



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΑΝΔΡΟΓΟΝΙΚΟΥ  
ΥΠΟΔΟΧΕΑ, ΡΥΘΜΙΣΤΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ AR  
ΟΔΟΥ ΚΑΙ ΥΠΑΡΞΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ  
ΦΩΤΟΠΟΥΛΟΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ  
ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ**

**Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η**

**Ι Ω Α Ν Ν Ι Ν Α 2 0 1 9**









**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΑΝΔΡΟΓΟΝΙΚΟΥ  
ΥΠΟΔΟΧΕΑ, ΡΥΘΜΙΣΤΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΡ  
ΟΔΟΥ ΚΑΙ ΥΠΑΡΞΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ  
ΦΩΤΟΠΟΥΛΟΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ  
ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ**

**Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η  
Ι Ω Α Ν Ν Ι Ν Α 2 0 1 9**



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)





**Ημερομηνία αίτησης του κ. Φωτόπουλου Γεωργίου: 4-2-2013**

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 752α/16-5-2013

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Πενθερουδάκης Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Παυλίδης Νικόλαος, Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γούσια Άννα, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 21-6-2013

*«Μελέτη της ανοσοιστοχημικής έκφρασης ανδρογονικού υποδοχέα (AR), ρυθμιστών σηματοδότησης και δεικτών ενεργότητας της AR οδού και ύπαρξης μεταλλάξεων στον Καρκίνο του Μαστού»*

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 823<sup>α</sup>/14-12-2017**

<b>Μπατιστάτου Άννα,</b>	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
<b>Γούσια Άννα</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
<b>Μήτσης Μιχαήλ</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
<b>Νάστος Δημήτριος</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
<b>Πενθερουδάκης Γεώργιος</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
<b>Χαρίσης Χαράλαμπος</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
<b>Ευαγγέλου Ευάγγελος</b>	Επίκουρος Καθηγητής Υγιεινής με έμφαση στην Κλινική και Μοριακή Επιδημιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 22-12-2017

Ιωάννινα 26-3-2019

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Άννα Μπατιστάτου**

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας





---

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

---

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στην Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το χρονικό διάστημα 2013 - 2017 και αποτελεί μέρος μίας μεγαλύτερης μελέτης της ανοσοιστοχημικής έκφρασης ανδρογονικού υποδοχέα (AR), ρυθμιστών σηματοδότησης και δεικτών ενεργότητας της AR οδού και ύπαρξης μεταλλάξεων στον Καρκίνο του Μαστού.

Ο ανδρογονικός υποδοχέας ( AR ) έχει βρεθεί ότι έχει δράση ligand-dependent και ligand-independent τόσο σε γονιδιακό ( σαν μεταγραφικός παράγοντας ) όσο και σε μη γονιδιακό επίπεδο ( ενδοκυττάριος ρυθμιστής άλλων πρωτεϊνών ). Η AR πρωτεΐνη βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα δεσμευμένη σε HSPs και συνοδές πρωτεΐνες και με τη σύνδεση της σε άλλα στοιχεία ( συνηθέστερα τεστοστερόνη και διυδροτεστοστερόνη , αλλά και υπό άλλες συνθήκες με οιστρογόνα , προγεστερόνη ) ή και με μετενεργοποίηση από HER2, IGF , EGFR , χωρίς διαδικασία σύνδεσης , σχηματίζει ομο- ή ετεροδιμερή (με ERα ) και μετατοπίζεται στον πυρήνα ώστε να ασκήσει το μεταγραφικό της ρόλο.

Ο πληθυσμός που θα μελετηθεί απαρτίζεται από ιστολογικά block παραφίνης αδenoκαρκινώματος μαστού σε ιστικές μικροσυστοιχίες (N=700).Οι ιστοί θα προέρχονται από ασθενείς με χ/θεν T1-4 N0-2 M0 ERany IHC PgRany HER2 any όγκο που έχουν αντιμετωπιστεί σύμφωνα με τα πρότυπα θεραπευτικά πρωτόκολλα της ΕΣΟΟ που περιλαμβάνουν επικουρική θεραπεία με σχήματα βασισμένα σε ταξάνες ή/και ανθρακυκλίνες. Πλήρη κλινικά και παθολογοανατομικά στοιχεία είναι διαθέσιμα στους φακέλους ασθενών.

Στην παρούσα φάση δεν υπάρχει ομοφωνία σε πληθώρα ζητημάτων όπως :

1. την επίπτωση της στον καρκίνο μαστού
2. την ογκοκατασταλτική ή μιτωτική της δράση
3. την ευνοϊκή ή δυσμενή προγνωστική σημασία σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού
4. την επίπτωση των AR μεταλλάξεων στον καρκίνο μαστού
5. το ρυθμιστικό της πλαίσιο
6. την επίπτωση σε υπότυπους καρκίνου μαστού .

Στόχος της διατριβής είναι η προσπάθεια αποσαφήνισης κάποιων από αυτών των ζητημάτων.

Τίποτα από τα ανωτέρω δεν θα ήταν εφικτό χωρίς την συμβολή των παρακάτω ατόμων τους οποίους και ευχαριστώ.

Την κ. Κολλίου Γεωργία, για τη συμβολή της στην στατιστική ανάλυση.

Την ομάδα της ΕΣΟΟ για τη συνδρομή της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες από καρδιάς στον Καθηγητή κ. Πενθερουδάκη που ήταν η κινητήρια δύναμη σε αυτή τη διατριβή και πάντα παρόν με ουσιαστικό ρόλο στην επίλυση των αρκετών δυσκολιών που συναντήσαμε σε αυτό το ταξίδι. Δεν ήταν λίγες οι φορές, ιδιαίτερα όταν έφυγα από τα Ιωάννινα, που όποτε προέκυπτε κάποιο κώλυμα, μικρό ή μεγάλο, ήξερα ότι αρκούσε ένα μήνυμα για να ξεπεραστεί ταχύτατα.

Ξεχωριστές ευχαριστίες στην Καθηγήτρια κ. Γουσια. Ειλικρινά πιστεύω ότι η διατριβή αυτή δεν θα είχε πραγματοποιηθεί χωρίς αυτήν. Χωρίς να με γνωρίζει εκ των προτέρων, χωρίς να έχει καμία υποχρέωση αφιέρωσε ατελείωτο χρόνο μαζί μου εις βάρος της οικογένειάς της, εις βάρος της ξεκούρασης της στην χρώση και ανάγνωση των μικροσυστοιχιών, στην καταγραφή, στην καθοδήγηση για τη βιβλιογραφία... Πάντα πρόθυμη, πάντα διαθέσιμη και υπομονετική να περάσουμε ατελείωτες απογευματινές ώρες πάνω από τα μικροσκόπια σε εκείνο το μικρό δωμάτιο του τμήματος Παθολογικής Ανατομικής.

---

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

### **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

- 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 5**
  - 1.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ 5**
  - 1.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ 5**
  - 1.3 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ 6**
  
- 2. ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΟΝ ΠΡΩΙΜΟ ΜΗ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ 6**
  - 2.1 TNM 6**
  - 2.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ, ΒΑΘΜΟΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΛΕΜΦΑΓΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΣΠΟΡΑ 7**
  - 2.3 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ 8**
  - 2.4 ΓΟΝΙΔΙΑΚΟ ΠΡΟΦΙΛ 9**
    - 2.4.1 LUMINAL ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΥΠΟΤΥΠΟΙ 10**
    - 2.4.2 HER2 ENRICHED 10**
    - 2.4.3 ER ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ ΥΠΟΤΥΠΟΙ 11**
  - 2.5 ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ 11**
    - 2.5.1 Ki 67 11**
    - 2.5.2 P53 12**
    - 2.5.3 ΛΟΙΠΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ 12**
  
- 3. ΠΡΟΒΛΕΠΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ 13**
  - 3.1 ER/PR STATUS 13**
  - 3.2 HER2 STATUS 13**
  - 3.3 ΠΡΟΒΛΕΠΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ 14**
  
- 4. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΠΡΩΙΜΟΥ ΜΗ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ 15**
  - 4.1 ΤΟΠΙΚΟΠΕΡΙΟΧΙΚΗ 15**
  - 4.2 ΟΡΜΟΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ 16**
  - 4.3 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ 16**
  
- 5. AR ΓΟΝΙΔΙΟ 19**
  
- 6. FKBP51 ΚΑΙ FKBP52 21**
  
- 7. PSA 23**
  
- 8. TMPRSS2 35**
  
- 9. AR ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ 26**
  - 9.1 TNBC 28**
  - 9.2 ER + ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ 28**
  - 9.3 HER2 + ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ 29**

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

1. **ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ** 30
  - 1.1 **ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ** 30
  - 1.2 **ΙΣΤΙΚΕΣ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ, ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ CUT OFF** 31
  - 1.3 **ΠΡΟΦΙΛ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ AR. ΥΛΙΚΟ, ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** 33
  - 1.4 **FISH AR/X. ΥΛΙΚΟ, ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** 37
2. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** 38
  - 2.1 **ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ** 39
  - 2.2 **ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ, ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ ΝΟΣΟΥ, ΟΛΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΥΠΟΤΥΠΩΝ** 45
3. **ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** 72
  - 3.1 **TMPRSS2** 72
  - 3.2 **FKBP5** 75
  - 3.3 **PSA** 79
4. **ΠΕΡΙΛΗΨΗ** 80
5. **SUMMARY** 82
6. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ** 94

---

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---

### **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Παγκοσμίως ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο συχνή κακοήθεια, αντιστοιχώντας σε ένα εκατομμύριο περιπτώσεις το χρόνο, έναν επιπολασμό 1 ανά 8 γυναίκες παγκοσμίως [1], και επιπλέον η κύρια αιτία θανάτου στις γυναίκες. Όταν γίνει η διάγνωση του καρκίνου

του μαστού είναι σημαντικό να εξακριβώσουμε την έκταση της νόσου καθώς αυτό θα καθορίσει την θεραπευτική μας προσέγγιση.

### 1.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η επίπτωση του καρκίνου του μαστού είναι πιο συχνή στις ΗΠΑ, Αυστραλία, Νέα Ζηλανδία και στην Ευρώπη ενώ χαμηλότερα ποσοστά εμφάνισης παρατηρούνται στην Ασία και στην Αφρική [2]. Αυτές οι διαφορές οφείλονται σε κοινωνικές διαφορές λόγω της βιομηχανοποίησης ( διατροφή, εμμηναρχή, εμμηνόπαυση, λιγότερες εγκυμοσύνες και μεγαλύτερη ηλικία πρώτης κύησης). Μελέτες που έχουν γίνει στις ΗΠΑ σε μετανάστες δεύτερης και τρίτης γενιάς πιστοποιούν αυτό το γεγονός [3]. Στις ΗΠΑ η νόσος αντιστοιχεί σε 250000 περιπτώσεις ετησίως κάθε χρόνο και σε 40.000 θανάτους [4]. Αυτό οφείλεται κυρίως στη διακοπή της ορμονοθεραπείας αντικατάστασης και στην αύξηση της μαστογραφίας [5]. Ενώ η νοσηρότητα αυξάνεται από το 1970 και μετά η θνησιμότητα ακολουθεί πτωτική τάση [6] και αυτό οφείλεται κυρίως στο καλύτερο έλεγχο και στις νεότερες θεραπείες [7]

### 1.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Σε χώρες με ανεπτυγμένο πρόγραμμα screening η εμφάνιση της νόσου γίνεται κυρίως λόγω μιας παθολογικής μαστογραφίας. Ακόμα και έτσι όμως στο 15% των περιπτώσεων η νόσος δεν ανιχνεύεται στην μαστογραφία και απλά γίνεται με αυτοψηλάφηση και ένα ποσοστό της τάξεως του 30% ανιχνεύεται μεταξύ 2 μαστογραφιών. Επιπλέον 10%των περιπτώσεων εμφανίζεται με μεταστατικό καρκίνο μαστού [8].

