaniem odciętej w postaci mediany ekspresji w całej grupie pacjentek z luminalnym A rakiem piersi (n=825). W grupie *FGFR2-high* 274 chore cechowały się wysoką ekspresją *NFE2L2* a 276 niską (Tab. 3).

Charakterystyka grupy *FGFR2-high* (n=550)

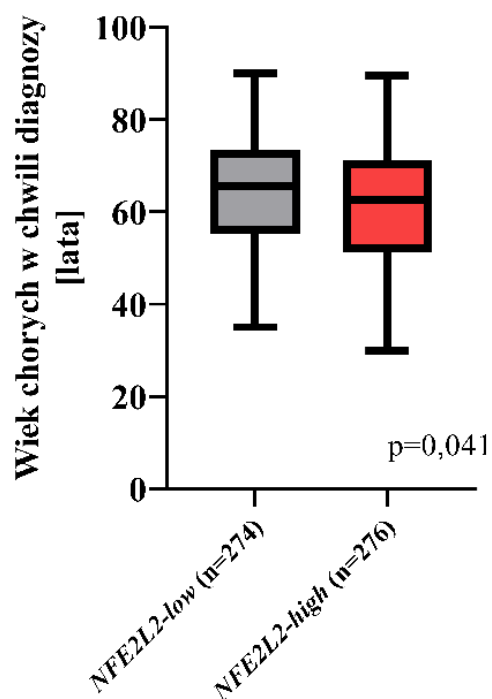
		mediana	IQR
	wiek w chwili diagnozy [lata]	64	53-72
	wielkość guza [mm]	21	17-30
		n	%
typ histologiczny	naciekający bez specjalnego typu (NST)	455	83
	mieszany	95	17
stopień złośliwości histologicznej (grade)	G1	71	13
	G2	269	51
	G3	189	36
	brak danych	21	-
stopień zaawansowania (stage)	I	155	38
	II	240	58
	III	16	4
	IV	2	0
	brak danych	137	-
status menopauzalny	przed	102	19
	po	448	81
status ER	ujemny	0	0
	dodatni	550	100
status PR	ujemny	0	0
	dodatni	550	100
status HER2	ujemny	524	95
	dodatni	26	5
chemioterapia	nie	497	90
	tak	53	10
hormonoterapia	nie	157	29
	tak	393	71
radioterapia	nie	228	41
	tak	322	59

Tabela 2. Kliniczna i patologiczna charakterystyka chorych z wysokim poziomem ekspresji genu *FGFR2* w guzie (grupa *FGFR2-high*, n=550). Dane nominalne przedstawiono jako liczebności z udziałem procentowym poszczególnych kategorii w całej grupie. Dane ciągłe przedstawiono jako mediany z rozstępami ćwiartkowymi (IQR).

	<i>FGFR2-low</i>	<i>FGFR2-high</i>
<i>NFE2L2-low</i>	17% (139)	33% (274)
<i>NFE2L2-high</i>	16% (136)	33% (276)

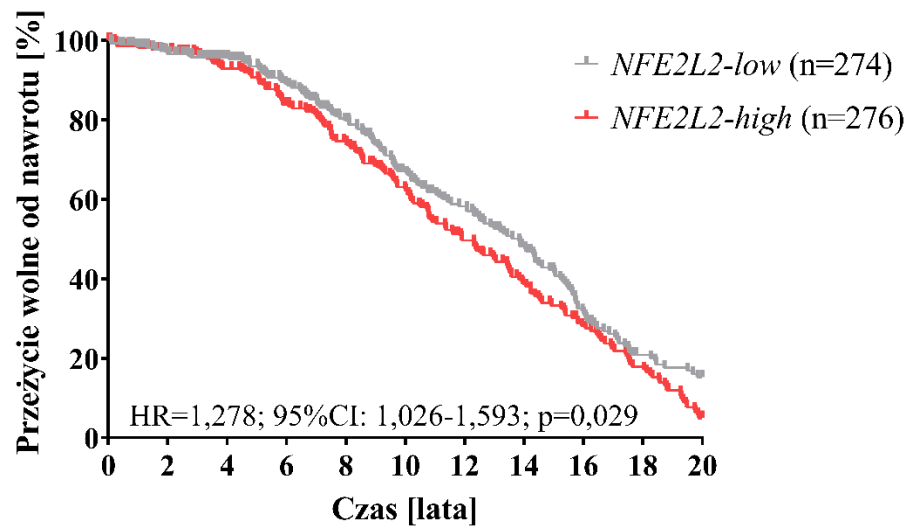
Tabela 3. Rozkład poziomu ekspresji genu *NFE2L2* (progowanej wg mediany) oraz *FGFR2* (progowanej wg pierwszej tercji) w grupie 825 pacjentek z luminalnym A rakiem piersi.

Korelacje statusu *FGFR2-high/NFE2L2-high* oraz *FGFR2-high/NFE2L2-low* z parametrami kliniczno-patologicznymi wykazały, że wiek pacjentek *FGFR2-high/NFE2L2-high* w momencie diagnozy był niższy od pacjentek *FGFR2-high/NFE2L2-low* (mediana 63 lata vs 66 lat; Ryc. 26). Nie zaobserwowano korelacji statusu *FGFR2/Nrf-2* z pozostałymi cechami kliniczno-patologicznymi takimi jak wielkość guza, typ histologiczny, stopień złośliwości histologicznej, stopień zaawansowania czy status HER2.



Rycina 26. Rozkład wieku chorych w chwili diagnozy [lata] w zależności of poziomu ekspresji genu *NFE2L2* w grupie chorych z luminalnym A rakiem piersi, charakteryzujących się wysoką ekspresją *FGFR2* w guzie (n=550). Analizy dokonano przy pomocy testu Manna-Whitneya-Wilcoxona.

Sprawdzono także, czy status ekspresji *NFE2L2* w grupie pacjentek z wysoką ekspresją *FGFR2* (*FGFR2-high*) będzie miał wpływ na wartość prognostyczną *FGFR2*. Zaobserwowano, że pacjentki *FGFR2-high/NFE2L2-high* charakteryzowały się krótszym czasem przeżycia wolnego od nawrotu choroby (RFS) (HR=1,278; 95%CI: 1,026-1,593; p=0,029), co oznacza gorsze rokowanie w stosunku do pacjentek *FGFR2-high/NFE2L2-low* (Ryc. 27). Otrzymane wyniki sugerują, że ekspresja *NFE2L2* stratyfikuje pacjentki o fenotypie *FGFR2-high* na podtypy o lepszej i gorszej prognozie.



Rycina 27. Wpływ poziomu ekspresji genu *NFE2L2* na czas przeżycia wolny od nawrotu choroby (RFS) pacjentek z luminalnym A rakiem piersi, charakteryzujących się wysoką ekspresją *FGFR2*. Estymację przeżycia zaprezentowano przy pomocy wykresu Kaplana-Meiera. Analiza przeżycia została wykonana przy pomocy modelu proporcjonalnego ryzyka Coxa. Za istotne statystycznie uznano wartości $p < 0,05$.

6. PODSUMOWANIE

Wyniki rozprawy doktorskiej, której celem była ocena znaczenia sygnalizacji FGFR2 w regulacji współzależności p62/Keap1/Nrf-2 w luminalnym raku piersi wykazały, że:

- Ścieżka sygnalizacyjna FGF7/FGFR2 jest zaangażowana w indukcję procesu autofagii
- FGFR2-zależna autofagia odpowiada za ochronę komórek raka piersi przed działaniem leków anti-ER, a zastosowanie inhibitora autofagii (chlorochiny) przywraca wrażliwość komórek na te leki
- Sygnalizacja FGF7/FGFR2 poprzez aktywację p62 w serynie 349 promuje dysocjację kompleksu Keap1/Nrf-2, translokację Nrf-2 do jądra komórkowego i aktywację zależnych od niego genów
- Czynniki transkrypcyjny Nrf-2 jest zaangażowany w ochronę komórek raka piersi przed działaniem leków anti-ER, a jego zahamowanie przy pomocy inhibitora przywraca odpowiedź komórek na te leki
- Nadekspresją Nrf-2 chroni komórki raka piersi przed działaniem leków anti-ER, z kolei wyciszenie ekspresji p62 przywraca pierwotną odpowiedź komórek na ich działanie
- Analiza czasu przeżycia wolnego od nawrotu choroby (RFS) wykazuje, że wysoka ekspresja *NFE2L2* (kodującego Nrf-2) pogarsza obserwowaną przez nas zespół dobrą wartość prognostyczną wysokiego poziomu *FGFR2* u chorych z luminalnym A rakiem piersi.

Podsumowując, wyniki realizowanego projektu doktorskiego po raz pierwszy wykazały, że regulowana przez sygnalizację FGFR2 współzależności p62/Keap1/Nrf-2 ma istotny wpływ na odpowiedź komórek luminalnego raka piersi na terapię anti-ER.

7. DYSKUSJA

Celem niniejszego projektu doktorskiego była ocena znaczenia sygnalizacji FGFR2 w regulacji współzależności p62/Keap1/Nrf-2 w luminalnym raku piersi. Projekt składał się z dwóch uzupełniających się poziomów badawczych: eksperymentów *in vitro* i analiz klinicznych *in silico*. Doświadczenia w warunkach *in vitro* miały na celu poznanie molekularnego mechanizmu regulacji procesu autofagii oraz aktywności Nrf-2 przez sygnalizację FGFR2 z uwzględnieniem odpowiedzi komórek raka piersi na leki anti-ER (tamoksyfen oraz fulwestrant). Analizy *in silico* oparte o materiał kliniczny od pacjentek z luminalnym A rakiem piersi (publicznie dostępna baza danych METABRIC) prowadzono w celu oszacowania potencjalnej wartości prognostycznej zależności FGFR2/Nrf-2.

Rak gruczołu piersiowego jest najczęściej diagnozowanym nowotworem wśród kobiet na świecie. Pomimo coraz skuteczniejszych strategii leczenia tego nowotworu, zapadalność na raka piersi stale rośnie a w ostatniej dekadzie obserwuje się wyhamowanie spadku umieralności z powodu tej choroby (Giaquinto et al, 2022; Siegel et al, 2022). Na podstawie oceny immunohistochemicznej poziomu ekspresji receptorów ER, PR, HER2 oraz indeksu proliferacyjnego Ki67 wyróżnia się cztery podtypy raka piersi: luminalny A, luminalny B, HER2-dodatni oraz trójujemny. Ocena IHC jest jedynym rutynowym testem klinicznym, na podstawie którego dobierany jest rodzaj terapii przeciwnowotworowej. Ta metoda klasyfikacji nie odzwierciedla jednak wysokiej heterogenności, która występuje w obrębie wymienionych podtypów raka piersi. Profilowanie genetyczne (analizy transkryptomyczne i genomowe), dzięki któremu opracowano system klasyfikacji molekularnej, ujawniło wysoką heterogenność wewnątrz klasycznych podtypów raka piersi. Stąd identyfikowane podtypy molekularne nie są w pełni tożsame z klasyfikacją kliniczno-patologiczną. Aktualne dane wskazują, że podtypy molekularne charakteryzują się różnymi cechami biologicznymi, przez co mogą wykazywać odmienną odpowiedź na stosowane leczenie (Blows et al, 2010; Dai et al, 2015). Dlatego wysoki nacisk kładzie się na polepszenie stratyfikacji pacjentek, czego efektem byłby bardziej dokładny i skuteczniejszy dobór terapii. Jednym z testów prognostycznych klasyfikujących wewnętrzne podtypy molekularne raka piersi jest sygnatura PAM50 (ang. *Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay*), w której sprawdza się ekspresję 50 genów związanych z tym nowotworem. PAM50 ma na celu ocenę 10-letniego ryzyka nawrotu choroby (tzw. ROR ang. *Risk of Recurrence*) i ułatwienie doboru odpowiedniej terapii. Wykazano, że wewnętrzne podtypy

molekularne raka piersi, zdefiniowane przez PAM50, znacznie poprawiają rokowanie pacjentek w porównaniu ze standardową charakterystyką guza (Nielsen et al, 2010; Pu et al, 2020; Raj-Kumar et al, 2019). Dotychczas sygnatura PAM50 została zaakceptowana przez FDA do oceny ryzyka nawrotu choroby u pacjentek postmenopauzalnych z wczesnym stadium hormono-zależnych raków piersi. Nadal nie potwierdzono jej wartości prognostycznej w przypadku pacjentek przedmenopauzalnych. Stąd niezbędna jest większa liczba badań na dobrze scharakteryzowanych kohortach pacjentek z rakiem piersi w celu potwierdzenia przydatności klinicznej tej sygnatury.