Η τοπική νόσος εμφανίζεται σαν μια σκληρή ακίνητη μάζα με ανώμαλα όρια ενώ η πιο προχωρημένη μπορεί να εμφανιστεί με μασχαλιαίους λεμφαδένες, ερύθημα δέρματος, εισολκή της θηλής και εξέλκωση. Η μεταστατική νόσος δεν έχει ειδικά σημεία εμφάνισης και μπορεί να μην έχει συμπτώματα καθόλου ή συμπτώματα ανάλογα με το όργανο που επηρεάζει όπως δύσπνοια, ηπατική ανεπάρκεια και οστικά άλγη.

Απεικονιστικά χρησιμοποιείται η μαστογραφία, ο υπέρηχος και η μαγνητική τομογραφία. Ανάλογα με τη μέθοδο απεικόνισης τα ευρήματα διαφέρουν [9,10]. Στη μαστογραφία φαίνεται μάζα μαλακών μορίων, ασβεστώσεις και άκανθες, στον υπέρηχο απεικονίζεται υποηχογένεια, ασβεστώσεις και πολλαπλοί λοβοί και στην μαγνητική τομογραφία ανώμαλα όρια, ανομοιογένεια στην ενίσχυση και αυξημένο T2 σήμα.

### 1.3 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ

Η πλειοψηφία των κακοηθειών του μαστού προέρχονται από επιθηλιακά στοιχεία και χαρακτηρίζονται σαν καρκινώματα. Αποτελούν μια ετερογενή ομάδα που διαφέρουν στη μικροσκοπική εμφάνιση και βιολογική συμπεριφορά, αν και στην κλινική πράξη αντιμετωπίζονται σε μια οντότητα.

Τα in situ καρκινώματα είναι είτε σωληνώδη είτε λοβώδη. Ο διαχωρισμός αυτός γίνεται κυρίως στο πρότυπο ανάπτυξης και στα κυτταρολογικά χαρακτηριστικά παρά στην ανατομική τους θέση. Τα διηθητικά καρκινώματα απαρτίζονται από διάφορους ιστολογικούς υποτύπους, τα ποσοστά των οποίων προέρχονται από μια σειρά 135.000 γυναικών από τη βάση δεδομένων SEER του NCI από το 1992 -2001 [11] και είναι το διηθητικό πορώδες (76 %) διηθητικό λοβώδες (8 %) πορώδες/λοβώδες (7 %) κολλοειδές (2.4 %) σωληνώδες (1.5 %) μυελλοειδές (1.2 %) θηλώδες (1%) . Άλλοι υπότυποι όπως μεταπλαστικό, βλεννώδες και διηθητικό μικροθηλώδες αντιστοιχούν σε λιγότερο από 5% [12].

## **2. ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΟΝ ΠΡΩΙΜΟ, ΜΗ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ**

Εξ' ορισμού ως προγνωστικός παράγοντας ορίζεται εκείνος που παρέχει πληροφορία για το κλινικό αποτέλεσμα κατά τη στιγμή της διάγνωσης, ανεξάρτητα από τη θεραπεία. Τέτοιοι δείκτες συνήθως αφορούν πολλαπλασιασμό, διήθηση και μεταστατικό δυναμικό [13]. Εν αντιθέση, προβλεπτικός παράγοντας είναι εκείνος που παρέχει πληροφορία για την πιθανότητα ανταπόκρισης σε μια θεραπεία. Αρκετοί παράγοντες πέφτουν και στις δύο κατηγορίες όπως π.χ η έκφραση του HER2

### **2.1 TNM**

Το μέγεθος του όγκου (T), που ορίζεται ως η μεγαλύτερη διάμετρος του πρωτοπαθούς όγκου του μαστού, αναγνωρίστηκε πρώιμα ως ένας σημαντικός προγνωστικός παράγοντας στον καρκίνο του μαστού [14-16]. Σε μια ομάδα 24.740 ασθενών του προγράμματος επιτήρησης, επιδημιολογίας και τελικών αποτελεσμάτων (SEER), το πενταετές ποσοστό επιβίωσης κυμαίνονταν από 91 % για T <2 cm, έως 80 % για T 2 έως 5 cm, και 63 % για T> 5 cm [15]. Το μέγεθος του όγκου συσχετίζεται με λεμφαδενική συμμετοχή, αλλά η προγνωστική αξία των δύο παραγόντων είναι ανεξάρτητη. Σε τριπλά αρνητικούς όγκους, η συσχέτιση του μεγέθους του όγκου με τη λεμφαδενική συμμετοχή και με την πρόγνωση είναι πολύ ασθενέστερη [17].

Η επίπτωση των πολυεστιακών (δηλαδή διηθητικών όγκων που εντοπίζονται στο ίδιο τεταρτημόριο του μαστού) ή των πολυκεντρικών (π.χ. διηθητικών όγκων που εντοπίζονται σε χωριστά τεταρτημόρια του μαστού) όγκων στην πρόγνωση είναι αμφιλεγόμενη, με ενδείξεις ότι σχετίζεται με κακή πρόγνωση και άλλα δεδομένα που υποδηλώνουν ότι δεν έχει αντίκτυπο στην πρόγνωση [18]. Επί του παρόντος, το σύστημα σταδιοποίησης TNM δεν αποδίδει ανεξάρτητη αξία στη πολυεστιακότητα ή πολυκεντρικότητα και χρησιμοποιεί τη διάμετρο της μεγαλύτερης βλάβης για την αντιστοίχιση του σταδίου T

Η λεμφαδενική συμμετοχή (δηλαδή ο αριθμός των ομόπλευρων μασχαλιαίων λεμφαδένων με καρκινική διήθηση ) είναι ένας ισχυρός και ανεξάρτητος αρνητικός προγνωστικός παράγοντας. Μεταξύ των γυναικών χωρίς στοιχεία μεταστατικής νόσου (M0), η πενταετής επιβίωση για όσους παρουσιάζουν τοπική (δηλ. μαστού μόνο) έναντι τοπικοπεριοχικής νόσου, λεμφαδενική συμμετοχής, είναι 99 και 85 τοις εκατό αντίστοιχα



[19] . Ακόμη και μικροί όγκοι (<2 cm) έχουν χειρότερη πρόγνωση παρουσία λεμφαδένων. Σε μια σειρά ασθενών που αφορούσε περίπου 25.000 περιπτώσεις, η σχετική πενταετής επιβίωση ήταν 96, 86 και 66 τοις εκατό αν οι ασθενείς ήταν N0, είχαν έναν έως τρεις λεμφαδένες θετικούς ή είχαν περισσότερους από τέσσερις λεμφαδένες θετικούς [20].

Ενώ οι μακρομεταστάσεις στους λεμφαδένες είναι ένας καλά εδραιωμένος ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας, η σημασία της μεταστατικής νόσου <2 mm (μικρομεταστάσεις, pN1mic) ή απομονωμένων κύτταρων (ITC, pNOITC) στους μασχαλιαίους λεμφαδένες είναι λιγότερο ξεκάθαρη. Ωστόσο, τα στοιχεία [ 21-23] δείχνουν ότι οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού pN1mic έχουν χειρότερη έκβαση σε σύγκριση με εκείνους με καρκίνο του μαστού με N0, ενώ η παρουσία μεμονωμένων καρκινικών κυττάρων δεν επηρεάζει την πρόγνωση

Οι ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού( M1) έχουν πτωχή πρόγνωση καθώς πρόκειται για μη ιάσιμη νόσο.

Το σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου του μαστού που χρησιμοποιείται βασίζεται στο AJCC UICC 2010

## 2.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ, ΒΑΘΜΟΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΛΕΜΦΑΓΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΣΠΟΡΑ

Ο συνηθέστερος τύπος είναι το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (IDC), που αντιπροσωπεύει περισσότερο από το 70% όλων των περιπτώσεων, ακολουθούμενο από το διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα (ILC), με συχνότητα περίπου 10% [11]. Ο ILC έχει μια διακριτή βιολογία και κλινική συμπεριφορά σε σύγκριση με τον IDC, αν και η προγνωστική σημασία της φαίνεται να ποικίλλει σε σχέση με το χρόνο. Αυτό φάνηκε σε μια συγκεντρωτική ανάλυση περισσότερων από 9000 ασθενών με εκτεταμένη παρακολούθηση που ανέφεραν 16% χαμηλότερο κίνδυνο υποτροπής για ILC σε σύγκριση με το IDC κατά τη διάρκεια των πρώτων έξι ετών παρακολούθησης. Ωστόσο, η ILC παρουσίασε 54% υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής μετά από έξι χρόνια [24]. Το σκληροειδές, θηλώδες, βλεννογόνο, μυελικό και αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα έχουν καλή πρόγνωση. Αντίθετα, τα μικροθηλώδη και τα μεταπλαστικά καρκινώματα φαίνεται να έχουν χειρότερη πρόγνωση.

Ο βαθμός διαφοροποίησης (grade) του καρκίνου του μαστού αποδίδεται χρησιμοποιώντας το σύστημα διαβάθμισης Elston-Ellis, το οποίο χαρακτηρίζει τον βαθμό διαφοροποίησης του όγκου από το ποσοστό του σχηματισμού σκληροειδών, τον πυρηνικό πολυμορφισμό και τη μιτωτική δραστηριότητα [25]. Αρχικά το σύστημα αυτό βρέθηκε να είναι προγνωστικό και αυτό επιβεβαιώθηκε σε περαιτέρω μελέτες [26].

Ωστόσο, η χρήση του grading περιορίζεται από την απουσία αντικειμενικότητας μεταξύ των εκάστοτε μετρήσεων και από την έλλειψη προγνωστικών πληροφοριών από όγκους grade 2 που πιθανώς αποτελούνται από ένα μίγμα. Ως εκ τούτου, η AJCC έχει

επιλέξει να μην συμπεριλάβει το βαθμό διαφοροποίησης στο αναθεωρημένο σύστημα σταδιοποίησης TNM για τον καρκίνο του μαστού [27].

Η λεμφαγγειακή διασπορά φαίνεται να είναι ένας κακός προγνωστικός δείκτης, ιδιαίτερα σε όγκους υψηλού βαθμού κακοήθειας. Αυτό απεδείχθη σε μια μελέτη 1704 ασθενών που δεν έλαβαν καμία συστηματική επικουρική θεραπεία, στην οποία η διασπορά (PLVI) ήταν ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για τοπική υποτροπή και θάνατο [28].

### 2.3 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

Η έκφραση υποδοχέα οιστρογόνων (ER) και υποδοχέα προγεστερόνης (PR) γενικά σχετίζεται με βελτιωμένα αποτελέσματα τουλάχιστον βραχυπρόθεσμα. Η θετική έκφραση ER/PR θα πρέπει να χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί εάν ένας ασθενής πρέπει ή δεν πρέπει να λαμβάνει ενδοκρινική θεραπεία.