Największy odsetek przypadków raka piersi (ok. 75-80%) stanowi podtyp luminalny (ER+), z czego podtyp luminalny A (ER+/PR+) występuje z częstotliwością 50-60%. Te hormono-zależne nowotwory charakteryzują się stosunkowo dobrym rokowaniem pacjentek. Podstawowa opcja leczenia raków luminalnych opiera się na blokowaniu funkcji ER lub syntezy estrogenów przy pomocy terapii anty-ER, głównie tamoksyfenu lub fulwestrantu. Wykazano, że terapia tamoksyfenem zmniejsza częstotliwość nawrotów raka piersi nawet o ok. 50%, a śmiertelność o ok. 30%. Pomimo jej wysokiej skuteczności część pacjentek nie odpowiada na lek, a z reguły jedna trzecia pacjentek leczonych tamoksyfenem mierzy się z nawrotem choroby (Cuzick et al, 2007; Fisher et al, 2005). Stąd zidentyfikowanie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za oporność na leczenie hormonalne stanowi ogromne wyzwanie kliniczne. Liczne badania wskazują na zaangażowanie sygnalizacji FGF/FGFR zarówno w progresję raka piersi, jak i odpowiedzi na stosowane terapie. Zaburzenia ścieżki sygnalizacyjnej FGFR2 (amplifikacje, mutacje, fuzje oraz występowanie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu tzw. SNPs) zostały scharakteryzowane w wielu nowotworach. W przypadku raka piersi szczególne znaczenie wydają się mieć SNPs w intronie 2 genu *FGFR2*, które korelują ze zwiększonym ryzykiem rozwoju tej choroby. Wykazano, że regulowana przez FGFR2 aktywność ER i PR przyczynia się do progresji raka piersi i powstawania oporności na terapię anty-ER. Z kolei zastosowanie inhibitorów FGFR zwiększyło wrażliwość komórek luminalnego raka piersi na terapię anty-ER (Campbell et al, 2018). Wyniki otrzymane w naszym zespole wskazują na zaangażowanie FGFR2 w: a) migrację komórek raka piersi oraz zwiększone ryzyko nawrotu tej choroby, b) progresję luminalnego raka piersi w kierunku bardziej agresywnego fenotypu PR-ujemnego, c) ochronę komórek luminalnego raka piersi przed działaniem tamoksyfenu oraz d) udział ścieżki sygnalizacyjnej FGFR2/JunB w progresji luminalnego raka piersi (Czaplińska et al, 2016; Czaplińska et al, 2014; Piasecka et al,

2019; Piasecka et al, 2016; Turczyk et al, 2017). Podjęliśmy również próbę określenia wartości prognostycznej FGFR2 u pacjentek z rakiem piersi. Okazało się, że zależy ona od statusu receptorów dla hormonów steroidowych. Wykazano, że wysoki poziom ekspresji FGFR2 związany był z dobrym lub złym rokowaniem chorych odpowiednio z luminalnym A i luminalnym B rakiem piersi (Braun et al, 2020). Co ważne, znaczenie prognostyczne FGFR2 zależało od statusu menopauzalnego tych pacjentek. Wysoka ekspresja FGFR2 korelowała z dłuższym czasem przeżycia wolnym od progresji choroby (PFS) jedynie u chorych postmenopauzalnych. W przypadku pacjentek przedmenopauzalnych efekt ten był zaburzony, co wskazuje na istnienie podgrup, w których FGFR2 ma różne znaczenie dla progresji raka piersi (Mieczkowski et al, 2022).

Liczne dowody wskazują na potencjał terapeutyczny hamowania sygnalizacji FGFR w luminalnych rakach piersi (Francavilla & O'Brien, 2022). Z drugiej strony obserwuje się zróżnicowaną odpowiedź pacjentek na stosowane terapie anti-FGFR, niezależnie od statusu tych receptorów (amplifikacji, nadekspresji czy mutacji). Problematyczne staje się więc wyznaczenie chorych mogących odnieść optymalne korzyści z terapii anti-FGFR. Najnowsze doniesienia wskazują, że przyczyną tego stanu rzeczy mogą być różne zmiany genetyczne w obrębie genu *FGFR2*. Zidentyfikowano wariant z mutacją *FGFR2* (tzw. *FGFR2^{AE18}*), który w przeciwieństwie do innych typów rearanżacji *FGFR2*, charakteryzował się wysoką odpowiedzią na terapię anti-FGFR (Zingg et al, 2022). Ponadto pacjentki z rearanżacjami *FGFR2* charakteryzowały się lepszym rokowaniem w porównaniu do pacjentek bez zmian w obrębie *FGFR2*. Wykazano również, że potencjał onkogenny FGFR2 zależał od amplifikacji genów z nim współwystępujących (np. *MYC* lub *CCND1*). To odkrycie rzuca nowe spojrzenie na konieczność lepszej selekcji pacjentek klasyfikowanych do terapii anti-FGFR. Pod uwagę powinien być brany nie tylko status rearanżacji *FGFR2*, ale także ekspresji onkogennych transkryptów *FGFR2* (np. *FGFR2^{AE18}*) i aberracji genów z nim współwystępujących.

Głównym czynnikiem pogarszającym rokowania pacjentek z luminalnym rakiem piersi jest wrodzona lub nabyta oporność na terapię anti-ER. Pojawiające się na przestrzeni ostatnich kilku lat doniesienia wskazują na proces autofagii jako jeden z czynników zaangażowanych w powstawanie oporności. Podjęto próby identyfikacji mechanizmów odpowiedzialnych za indukcję autofagii w komórkach raka piersi opornych na działanie leków anti-ER. Wydaje się, że sam ER w sposób niekanoniczny (poprzez aktywację białka BAG3) może indukować proces autofagii odpowiedzialny za

rozwój tej oporności (Felzen et al, 2015). Zarówno zahamowanie autofagii, jak i wyciszenie ekspresji BAG3 przywróciło skuteczność leków anti-ER (Felzen et al, 2015). Wskazuje się również na udział białka MTA1 (ang. *metastasis-associated 1*) w AMPK-zależnej indukcji autofagii odpowiedzialnej za oporność komórek raka piersi na tamoksyfen (Lee et al, 2018). Co ciekawe, zasugerowano, że zwiększony poziom ekspresji MTA1 jest wynikiem wzmocnionej aktywności rodziny receptorów naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR i/lub HER2). Zastosowanie inhibitorów celujących w aktywność tych receptorów, obniżyło ekspresję MTA1 w komórkach opornych na tamoksyfen. Liczne doniesienia wskazują na potencjał hamowania autofagii w przywracaniu odpowiedzi komórek raka piersi, które rozwinęły oporność na terapię anti-ER (Cook et al, 2014; Duan et al, 2014; Lee et al, 2018; Qadir et al, 2008; Sun et al, 2021). Zwiększony poziom autofagii w komórkach raka piersi opornych na tamoksyfen został odnotowany w kilku niezależnych badaniach. Stąd w pierwszym etapie projektu doktorskiego porównano poziom ekspresji markerów autofagii (LC3B oraz p62) w komórkach luminalnego raka piersi (MCF7) oraz ich wariantcie z wyprowadzoną opornością na tamoksyfen (MCF7 4-OHT^R). Zaobserwowany jednoczesny wzrost poziomu ekspresji LC3B i spadek poziomu p62 w MCF7 4-OHT^R świadczy o zwiększonym poziomie autofagii i wskazuje na jej zaangażowanie w wykształcanie się oporności komórek raka piersi na działanie tamoksyfenu. Uzyskane wyniki są zgodne z przytoczonymi wcześniej danymi literaturowymi.

Kluczowym czynnikiem w progresji nowotworów oraz oporności na stosowane terapie jest mikrośrodowisko guza. Badania wskazują na istnienie zależności pomiędzy mikrośrodowiskiem guza a autofagią. Może ono regulować autofagię poprzez aktywację różnych ścieżek sygnalizacyjnych, z kolei autofagia może modyfikować mikrośrodowisko guza poprzez promowanie angiogenezy, dostarczanie składników odżywczych i modulowanie odpowiedzi zapalnej (Yang et al, 2015). Wydaje się więc, że autofagia oprócz jej podstawowej roli (degradacji i recyklingu składników komórkowych) pełni także inne funkcje m.in. w integracji sygnałów pochodzących z mikrośrodowiska guza. Zrozumienie skomplikowanej zależności między autofagią a mikrośrodowiskiem guza może być korzystne w przewyciężaniu oporności na leki przeciwnowotworowe. Doniesienia na temat roli receptorów o aktywności kinaz tyrozynowych, pośredniczących w przekazywaniu sygnałów z mikrośrodowiska guza, w regulacji procesu autofagii nie są jednoznaczne. Podczas gdy stymulacja niektórych z tych receptorów (EGFR, HER2, FGFR1) hamuje autofagię, aktywacja innych (ErbB3,

ErbB4, VEGFR) może ją promować (Fraser et al, 2017). Nasze wcześniejsze prace wskazują na zaangażowanie FGFR2 w ochronę komórek raka piersi przed działaniem tamoksyfenu (Turczyk et al, 2017). Dotychczas poznana rola FGFR w regulacji procesu autofagii została opisana w kilku niezależnych pracach (Lin et al, 2011; Wang et al, 2015; Yuan et al, 2017). Nie ma natomiast doniesień o udziale samego FGFR2 w regulacji procesu autofagii w raku piersi. W niniejszym projekcie doktorskim po raz pierwszy podjęto próbę oceny tej zależności. W badaniach *in vitro* wykorzystano modelowe linie komórkowe luminalnego raka piersi – MCF7 oraz T47D. Dodatkowo, w hodowlach trójwymiarowych (3D) w Matrigelu zastosowano linię CAMA-1. Doświadczenia z zastosowaniem trzech linii luminalnego raka piersi umożliwiły wykluczenie sytuacji, w której zaobserwowane efekty byłyby komórkowo-specyficzne. W celu oceny wpływu sygnalizacji FGFR2 na regulację autofagii sprawdzono aktywację szeregu białek zaangażowanych w regulację tego procesu, zarówno indukcję (AMPK α , ULK1 i p62), jak i inhibicję (mTOR). Zaobserwowano aktywację kinaz AMPK α i ULK1 oraz białka p62. Jedno z analizowanych miejsc fosforylacji białka p62 (seryna 403) odpowiada za indukcję autofagii, z kolei fosforylacja seryny 349 inicjuje dysocjację kompleksu Keap1/Nrf-2 oraz aktywację czynnika transkrypcyjnego Nrf-2. Ta obserwacja była załączkiem do późniejszej analizy wpływu sygnalizacji FGFR2 na regulację kompleksu Keap1/Nrf-2, będącego głównym regulatorem stresu oksydacyjnego w komórce. Planując doświadczenia badające dynamikę procesu autofagii kierowano się wytycznymi dotyczącymi stosowania i interpretacji testów do monitorowania tego procesu (Klionsky et al, 2021a). Literatura fachowa wskazuje, że monitorowanie autofagii może prowadzić do błędnej interpretacji wyników, stąd zaleca się jednoczesne stosowanie różnych metod. W związku z tym postanowiono sprawdzić ekspresję dwóch powszechnie uznawanych markerów autofagii, białek LC3B oraz p62. Równoczesne monitorowanie wzrostu ekspresji LC3B i spadku poziomu p62 potwierdziło, że ścieżka FGFR2 indukuje autofagię. Obserwowany spadek poziomu ekspresji p62 może być także wynikiem jego degradacji na drodze proteasomalnej. Aby zdefiniować ścieżkę odpowiedzialną za degradację białka p62 użyto inhibitora lizosomu/procesu autofagii (chlorochiny) oraz inhibitora proteasomu (MG132). Jedynie chlorochina spowodowała zahamowanie FGF7-indukowanego spadku ekspresji p62 na poziomie białka, co potwierdza założenie, że w wyniku aktywacji FGFR2 p62 jest degradowany w lizosomach w procesie autofagii. Oprócz badania poziomu ekspresji markerów autofagii przy pomocy analizy Western blot, zastosowano mikroskopię fluorescencyjną

umożliwiająca badanie dynamiki autofagii poprzez monitorowanie powstawania autofagosomów i autolizosomów. Zaobserwowany wzrost ilości autofagosomów i autolizosomów pod wpływem FGF7 potwierdził FGFR2-zależną indukcję autofagii. Dodatkowo wykorzystano komórki z wyciszoną ekspresją FGFR2, dla których nie zaobserwowano FGF7-indukowanych zmian w ekspresji markerów autofagii czy aktywacji białek zaangażowanych w indukcję tego procesu. Potwierdziło to specyficzność aktywacji autofagii zależną od FGFR2.

W następnym etapie projektu sprawdzono, czy indukcja autofagii przez FGFR2 wpływa na odpowiedź komórek luminalnego raka piersi na terapię anti-ER. Zaletą zastosowanego modelu hodowli trójwymiarowych (3D) w Matrigelu jest odzwierciedlenie warunków *in vivo*, panujących w tkance gruczołu piersiowego. We wcześniejszych badaniach zespołu wykazano, że sygnalizacja FGFR2 jest zaangażowana w ochronę komórek raka piersi przed działaniem tamoksyfenu (Turczyk et al, 2017). Analogiczny efekt zaobserwowano w tej pracy w przypadku innego leku anti-ER - fulwestrantu. W celu sprawdzenia zaangażowania autofagii w obserwowane efekty ochronne zastosowano inhibitor tego procesu – chlorochinę. Chlorochina i jej pochodna hydroksychlorochina pozostają najlepiej zbadanymi i jedynymi zatwierdzonymi przez FDA inhibitorami autofagii. Zahamowanie autofagii przywróciło pierwotną odpowiedź komórek na działanie leków anti-ER, co wskazuje na zaangażowanie tego procesu w FGFR2-zależnym efekcie ochronnym. Chociaż wiele badań przedklinicznych potwierdziło skuteczność strategii łączących inhibitory autofagii z lekami przeciwnowotworowymi, nadal brakuje ewidentnych dowodów pochodzących z badań klinicznych. W przypadku raka piersi obecnie prowadzone są 4 badania kliniczne dotyczące kombinacji inhibitora autofagii (HCQ) z inhibitorami kinazy mTOR, aromatazy i CDK4/6. Głównym ograniczeniem zastosowania inhibitorów autofagii w terapii jest ich brak selektywności wobec komórek nowotworowych. Oddziałują one także na komórki zdrowe, w których autofagia pełni ważną rolę w utrzymaniu homeostazy. Problematiczną kwestią jest także niska skuteczność kliniczna obecnych inhibitorów autofagii w dawkach tolerowanych przez pacjentów. Rozwiązaniem tego może być synteza związków pochodnych o zwiększonej skuteczności.

Pomimo licznych doniesień naukowych nadal nie są dobrze poznane mechanizmy molekularne, przez które autofagia promuje oporność na leki anti-ER. Otrzymane przez nas wyniki wskazują, że sygnalizacja FGFR2 poprzez indukcję autofagii wpływa na odpowiedź komórek raka piersi na leki anti-ER. W przedstawionym

projekcie doktorskim postanowiono zidentyfikować ścieżkę sygnalizacyjną aktywowaną przez FGFR2, która bierze udział w indukcji autofagii. Analiza poziomu ekspresji p62 w obecności FGF7 i inhibitorów celujących w szereg ścieżek sygnalizacyjnych FGFR2 (p38, Src, ERK1/2, RSK2 oraz JNK) wskazała na potencjalny udział kinazy p38. Jednak ocena wzrostu komórek w Matrigelu wykazała, że zahamowanie p38 nie znosiło efektu ochronnego FGF7 na działanie tamoksyfenu (jak to zaobserwowano w przypadku chlorochiny). Wywnioskowano więc, że kinaza p38 nie bierze udziału w promowanej przez zależność FGFR2/autofagia oporności na leki anty-ER. Poszukiwano więc innego regulowanego przez FGFR2 mechanizmu związanego z procesem autofagii. Założono, że jednym z nich mogłaby być regulacja kompleksu Keap1/Nrf-2, będącego wewnątrzkomórkowym mechanizmem obronnym przed stresem oksydacyjnym i elektrofilowym. Spoiwem łączącym autofagię z sygnalizacją Keap1/Nrf-2 jest białko p62. W początkowych etapach projektu wykazano, że sygnalizacja FGFR2 aktywuje białko p62 w serynie 349, odpowiadającej za dysocjację kompleksu Keap1/Nrf-2 i aktywację Nrf-2. Analiza poziomu ekspresji Nrf-2 wykazała jego wzrost z jednoczesnym spadkiem poziomu Keap1 pod wpływem FGF7, co może świadczyć o rozpadzie tego kompleksu. Jako, że Nrf-2 ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego, sprawdzono również jego lokalizację w obecności FGF7. Co prawda nie zaobserwowano zmiany lokalizacji Nrf-2 z cytoplazmy do jądra komórkowego, jednak wzrost ilości Nrf-2 we frakcji jądrowej w wyniku stymulacji komórek FGF7 sugeruje, że jest to prawdopodobnie aktywny Nrf-2. Zastosowanie metody PLA, charakteryzującej się wysoką czułością i specyficznością wykazało, że sygnalizacja FGFR2 prowadzi do dysocjacji kompleksu Keap1/Nrf-2. Również przy pomocy testu kolorymetrycznego, w którym wykorzystuje się oligonukleotydy wiążące specyficznie jedynie aktywny Nrf-2, zaobserwowano zwiększoną aktywność Nrf-2 pod wpływem FGF7. Analiza ekspresji genu *NFE2L2* (kodującego Nrf-2) wykazała, że sygnalizacja FGFR2 zwiększa poziom mRNA Nrf-2. Na podstawie dotychczas otrzymanych wyników wywnioskowano więc, że sygnalizacja FGFR2 reguluje ekspresję Nrf-2 zarówno na poziomie białka, jak i mRNA. Sprawdzone także wpływ FGFR2 na aktywność transkrypcyjną Nrf-2, poprzez sprawdzenie ekspresji genów zależnych od Nrf-2, posiadających w obrębie promotora motyw ARE. Jako, że Nrf-2 reguluje aktywność ponad 200 genów, na podstawie literatury wytypowano te, które były najczęściej sprawdzane w kontekście oceny jego aktywności (*NQO1*, *HMOX1* oraz *SOD1*). Analiza qPCR wykazała, że aktywacja FGFR2 indukuje ekspresję

wszystkich trzech genów w obu testowanych liniach komórkowych. Podsumowując szereg przeprowadzonych w pracy analiz, jednoznacznie potwierdzono udział sygnalizacji FGFR2 w dysocjacji kompleksu Keap1/Nrf-2, a w następstwie aktywacji Nrf-2.

Pomimo działania antyoksydacyjnego, czynnik transkrypcyjny Nrf-2 może także pełnić rolę pronowotworową. Wykazano zaangażowanie Nrf-2 w rozwoju oporności na chemioterapię w komórkach MCF7 (Syu et al, 2016). Wiele doniesień wskazuje również na udział Nrf-2 w powstawaniu oporności na terapię anti-ER. Wysoka ekspresja i aktywność Nrf-2 (odzwierciedlona podwyższoną ekspresją genów zależnych od Nrf-2) została zanotowana w liniach komórkowych raka piersi opornych na tamoksyfen oraz w tkankach nowotworowych pacjentów leczonych przedoperacyjnie tamoksyfenem (Bekele et al, 2016; Kim et al, 2008; Naumann et al, 2023). Komórki odporne na tamoksyfen wykazywały także krzyżową oporność na radioterapię, której zniesienie uzyskano zahamowując aktywność Nrf-2. W związku z powyższym w kolejnym etapie projektu sprawdzono zaangażowanie Nrf-2 w odpowiedź komórek raka piersi na terapię anti-ER. Analizy wzrostu 3D w Matrigelu wykazały, że dodatek inhibitora Nrf-2 (K67) znosił ochronny efekt FGF7 na działanie zarówno tamoksyfenu, jak i fulwestrantu. Sugeruje to udział Nrf-2 w FGFR2-zależnej ochronie komórek raka piersi przed działaniem leków anti-ER. Co ważne, dobór inhibitora Nrf-2 nie był przypadkowy. K67 blokuje interakcję pomiędzy ufosforylowanym p62 a Keap1, wynikiem czego jest hamowanie dysocjacji kompleksu Keap1/Nrf-2 i degradacja Nrf-2. Zastosowanie tego inhibitora w komórkach raka wątrobowokomórkowego, których zwiększona proliferacja była wynikiem aktywnej osi p62/Nrf-2, skutkowało zahamowaniem proliferacji tych komórek i zmniejszeniem tolerancji na stosowane leki przeciwnowotworowe (Saito et al, 2016). Ponieważ K67 hamuje Nrf-2 w sposób zależny od p62, autorzy tej publikacji sugerują, że inhibitor ten może przynosić korzyści pacjentom, u których oporność na środki przeciwnowotworowe jest powiązana z p62. K67 to inhibitor stosunkowo niedawno odkryty, którego wadą jest niska rozpuszczalność. Niezbędne jest więc opracowanie związków pochodnych o lepszych właściwościach fizycznych dla poprawy potencjalnego efektu farmakologicznego w terapii pacjentów. Aby jednoznacznie potwierdzić udział Nrf-2 w odpowiedzi komórek raka piersi na terapię anti-ER wyprowadzono linie komórkowe z nadekspresją Nrf-2 (T47D Nrf-2 \uparrow oraz MCF7 Nrf-2 \uparrow). Dane literaturowe pokazują, że Nrf-2 może regulować własną aktywność transkrypcyjną (tzw. pętla sprzężenia zwrotnego) poprzez wpływ na poziom

ekspresji mRNA genu kodującego p62 (*SQSTM1*), który posiada sekwencję ARE. Konsekwencją tego jest zwiększenie ekspresji białka p62, prowadzące ostatecznie do dysocjacji kompleksu Keap1/Nrf-2 i aktywacji Nrf-2 (Jain et al, 2010). W wyprowadzonych wariantach z nadekspresją Nrf-2 zanotowano zwiększony poziom ekspresji mRNA i białka p62, co potwierdza wpływ Nrf-2 na ekspresję p62 i możliwą pętlę autoregulacyjną Nrf-2. Co istotne, zarówno analizy wzrostu 3D w Matrigelu jak i testy proliferacyjne MTT potwierdziły, że nadekspresja Nrf-2 w komórkach T47D powodowała ich gorszą odpowiedź na leki anti-ER. Ponadto nadekspresja Nrf-2 potęgowała ochronne działanie FGF7 wobec tamoksyfenu i fulwestrantu. Otrzymane wyniki jednoznacznie potwierdzają zaangażowanie Nrf-2 w regulację odpowiedzi komórek raka piersi na leki anti-ER. Mimo wcześniejszych doniesień o udziale Nrf-2 w powstawaniu oporności na terapie celowane niniejszy projekt doktorski po raz pierwszy pokazuje zaangażowanie Nrf-2 w FGFR2-zależną ochronę komórek raka piersi przed działaniem leków anti-ER.

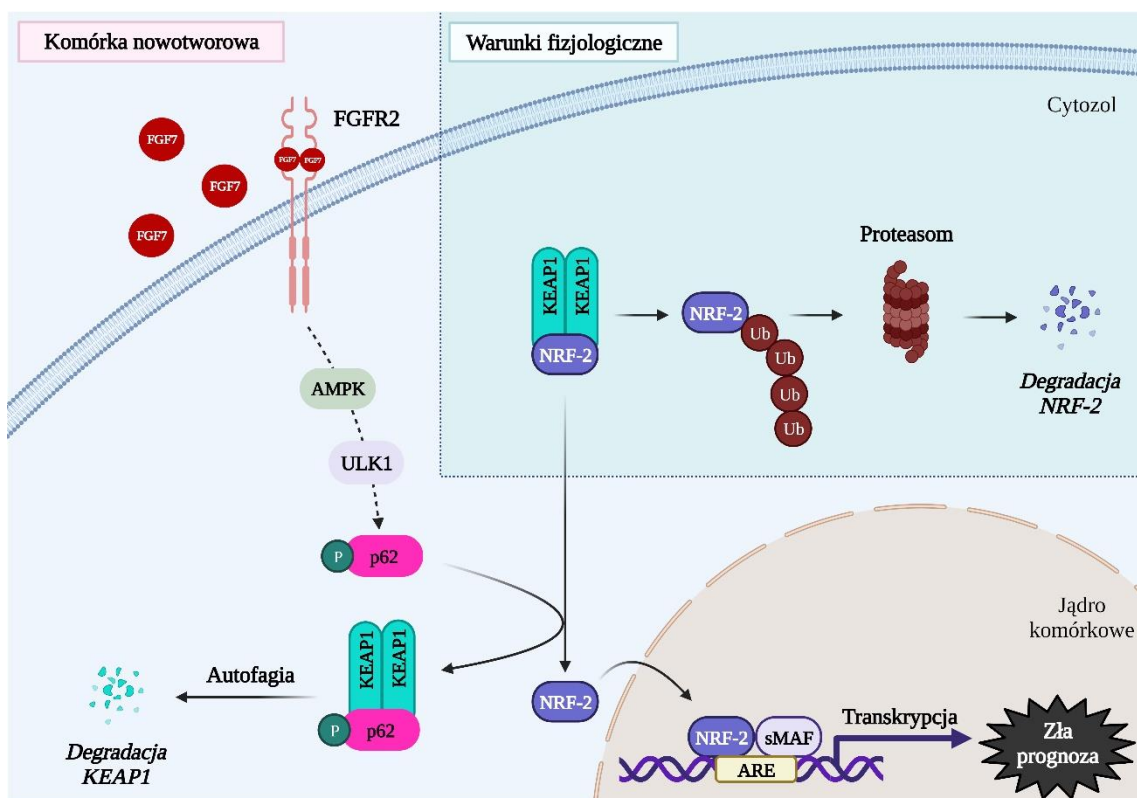
Biorąc pod uwagę zachęcające wyniki z użyciem inhibitora K67 (hamującego aktywność Nrf-2 w sposób zależny od p62) oraz zaobserwowanie autoregulacji Nrf-2 poprzez pętlę sprzężenia zwrotnego i wpływ na poziom p62, w następnym etapie projektu postanowiono potwierdzić zaangażowanie p62 w mediowaną przez oś FGFR2/Nrf-2 ochronę komórek przed działaniem leków anti-ER. Sprawdzone więc, czy wyciszenie ekspresji p62 w liniach T47D i MCF7 przywróci wrażliwość komórek na leczenie anti-ER. W tym celu ponownie przeprowadzono analizy wzrostu 3D w Matrigelu oraz testy proliferacyjne MTT. Ponieważ w hodowli 3D w Matrigelu same leki anti-ER mocno hamowały wzrost komórek, zaobserwowana słabsza odpowiedź wariantów z wyciszoną ekspresją p62 nie była istotna statystycznie. Jednak w teście proliferacyjnym MTT, w którym zastosowano różne stężenia fulwestrantu zaobserwowano istotną lepszą odpowiedź wariantów z wyciszoną ekspresją p62 na działanie tego leku. Co istotniejsze, wyciszenie ekspresji p62 znosiło efekt ochronny FGF7 wobec obydwu leków anti-ER. Na podstawie otrzymanych wyników wywnioskowano, że sygnalizacja FGFR2/p62/Nrf-2 wydaje się być zaangażowana w rozwój oporności na leki anti-ER.

Końcowy etap projektu obejmował określenie potencjalnej wartości prognostycznej zależności FGFR2/Nrf-2. W tym celu wykonano analizy *in silico* oparte o materiał kliniczny pacjentek z luminalnym A rakiem piersi. Aby zachować spójność z naszymi wcześniejszymi analizami materiału klinicznego, na podstawie których określono wartość prognostyczną FGFR2, w niniejszym projekcie przeprowadzono

analizy na tej samej kohorcie pacjentek (baza danych METABRIC). Zaobserwowana poprzednio dobra wartość prognostyczna FGFR2 w tej grupie chorych jest nieco zaskakująca w świetle wyników badań *in vitro* dotyczących udziału tego receptora w progresji raka piersi i odpowiedzi na terapię anty-ER. Analiza korelacji pomiędzy poziomem mRNA *FGFR2* i *NFE2L2* nie wykazała zależności pomiędzy ekspresją tych dwóch genów w tkankach pochodzących od pacjentek. Następnie porównano cechy kliniczno-patologiczne pacjentek z wysoką ekspresją *FGFR2*, różniących się poziomem ekspresji *NFE2L2*. Aby ocenić prognostyczne znaczenie zależności FGFR2/Nrf-2, dalszą analizę materiału klinicznego ograniczono do grupy z wysokim poziomem ekspresji genu *FGFR2* (tzw. *FGFR2-high*) w guzie, którą podzielono względem poziomu ekspresji *NFE2L2*. Analiza korelacji podgrup *FGFR2-high/NFE2L2-low* oraz *FGFR2-high/NFE2L2-high* z cechami kliniczno-patologicznymi (takimi jak wiek w chwili diagnozy, wielkość guza, typ histologiczny, stopień złośliwości histologicznej, stopień zaawansowania czy ekspresja HER2) wykazała istotny statystycznie związek jedynie z wiekiem pacjentek w chwili postawienia diagnozy. Pacjentki *FGFR2-high/NFE2L2-high* charakteryzowały się młodszym wiekiem w momencie diagnozy. Oceniono również czy Nrf-2 wpływa na wartość rokowniczą FGFR2 w badanej grupie chorych. Analiza czasu przeżycia wolnego od nawrotu choroby (RFS) wykazała, że pacjentki o fenotypie *FGFR2-high* posiadające wysoką ekspresję *NFE2L2* charakteryzowały się krótszym czasem przeżycia wolnym od nawrotu choroby niż grupa *FGFR2-high/NFE2L2-low*. Otrzymane dane sugerują, że podgrupa pacjentek *FGFR2-high* jest niejednorodna. Wydaje się, że oznaczenie ekspresji *NFE2L2* ujawnia pacjentki, u których ekspresja *FGFR2* ma gorsze rokowanie. Dane literaturowe potwierdzają złą wartość prognostyczną Nrf-2 w raku piersi (Almeida et al, 2020; Bekele et al, 2016; Bocci et al, 2019; Cha et al, 2017; Guo & Shen, 2017; Onodera et al, 2014; Wolf et al, 2016). Wysoki poziom ekspresji Nrf-2 u pacjentek z rakiem piersi wiązał się z krótszym czasem przeżycia całkowitego (OS) oraz czasem przeżycia wolnego od choroby (DFS). Warto zauważyć, że przeprowadzone analizy korelacji genów nie są doskonałym sposobem weryfikacji efektów obserwowanych w badaniach *in vitro* wykonanych w tym projekcie. Optymalne byłoby sprawdzenie korelacji FGFR2/Nrf-2 na poziomie białka (oznaczonych immunohistochemicznie) z uwzględnieniem lokalizacji komórkowej Nrf-2 i jego aktywności np. w postaci „odcisku transkrypcyjnego” Nrf-2 zależnych genów.