Τα δεδομένα δείχνουν ότι η συνολική επιβίωση, η επιβίωση χωρίς νόσο και ο χρόνος για την αποτυχία της θεραπείας είναι όλα θετικά συνδεδεμένα με τα επίπεδα ER και PR [29]. Ωστόσο, ενώ ο ετήσιος ρυθμός επανεμφάνισης για καρκίνους θετικούς σε ER είναι χαμηλότερος τα πρώτα πέντε χρόνια μετά την αρχική θεραπεία σε σύγκριση με καρκίνους αρνητικούς σε ER, μελέτες υποδηλώνουν ότι μπορεί να είναι υψηλότερη με πιο μακροπρόθεσμη παρακολούθηση [30]. Για παράδειγμα, σε μία μελέτη με περισσότερους από 4000 ασθενείς με ορμονοθετικό καρκίνο του μαστού που συμμετείχαν στις κλινικές δοκιμές I έως V στις διεθνείς ομάδες μελέτης για τον Καρκίνο του Μαστού, οι ασθενείς με ER θετική νόσο είχαν μικρότερο ετήσιο κίνδυνο υποτροπής κατά τη διάρκεια των πρώτων πέντε ετών από την αρχική θεραπεία τους σε σχέση με εκείνους με ER αρνητική νόσο (9,9 έναντι 11,5 τοις εκατό). Ωστόσο, μετά από πέντε χρόνια, οι ασθενείς με θετική ER έκφραση είχαν μεγαλύτερο ετήσιο κίνδυνο υποτροπής (5 έως 10 έτη: 5,4 έναντι 3,3%, 10 έως 15 ετών: 2,9 έναντι 1,3%, 15 έως 20 ετών: 2,8 έναντι 1,2% [31].

Η έκφραση ER σχετίζεται επίσης με συγκεκριμένο πρότυπο μεταστατικής εξάπλωσης. Για ασαφείς λόγους, οι θετικοί στην ER όγκοι είναι πιο πιθανό να αναπτύξουν μεταστάσεις σε οστά, μαλακούς ιστούς ή αναπαραγωγικές / γεννητικές οδούς. Αντίθετα, οι ER-αρνητικοί όγκοι συχνότερα μεθίστανται στον εγκέφαλο και στο ήπαρ, θέσεις που σχετίζονται με μικρότερη επιβίωση [32].

Οι ER-θετικοί όγκοι είναι πιθανότερο να είναι καλά διαφοροποιημένοι [33], να έχουν μικρότερο βαθμό πολλαπλασιασμού και να είναι διπλοειδείς [34]. Είναι επίσης λιγότερο πιθανό να σχετίζονται με μεταλλάξεις, απώλεια ή ενίσχυση γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού, όπως το p53 (HER2) ή το HER1 όλα τα οποία έχουν συσχετιστεί με φτωχότερη πρόγνωση.[35-41]

Ο PR υποδοχέας φαίνεται να είναι προγνωστικά ανεξάρτητος από τον ER [42]. Αυτό παρουσιάστηκε σε μια μεγάλη πληθυσμιακή μελέτη που περιελάμβανε περισσότερες από 1000 γυναίκες με πρώιμο καρκίνο του μαστού, οι οποίες υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση με θεραπευτική πρόθεση [43]. Η συστηματική θεραπεία συνίστατο σε χημειοθεραπεία και ενδοκρινική θεραπεία σε 29 και 80,5% των ασθενών, αντίστοιχα. Σε ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών, η έκφραση PR ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας της επιβίωσης χωρίς νόσο και ειδική επιβίωσης για καρκίνο του μαστού. Επιπλέον, η προγνωστική σημασία του PR φαίνεται να αυξάνεται μετά από το έκτο έτος παρακολούθησης. Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζονται από το εύρημα ότι ασθενείς με ER-θετική, PR-αρνητική νόσο έχουν πιο επιθετικό υπότυπο καρκίνο του μαστού και συχνά υποπίπτουν στους όγκους Luminal B[44].

Η υπερέκφραση του HER2 έχει μια δυσμενή πρόγνωση, ιδιαίτερα εάν οι ασθενείς δεν υποβάλλονται σε θεραπεία με θεραπεία και φάρμακα που στοχεύουν τον HER2. Το ογκογονίδιο HER2 κωδικοποιεί έναν υποδοχέα διαμεμβρανικής γλυκοπρωτεΐνης 185 kD με δραστηριότητα ενδοκυτταρικής τυροσινικής κινάσης. Ανήκει στην οικογένεια υποδοχέων υποδοχέα αυξητικού παράγοντα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), οι οποίοι είναι κρίσιμοι στην ενεργοποίηση των οδών υποκυτταρικής μεταγωγής σήματος που ελέγχουν την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων και ενδεχομένως την αγγειογένεση [45]. Ο HER2, ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2, ονομάστηκε προηγουμένως HER2 / neu ή ERBB-2

Ωστόσο, η προστιθέμενη αξία αυτών των πληροφοριών στην κλινική πρακτική είναι αμφισβητήσιμη επειδή τα αποτελέσματα επηρεάζονται σημαντικά από τη χορήγηση της θεραπείας [46]. Στις γυναίκες με καρκίνο του μαστού, το κύριο όφελος από τη δοκιμή HER2 είναι η προγνωστική αξία για τους κατάλληλους υποψήφιους που θα πρέπει να λαμβάνουν φάρμακα που κατευθύνονται από HER2

## 2.4 ΓΟΝΙΔΙΑΚΟ ΠΡΟΦΙΛ

Η κυτταρική και μοριακή ετερογένεια του καρκίνου του μαστού και ο μεγάλος αριθμός γονιδίων που εμπλέκονται στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης, του θανάτου και της διαφοροποίησης υπογραμμίζουν τη σπουδαιότητα της μελέτης πολλαπλών γενετικών αλλαγών στο σύνολο τους. Η δημιουργία προφίλ γονιδιακής έκφρασης επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση της δραστηριότητας (έκφρασης) χιλιάδων γονιδίων στο καρκινικό κύτταρο. Οι μελέτες γονιδιακής έκφρασης έχουν εντοπίσει αρκετούς διαφορετικούς υποτύπους καρκίνου του μαστού που διαφέρουν σημαντικά στην πρόγνωση και στους θεραπευτικούς στόχους που εκφράζουν [Error: Reference source not found- 55]. Ο κατάλογος των γονιδίων που διαφοροποιεί αυτούς τους υποτύπους ονομάζεται εγγενής λίστα και αποτελείται από διάφορες ομάδες γονιδίων που σχετίζονται με την έκφραση του ER, την έκφραση HER2, τον βαθμό κυτταρικής διαίρεσης και ένα μοναδικό σύμπλεγμα γονιδίων που ονομάζεται βασικό σύμπλεγμα

Οι ενδογενείς υπότυποι διαχωρίζονται σε δύο ομάδες που αντιστοιχούν στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τους ορμονικούς υποδοχείς. Αυτός ο διαχωρισμός συνάδει τόσο με τη βιβλιογραφία όσο και με την κλινική εμπειρία που δείχνει ότι οι ER-θετικοί και οι ER-αρνητικοί καρκίνοι ορίζουν βιολογικά διακριτούς φαινότυπους που μπορεί να προέρχονται από διαφορετικά προγονικά κύτταρα [51]. Ωστόσο, η αναλυτική εγκυρότητα και η κλινική χρησιμότητα του προσδιορισμού των μοριακών υποτύπων εξαρτάται από την ειδική ανίχνευση και την ακριβή κλινική χρήση στην οποία θα εφαρμοστεί.

#### 2.4.1 LUMINAL ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΥΠΟΤΥΠΟΙ

Ο όρος "luminal" προέρχεται από την ομοιότητα στην γονιδιακή έκφραση μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και του επιθηλίου του μαστού. Τυπικά εκφράζουν τις κυτταροκερατίνες 8 και 18. Είναι οι συνηθέστεροι υποτύποι, συνιστούν την πλειοψηφία του καρκίνου του μαστού με θετικό ER και χαρακτηρίζονται από έκφραση ER, και PR και άλλων γονιδίων που σχετίζονται με ενεργοποίηση ER. Παρά το γεγονός ότι περιλάμβανε την πλειονότητα των ER-θετικών καρκίνων του μαστού, οι υπότυποι Luminal A και Luminal B έχουν σημαντικές μοριακές και προγνωστικές διαφορές.

Οι Luminal A, οι οποίοι αποτελούν κατά πάσα πιθανότητα περίπου το 40% όλων των καρκίνων του μαστού, συνήθως έχουν υψηλή έκφραση των σχετιζόμενων με το ER γονιδίων, χαμηλή έκφραση του συμπλέγματος γονιδίων HER2 και χαμηλή έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, όπως ο Ki67 [56,57]. Ο Luminal A είναι ο συνηθέστερος υπότυπος και γενικά φέρει την καλύτερη πρόγνωση από όλους τους υποτύπους [58,59]. Παρά ταύτα, οι περισσότεροι θάνατοι από καρκίνο του μαστού προέρχονται από ER-θετική, HER2-αρνητική νόσο και η φυλετική διαφορά στην έκβαση βρίσκεται ιδιαίτερα σε αυτό το υποσύνολο [60].

Οι Luminal B (περίπου 20%) έχουν σχετικώς χαμηλότερη (αν και εξακολουθεί να υπάρχει) έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με ER, μεταβλητή έκφραση του συμπλέγματος HER2 και υψηλότερη έκφραση του συμπλέγματος πολλαπλασιασμού Ki 67. Γενικώς φέρουν μια χειρότερη πρόγνωση και έχουν και υψηλό RS συνήθως[59].