Podsumowując, praca po raz pierwszy dowiodła udziału FGFR2 w regulacji współzależności p62/Keap1/Nrf-2, mającego negatywny wpływ na odpowiedź komórek

luminalnego raka piersi na terapię anti-ER (proponowany mechanizm przedstawia Ryc. 28). Zebrane w niniejszym projekcie dane z analiz *in silico* wydają się być ważnym uzupełnieniem wykazanej przez nasz zespół złożonej wartości prognostycznej FGFR2. Wydaje się, że Nrf-2 mógłby pełnić rolę markera wskazującego na potencjalne wdrożenie terapii anti-FGFR u chorych z luminalnym rakiem piersi, przykładowo w kombinacji z lekami anti-ER. W perspektywie kolejnych lat istotna wydaje się również ocena bezpieczeństwa inhibitorów Nrf-2 poprzedzająca określenie skuteczności klinicznej potencjalnej terapii łączącej inhibitory FGFR i Nrf-2.



Rycina 28. Proponowany mechanizm regulacji współzależności p62/Keap1/Nrf-2 przez FGFR2 w luminalnym raku piersi. W wyniku aktywacji sygnalizacji FGFR2 w komórce nowotworowej dochodzi kolejno do aktywacji kinazy AMPK, kompleksu ULK1 i białka p62, rezultatem czego jest dysocjacja kompleksu Keap1/Nrf-2 (w zdrowej komórce w warunkach fizjologicznych Keap1 kieruje Nrf-2 do degradacji na drodze proteasomalnej). Keap1 związany przez p62 może być kierowany do degradacji w procesie autofagii, z kolei niezwiązany Nrf-2 wędruje do jądra komórkowego, gdzie oddziałując z białkami sMAF wiąże się do miejsca ARE w obrębie promotora regulowanych przez niego genów. Aktywność transkrypcyjna Nrf-2 może prowadzić do pogorszenia rokowania pacjentek z luminalnym A rakiem piersi. Schemat powstał z wykorzystaniem programu BioRender.com.

LITERATURA

- Abdel-Aziz, A. K., Saadeldin, M. K., Salem, A. H., Ibrahim, S. A., Shouman, S., Abdel-Naim, A. B. & Orecchia, R. (2022) A Critical Review of Chloroquine and Hydroxychloroquine as Potential Adjuvant Agents for Treating People with Cancer. *Future Pharmacology*, 2(4), 431-443.
- Actis, C., Muzio, G. & Autelli, R. (2021) Autophagy Triggers Tamoxifen Resistance in Human Breast Cancer Cells by Preventing Drug-Induced Lysosomal Damage. *Cancers*, 13(6), 1252.
- Aita, V. M., Liang, X. H., Murty, V. V., Pincus, D. L., Yu, W., Cayanis, E., Kalachikov, S., Gilliam, T. C. & Levine, B. (1999) Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics*, 59(1), 59-65.
- Almeida, M., Soares, M., Ramalhinho, A. C., Moutinho, J. F., Breitenfeld, L. & Pereira, L. (2020) The prognostic value of NRF2 in breast cancer patients: a systematic review with meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 179(3), 523-532.
- Andersen, S. W., Trentham-Dietz, A., Figueroa, J. D., Titus, L. J., Cai, Q., Long, J., Hampton, J. M., Egan, K. M. & Newcomb, P. A. (2013) Breast cancer susceptibility associated with rs1219648 (fibroblast growth factor receptor 2) and postmenopausal hormone therapy use in a population-based United States study. *Menopause*, 20(3), 354-358.
- Anderson, N. M. & Simon, M. C. (2020) The tumor microenvironment. *Current Biology*, 30(16), R921-R925.
- André, F. & Cortés, J. (2015) Rationale for targeting fibroblast growth factor receptor signaling in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 150(1), 1-8.
- Arnold, M., Morgan, E., Rungay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Gralow, J. R., Cardoso, F., Siesling, S. & Soerjomataram, I. (2022) Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *The Breast*, 66, 15-23.
- Asif, P. J., Longobardi, C., Hahne, M. & Medema, J. P. (2021) The Role of Cancer-Associated Fibroblasts in Cancer Invasion and Metastasis. *Cancers*, 13(18), 4720.

- Baghban, R., Roshangar, L., Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Ebrahimi-Kalan, A., Jaymand, M., Kolahian, S., Javaheri, T. & Zare, P. (2020) Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Communication and Signaling*, 18(1).
- Beenken, A. & Mohammadi, M. (2009) The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(3), 235-253.
- Bekele, R. T., Venkatraman, G., Liu, R.-Z., Tang, X., Mi, S., Benesch, M. G. K., Mackey, J. R., Godbout, R., Curtis, J. M., McMullen, T. P. W. & Brindley, D. N. (2016) Oxidative stress contributes to the tamoxifen-induced killing of breast cancer cells: implications for tamoxifen therapy and resistance. *Scientific Reports*, 6(1), 21164.
- Bhutia, S. K., Mukhopadhyay, S., Sinha, N., Das, D. N., Panda, P. K., Patra, S. K., Maiti, T. K., Mandal, M., Dent, P., Wang, X.-Y., Das, S. K., Sarkar, D. & Fisher, P. B. (2013) Autophagy, *Advances in Cancer Research* Elsevier, 61-95.
- Blows, F. M., Driver, K. E., Schmidt, M. K., Broeks, A., Van Leeuwen, F. E., Wesseling, J., Cheang, M. C., Gelmon, K., Nielsen, T. O., Blomqvist, C., Heikkilä, P., Heikkinen, T., Nevanlinna, H., Akslen, L. A., Bégin, L. R., Foulkes, W. D., Couch, F. J., Wang, X., Cafourek, V., Olson, J. E., Baglietto, L., Giles, G. G., Severi, G., Mclean, C. A., Southey, M. C., Rakha, E., Green, A. R., Ellis, I. O., Sherman, M. E., Lissowska, J., Anderson, W. F., Cox, A., Cross, S. S., Reed, M. W. R., Provenzano, E., Dawson, S.-J., Dunning, A. M., Humphreys, M., Easton, D. F., García-Closas, M., Caldas, C., Pharoah, P. D. & Huntsman, D. (2010) Subtyping of Breast Cancer by Immunohistochemistry to Investigate a Relationship between Subtype and Short and Long Term Survival: A Collaborative Analysis of Data for 10,159 Cases from 12 Studies. *PLoS Medicine*, 7(5), e1000279.
- Bocci, F., Tripathi, S. C., Vilchez Mercedes, S. A., George, J. T., Casabar, J. P., Wong, P. K., Hanash, S. M., Levine, H., Onuchic, J. N. & Jolly, M. K. (2019) NRF2 activates a partial epithelial-mesenchymal transition and is maximally present in a hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. *Integr Biol (Camb)*, 11(6), 251-263.
- Borriello, L., Nakata, R., Sheard, M. A., Fernandez, G. E., Sposto, R., Malvar, J., Blavier, L., Shimada, H., Asgharzadeh, S., Seeger, R. C. & Declerck, Y. A. (2017)

- Cancer-Associated Fibroblasts Share Characteristics and Protumorigenic Activity with Mesenchymal Stromal Cells. *Cancer Research*, 77(18), 5142-5157.
- Braun, M., Piasecka, D., Tomasik, B., Mieczkowski, K., Stawiski, K., Zielinska, A., Kopczynski, J., Nejc, D., Kordek, R., Sadej, R. & Romanska, H. M. (2020) Hormonal Receptor Status Determines Prognostic Significance of FGFR2 in Invasive Breast Carcinoma. *Cancers*, 12(9), 2713.
- Brechbuhl, H. M., Finlay-Schultz, J., Yamamoto, T. M., Gillen, A. E., Cittelly, D. M., Tan, A.-C., Sams, S. B., Pillai, M. M., Elias, A. D., Robinson, W. A., Sartorius, C. A. & Kabos, P. (2017) Fibroblast Subtypes Regulate Responsiveness of Luminal Breast Cancer to Estrogen. *Clinical Cancer Research*, 23(7), 1710-1721.
- Brisken, C. & O'Malley, B. (2010) Hormone Action in the Mammary Gland. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(12), a003178-a003178.
- Brooks, A. N., Kilgour, E. & Smith, P. D. (2012) Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer. *Clin Cancer Res*, 18(7), 1855-62.
- Bryan, H. K., Olayanju, A., Goldring, C. E. & Park, B. K. (2013) The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem Pharmacol*, 85(6), 705-17.
- Bursch, W., Ellinger, A., Kienzl, H., Török, L., Pandey, S., Sikorska, M., Walker, R. & Hermann, R. S. (1996) Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis*, 17(8), 1595-607.
- Campbell, T. M., Castro, M. A. A., De Oliveira, K. G., Ponder, B. A. J. & Meyer, K. B. (2018) ER α Binding by Transcription Factors NFIB and YBX1 Enables FGFR2 Signaling to Modulate Estrogen Responsiveness in Breast Cancer. *Cancer Research*, 78(2), 410-421.
- Cerliani, J. P., Guillardoy, T., Giulianelli, S., Vaque, J. P., Gutkind, J. S., Vanzulli, S. I., Martins, R., Zeitlin, E., Lamb, C. A. & Lanari, C. (2011) Interaction between FGFR-2, STAT5, and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Cancer Research*, 71(10), 3720-3731.

- Cha, Y. J., Jung, W. H. & Koo, J. S. (2017) Differential Site-Based Expression of Pentose Phosphate Pathway-Related Proteins among Breast Cancer Metastases. *Disease Markers*, 2017, 1-10.
- Chang, N. C. (2020) Autophagy and Stem Cells: Self-Eating for Self-Renewal. *Front Cell Dev Biol*, 8, 138.
- Chavez-Dominguez, R., Perez-Medina, M., Lopez-Gonzalez, J. S., Galicia-Velasco, M. & Aguilar-Cazares, D. (2020) The Double-Edge Sword of Autophagy in Cancer: From Tumor Suppression to Pro-tumor Activity. *Front Oncol*, 10, 578418.
- Chen, L., Zhang, Y., Yin, L., Cai, B., Huang, P., Li, X. & Liang, G. (2021) Fibroblast growth factor receptor fusions in cancer: opportunities and challenges. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40(1).
- Chen, Y., Zhang, W., Guo, X., Ren, J. & Gao, A. (2019) The crosstalk between autophagy and apoptosis was mediated by phosphorylation of Bcl-2 and beclin1 in benzene-induced hematotoxicity. *Cell Death & Disease*, 10(10).
- Chowdhry, S., Zhang, Y., McMahon, M., Sutherland, C., Cuadrado, A. & Hayes, J. D. (2013) Nrf2 is controlled by two distinct β -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. *Oncogene*, 32(32), 3765-3781.
- Cook, K. L., Shajahan, A. N. & Clarke, R. (2011) Autophagy and endocrine resistance in breast cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 11(8), 1283-1294.
- Cook, K. L., Wärrri, A., Soto-Pantoja, D. R., Clarke, P. A., Cruz, M. I., Zwart, A. & Clarke, R. (2014) Chloroquine Inhibits Autophagy to Potentiate Antiestrogen Responsiveness in ER+ Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 20(12), 3222-3232.
- Coombes, R. C., Badman, P. D., Lozano-Kuehne, J. P., Liu, X., Macpherson, I. R., Zubairi, I., Baird, R. D., Rosenfeld, N., Garcia-Corbacho, J., Cresti, N., Plummer, R., Armstrong, A., Allerton, R., Landers, D., Nicholas, H., McLellan, L., Lim, A., Mouliere, F., Pardo, O. E., Ferguson, V. & Seckl, M. J. (2022) Results of the phase IIa RADICAL trial of the FGFR inhibitor AZD4547 in endocrine resistant breast cancer. *Nature Communications*, 13(1).