#### 2.4.2 HER-2 ENRICHED

Ο υπότυπος HER-2 enriched αποτελεί περίπου το 10-15% των καρκίνων του μαστού και χαρακτηρίζεται από υψηλή έκφραση των γονιδίων HER2 και γονιδίων πολλαπλασιασμού και χαμηλή έκφραση των γονιδίων έκφρασης ER και PR. Για το λόγο αυτό, αυτοί οι όγκοι είναι συχνότερα αρνητικοί για ER και PR και θετικοί για HER2, ωστόσο, δεν είναι συνώνυμος με κλινικά HER2-θετικό καρκίνο του μαστού. Ενώ οι μισοί από τους HER2-θετικούς καρκίνους του μαστού εμπλουτίζονται με HER2, οι υπόλοιποι μπορεί να περιλαμβάνουν οποιοδήποτε Luminal υπότυπο αρκεί να εκφράζεται ο HER2. Περίπου το 30% των HER2- enriched όγκων είναι κλινικά HER2-αρνητικά. Ενώ μελετάται η επίδραση της στόχευσης HER2 σε αυτούς τους όγκους, είναι πιθανό ότι τουλάχιστον μερικοί αντιπροσωπεύουν μεταλλάξεις του HER2 ή άλλα γεγονότα στη οδό σηματοδότησης του HER2 που παράγουν παρόμοιο φαινότυπο έκφρασης χωρίς ενίσχυση

### 2.4.3 ER ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ ΥΠΟΤΥΠΟΙ

Το ER-αρνητικό γονιδιακό προφίλ περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, πολλαπλούς υποτύπους, όπως το basal - like, το claudin-low [61] και το IFN enriched [62]. Τα περισσότερα από αυτά εμπίπτουν στην κατηγορία των καρκίνων του τριπλού αρνητικού μαστού επειδή είναι επίσης PR αρνητικά και HER2 αρνητικά. Ο καλύτερα περιγραφόμενος είναι ο υπότυπος claudin-low. Ο basal-like υποτύπος, που ονομάζεται έτσι λόγω κάποιας ομοιότητας στην έκφραση γονιδίων με εκείνη των βασικών επιθηλιακών κυττάρων του φυσιολογικού ιστού του μαστού, αποτελεί περίπου 15 με 20% των καρκίνων του μαστού. Χαρακτηρίζεται από χαμηλή έκφραση των γονιδίων ER και HER2. Για το λόγο αυτό, αυτοί οι όγκοι είναι κατά βάση ER, PR και HER2 αρνητικοί, γεγονός που έχει προκαλέσει το όρο "triple negative breast cancer" για να τους περιγράψει. Ωστόσο, ενώ οι περισσότεροι τριπλά αρνητικοί καρκίνοι είναι του τύπου basal like, και οι περισσότεροι basal like είναι τριπλά αρνητικοί, υπάρχει σημαντική ασυμφωνία (έως και 30%) μεταξύ αυτών των δύο μεθόδων ταξινόμησης που πρέπει να λαμβάνεται πάντα υπόψη κατά την αξιολόγηση

### 2.5 ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού του καρκίνου του μαστού φαίνεται να έχει προγνωστική αξία. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση αυτού, συμπεριλαμβανομένων του αριθμού μιτώσεων, των κλασμάτων φάσης S όπως προσδιορίζονται με κυτταρομετρία ροής και ανοσοϊστοχημείας χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα έναντι αντιγόνων που βρίσκονται σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα.

Ωστόσο, η πιο συχνά μελετημένη μέθοδος είναι η πραγματοποίηση ανοσοϊστοχημείας του πυρηνικού αντιγόνου Ki-67.

#### 2.5.1 Ki -67

Η σχέση μεταξύ του Ki67 και της πρόγνωσης στον πρώιμο καρκίνο του μαστού έχει μελετηθεί εκτενώς [63]. Παρά την ετερογένεια στις κλινικές δοκιμές και τις μεθόδους αξιολόγησης Ki67, τα αποτελέσματα δύο μεγάλων μετα-αναλύσεων συμφωνούν με την ανεξάρτητη προγνωστική αξία του Ki67 [64,65]. Παρόλα αυτά, η χρήση του Ki67 ως προγνωστικού δείκτη στην κλινική περίθαλψη είναι από πολλούς αμφιλεγόμενη λόγω της ετερογένειας και της ασυνέπειας ορισμένων αναδρομικών μελετών και μεθοδολογικών ζητημάτων των εργαστηριακών αντιδραστηρίων, των διαδικασιών και, ειδικότερα, της βαθμονόμησης. Αυτό αποδείχθηκε σε μια πολυεθνική μελέτη που κατέδειξε την κακή αναλυτική εγκυρότητα ανα εργαστήριο, ακόμη και μεταξύ ορισμένων από τα πιο αναγνωρισμένα του κόσμου [66]. Παρόλο που μια προκαταρκτική έκθεση υποδηλώνει ότι η αναλυτική εγκυρότητα μπορεί να επιτευχθεί με συστηματική εκπαίδευση επί του παρόντος η επιτροπή εμπειρογνομόνων του ASCO δεν συνιστά τη χρήση παραγόντων πολλαπλασιασμού για την εκτίμηση της πρόγνωσης [67]. Ενώ άλλοι προτείνουν το συνδυασμό των επιπέδων Ki-67 με τον ER, PR και HER2 για

προγνωστική αξιολόγηση [68], μια άλλη ομάδα, η διεθνής ομάδα εργασίας IMPAKT συμφωνεί με τις κατευθυντήριες γραμμές ASCO.

Παρα ταύτα, βάση της ESMO, το Ki67 χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό Luminal A και Luminal B με ένα cut off 20% ενώ το St Gallen το cut off είναι 14%, όπου κάτω από 10% θεωρείται χαμηλό και πάνω από 30% υψηλό [69]

### 2.5.2 p53

Πολλές μελέτες έχουν διερευνήσει τον προγνωστικό ρόλο των σωματικών ανωμαλιών του p53 στον καρκίνο του μαστού και οι παραλλαγές των γονιδίων στο p53 έχουν καταχωρηθεί σε μια ηλεκτρονική βάση δεδομένων [70]. Οι σωματικές μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 (TP53) βρίσκονται σε 20-30% των καρκίνων του μαστού [71]. Η μετάλλαξη του p53 είναι μια σπάνια αιτία για κληρονομικά σύνδρομα καρκίνου του μαστού. Για τους ασθενείς με ιστορικό που υποδηλώνει γενετική προδιάθεση για καρκίνο του μαστού, η εξέταση p53 της βλαστικής γραμμής μπορεί να είναι λογική.

Ενώ η προγνωστική αξία της σωματικής μετάλλαξης p53 παραμένει ασαφής, τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι οι ασθενείς με μεταλλάξεις στο p53 έχουν χειρότερη πρόγνωση σε σύγκριση με άλλους ασθενείς ανεξάρτητα από το μέγεθος του όγκου, τους ορμονικούς υποδοχείς και τη διήθηση των λεμφαδένων [71-73]. Σε μια μελέτη περίπου 1800 ασθενών των οποίων οι όγκοι εξετάστηκαν για σωματικές μεταλλάξεις p53, ο σχετικός κίνδυνος θανάτου από καρκίνο του μαστού στα 10 χρόνια ήταν περίπου δύο φορές υψηλότερος στους ασθενείς των οποίων οι όγκοι είχαν μεταλλάξεις TP53 [73].

### 2.5.3 ΑΛΛΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΔΙΗΘΗΣΗΣ

Πολλοί άλλοι δείκτες εισβολής και μεταστατικού δυναμικού έχουν προταθεί και μελετηθεί σε αναδρομικές εκθέσεις. Αυτά περιλαμβάνουν τη nm23, E-cadherin, catenins, tissue (TIMPs), prostate specific antigen, tissue factor, and osteopontin. Η απώλεια αλληλουχιών της μικροδορυφορικής αστάθειας, η καταστολή μεθυλίωσης ογκοκατασταλτικών γονιδίων μπορούν επίσης να παρέχουν προγνωστικές πληροφορίες [74-77]. Όλοι αυτοί οι δυνητικοί προγνωστικοί δείκτες ζ απαιτούν περαιτέρω αξιολόγηση και επικύρωση.

## 3. ΠΡΟΒΛΕΠΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

### 3.1 ER ΚΑΙ PR STATUS

Εκτός από το ρόλο του ως προγνωστικό παράγοντα, η έκφραση ER προβλέπει ασθενείς που θα επωφεληθούν από την ενδοκρινική θεραπεία. Παρόλο που οι ασθενείς με θετικούς υποδοχείς υποδοχέα προγεστερόνης (PR) έχουν επίσης καλύτερα αποτελέσματα όταν αντιμετωπίζονται με ενδοκρινική θεραπεία, το PR status εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το ER ,επομένως, δεν φαίνεται ότι η PR έχει ανεξάρτητα προβλεπτική αξία, ειδικά όταν είναι γνωστή η κατάσταση του ER [78].

Η προβλεπτική αξία του ER αποδεικνύεται με σαφήνεια από την μετα-ανάλυση των κλινικών δοκιμών της ταμοξιφένης [78] από την Ομάδα Συνεργαζόμενων Ομάδων του Πρώιμου Καρκίνου του Μαστού (EBCTCG). Σε ασθενείς με θετική ER, η tamoxifen μείωσε σημαντικά τον κίνδυνο υποτροπής κατά 39% και θανάτου κατά 30% σε 15 χρόνια παρακολούθησης. Το όφελος ήταν ανεξάρτητο από το PR status, την ηλικία, τη διήθηση των λεμφαδένων ή τη χρήση επικουρικής χημειοθεραπείας. Αντίθετα, δεν υπήρχε κανένας αντίκτυπος στην υποτροπή ή στα ποσοστά επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού αρνητικού σε ER.

Το αν η καταστολή των ωοθηκών με GnRH agonists βελτιώνει τα αποτελέσματα δεν είναι απολύτως σαφές, αν και υπάρχει ένας πιο εδραιωμένος ρόλος για τη χρήση του σε υποομάδες ασθενών υψηλού ρίσκου από ορμονοευαίσθητους καρκίνους μαστού [79-81]. Οποιοσδήποτε ενδεχόμενος θεραπευτικός ρόλος των αγωνιστών GnRH στον ER αρνητικό καρκίνο του μαστού απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της Αμερικανικής Εταιρείας Κλινικής Ογκολογίας (ASCO), η ανάλυση ER / PR πρέπει να διεξάγεται συστηματικά σε όλους τους επεμβατικούς καρκίνους του μαστού [82].

### 3.2 HER2 STATUS

Περίπου το 20% των καρκίνων του μαστού υπερεκφράζει τον ανθρώπινο υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (HER2), έναν υποδοχέα διαμεμβρανικής γλυκοπρωτεΐνης (EGFR) με δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης. Ιστορικά, η υπερέκφραση αυτού του υποδοχέα συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της νόσου και συνολικά χειρότερη πρόγνωση.

Οι θεραπείες που στοχεύουν το HER2 έχουν καταστεί σημαντικοί παράγοντες στη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του μαστού και στην επικουρική θεραπεία και έχουν μεταβάλει τη φυσική πορεία του καρκίνου του μαστού με θετικό HER2 [83]. Επειδή η χρήση της HER2-κατευθυνόμενης θεραπείας βελτιώνει την επιβίωση σε ασθενείς με HER2-θετικό μεταστατικό καρκίνο του μαστού, συνιστάται στους ασθενείς

αυτούς να λαμβάνουν HER2-κατευθυνόμενη θεραπεία ως θεραπεία πρώτης και μεταγενέστερης γραμμής [84]. Ένα υψηλό επίπεδο υπερέκφρασης HER2, όπως προσδιορίζεται είτε με 3+ χρώση με ανοσοϊστοχημεία (IHC) για την πρωτεΐνη HER2 είτε με ένδειξη ενίσχυσης γονιδίου HER2 με υβριδοποίηση *in situ* φθορισμού (FISH > 2.0), είναι ένας ισχυρός προβλεπτικός παράγοντας για ευαισθησία σε HER2 θεραπείες και αυτά τα κριτήρια θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για την επιλογή ασθενών για αυτά τα φάρμακα [85-87]. Ασθενείς χωρίς υπερέκφραση του HER2 δεν φαίνεται να ωφελούνται από αυτά τα φάρμακα. Η προβλεπτική αξία του HER2 είναι εμφανής σε όλες τις μελέτες HER2 κατευθυνόμενης θεραπείας είτε επικουρικές είτε μεταστατικές [88-92]

### 3.3 ΠΡΟΒΛΕΠΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

Η EBCTCG δηλώνει ότι το σχετικό όφελος της χημειοθεραπείας είναι παρόμοιο σε όλες τις υποομάδες ανεξάρτητα από την ηλικία, το στάδιο, την ιστολογία και την κατάσταση του ER [93].