- Costa, A., Kieffer, Y., Scholer-Dahirel, A., Pelon, F., Bourachot, B., Cardon, M., Sirven, P., Magagna, I., Fuhrmann, L., Bernard, C., Bonneau, C., Kondratova, M., Kuperstein, I., Zinovyev, A., Givel, A.-M., Parrini, M.-C., Soumelis, V., Vincent-Salomon, A. & Mechta-Grigoriou, F. (2018) Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell*, 33(3), 463-479.e10.
- Crawford, A. C., Riggins, R. B., Shajahan, A. N., Zwart, A. & Clarke, R. (2010) Co-Inhibition of BCL-W and BCL2 Restores Antiestrogen Sensitivity through BECN1 and Promotes an Autophagy-Associated Necrosis. *PLoS ONE*, 5(1), e8604.
- Cui, F., Wu, D., Wang, W., He, X. & Wang, M. (2016) Variants of FGFR2 and their associations with breast cancer risk: a HUGE systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 155(2), 313-335.
- Curtis, C., Shah, S. P., Chin, S.-F., Turashvili, G., Rueda, O. M., Dunning, M. J., Speed, D., Lynch, A. G., Samarajiwa, S., Yuan, Y., Gräf, S., Ha, G., Haffari, G., Bashashati, A., Russell, R., Mckinney, S., Langerød, A., Green, A., Provenzano, E., Wishart, G., Pinder, S., Watson, P., Markowitz, F., Murphy, L., Ellis, I., Purushotham, A., Børresen-Dale, A.-L., Brenton, J. D., Tavaré, S., Caldas, C. & Aparicio, S. (2012) The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 486(7403), 346-352.
- Cuzick, J., Forbes, J. F., Sestak, I., Cawthorn, S., Hamed, H., Holli, K., Howell, A. & Investigators, I. B. C. I. S. I. (2007) Long-term results of tamoxifen prophylaxis for breast cancer--96-month follow-up of the randomized IBIS-I trial. *J Natl Cancer Inst*, 99(4), 272-82.
- Czaplinska, D., Mieczkowski, K., Supernat, A., Skladanowski, A. C., Kordek, R., Biernat, W., Zaczek, A. J., Romanska, H. M. & Sadej, R. (2016) Interactions between FGFR2 and RSK2—implications for breast cancer prognosis. *Tumor Biology*, 37(10), 13721-13731.
- Czaplinska, D., Turczyk, L., Grudowska, A., Mieszkowska, M., Lipinska, A. D., Skladanowski, A. C., Zaczek, A. J., Romanska, H. M. & Sadej, R. (2014) Phosphorylation of RSK2 at Tyr529 by FGFR2-p38 enhances human mammary epithelial cells migration. *Biochim Biophys Acta*, 1843(11), 2461-70.

- Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J. & Shi, B. (2015) Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res*, 5(10), 2929-43.
- Denicola, G. M., Karreth, F. A., Humpton, T. J., Gopinathan, A., Wei, C., Frese, K., Mangal, D., Yu, K. H., Yeo, C. J., Calhoun, E. S., Scrimieri, F., Winter, J. M., Hruban, R. H., Iacobuzio-Donahue, C., Kern, S. E., Blair, I. A. & Tuveson, D. A. (2011) Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature*, 475(7354), 106-109.
- Dikic, I. & Elazar, Z. (2018) Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(6), 349-364.
- Ding, X., Boney-Montoya, J., Owen, M., Bryn, Bookout, L., Angie, Coate, C., Katie, Mangelsdorf, J., David & Kliewer, A., Steven (2012) β Klotho Is Required for Fibroblast Growth Factor 21 Effects on Growth and Metabolism. *Cell Metabolism*, 16(3), 387-393.
- Duan, L., Calhoun, S., Shim, D., Perez, R. E., Blatter, L. A. & Maki, C. G. (2021) Fatty acid oxidation and autophagy promote endoxifen resistance and counter the effect of AKT inhibition in ER-positive breast cancer cells. *J Mol Cell Biol*, 13(6), 433-444.
- Duan, L., Danzer, B., Levenson, V. V. & Maki, C. G. (2014) Critical roles for nitric oxide and ERK in the completion of prosurvival autophagy in 4OHTAM-treated estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Cancer Letters*, 353(2), 290-300.
- Dunnwald, L. K., Rossing, M. A. & Li, C. I. (2007) Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Research*, 9(1).
- Easton, D. F., Pooley, K. A., Dunning, A. M., Pharoah, P. D. P., Thompson, D., Ballinger, D. G., Struwing, J. P., Morrison, J., Field, H., Luben, R., Wareham, N., Ahmed, S., Healey, C. S., Bowman, R., Luccarini, C., Conroy, D., Shah, M., Munday, H., Jordan, C., Perkins, B., West, J., Redman, K., Driver, K., Meyer, K. B., Haiman, C. A., Kolonel, L. K., Henderson, B. E., Le Marchand, L., Brennan, P., Sangrajrang, S., Gaborieau, V., Odefrey, F., Shen, C.-Y., Wu, P.-E., Wang, H.-C., Eccles, D., Evans, D. G., Peto, J., Fletcher, O., Johnson, N., Seal, S., Stratton, M. R., Rahman, N., Chenevix-Trench, G., Bojesen, S. E., Nordestgaard,

B. G., Axelsson, C. K., Garcia-Closas, M., Brinton, L., Chanock, S., Lissowska, J., Peplonska, B., Nevanlinna, H., Fagerholm, R., Eerola, H., Kang, D., Yoo, K.-Y., Noh, D.-Y., Ahn, S.-H., Hunter, D. J., Hankinson, S. E., Cox, D. G., Hall, P., Wedren, S., Liu, J., Low, Y.-L., Bogdanova, N., Schürmann, P., Dörk, T., Tollenaar, R. A. E. M., Jacobi, C. E., Devilee, P., Klijn, J. G. M., Sigurdson, A. J., Doody, M. M., Alexander, B. H., Zhang, J., Cox, A., Brock, I. W., Macpherson, G., Reed, M. W. R., Couch, F. J., Goode, E. L., Olson, J. E., Meijers-Heijboer, H., Van Den Ouweland, A., Uitterlinden, A., Rivadeneira, F., Milne, R. L., Ribas, G., Gonzalez-Neira, A., Benitez, J., Hopper, J. L., McCreddie, M., Southey, M., Giles, G. G., Schroen, C., Justenhoven, C., Brauch, H., Hamann, U., et al (2007) Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature*, 447(7148), 1087-1093.

Ellmann, S., Sticht, H., Thiel, F., Beckmann, M. W., Strick, R. & Strissel, P. L. (2009) Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(15), 2405-2426.

Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J. A. & Lluch, A. (2012) Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*, 38(6), 698-707.

Fan, W., Tang, Z., Chen, D., Moughon, D., Ding, X., Chen, S., Zhu, M. & Zhong, Q. (2010) Keap1 facilitates p62-mediated ubiquitin aggregate clearance via autophagy. *Autophagy*, 6(5), 614-621.

Fearon, D. T. (2014) The carcinoma-associated fibroblast expressing fibroblast activation protein and escape from immune surveillance. *Cancer Immunol Res*, 2(3), 187-93.

Felzen, V., Hiebel, C., Koziollek-Drechsler, I., Reißig, S., Wolfrum, U., Kögel, D., Brandts, C., Behl, C. & Morawe, T. (2015) Estrogen receptor α regulates non-canonical autophagy that provides stress resistance to neuroblastoma and breast cancer cells and involves BAG3 function. *Cell Death & Disease*, 6(7), e1812-e1812.

Fisher, B., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., Cecchini, R. S., Cronin, W. M., Robidoux, A., Bevers, T. B., Kavanah, M. T., Atkins, J. N., Margolese, R. G., Runowicz, C. D., James, J. M., Ford, L. G. & Wolmark, N. (2005) Tamoxifen for

the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J Natl Cancer Inst*, 97(22), 1652-62.

Fisher, B., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., Redmond, C. K., Kavanah, M., Cronin, W. M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J., Daly, M., Wieand, S., Tan-Chiu, E., Ford, L. & Wolmark, N. (1998) Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst*, 90(18), 1371-88.

Francavilla, C. & O'Brien, C. S. (2022) Fibroblast growth factor receptor signalling dysregulation and targeting in breast cancer. *Open Biology*, 12(2).

Fraser, J., Cabodevilla, A. G., Simpson, J. & Gammoh, N. (2017) Interplay of autophagy, receptor tyrosine kinase signalling and endocytic trafficking. *Essays Biochem*, 61(6), 597-607.

Friedman, G., Levi-Galibov, O., David, E., Bornstein, C., Giladi, A., Dadiani, M., Mayo, A., Halperin, C., Pevsner-Fischer, M., Lavon, H., Mayer, S., Nevo, R., Stein, Y., Balint-Lahat, N., Barshack, I., Ali, H. R., Caldas, C., Nili-Gal-Yam, E., Alon, U., Amit, I. & Scherz-Shouval, R. (2020) Cancer-associated fibroblast compositions change with breast cancer progression linking the ratio of S100A4+ and PDPN+ CAFs to clinical outcome. *Nature Cancer*, 1(7), 692-708.

Galan-Cobo, A., Sitthideatphaiboon, P., Qu, X., Poteete, A., Pisegna, M. A., Tong, P., Chen, P. H., Boroughs, L. K., Rodriguez, M. L. M., Zhang, W., Parlati, F., Wang, J., Gandhi, V., Skoulidis, F., DeBerardinis, R. J., Minna, J. D. & Heymach, J. V. (2019) LKB1 and KEAP1/NRF2 Pathways Cooperatively Promote Metabolic Reprogramming with Enhanced Glutamine Dependence in. *Cancer Res*, 79(13), 3251-3267.

Galluzzi, L., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J. M., Cecconi, F., Choi, A. M., Chu, C. T., Codogno, P., Colombo, M. I., Cuervo, A. M., Debnath, J., Deretic, V., Dikic, I., Eskelinen, E. L., Fimia, G. M., Fulda, S., Gewirtz, D. A., Green, D. R., Hansen, M., Harper, J. W., Jäättelä, M., Johansen, T., Juhasz, G., Kimmelman, A. C., Kraft, C., Ktistakis, N. T., Kumar, S., Levine, B., Lopez-Otin, C., Madeo, F., Martens, S., Martinez, J., Melendez, A., Mizushima, N., Münz, C., Murphy, L. O., Penninger, J. M., Piacentini, M., Reggiori, F., Rubinsztein, D. C., Ryan, K. M., Santambrogio, L., Scorrano, L.,

- Simon, A. K., Simon, H. U., Simonsen, A., Tavernarakis, N., Tooze, S. A., Yoshimori, T., Yuan, J., Yue, Z., Zhong, Q. & Kroemer, G. (2017a) Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal*, 36(13), 1811-1836.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Levine, B., Green, D. R. & Kroemer, G. (2017b) Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles. *Nat Rev Drug Discov*, 16(7), 487-511.
- Garcia-Closas, M., Hall, P., Nevanlinna, H., Pooley, K., Morrison, J., Richesson, D. A., Bojesen, S. E., Nordestgaard, B. G., Axelsson, C. K., Arias, J. I., Milne, R. L., Ribas, G., González-Neira, A., Benítez, J., Zamora, P., Brauch, H., Justenhoven, C., Hamann, U., Ko, Y.-D., Bruening, T., Haas, S., Dörk, T., Schürmann, P., Hillemanns, P., Bogdanova, N., Bremer, M., Karstens, J. H., Fagerholm, R., Aaltonen, K., Aittomäki, K., Von Smitten, K., Blomqvist, C., Mannermaa, A., Uusitupa, M., Eskelinen, M., Tengström, M., Kosma, V.-M., Kataja, V., Chenevix-Trench, G., Spurdle, A. B., Beesley, J., Chen, X., Devilee, P., Van Asperen, C. J., Jacobi, C. E., Tollenaar, R. A. E. M., Huijts, P. E. A., Klijn, J. G. M., Chang-Claude, J., Kropp, S., Slinger, T., Flesch-Janys, D., Mutschelknauss, E., Salazar, R., Wang-Gohrke, S., Couch, F., Goode, E. L., Olson, J. E., Vachon, C., Fredericksen, Z. S., Giles, G. G., Baglietto, L., Severi, G., Hopper, J. L., English, D. R., Southey, M. C., Haiman, C. A., Henderson, B. E., Kolonel, L. N., Le Marchand, L., Stram, D. O., Hunter, D. J., Hankinson, S. E., Cox, D. G., Tamimi, R., Kraft, P., Sherman, M. E., Chanock, S. J., Lissowska, J., Brinton, L. A., Peplonska, B., Klijn, J. G. M., Hooning, M. J., Meijers-Heijboer, H., Collee, J. M., Van Den Ouweland, A., Uitterlinden, A. G., Liu, J., Lin, L. Y., Yuqing, L., Humphreys, K., Czene, K., Cox, A., Balasubramanian, S. P., Cross, S. S., Reed, M. W. R., Blows, F., Driver, K., Dunning, A., Tyrer, J., et al (2008) Heterogeneity of Breast Cancer Associations with Five Susceptibility Loci by Clinical and Pathological Characteristics. *PLoS Genetics*, 4(4), e1000054.
- Garufi, A., Giorno, E., Gilardini Montani, M. S., Pistritto, G., Crispini, A., Cirone, M. & D'Orazi, G. (2021) p62/SQSTM1/Keap1/NRF2 Axis Reduces Cancer Cells Death-Sensitivity in Response to Zn(II)-Curcumin Complex. *Biomolecules*, 11(3), 348.

- Giaquinto, A. N., Sung, H., Miller, K. D., Kramer, J. L., Newman, L. A., Minihan, A., Jemal, A. & Siegel, R. L. (2022) Breast Cancer Statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(6), 524-541.
- Giulianelli, S., Cerliani, J. P., Lamb, C. A., Fabris, V. T., Bottino, M. C., Gorostiaga, M. A., Novaro, V., Góngora, A., Baldi, A., Molinolo, A. & Lanari, C. (2008) Carcinoma-associated fibroblasts activate progesterone receptors and induce hormone independent mammary tumor growth: A role for the FGF-2/FGFR-2 axis. *International Journal of Cancer*, 123(11), 2518-2531.
- Glick, D., Barth, S. & Macleod, K. F. (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology*, 221(1), 3-12.
- Gorrini, C., Gang, B. P., Bassi, C., Wakeham, A., Baniasadi, S. P., Hao, Z., Li, W. Y., Cescon, D. W., Li, Y.-T., Molyneux, S., Penrod, N., Lupien, M., Schmidt, E. E., Stambolic, V., Gauthier, M. L. & Mak, T. W. (2014) Estrogen controls the survival of BRCA1-deficient cells via a PI3K–NRF2-regulated pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(12), 4472-4477.
- Guo, Y. & Shen, L. (2017) Overexpression of NRF2 is correlated with prognoses of patients with malignancies: A meta-analysis. *Thoracic Cancer*, 8(6), 558-564.
- Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E. & Shaw, R. J. (2008) AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell*, 30(2), 214-226.
- Hanahan, D. (2022) Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*, 12(1), 31-46.
- Hanahan, D. & Weinberg, A., Robert (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Helsten, T., Elkin, S., Arthur, E., Tomson, B. N., Carter, J. & Kurzrock, R. (2016) The FGFR Landscape in Cancer: Analysis of 4,853 Tumors by Next-Generation Sequencing. *Clinical Cancer Research*, 22(1), 259–267. Available online: [Accessed].
- Holzmann, K., Grunt, T., Heinzle, C., Sampl, S., Steinhoff, H., Reichmann, N., Kleiter, M., Hauck, M. & Marian, B. (2012) Alternative Splicing of Fibroblast Growth Factor Receptor IgIII Loops in Cancer. *Journal of Nucleic Acids*, 2012, 1-12.