Οι περισσότεροι Luminal A όγκοι, εκτός από εκείνους με τον υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής (εκτεταμένη λεμφαδενική διήθηση), δεν απαιτούν χημειοθεραπεία. [94]

Οι Luminal B HER2-θετικοί όγκοι αντιμετωπίζονται με χημειοθεραπεία, ορμονοθεραπεία και trastuzumab. Δεν υπάρχουν μελέτες που να υποστηρίζουν την παράλειψη χημειοθεραπείας σε αυτή την ομάδα. Ωστόσο, σε μικρούς, χωρίς λεμφαδένες όγκους, ο συνδυασμός μονοθεραπείας με πακλιταξέλη και trastuzumab παρέχει εξαιρετικά αποτελέσματα [95]

Οι τριπλά αρνητικοί όγκοι επωφελούνται από την επικουρική χημειοθεραπεία, με την πιθανή εξαίρεση των «ειδικών ιστολογικών υποτύπων» χαμηλού κινδύνου όπως αποκριτικά ή αδενοειδή κυστικά καρκινώματα [96].

Οι Luminal B HER2-αρνητικοί καρκίνοι αποτελούν τον πληθυσμό με την υψηλότερη αβεβαιότητα όσον αφορά τις ενδείξεις χημειοθεραπείας. Οι ενδείξεις χημειοθεραπείας στο πλαίσιο αυτού του υποτύπου εξαρτώνται από τον κίνδυνο υποτροπής του ατόμου, λαμβάνοντας υπόψη την έκταση του όγκου και τα χαρακτηριστικά που υποδηλώνουν την επιθετικότητα του (βαθμός διαφοροποίησης, δείκτης πολλαπλασιασμού, λεμφαγγειακή διήθηση, αναμενόμενη ανταπόκριση στην ορμονοθεραπεία και προτιμήσεις ασθενών. Χαρακτηριστικά που σχετίζονται με χαμηλή ενδοκρινική απόκριση περιλαμβάνουν, χαμηλή έκφραση υποδοχέα στεροειδούς, έλλειψη έκφρασης PgR, χαμηλού βαθμού διαφοροποίηση και υψηλή έκφραση δεικτών πολλαπλασιασμού [97]

## 4. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΠΡΩΙΜΟΥ ΜΗ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

### 4.1 ΤΟΠΙΚΟΠΕΡΙΟΧΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ



Αναμφισβήτητα, η σημαντική αλλαγή στη χειρουργική θεραπεία του πρωτοπαθούς καρκίνου του μαστού υπήρξε μια στροφή προς τη θεραπεία της διατήρησης του μαστού, η οποία ξεκίνησε πριν 30 χρόνια. Επί του παρόντος, στη Δυτική Ευρώπη, το 60% -80% των νεοδιαγνωσθέντων καρκίνων είναι δυνατόν να υποβληθούν σε χειρουργείο διατήρησης του μαστού με ευρεία τοπική εκτομή και ακτινοθεραπεία. Σε μερικούς ασθενείς η μαστεκτομή εξακολουθεί να υφίσταται λόγω του μεγέθους του όγκου (σε σχέση με το μέγεθος του μαστού), της πολυκεντρικότητας της αδυναμίας να επιτευχθούν αρνητικά χειρουργικά όρια μετά από πολλαπλές εκτομές, προηγούμενη ακτινοβολία στο θωρακικό τοίχωμα / στήθος ή άλλες αντενδείξεις για ακτινοθεραπεία[98]

Για τους ασθενείς που υφίστανται τοπικο-περιοχική χειρουργική εκτομή, δίδεται μεγαλύτερη έμφαση στην επίτευξη αποδεκτού αισθητικού αποτελέσματος. Οι ογκοπλαστικές επεμβάσεις μπορούν να οδηγήσουν σε καλύτερο αισθητικό αποτέλεσμα, ειδικά σε ασθενείς με μεγάλο στήθος, λιγότερο ευνοϊκή αναλογία όγκου / μαστού ή μια θέση του όγκου (κεντρική ή κατώτερη) εντός του μαστού πρόκληση για καλό χειρουργικό αποτέλεσμα.

Μια προσεκτική ιστολογική αξιολόγηση των ορίων εκτομής είναι απαραίτητη. Το χειρουργικό όριο πρέπει να αναφέρεται. Για παράδειγμα, ένα όριο είναι θετικό, όταν υπάρχει επαφή με το μελάνι στα όρια του διηθητικού καρκίνου ή του DCIS. Για τα αρνητικά όρια, θα πρέπει να αναφέρεται η απόσταση του διηθητικού καρκίνου ή / και του DCIS από αυτό ( 2mm για το DCIS και ελεύθερο από μελάνι για το διηθητικό καρκίνο) [99].

Για όλες τις άλλες περιπτώσεις προτιμάται η τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή με ομόπλευρο λεμφαδενικό καθαρισμό. Υπό το φως των πρόσφατων αποτελεσμάτων σε ασθενείς με κλινικά αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, οι ασθενείς με μακρομεταστάσεις σε έναν ή δύο λεμφαδένες φρουρούς μετά από μαστεκτομή, χρειάζονται μασχαλιαίο λεμφαδενικό καθαρισμό εάν δεν προβλέπεται ακτινοθεραπεία,. Η παράλειψη μασχαλιαίου λεμφαδενικού καθαρισμού μετά από συντηρητική εκτομή μπορεί να γίνει με εφαρμογή ακτινοθεραπείας. Σε ασθενή με θετικό λεμφαδένα φρουρό κατά την απεικόνιση, ο οποίος υποβαθμίζεται απεικονιστικά μετά από νεοεπιχειρητική χημειοθεραπεία, η βιοψία του ήταν θετική, αλλά ότι, σε αυτή την περίπτωση, ήταν απαραίτητη η ανατομή των μασχαλιαίων λεμφαδένων, εάν η βιοψία ήταν θετική. Ωστόσο, τα ψευδώς αρνητικά ποσοστά παραμένουν υψηλά αν δεν εξεταστούν τρία ή περισσότερα σημεία ελέγχου. [100]

Μετά τη συντηρητική χειρουργική επέμβαση, η ακτινοβολία θα πρέπει να περιορίζεται στο στήθος μόνο αν οι λεμφαδένες είναι αρνητικοί. Η ομάδα υποστήριζε τουλάχιστον τοπικο-περιοχική ακτινοθεραπεία εάν οι μασχαλιαίοι λεμφαδένες ήταν θετικοί και ίσως επέκταση στους έσω μαστικούς λεμφαδένες

Μετά την τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή, η ακτινοθεραπεία πρέπει να εφαρμόζεται για μέγεθος όγκου 5 cm ή περισσότερο, θετικές μακρομεταστάσεις σε λεμφαδένα φρουρό χωρίς πρότερο λεμφαδενικό καθαρισμό και σε ασθενείς με ένα έως τρεις θετικούς λεμφαδένες και δυσμενή ιστολογικό τύπο. Οι ίδιες ενδείξεις ισχύουν μετά από

λεμφαδενικό καθαρισμό χωρίς πρότερη βιοψία φρουρού λεμφαδένα αν ελέγχθηκαν λιγότεροι από 8 λεμφαδένες [100]. Τα hypofractionated σχήματα που περιλαμβάνουν 15 ή 16 κλάσματα είναι πλέον ευρέως αποδεκτά ως standard of care.

#### 4.2 ΟΡΜΟΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η αρχική προσέγγιση της θεραπείας σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με μη μεταστατικό καρκίνο του μαστού με θετικό υποδοχέα ορμονών έχει ως εξής:

Για τις γυναίκες με καρκίνο του μαστού υψηλού κινδύνου, συνιστούμε την καταστολή των ωοθηκών μαζί με την εξαμεσάνη παρά την ταμοξιφαίνη ενώ για τις γυναίκες που θεωρούνται ότι δεν έχουν καρκίνο του μαστού υψηλού κινδύνου, προτείνουμε την ταμοξιφαίνη ως μονοθεραπεία[101]

Η προσέγγισή στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες είναι η ακόλουθη:

Οι αναστολείς αρωματάσης σχετίζονται με βελτιωμένα αποτελέσματα σε σύγκριση με την ταμοξιφαίνη ενώ αμφότεροι οι παράγοντες μειώνουν τις υποτροπές και τους νέους πρωτοπαθείς καρκίνους του μαστού.[101]

Μερικές γυναίκες μπορούν να ανεχθούν τους κινδύνους και την τοξικότητα της ταμοξιφαίνης καλύτερα από τους αναστολείς αρωματάσης. Η προτεινόμενη διάρκεια είναι 5 χρόνια ενώ προτείνεται για ασθενείς υψηλού κινδύνου, πχ T3,θετικούς λεμφαδένες, θεραπεία με ταμοξιφαίνη για επιπλέον 5 χρόνια.[101]

Οι γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας πρέπει να χρησιμοποιούν αποτελεσματικά αντισυλληπτικά μέσα κατά τη διάρκεια της ταμοξιφαίνης. Μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας με ταμοξιφαίνη, οι γυναίκες θα πρέπει να περιμένουν τουλάχιστον δύο μήνες μετά τη διακοπή της ταμοξιφαίνης πριν από την εγκυμοσύνη[101]

#### 4.3 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Ο συνδυασμός της δοξορουβικίνης και του κυκλοφωσφαμιδης που ακολουθείται από την πακλιταξέλη (AC-T) είναι το προτιμώμενο σχήμα για τους περισσότερους ασθενείς. Για τους ασθενείς με νόσο χαμηλότερου κινδύνου ή με ιστορικό καρδιακής νόσου, τα σχήματα χωρίς ανυρακυκλίνη μπορεί να είναι προτιμότερα.

Η λογική για τη χρήση αυτού του σχήματος βασίζεται σε στοιχεία που αποδεικνύουν ότι ένα σχήμα που περιέχει ανθρακυκλίνη είναι τουλάχιστον ισοδύναμο με το ιστορικό τυπικό σχήμα CMF και ότι η προσθήκη ταξάνης σε σχήμα βασισμένο σε ανθρακυκλίνη βελτιώνει περαιτέρω τα αποτελέσματα. Αυτά τα δεδομένα προέρχονται από τη μετανάλυση EBCTCG, η οποία υποδηλώνει ότι τα σχήματα με βάση την ανθρακυκλίνη είχαν παρόμοια ή καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την CMF [102]. Η μετανάλυση συνέκρινε τη χρήση του CMF με τη χρήση διαφόρων δόσεων ανθρακυκλίνης, που ορίζονται είτε ως «τυποποιημένες» δόσεις (π.χ., για τέσσερις κύκλους, σε σωρευτική δόση 240 mg / m<sup>2</sup> doxorubicin) είτε υψηλότερες δόσεις (για περισσότερους από τέσσερις κύκλους, σε σωρευτική δόση > 240 mg / m<sup>2</sup> δοξορουβικίνης) . Σε περισσότερες

από 5.000 γυναίκες, η χρήση ανθρακυκλίνης που χορηγήθηκε σε «κανονικές» δόσεις, σε σύγκριση με την CMF, συσχετίστηκε με παρόμοιο κίνδυνο επανεμφάνισης (41 έναντι 42%), θνησιμότητα από καρκίνο του μαστού (32 έναντι 33%) και συνολική θνησιμότητα 35 τοις εκατό) σε 10 χρόνια. Οι ασθενείς που έλαβαν υψηλότερες αθροιστικές δόσεις ανθρακυκλίνης είχαν οριακές βελτιώσεις σε αυτά τα μέτρα σε σύγκριση με την CMF.

Ωστόσο, η προσθήκη ταξανών σε χημειοθεραπεία που περιέχει ανθρακυκλίνη συσχετίστηκε με βελτιωμένο κίνδυνο υποτροπής, θνησιμότητα από καρκίνο του μαστού και συνολική θνησιμότητα σε σύγκριση με άλλα κυτταροτοξικά σχήματα [102]. Σε μελέτες όπου ο ίδιος αριθμός κύκλων ανθρακυκλίνης χρησιμοποιήθηκε στον control arm σαν πειραματικό (ανθρακυκλίνες ακολουθούμενο από ταξάνες) σκέλος (n = 11.167 γυναίκες), η ενσωμάτωση των ταξανών οδήγησε στα ακόλουθα αποτελέσματα:

- Μείωση του κινδύνου υποτροπής από 35% σε 30% (σχετικός κίνδυνος [RR] 0,84, 95% CI 0,78-0,91)
- Μείωση του κινδύνου θνησιμότητας από καρκίνο του μαστού από 24% σε 21% (RR 0,86, 95% CI 0,79-0,93)
- Μείωση της συνολικής θνησιμότητας από 27 σε 24% (RR 0,90, 95% CI 0,79-0,93)

Τα οφέλη της ενσωμάτωσης των ταξανών ήταν ανεξάρτητα από την ηλικία, την κατάσταση των λεμφαδένων, το μέγεθος του όγκου, το βαθμό διαφοροποίησης και την κατάσταση των υποδοχέων οιστρογόνων (ER) [102]

Η διάρκεια της θεραπείας ποικίλλει ανάλογα με τη δοσολογία που χρησιμοποιείται. Παραδείγματος χάριν, η δόση-πυκνός AC-T χορηγείται επί 16 εβδομάδες (σύνολο οκτώ κύκλων σε διαστήματα δύο εβδομάδων), ενώ η CMF γενικά χορηγείται επί έξι μήνες (έξι κύκλοι σε διαστήματα τεσσάρων εβδομάδων). Τα δεδομένα είναι περιορισμένα όσον αφορά το κατά πόσο τα μακρύτερα διαστήματα θεραπείας οδηγούν σε καλύτερα αποτελέσματα [103]

Κανένα σχήμα δεν έχει αποδειχθεί ότι είναι ανώτερο από την AC-T για ασθενείς υψηλού κινδύνου οι οποίοι είναι υποψήφιοι για ανθρακυκλίνη. Ωστόσο, τα μη ανθρακυκλινούχα σχήματα βασισμένα στη δοσεταξέλη και την κυκλοφωσφαμιδη που χορηγούνται ανα τρεις εβδομάδες για τέσσερις κύκλους (TC) μπορεί να αποτελούν εναλλακτική λύση για ασθενείς που έχουν ενδείξη για χημειοθεραπεία αλλά έχουν νόσο χαμηλότερου κινδύνου ή ασθενείς με ιστορικό καρδιακής νόσου και για εκείνους που δεν αποδέχονται τους κινδύνους της θεραπείας με βάση την ανθρακυκλίνη [104]

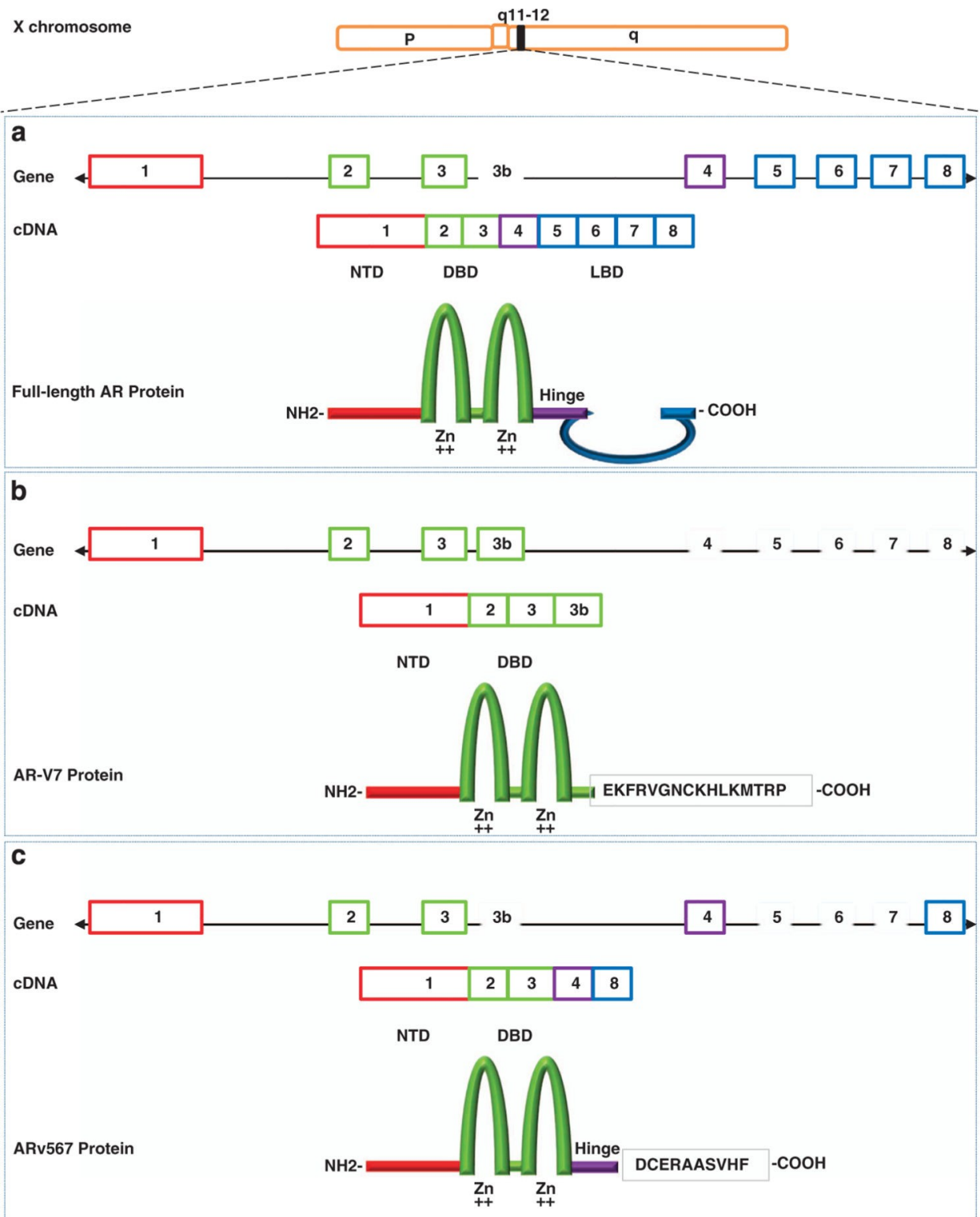
Τα οφέλη από την προσθήκη trastuzumab σε επικουρική χημειοθεραπεία σε ασθενείς με HER2+ όγκους επιβεβαιώθηκαν σε μια μετα-ανάλυση των οκτώ κλινικών μελετών

χημειοθεραπείας και trastuzumab έναντι της χημειοθεραπείας το 2012 με τη συμμετοχή περίπου 12.000 ασθενών [105]:

- I. Βελτίωση της επιβίωσης χωρίς νόσο (DFS, αναλογία κινδύνου [HR] για επανεμφάνιση 0,60, 95% CI 0,50-0,71), ανεξάρτητα από τη διάρκεια της θεραπείας με trastuzumab ή το σχήμα χορήγησης (δηλαδή ταυτόχρονα με χημειοθεραπεία ή χημειοθεραπεία που ακολουθεί).
- II. Βελτίωση της συνολικής επιβίωσης (OS, HR για θνησιμότητα 0.66, 95% CI 0.57-0.77).
- III. Το trastuzumab που χορηγήθηκε για 12 μήνες, συσχετίστηκε με μία βελτίωση στο OS (HR 0.67, 95% CI 0.57-0.80) ενώ η θεραπεία για  $\leq 6$  μήνες έδειξε επίσης μια τάση προς βελτίωση του λειτουργικού συστήματος, δεν έφθασε στατιστική σημασία (HR 0,55, 95% CI 0,27-1,11).
- IV. Το όφελος στο OS συσχετίστηκε με ταυτόχρονη χορήγηση με χημειοθεραπεία (HR 0,64, 95% CI 0,53-0,76) αλλά όχι με χημειοθεραπείας ακολουθούμενη από μονοθεραπεία (HR 0,85, 95% CI 0,43-1,67).

## 5. AR ΓΟΝΙΔΙΟ. ΔΟΜΗ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ [ΕΙΚΟΝΑ 1]

Εικόνα 1



Τα βιολογικά αποτελέσματά του γονιδίου AR έχουν δράση μέσω μιας πρωτεΐνης 110 kDa που δρα ως πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας. Το γονίδιο AR βρίσκεται στο Xq11-12 και αποτελείται από οκτώ εξόνια. Ο N-τερματικός τομέας (NTD) περιέχει τη λειτουργία ενεργοποίησης 1 (AF-1) που περιλαμβάνει δύο επικαλυπτόμενες μονάδες

ενεργοποίησης μεταγραφής (TAUs): TAU-1 (αμινοξέα 1-370), που υποστηρίζει AR μεταγραφική δραστηριότητα μετά από διέγερση από πλήρη αγωνιστή, και το TAU-5 (αμινοξέα 360-528), το οποίο προσδίδει δραστικότητα στο AR απουσία της θέσης πρόσδεσης (LBD). Ο NTD περιέχει αρκετές ρυθμιστικές θέσεις φωσφορυλίωσης [106].