- Hsu, W.-L., Wang, C.-M., Yao, C.-L., Chen, S.-C., Nien, C.-Y., Sun, Y.-H., Tseng, T.-Y. & Luo, Y.-H. (2022) Blockage of Nrf2 and autophagy by L-selenocystine induces selective death in Nrf2-addicted colorectal cancer cells through p62-Keap-1-Nrf2 axis. *Cell Death & Disease*, 13(12).
- Hu, M. & Polyak, K. (2008) Molecular characterisation of the tumour microenvironment in breast cancer. *European Journal of Cancer*, 44(18), 2760-2765.
- Hultsch, S., Kankainen, M., Paavolainen, L., Kovanen, R.-M., Ikonen, E., Kangaspeska, S., Pietiäinen, V. & Kallioniemi, O. (2018) Association of tamoxifen resistance and lipid reprogramming in breast cancer. *BMC Cancer*, 18(1).
- Hunter, D. J., Kraft, P., Jacobs, K. B., Cox, D. G., Yeager, M., Hankinson, S. E., Wacholder, S., Wang, Z., Welch, R., Hutchinson, A., Wang, J., Yu, K., Chatterjee, N., Orr, N., Willett, W. C., Colditz, G. A., Ziegler, R. G., Berg, C. D., Buys, S. S., McCarty, C. A., Feigelson, H. S., Calle, E. E., Thun, M. J., Hayes, R. B., Tucker, M., Gerhard, D. S., Fraumeni, J. F., Hoover, R. N., Thomas, G. & Chanock, S. J. (2007) A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nature Genetics*, 39(7), 870-874.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T. & Ohsumi, Y. (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 408(6811), 488-492.
- Inami, Y., Waguri, S., Sakamoto, A., Kouno, T., Nakada, K., Hino, O., Watanabe, S., Ando, J., Iwadate, M., Yamamoto, M., Lee, M.-S., Tanaka, K. & Komatsu, M. (2011) Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Cell Biology*, 193(2), 275-284.
- Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Bowitz Larsen, K., Atesoh Awuh, J., Øvervatn, A., McMahon, M., Hayes, J. D. & Johansen, T. (2010) p62/SQSTM1 Is a Target Gene for Transcription Factor NRF2 and Creates a Positive Feedback Loop by Inducing Antioxidant Response Element-driven Gene Transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 22576-22591.

- Jassem, J. & Krzakowski, M. (2018) Breast cancer. *Oncology in Clinical Practice*, 14(Vol 14, No 4 (2018)), 171-215.
- Javle, M., Roychowdhury, S., Kelley, R. K., Sadeghi, S., Macarulla, T., Weiss, K. H., Waldschmidt, D. T., Goyal, L., Borbath, I., El-Khoueiry, A., Borad, M. J., Yong, W. P., Philip, P. A., Bitzer, M., Tanasanvimon, S., Li, A., Pande, A., Soifer, H. S., Shepherd, S. P., Moran, S., Zhu, A. X., Bekaii-Saab, T. S. & Abou-Alfa, G. K. (2021) Infigratinib (BGJ398) in previously treated patients with advanced or metastatic cholangiocarcinoma with FGFR2 fusions or rearrangements: mature results from a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 6(10), 803-815.
- Jiang, G., Liang, X., Huang, Y., Lan, Z., Zhang, Z., Su, Z., Fang, Z., Lai, Y., Yao, W., Liu, T., Hu, L., Wang, F., Huang, H., Liu, L. & Jiang, X. (2020) p62 promotes proliferation, apoptosis-resistance and invasion of prostate cancer cells through the Keap1/Nrf2/ARE axis. *Oncology Reports*.
- Jin, M.-Z. & Jin, W.-L. (2020) The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1).
- Johansen, T. & Lamark, T. (2011) Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, 7(3), 279-296.
- Johnson, D. E., Lu, J., Chen, H., Werner, S. & Williams, L. T. (1991) The human fibroblast growth factor receptor genes: a common structural arrangement underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain. *Molecular and Cellular Biology*, 11(9), 4627-4634.
- Jones, M. R., Dilai, S., Lingampally, A., Chao, C. M., Danopoulos, S., Carraro, G., Mukhametshina, R., Wilhelm, J., Baumgart-Vogt, E., Al Alam, D., Chen, C., Mino, P., Zhang, J. S. & Bellusci, S. (2018) A Comprehensive Analysis of Fibroblast Growth Factor Receptor 2b Signaling on Epithelial Tip Progenitor Cells During Early Mouse Lung Branching Morphogenesis. *Front Genet*, 9, 746.
- Kageyama, S., Gudmundsson, S. R., Sou, Y.-S., Ichimura, Y., Tamura, N., Kazuno, S., Ueno, T., Miura, Y., Noshiro, D., Abe, M., Mizushima, T., Miura, N., Okuda, S., Motohashi, H., Lee, J.-A., Sakimura, K., Ohe, T., Noda, N. N., Waguri, S., Eskelinen, E.-L. & Komatsu, M. (2021) p62/SQSTM1-droplet serves as a

- platform for autophagosome formation and anti-oxidative stress response. *Nature Communications*, 12(1).
- Kalluri, R. (2016) The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 16(9), 582-598.
- Kang, J. I., Kim, D. H., Sung, K. W., Shim, S. M., Cha-Molstad, H., Soung, N. K., Lee, K. H., Hwang, J., Lee, H. G., Kwon, Y. T. & Kim, B. Y. (2021) p62-Induced Cancer-Associated Fibroblast Activation via the Nrf2-ATF6 Pathway Promotes Lung Tumorigenesis. *Cancers*, 13(4), 864.
- Kaspar, J. W., Niture, S. K. & Jaiswal, A. K. (2009) Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 47(9), 1304-9.
- Katsuragi, Y., Ichimura, Y. & Komatsu, M. (2015) p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS Journal*, 282(24), 4672-4678.
- Kawakami, Y., Rodríguez-León, J., Koth, C. M., Büscher, D., Itoh, T., Raya, A., Ng, J. K., Esteban, C. R., Takahashi, S., Henrique, D., Schwarz, M. F., Asahara, H. & Izpisua Belmonte, J. C. (2003) MKP3 mediates the cellular response to FGF8 signalling in the vertebrate limb. *Nat Cell Biol*, 5(6), 513-9.
- Kim, D.-H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Sabatini, D. M. (2002) mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery. *Cell*, 110(2), 163-175.
- Kim, S. K., Yang, J. W., Kim, M. R., Roh, S. H., Kim, H. G., Lee, K. Y., Jeong, H. G. & Kang, K. W. (2008) Increased expression of Nrf2/ARE-dependent anti-oxidant proteins in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Free Radic Biol Med*, 45(4), 537-46.
- Kitowska, K., Gorska-Arcisz, M., Antoun, D., Zarczynska, I., Czaplinska, D., Szczepaniak, A., Skladanowski, A. C., Wieczorek, M., Stanczak, A., Skupinska, M. & Sadej, R. (2021) MET-Pyk2 Axis Mediates Acquired Resistance to FGFR Inhibition in Cancer Cells. *Front Oncol*, 11, 633410.
- Klionsky, D. J., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M. H., Abudu, Y. P., Acevedo-Arozena, A., Adamopoulos, I. E., Adeli, K., Adolph, T. E., Adornetto, A., Aflaki, E., Agam,

G., Agarwal, A., Aggarwal, B. B., Agnello, M., Agostinis, P., Agrewala, J. N., Agrotis, A., Aguilar, P. V., Ahmad, S. T., Ahmed, Z. M., Ahumada-Castro, U., Aits, S., Aizawa, S., Akkoc, Y., Akoumianaki, T., Akpinar, H. A., Al-Abd, A. M., Al-Akra, L., Al-Gharaibeh, A., Alaoui-Jamali, M. A., Alberti, S., Alcocer-Gómez, E., Alessandri, C., Ali, M., Alim Al-Bari, M. A., Aliwaini, S., Alizadeh, J., Almacellas, E., Almasan, A., Alonso, A., Alonso, G. D., Altan-Bonnet, N., Altieri, D. C., Álvarez, É., Alves, S., Alves da Costa, C., Alzaharna, M. M., Amadio, M., Amantini, C., Amaral, C., Ambrosio, S., Amer, A. O., Ammanathan, V., An, Z., Andersen, S. U., Andrabi, S. A., Andrade-Silva, M., Andres, A. M., Angelini, S., Ann, D., Anozie, U. C., Ansari, M. Y., Antas, P., Antebi, A., Antón, Z., Anwar, T., Apetoh, L., Apostolova, N., Araki, T., Araki, Y., Arasaki, K., Araújo, W. L., Araya, J., Arden, C., Arévalo, M. A., Arguelles, S., Arias, E., Arikath, J., Arimoto, H., Ariosa, A. R., Armstrong-James, D., Arnauné-Pelloquin, L., Aroca, A., Arroyo, D. S., Arsov, I., Artero, R., Asaro, D. M. L., Aschner, M., Ashrafizadeh, M., Ashur-Fabian, O., Atanasov, A. G., Au, A. K., Auburger, P., Auner, H. W., Aurelian, L., et al (2021a) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy*, 17(1), 1-382.

Klionsky, D. J., Petroni, G., Amaravadi, R. K., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J. M., Cadwell, K., Cecconi, F., Choi, A. M. K., Choi, M. E., Chu, C. T., Codogno, P., Colombo, I., Maria, Cuervo, A. M., Deretic, V., Dikic, I., Elazar, Z., Eskelinen, E. L., Fimia, G. M., Gewirtz, D. A., Green, D. R., Hansen, M., Jäättelä, M., Johansen, T., Juhász, G., Karantza, V., Kraft, C., Kroemer, G., Ktistakis, N. T., Kumar, S., Lopez-Otin, C., Macleod, K. F., Madeo, F., Martinez, J., Meléndez, A., Mizushima, N., Münz, C., Penninger, J. M., Perera, M., Rushika, Piacentini, M., Reggiori, F., Rubinsztein, D. C., Ryan, M., Kevin, Sadoshima, J., Santambrogio, L., Scorrano, L., Simon, H. U., Simon, A. K., Simonsen, A., Stolz, A., Tavernarakis, N., Tooze, S. A., Yoshimori, T., Yuan, J., Yue, Z., Zhong, Q., Galluzzi, L. & Pietrocola, F. (2021b) Autophagy in major human diseases. *The EMBO Journal*, 40(19).

Kollmannsberger, C., Britten, C. D., Olszanski, A. J., Walker, J. A., Zang, W., Willard, M. D., Radtke, D. B., Farrington, D. L., Bell-Mcguinn, K. M. & Patnaik, A. (2021) A phase 1 study of LY3076226, a fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)

- antibody–drug conjugate, in patients with advanced or metastatic cancer. *Investigational New Drugs*, 39(6), 1613-1623.
- Komarla, A., Dufresne, S. & Towers, C. G. (2023) Recent Advances in the Role of Autophagy in Endocrine-Dependent Tumors. *Endocr Rev*.
- Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y. S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K. I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K. & Yamamoto, M. (2010) The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol*, 12(3), 213-23.
- Kozieł, M. J., Kowalska, K. & Piastowska-Ciesielska, A. W. (2021) Nrf2: a main responsive element in cells to mycotoxin-induced toxicity. *Archives of Toxicology*, 95(5), 1521-1533.
- Krook, M. A., Reeser, J. W., Ernst, G., Barker, H., Wilberding, M., Li, G., Chen, H.-Z. & Roychowdhury, S. (2021) Fibroblast growth factor receptors in cancer: genetic alterations, diagnostics, therapeutic targets and mechanisms of resistance. *British Journal of Cancer*, 124(5), 880-892.
- Lau, A., Wang, X.-J., Zhao, F., Villeneuve, N. F., Wu, T., Jiang, T., Sun, Z., White, E. & Zhang, D. D. (2010) A Noncanonical Mechanism of Nrf2 Activation by Autophagy Deficiency: Direct Interaction between Keap1 and p62. *Molecular and Cellular Biology*, 30(13), 3275-3285.
- Lee, M.-H., Koh, D., Na, H., Ka, N.-L., Kim, S., Kim, H.-J., Hong, S., Shin, Y. K., Seong, J. K. & Lee, M.-O. (2018) MTA1 is a novel regulator of autophagy that induces tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Autophagy*, 14(5), 812-824.
- Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. (2010) Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*, 141(7), 1117-1134.
- Levine, B., Sinha, S. C. & Kroemer, G. (2008) Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, 4(5), 600-606.
- Levy, J. M. M., Towers, C. G. & Thorburn, A. (2017) Targeting autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 17(9), 528-542.