Η κεντρική περιοχή του υποδοχέα περιέχει τον τομέα δέσμευσης DNA και την περιοχή πρόσδεσης και φιλοξενεί το πυρηνικό σήμα εντοπισμού. Το καρβοξυλικό άκρο περιέχει τη λειτουργία LBD και AF-2. Η δραστικότητα αμφότερων των AF-1 και AF-2 καθορίζεται από ρυθμιστικές πρωτεΐνες, οι οποίες λειτουργούν ρυθμίζοντας είτε θετικά είτε αρνητικά τη λειτουργικότητα του AR. Η δραστικότητα της πρωτεΐνης AR εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την πρόσβαση σε συγγενείς θέσεις πρόσδεσης στη χρωματίνη, μέσω ενζύμων τροποποίησης ιστόνης όπως ρ300 και πρωτεΐνη που δεσμεύει CREB – δεσμευτικής πρωτεΐνης (τα οποία προάγουν άμεσα ένα τοπικό χρωματίνης ευνοϊκό για μεταγραφική ενεργοποίηση) και παράγοντες όπως FOXA1 και GATA2 (οι οποίοι προάγουν την ανοικτή δομή χρωματίνης, την επακόλουθη δέσμευση του πυρηνικού υποδοχέα κοντά και την προκύπτουσα έναρξη συγκεκριμένων μεταγραφικών προγραμμάτων)[106]

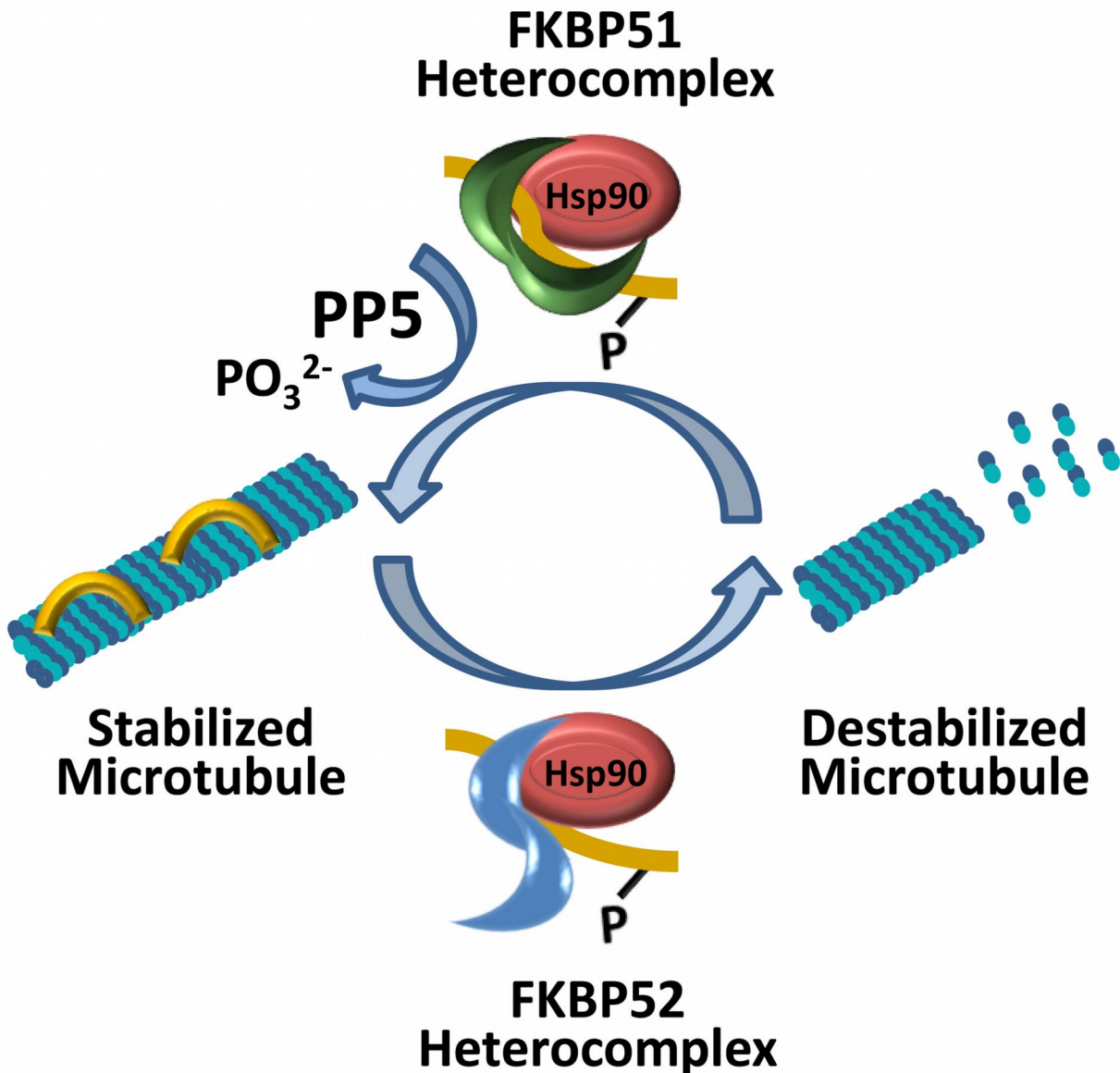
Απουσία θέσης σύνδεσης, ο AR εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και συνδέεται σε ένα σύμπλεγμα με πρωτεΐνες θερμικού σοκ HSP90, HSP70 και διάφορες ουσίες, οι οποίες διατηρούν το AR σε μια διαμόρφωση ικανή για σύνδεση σε θέση πρόσδεσης προστατεύοντας τον AR από πρωτεόλυση. Με την σύνδεση του συνδέτη, το AR διαχωρίζεται από το HSP90 και υφίσταται μεταβολή της διαμόρφωσης με την οποία η εξαιρετικά ευλύγιστη O-τερματική έλικα (H12) ευθυγραμμίζεται πάνω από τον θύλακα πρόσδεσης για να δώσει μια εγκοπή σύνδεσης υδρόφοβου συνενεργοποιητή που χρησιμεύει ως πλατφόρμα αλληλεπίδρασης με τους συνενεργοποιητές 10 και διευκολύνει την NTD / LBD. Η αλληλεπίδραση σταθεροποιεί την πρωτεΐνη AR με επιβράδυνση του ρυθμού διάσπασης του συνδέτη και είναι σημαντική για τη βέλτιστη μεταγραφική απόκριση. Αρκετές πρωτεΐνες διευκολύνουν την εισαγωγή του AR στον πυρήνα συμπεριλαμβανομένου του πυρηνικού συμπλόκου importin που μετακινεί την AR πρωτεΐνη μέσω των πυρηνικών πόρων. Ο ρόλος του HSP27 στην ενίσχυση της σταθερότητας του AR, μετακίνησης προς τον πυρήνα, και μεταγραφική δραστικότητας παρατηρήθηκε επίσης μετά από θεραπεία με ανδρογόνα[107]

Στην κανονική γονιδιακή οδό, ο AR μεταφέρεται στον πυρήνα και δεσμεύεται με στοιχεία απόκρισης AR στο DNA, προσλαμβάνει συν ρυθμιστές για να σχηματίσει ένα σύμπλεγμα εκκίνησης και μαζί με τον βασικό μεταγραφικό μηχανισμό ξεκινά τη μεταγραφή ειδικών AR στόχων γονιδίων. Επιπλέον, στον καρκίνο του προστάτη το γονίδιο AR μπορεί να οδηγήσει στην έκφραση των ογκογονιδίων όπως οι παράγοντες μεταγραφής του ETS (για παράδειγμα, ERG, ETV1) και λιγότερο συχνά BRAF και C-RF ως συνέπεια ανακατατάξεις αυτών. Μεταξύ αυτών των αναδιατάξεων, η συνηθέστερη είναι η σύντηξη της 3' περιοχής του ERG με την περιοχή 5' (που περιέχει την περιοχή προαγωγού / ενισχυτή) του γονιδίου TMPRSS2 που ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από το AR γονίδιο. Οι αναδιατάξεις ERG έχουν εντοπιστεί στο 40-60% των καρκίνων του προστάτη. Τα στοιχεία δείχνουν επίσης ότι το AR γονίδιο μπορεί να

ενεργοποιήσει τη μεταγραφή συνδέοντας άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και ουσιαστικά λειτουργώντας ως συνενεργοποιητής [108]

## 6. FKBP52 ΚΑΙ FKBP51. ΔΟΜΗ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ [ΕΙΚΟΝΑ 2]

Εικόνα 2



Οι FK506 δεσμευτικές πρωτεΐνες (FKBPs) είναι μέλη μιας μεγάλης υπεροικογένειας πεπτιδυλ-προλυλυμεομεράσεων (PPIάσης) που είναι ευρέως κατανομημένες στη φύση και έχουν διάφορες λειτουργίες . Ορισμένες FKBP, συμπεριλαμβανομένων των FKBP52 και FKBP51, έχουν ένα C-τερματικό τετρατρικοπεπτιδίο (TPR). Μέσω της περιοχής TPR, τα FKBP52 και FKBP51 ανταγωνίζονται για σύνδεση με σύμπλοκα Hsp90, ειδικά εκείνα που σχετίζονται με υποδοχείς στεροειδών ορμονών. Πρόσφατες εργασίες αποκάλυψαν νέους ρόλους για αυτά και άλλα FKBP στην κυτταρική λειτουργία, ειδικά σε σχέση με τη βιολογία του καρκίνου [109].

Το ανθρώπινο γονίδιο του FKBP52 ανθρώπου απομονώθηκαν από το γονιδιωματικό DNA το 2003 και οι υποκινητές του χαρακτηρίστηκαν εν μέρει. Τα γονίδια FKBP51 ανθρώπου και ποντικού απομονώθηκαν κατά την ίδια χρονική περίοδο. Το FKBP5 έχει 13 εξόνια και 12 ιντρόνια που ξεπερνούν τα 150 kb. Η κατανόηση της έκφρασης FKBP5 είναι μεγαλύτερη, έτσι όσο αυξάνεται η γενετική και η επιγενετική μεταβολή σε μη κωδικοποιητικές περιοχές του FKBP5 μπορεί να επηρεαστεί η βασική και ορμονο-διεγερμένη έκφραση αυτού του γονιδίου. Για παράδειγμα, οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου σε FKBP5 σχετίζονται με την αυξημένη έκφραση του FKBP51 και την εξασθένιση της ρύθμισης της ορμόνης του στρες [110]

Οι FKBP51 και FKBP52 είναι ομόλογες πρωτεΐνες όπως αποδεικνύεται από τις αλληλουχίες των αμινοξέων τους την οργάνωση και τις τρισδιάστατες δομές τους. Μοιράζονται το 60% της ταυτότητας και 75% ομοιότητας στις αλληλουχίες. Αμφότερες οι πρωτεΐνες περιέχουν μία N τερματική FK1 περιοχή η οποία είναι υπεύθυνη για την δραστικότητα ΡΡ1άσης και μία περιοχή ΡΚ2 τύπου ΡΡ1άσης, η οποία μοιράζεται 32% ομολογία αλληλουχίας με FK1 και δεν εμφανίζει δραστικότητα ΡΡ1άσης. Λαμβάνοντας υπόψη την παρόμοια οργάνωση τομέα και την αλληλουχία των FKBP52 και FKBP51, υπάρχει αλληλεπικάλυψη στις ενέργειές τους. Ωστόσο, όταν οι τρισδιάστατες κρυσταλλογραφικές δομές των δύο πρωτεϊνών υπερκαλύφθηκαν, αποκαλύφθηκαν διαφορές[110]