- Li, C. I., Uribe, D. J. & Daling, J. R. (2005) Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *British Journal of Cancer*, 93(9), 1046-1052.
- Li, M., Liu, J., Li, S., Feng, Y., Yi, F., Wang, L., Wei, S. & Cao, L. (2019) Autophagy-related 7 modulates tumor progression in triple-negative breast cancer. *Laboratory Investigation*, 99(9), 1266-1274.
- Li, T., Jiang, D. & Wu, K. (2020) p62 promotes bladder cancer cell growth by activating KEAP1/NRF2-dependent antioxidative response. *Cancer Science*, 111(4), 1156-1164.
- Li, Z., Chen, B., Wu, Y., Jin, F., Xia, Y. & Liu, X. (2010) Genetic and epigenetic silencing of the beclin 1 gene in sporadic breast tumors. *BMC Cancer*, 10(1), 98.
- Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H. & Levine, B. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402(6762), 672-676.
- Lim, S. M., Mohamad Hanif, E. A. & Chin, S.-F. (2021) Is targeting autophagy mechanism in cancer a good approach? The possible double-edge sword effect. *Cell & Bioscience*, 11(1).
- Lin, X., Zhang, Y., Liu, L., Mckeehan, W. L., Shen, Y., Song, S. & Wang, F. (2011) FRS2 α is Essential for the Fibroblast Growth Factor to Regulate the mTOR Pathway and Autophagy in Mouse Embryonic Fibroblasts. *International Journal of Biological Sciences*, 7(8), 1114-1121.
- Liu, W. J., Ye, L., Huang, W. F., Guo, L. J., Xu, Z. G., Wu, H. L., Yang, C. & Liu, H. F. (2016) p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin–proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 21(1).
- Long, X. & Nephew, K. P. (2006) Fulvestrant (ICI 182,780)-dependent Interacting Proteins Mediate Immobilization and Degradation of Estrogen Receptor- α . *Journal of Biological Chemistry*, 281(14), 9607-9615.
- Loriot, Y., Schuler, M. H., Iyer, G., Witt, O., Doi, T., Qin, S., Tabernero, J., Reardon, D. A., Massard, C., Palmer, D., Lugowska, I., Coward, J., Corassa, M., Stuyckens, K., Liao, H., Najmi, S., Hammond, C., Santiago-Walker, A. E., Sweiti, H. & Pant, S. (2022) Tumor agnostic efficacy and safety of erdafitinib in patients (pts) with

- advanced solid tumors with prespecified fibroblast growth factor receptor alterations (<i>FGFRalt</i>) in RAGNAR: Interim analysis (IA) results. *Journal of Clinical Oncology*, 40(16_suppl), 3007-3007.
- Lu, B.-C., Li, J., Yu, W.-F., Zhang, G.-Z., Wang, H.-M. & Ma, H.-M. (2016) Elevated expression of Nrf2 mediates multidrug resistance in CD133+ head and neck squamous cell carcinoma stem cells. *Oncology Letters*, 12(6), 4333-4338.
- Lu, P., Ewald, A. J., Martin, G. R. & Werb, Z. (2008) Genetic mosaic analysis reveals FGF receptor 2 function in terminal end buds during mammary gland branching morphogenesis. *Dev Biol*, 321(1), 77-87.
- Mailleux, A. A., Spencer-Dene, B., Dillon, C., Ndiaye, D., Savona-Baron, C., Itoh, N., Kato, S., Dickson, C., Thiery, J. P. & Bellusci, S. (2002) Role of FGF10/FGFR2b signaling during mammary gland development in the mouse embryo. *Development*, 129(1), 53-60.
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A. & Kroemer, G. (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(9), 741-52.
- Martinez-Outschoorn, U. E., Goldberg, A. F., Lin, Z., Ko, Y.-H., Flomenberg, N., Wang, C., Pavlides, S., Pestell, R. G., Howell, A., Sotgia, F. & Lisanti, M. P. (2011) Anti-estrogen resistance in breast cancer is induced by the tumor microenvironment and can be overcome by inhibiting mitochondrial function in epithelial cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*, 12(10), 924-938.
- Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K. J., Coppes, R. P., Engedal, N., Mari, M. & Reggiori, F. (2018) Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 14(8), 1435-1455.
- Mcafee, Q., Zhang, Z., Samanta, A., Levi, S. M., Ma, X.-H., Piao, S., Lynch, J. P., Uehara, T., Sepulveda, A. R., Davis, L. E., Winkler, J. D. & Amaravadi, R. K. (2012) Autophagy inhibitor Lys05 has single-agent antitumor activity and reproduces the phenotype of a genetic autophagy deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(21), 8253-8258.

- Meyer, K. B., Maia, A.-T., O'Reilly, M., Teschendorff, A. E., Chin, S.-F., Caldas, C. & Ponder, B. A. J. (2008) Allele-Specific Up-Regulation of FGFR2 Increases Susceptibility to Breast Cancer. *PLoS Biology*, 6(5), e108.
- Mieczkowski, K., Kitowska, K., Braun, M., Galikowska-Bogut, B., Gorska-Arcisz, M., Piasecka, D., Stawiski, K., Zaczek, A. J., Nejc, D., Kordek, R., Romanska, H. M. & Sadej, R. (2022a) FGF7/FGFR2–JunB signalling counteracts the effect of progesterone in luminal breast cancer. *Molecular Oncology*, 16(15), 2823-2842.
- Milkovic, L., Zarkovic, N. & Saso, L. (2017) Controversy about pharmacological modulation of Nrf2 for cancer therapy. *Redox Biol*, 12, 727-732.
- Naumann, F. V., Sweep, F. C. G. J., Adema, G. J., Peeters, W. J. M., Martens, J. W. M., Bussink, J. & Span, P. N. (2023) Tamoxifen induces radioresistance through NRF2-mediated metabolic reprogramming in breast cancer. *Cancer & Metabolism*, 11(1).
- Ni, H.-M., Woolbright, B. L., Williams, J., Copple, B., Cui, W., Luyendyk, J. P., Jaeschke, H. & Ding, W.-X. (2014) Nrf2 promotes the development of fibrosis and tumorigenesis in mice with defective hepatic autophagy. *Journal of Hepatology*, 61(3), 617-625.
- Nielsen, T. O., Parker, J. S., Leung, S., Voduc, D., Ebbert, M., Vickery, T., Davies, S. R., Snider, J., Stijleman, I. J., Reed, J., Cheang, M. C. U., Mardis, E. R., Perou, C. M., Bernard, P. S. & Ellis, M. J. (2010) A Comparison of PAM50 Intrinsic Subtyping with Immunohistochemistry and Clinical Prognostic Factors in Tamoxifen-Treated Estrogen Receptor–Positive Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 16(21), 5222-5232.
- Ohta, T., Iijima, K., Miyamoto, M., Nakahara, I., Tanaka, H., Ohtsuji, M., Suzuki, T., Kobayashi, A., Yokota, J., Sakiyama, T., Shibata, T., Yamamoto, M. & Hirohashi, S. (2008) Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res*, 68(5), 1303-9.
- Onodera, Y., Motohashi, H., Takagi, K., Miki, Y., Shibahara, Y., Watanabe, M., Ishida, T., Hirakawa, H., Sasano, H., Yamamoto, M. & Suzuki, T. (2014) NRF2 immunolocalization in human breast cancer patients as a prognostic factor. *Endocrine-Related Cancer*, 21(2), 241-252.

- Ornitz, D. M. & Itoh, N. (2015) The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *WIREs Developmental Biology*, 4(3), 215-266.
- Panieri, E., Buha, A., Telkoparan-Akillilar, P., Cevik, D., Kouretas, D., Veskoukis, A., Skaperda, Z., Tsatsakis, A., Wallace, D., Suzen, S. & Saso, L. (2020) Potential Applications of NRF2 Modulators in Cancer Therapy. *Antioxidants (Basel)*, 9(3).
- Pankova, D., Chen, Y., Terajima, M., Schliekelman, M. J., Baird, B. N., Fahrenholtz, M., Sun, L., Gill, B. J., Vadakkan, T. J., Kim, M. P., Ahn, Y.-H., Roybal, J. D., Liu, X., Parra Cuentas, E. R., Rodriguez, J., Wistuba, I. I., Creighton, C. J., Gibbons, D. L., Hicks, J. M., Dickinson, M. E., West, J. L., Grande-Allen, K. J., Hanash, S. M., Yamauchi, M. & Kurie, J. M. (2016) Cancer-Associated Fibroblasts Induce a Collagen Cross-link Switch in Tumor Stroma. *Molecular Cancer Research*, 14(3), 287-295.
- Park, S., Koo, J. S., Kim, M. S., Park, H. S., Lee, J. S., Kim, S. I. & Park, B. W. (2012) Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *Breast*, 21(1), 50-7.
- Parsa, S., Ramasamy, S. K., De Langhe, S., Gupte, V. V., Haigh, J. J., Medina, D. & Bellusci, S. (2008) Terminal end bud maintenance in mammary gland is dependent upon FGFR2b signaling. *Dev Biol*, 317(1), 121-31.
- Pereira, B., Chin, S.-F., Rueda, O. M., Vollan, H.-K. M., Provenzano, E., Bardwell, H. A., Pugh, M., Jones, L., Russell, R., Sammut, S.-J., Tsui, D. W. Y., Liu, B., Dawson, S.-J., Abraham, J., Northen, H., Peden, J. F., Mukherjee, A., Turashvili, G., Green, A. R., Mckinney, S., Oloumi, A., Shah, S., Rosenfeld, N., Murphy, L., Bentley, D. R., Ellis, I. O., Purushotham, A., Pinder, S. E., Børresen-Dale, A.-L., Earl, H. M., Pharoah, P. D., Ross, M. T., Aparicio, S. & Caldas, C. (2016) The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refine their genomic and transcriptomic landscapes. *Nature Communications*, 7(1), 11479.
- Piasecka, D., Braun, M., Kitowska, K., Mieczkowski, K., Kordek, R., Sadej, R. & Romanska, H. (2019) FGFs/FGFRs-dependent signalling in regulation of steroid hormone receptors – implications for therapy of luminal breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1).

- Piasecka, D., Kitowska, K., Czaplinska, D., Mieczkowski, K., Mieszkowska, M., Turczyk, L., Skladanowski, A. C., Zaczek, A. J., Biernat, W., Kordek, R., Romanska, H. M. & Sadej, R. (2016) Fibroblast growth factor signalling induces loss of progesterone receptor in breast cancer cells. *Oncotarget*, 7(52), 86011-86025.
- Pillai, R., Hayashi, M., Zavitsanou, A. M. & Papagiannakopoulos, T. (2022) NRF2: KEAPing Tumors Protected. *Cancer Discov*, 12(3), 625-643.
- Pontiggia, O., Sampayo, R., Raffo, D., Motter, A., Xu, R., Bissell, M. J., De Kier Joffé, E. B. & Simian, M. (2012) The tumor microenvironment modulates tamoxifen resistance in breast cancer: a role for soluble stromal factors and fibronectin through $\beta 1$ integrin. *Breast Cancer Research and Treatment*, 133(2), 459-471.
- Pouremamali, F., Pouremamali, A., Dadashpour, M., Soozangar, N. & Jeddi, F. (2022) An update of Nrf2 activators and inhibitors in cancer prevention/promotion. *Cell Communication and Signaling*, 20(1).
- Powles, T. J., Ashley, S., Tidy, A., Smith, I. E. & Dowsett, M. (2007) Twenty-year follow-up of the Royal Marsden randomized, double-blinded tamoxifen breast cancer prevention trial. *J Natl Cancer Inst*, 99(4), 283-90.
- Pu, M., Messer, K., Davies, S. R., Vickery, T. L., Pittman, E., Parker, B. A., Ellis, M. J., Flatt, S. W., Marinac, C. R., Nelson, S. H., Mardis, E. R., Pierce, J. P. & Natarajan, L. (2020) Research-based PAM50 signature and long-term breast cancer survival. *Breast Cancer Research and Treatment*, 179(1), 197-206.
- Qadir, M. A., Kwok, B., Dragowska, W. H., To, K. H., Le, D., Bally, M. B. & Gorski, S. M. (2008) Macroautophagy inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells and enhances mitochondrial depolarization. *Breast Cancer Research and Treatment*, 112(3), 389-403.
- Qiao, Y., Zhang, C., Li, A., Wang, D., Luo, Z., Ping, Y., Zhou, B., Liu, S., Li, H., Yue, D., Zhang, Z., Chen, X., Shen, Z., Lian, J., Li, Y., Wang, S., Li, F., Huang, L., Wang, L., Zhang, B., Yu, J., Qin, Z. & Zhang, Y. (2018) IL6 derived from cancer-associated fibroblasts promotes chemoresistance via CXCR7 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene*, 37(7), 873-883.

- Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E.-L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Cattoretti, G. & Levine, B. (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1809-1820.
- Rabinowitz, J. D. & White, E. (2010) Autophagy and Metabolism. *Science*, 330(6009), 1344-1348.
- Rada, P., Rojo, A. I., Chowdhry, S., McMahon, M., Hayes, J. D. & Cuadrado, A. (2011) SCF/ β -TrCP Promotes Glycogen Synthase Kinase 3-Dependent Degradation of the Nrf2 Transcription Factor in a Keap1-Independent Manner. *Molecular and Cellular Biology*, 31(6), 1121-1133.
- Raj-Kumar, P.-K., Liu, J., Hooke, J. A., Kovatich, A. J., Kvecher, L., Shriver, C. D. & Hu, H. (2019) PCA-PAM50 improves consistency between breast cancer intrinsic and clinical subtyping reclassifying a subset of luminal A tumors as luminal B. *Scientific Reports*, 9(1).
- Rizzo, A., Ricci, A. D. & Brandi, G. (2021) Futibatinib, an investigational agent for the treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma: evidence to date and future perspectives. *Expert Opin Investig Drugs*, 30(4), 317-324.
- Rizzolio, S., Giordano, S. & Corso, S. (2022) The importance of being CAFs (in cancer resistance to targeted therapies). *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 41(1).
- Robertson, J. F. (2001) ICI 182,780 (Fulvestrant)--the first oestrogen receptor down-regulator--current clinical data. *Br J Cancer*, 85 Suppl 2(Suppl 2), 11-4.
- Rojo De La Vega, M., Chapman, E. & Zhang, D. D. (2018) NRF2 and the Hallmarks of Cancer. *Cancer Cell*, 34(1), 21-43.
- Russell, R. C., Yuan, H.-X. & Guan, K.-L. (2014) Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Research*, 24(1), 42-57.
- Sahai, E., Astsaturov, I., Cukierman, E., Denardo, D. G., Egeblad, M., Evans, R. M., Fearon, D., Greten, F. R., Hingorani, S. R., Hunter, T., Hynes, R. O., Jain, R. K., Janowitz, T., Jorgensen, C., Kimmelman, A. C., Kolonin, M. G., Maki, R. G., Powers, R. S., Puré, E., Ramirez, D. C., Scherz-Shouval, R., Sherman, M. H., Stewart, S., Tlsty, T. D., Tuveson, D. A., Watt, F. M., Weaver, V., Weeraratna,

- A. T. & Werb, Z. (2020) A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nature Reviews Cancer*, 20(3), 174-186.
- Saito, T., Ichimura, Y., Taguchi, K., Suzuki, T., Mizushima, T., Takagi, K., Hirose, Y., Nagahashi, M., Iso, T., Fukutomi, T., Ohishi, M., Endo, K., Uemura, T., Nishito, Y., Okuda, S., Obata, M., Kouno, T., Imamura, R., Tada, Y., Obata, R., Yasuda, D., Takahashi, K., Fujimura, T., Pi, J., Lee, M.-S., Ueno, T., Ohe, T., Mashino, T., Wakai, T., Kojima, H., Okabe, T., Nagano, T., Motohashi, H., Waguri, S., Soga, T., Yamamoto, M., Tanaka, K. & Komatsu, M. (2016) p62/Sqstm1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming. *Nature Communications*, 7(1), 12030.
- Samaddar, J. S., Gaddy, V. T., Duplantier, J., Thandavan, S. P., Shah, M., Smith, M. J., Browning, D., Rawson, J., Smith, S. B., Barrett, J. T. & Schoenlein, P. V. (2008) A role for macroautophagy in protection against 4-hydroxytamoxifen-induced cell death and the development of antiestrogen resistance. *Mol Cancer Ther*, 7(9), 2977-87.
- Santolla, M. F. & Maggiolini, M. (2020) The FGF/FGFR System in Breast Cancer: Oncogenic Features and Therapeutic Perspectives. *Cancers*, 12(10), 3029.
- Sarabipour, S. & Hristova, K. (2016) Mechanism of FGF receptor dimerization and activation. *Nature Communications*, 7(1), 10262.
- Schoenlein, P. V., Periyasamy-Thandavan, S., Samaddar, J. S., Jackson, W. H. & Barrett, J. T. (2009) Autophagy facilitates the progression of ER α -positive breast cancer cells to antiestrogen resistance. *Autophagy*, 5(3), 400-403.
- Senkus, E., Kyriakides, S., Ohno, S., Penault-Llorca, F., Poortmans, P., Rutgers, E., Zackrisson, S. & Cardoso, F. (2015) Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 26(suppl 5), v8-v30.
- Shekhar, M. P. V., Santner, S., Carolin, K. A. & Tait, L. (2007) Direct Involvement of Breast Tumor Fibroblasts in the Modulation of Tamoxifen Sensitivity. *The American Journal of Pathology*, 170(5), 1546-1560.

- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. & Jemal, A. (2022) Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), 7-33.
- Sova, M. & Saso, L. (2018) Design and development of Nrf2 modulators for cancer chemoprevention and therapy: a review. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 12, 3181-3197.
- Sun, M., Zhao, S., Duan, Y., Ma, Y., Wang, Y., Ji, H. & Zhang, Q. (2021) GLUT1 participates in tamoxifen resistance in breast cancer cells through autophagy regulation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 394(1), 205-216.
- Syu, J.-P., Chi, J.-T. & Kung, H.-N. (2016) Nrf2 is the key to chemotherapy resistance in MCF7 breast cancer cells under hypoxia. *Oncotarget*, 7(12), 14659-14672.
- Tavera-Mendoza, L. E., Westerling, T., Libby, E., Marusyk, A., Cato, L., Cassani, R., Cameron, L. A., Ficarro, S. B., Marto, J. A., Klawitter, J. & Brown, M. (2017) Vitamin D receptor regulates autophagy in the normal mammary gland and in luminal breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(11), E2186-E2194.
- Tiong, K. H., Mah, L. Y. & Leong, C.-O. (2013) Functional roles of fibroblast growth factor receptors (FGFRs) signaling in human cancers. *Apoptosis*, 18(12), 1447-1468.
- Tonelli, C., Chio, I. I. C. & Tuveson, D. A. (2018) Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal*, 29(17), 1727-1745.
- Tsang, M., Friesel, R., Kudoh, T. & Dawid, I. B. (2002) Identification of Sef, a novel modulator of FGF signalling. *Nat Cell Biol*, 4(2), 165-9.
- Turczyk, L., Kitowska, K., Mieszkowska, M., Mieczkowski, K., Czaplinska, D., Piasecka, D., Kordek, R., Skladanowski, A. C., Potemski, P., Romanska, H. M. & Sadej, R. (2017) FGFR2-Driven Signaling Counteracts Tamoxifen Effect on ER α -Positive Breast Cancer Cells. *Neoplasia*, 19(10), 791-804.
- Turner, N. & Grose, R. (2010) Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer*, 10(2), 116-29.
- Turner, N., Lambros, M. B., Horlings, H. M., Pearson, A., Sharpe, R., Natrajan, R., Geyer, F. C., Van Kouwenhove, M., Kreike, B., Mackay, A., Ashworth, A., Van De Vijver, M. J. & Reis-Filho, J. S. (2010) Integrative molecular profiling of triple

negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets. *Oncogene*, 29(14), 2013-2023.

Van Brummelen, E. M. J., Levchenko, E., Dómine, M., Fennell, D. A., Kindler, H. L., Viteri, S., Gadgeel, S., López, P. G., Kostorov, V., Morgensztern, D., Orlov, S., Zauderer, M. G., Vansteenkiste, J. F., Baker-Neblett, K., Vasquez, J., Wang, X., Bellovin, D. I., Schellens, J. H. M., Yan, L., Mitrica, I., Deyoung, M. P. & Trigo, J. (2020) A phase Ib study of GSK3052230, an FGF ligand trap in combination with pemetrexed and cisplatin in patients with malignant pleural mesothelioma. *Investigational New Drugs*, 38(2), 457-467.

Wainberg, Z. A., Enzinger, P. C., Kang, Y. K., Qin, S., Yamaguchi, K., Kim, I. H., Saeed, A., Oh, S. C., Li, J., Turk, H. M., Teixeira, A., Borg, C., Hitre, E., Udrea, A. A., Cardellino, G. G., Sanchez, R. G., Collins, H., Mitra, S., Yang, Y., Catenacci, D. V. T. & Lee, K. W. (2022) Bemarituzumab in patients with FGFR2b-selected gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FIGHT): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol*, 23(11), 1430-1440.

Walden, D., Eslinger, C. & Bekaii-Saab, T. (2022) Pemigatinib for adults with previously treated, locally advanced or metastatic cholangiocarcinoma with FGFR2 fusions/rearrangements. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 15, 175628482211153.

Wang, H., Liu, K., Geng, M., Gao, P., Wu, X., Hai, Y., Li, Y., Luo, L., Hayes, J. D., Wang, X. J. & Tang, X. (2013a) RXR α inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2. *Cancer Res*, 73(10), 3097-108.

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

Wang, M., Zhang, J., Huang, Y., Ji, S., Shao, G., Feng, S., Chen, D., Zhao, K., Wang, Z. & Wu, A. (2017a) Cancer-Associated Fibroblasts Autophagy Enhances Progression of Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Medical Science Monitor*, 23, 3904-3912.

- Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., Gong, Z., Zhang, S., Zhou, J., Cao, K., Li, X., Xiong, W., Li, G., Zeng, Z. & Guo, C. (2017b) Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 8(5), 761-773.
- Wang, X., Qi, H., Wang, Q., Zhu, Y., Wang, X., Jin, M., Tan, Q., Huang, Q., Xu, W., Li, X., Kuang, L., Tang, Y., Du, X., Chen, D. & Chen, L. (2015) FGFR3/fibroblast growth factor receptor 3 inhibits autophagy through decreasing the ATG12–ATG5 conjugate, leading to the delay of cartilage development in achondroplasia. *Autophagy*, 11(11), 1998-2013.
- Weigelt, B., Geyer, F. C. & Reis-Filho, J. S. (2010) Histological types of breast cancer: How special are they? *Molecular Oncology*, 4(3), 192-208.
- White, E. & DiPaola, R. S. (2009) The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res*, 15(17), 5308-16.
- Wijshake, T., Zou, Z., Chen, B., Zhong, L., Xiao, G., Xie, Y., Doench, J. G., Bennett, L. & Levine, B. (2021) Tumor-suppressor function of Beclin 1 in breast cancer cells requires E-cadherin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(5), e2020478118.
- Winkler, J., Abisoye-Ogunniyan, A., Metcalf, K. J. & Werb, Z. (2020) Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. *Nature Communications*, 11(1).
- Wolf, B., Goebel, G., Hackl, H. & Fiegl, H. (2016) Reduced mRNA expression levels of NFE2L2 are associated with poor outcome in breast cancer patients. *BMC Cancer*, 16(1).
- Wolowczyk, C., Neckmann, U., Aure, M. R., Hall, M., Johannessen, B., Zhao, S., Skotheim, R. I., Andersen, S. B., Zwiggelaar, R., Steigedal, T. S., Lingjærde, O. C., Sahlberg, K. K., Almaas, E. & Bjørkøy, G. (2022) NRF2 drives an oxidative stress response predictive of breast cancer. *Free Radic Biol Med*, 184, 170-184.
- Wu, J., Williams, D., Walter, G. A., Thompson, W. E. & Sidell, N. (2014) Estrogen increases Nrf2 activity through activation of the PI3K pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Exp Cell Res*, 328(2), 351-60.

- Xie, Y., Su, N., Yang, J., Tan, Q., Huang, S., Jin, M., Ni, Z., Zhang, B., Zhang, D., Luo, F., Chen, H., Sun, X., Feng, J. Q., Qi, H. & Chen, L. (2020) FGF/FGFR signaling in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1).
- Xing, F. (2010) Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Frontiers in Bioscience*, 15(1), 166.
- Yang, X., Yu, D.-D., Yan, F., Jing, Y.-Y., Han, Z.-P., Sun, K., Liang, L., Hou, J. & Wei, L.-X. (2015) The role of autophagy induced by tumor microenvironment in different cells and stages of cancer. *Cell & Bioscience*, 5(1).
- Yang, Y. & Klionsky, D. J. (2020) Autophagy and disease: unanswered questions. *Cell Death & Differentiation*, 27(3), 858-871.
- Yang, Z. J., Chee, C. E., Huang, S. & Sinicrope, F. A. (2011) The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(9), 1533-1541.
- Yeh, B. K., Igarashi, M., Eliseenkova, A. V., Plotnikov, A. N., Sher, I., Ron, D., Aaronson, S. A. & Mohammadi, M. (2003) Structural basis by which alternative splicing confers specificity in fibroblast growth factor receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), 2266-2271.
- Yeo, S. K. & Guan, J. L. (2017) Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? *Trends Cancer*, 3(11), 753-760.
- Yuan, H., Li, Z.-M., Shao, J., Ji, W.-X., Xia, W. & Lu, S. (2017) FGF2/FGFR1 regulates autophagy in FGFR1-amplified non-small cell lung cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 36(1).
- Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J. & Heintz, N. (2003) Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 15077-15082.
- Zarczynska, I., Gorska-Arcisz, M., Cortez, A. J., Kujawa, K. A., Wilk, A. M., Skladanowski, A. C., Stanczak, A., Skupinska, M., Wieczorek, M., Lisowska, K. M., Sadej, R. & Kitowska, K. (2021) p38 Mediates Resistance to FGFR Inhibition in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cells*, 10(12), 3363.

- Zhang, C., Wang, H.-J., Bao, Q.-C., Wang, L., Guo, T.-K., Chen, W.-L., Xu, L.-L., Zhou, H.-S., Bian, J.-L., Yang, Y.-R., Sun, H.-P., Xu, X.-L. & You, Q.-D. (2016) NRF2 promotes breast cancer cell proliferation and metastasis by increasing RhoA/ROCK pathway signal transduction. *Oncotarget*, 7(45), 73593-73606.
- Zhang, H. S., Zhang, Z. G., Du, G. Y., Sun, H. L., Liu, H. Y., Zhou, Z., Gou, X. M., Wu, X. H., Yu, X. Y. & Huang, Y. H. (2019) Nrf2 promotes breast cancer cell migration via up-regulation of G6PD/HIF-1 α /Notch1 axis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(5), 3451-3463.
- Zhang, X., Ibrahimi, O. A., Olsen, S. K., Umemori, H., Mohammadi, M. & Ornitz, D. M. (2006) Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family. *Journal of Biological Chemistry*, 281(23), 15694-15700.
- Zhang, X., Martinez, D., Koledova, Z., Qiao, G., Streuli, C. H. & Lu, P. (2014) FGF ligands of the postnatal mammary stroma regulate distinct aspects of epithelial morphogenesis. *Development*, 141(17), 3352-62.
- Zheng, J., Zhang, W., Li, L., He, Y., Wei, Y., Dang, Y., Nie, S. & Guo, Z. (2022) Signaling Pathway and Small-Molecule Drug Discovery of FGFR: A Comprehensive Review. *Front Chem*, 10, 860985.
- Zingg, D., Bhin, J., Yemelyanenko, J., Kas, S. M., Rolfs, F., Lutz, C., Lee, J. K., Klarenbeek, S., Silverman, I. M., Annunziato, S., Chan, C. S., Piersma, S. R., Eijkman, T., Badoux, M., Gogola, E., Siteur, B., Sprengers, J., de Klein, B., de Goeij-de Haas, R. R., Riedlinger, G. M., Ke, H., Madison, R., Drenth, A. P., van der Burg, E., Schut, E., Henneman, L., van Miltenburg, M. H., Proost, N., Zhen, H., Wientjens, E., de Bruijn, R., de Ruiter, J. R., Boon, U., de Korte-Grimmerink, R., van Gerwen, B., Féliz, L., Abou-Alfa, G. K., Ross, J. S., van de Ven, M., Rottenberg, S., Cuppen, E., Chessex, A. V., Ali, S. M., Burn, T. C., Jimenez, C. R., Ganesan, S., Wessels, L. F. A. & Jonkers, J. (2022) Publisher Correction: Truncated FGFR2 is a clinically actionable oncogene in multiple cancers. *Nature*, 609(7929), E13.
- Özdemir, B. C., Pentcheva-Hoang, T., Carstens, J. L., Zheng, X., Wu, C. C., Simpson, T. R., Laklai, H., Sugimoto, H., Kahlert, C., Novitskiy, S. V., De Jesus-Acosta, A., Sharma, P., Heidari, P., Mahmood, U., Chin, L., Moses, H. L., Weaver, V. M., Maitra, A., Allison, J. P., LeBleu, V. S. & Kalluri, R. (2014) Depletion of

carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell*, 25(6), 719-34.