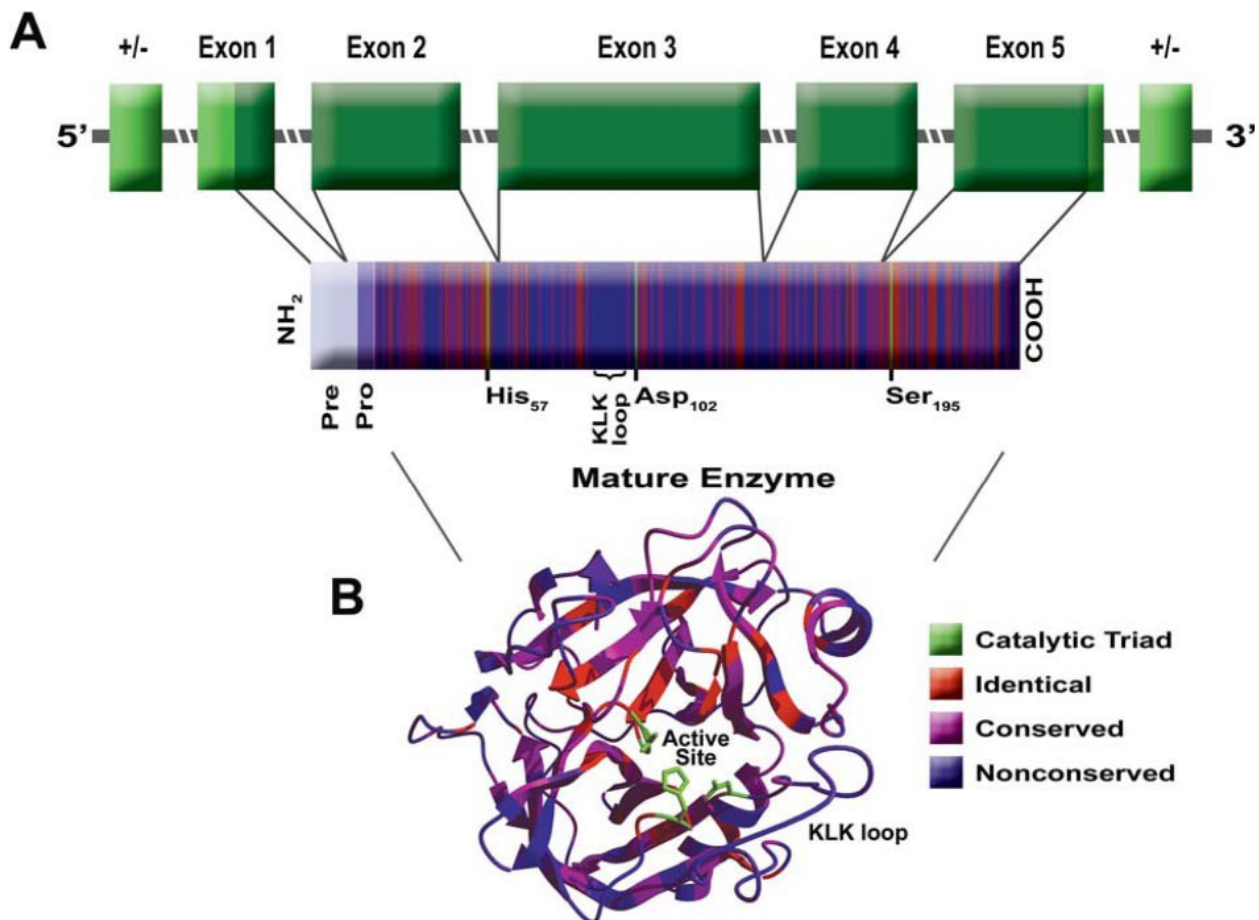
Οι πρωτεΐνες FKBP51 και FKBP52 έχουν τις εξής λειτουργίες[111]

1. Ρύθμιση της λειτουργίας των υποδοχέων στεροειδών ορμονών
2. Έλεγχος της τοξικότητας του β-αμυλοειδούς και της ομοιόστασης του χαλκού στη *Drosophila*
3. Διαμόρφωση της συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης
4. Έλεγχος της πρωτοεμφανιζόμενης RET στους νευρώνες
5. Προστασία της εγκυμοσύνης από οξειδωτικό στρες
6. Ρύθμιση των επιπέδων υπεροξειδυδοξίνης
7. Ρύθμιση της λειτουργίας των υποδοχέων στεροειδών ορμονών
8. Απόπτωση αναστολής σε κύτταρα ακτινοβολημένου μελανώματος
9. Προώθηση της αποφωσφορυλίωσης του Akt και καθοδική ρύθμιση της οδού Akt
10. Σύνδεση πολυμορφισμών σε FKBP5 με συναισθηματικές και αγχωτικές διαταραχές



## 7. PSA.ΔΟΜΗ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ [ ΕΙΚΟΝΑ 3]

Εικόνα 3



Το γονίδιο PSA είναι μέλος της οικογένειας των γονιδίων καλλικρεΐνης, το οποίο περιλαμβάνει το PSA και άλλα δύο γονίδια, hKLK1 και hKLK2. Το γονίδιο για το PSA είναι επίσης γνωστό ως ανθρώπινη καλλικρεΐνη 3 (hKLK3). Και τα τρία γονίδια συγκεντρώνονται εντός μιας περιοχής 60 kb επί του χρωμοσώματος 19q13.3-q13.4. Οι περιοχές κωδικοποίησης και ενισχυτή προαγωγέα του γονιδίου PSA έχουν χαρακτηριστεί επαρκώς. Το γονίδιο αποτελείται από πέντε εξόνια και κωδικοποιεί μια ώριμη πρωτεΐνη 237 αμινοξέων η οποία είναι γλυκοζυλιωμένη σε ένα μόνο σημείο. Η ρύθμιση του γονιδίου PSA διαμεσολαβείται μέσω του στεροειδούς συστήματος υποδοχέα ορμονών. Η περιοχή προαγωγού-ενισχυτή γονιδίου PSA εκτείνεται περίπου 5 kb DNA και περιέχει τρεις διακριτές περιοχές ανδρογονικής απόκρισης (AREs). Ανδρογόνα προγεστερόνες και γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζουν δραματικά την γονιδιακή έκφραση με τρόπο ειδικό για τον ιστό.

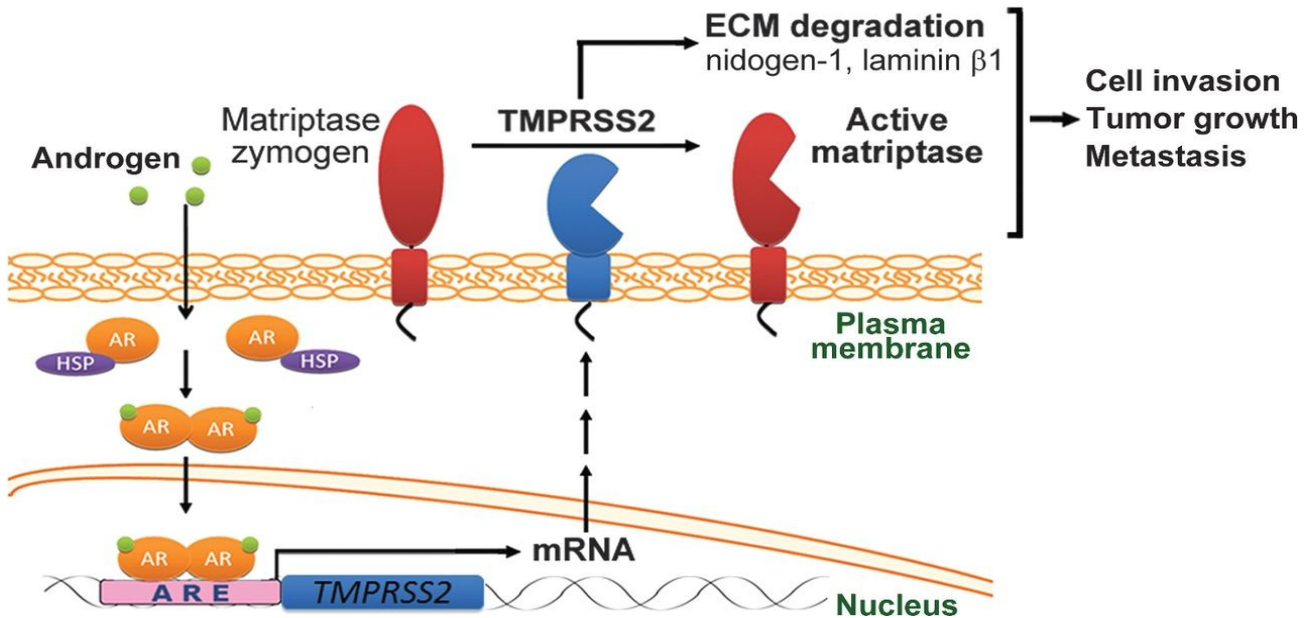
Το PSA είναι μία πρωτεάση σερίνης με ενζυμική δραστηριότητα τύπου χυμοθρυψίνης. Η PAA δρα επί της σεμεντογελίνης I, της σεμεντογελίνης II και της ινωδονεκτίνης στο σπερματικό πλάσμα, προκαλώντας υγροποίηση του σπερματικού θρόμβου πλάσματος μετά από εκσπερμάτωση. Το PSA μπορεί να έχει άλλες πιθανές βιολογικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης του αυξητικού παράγοντα, τόσο εντός όσο και εκτός του προστάτη. Πρόσφατα, η πρόταση αυτή ενισχύθηκε από την επίδειξη αυξημένων επιπέδων ορού ινσουλίνης-αυξητικού παράγοντα 1 (IGF-1) σε άτομα με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη.

Αρχικά, οι ερευνητές που ανακάλυψαν την πρωτεΐνη PSA εξέτασαν πολλούς ανθρώπινους ιστούς για την έκφραση του PSA, αλλά κανένα από τα τεστ αυτά δεν ήταν θετικό. Ο όρος προστατικό ειδικό αντιγόνο δικαιολογήθηκε πλήρως μέχρι πριν από λίγα χρόνια όταν το PSA εντοπίστηκε σε σχετικά χαμηλά επίπεδα σε διάφορους ιστούς, αλλά κυρίως στο γυναικείο μαστικό ιστό και στις εκκρίσεις του.

Η έκφραση του PSA στον ιστό του μαστού ρυθμίζεται από στεροειδείς ορμόνες. Εκτός από τις κλινικές μελέτες που υποδηλώνουν μια προγνωστική αξία για την έκφραση PSA σε όγκους του μαστού, την πιθανότητα διάγνωσης καρκίνου του μαστού μέσω διαγνωστικών εφαρμογών που βασίζονται σε μετρήσεις PSA από αναρρόφηση υγρού από τη θηλή των γυναικών, υπάρχουν συστήματα κυτταρικών σειρών που βασίζονται σε καρκινικές σειρές μαστού που είναι πολύτιμα για τη μελέτη της ρυθμιστικότητας του PSA. Επειδή το PSA είναι πρωτεάση, υπάρχουν προτάσεις ότι μπορεί να έχει βιολογική λειτουργία στο μαστό, όπως η ενεργοποίηση παραγόντων λανθάνοντος αναπτύξεως (ή κυτοκινών), η αποικοδόμηση των δεσμευτικών πρωτεϊνών για αυξητικούς παράγοντες ή η δραστικότητα ρυθμίσεως ενδογενούς αναπτύξεως [112]

## 8. TMPRSS2. ΔΟΜΗ, ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ [ΕΙΚΟΝΑ 4]

Εικόνα 4



Η διαμεμβρανική πρωτεάση σερίνης 2 (TMPRSS2) εκφράζεται στο επιθήλιο του προστάτη και η λειτουργία της ενισχύεται σε επιθετικούς καρκίνους του προστάτη. Το TMPRSS2 εκφράζεται κατά κανόνα αρκετές φορές υψηλότερα στον προστάτη σε σχέση με οποιονδήποτε άλλο ανθρώπινο ιστό, αν και η κανονική φυσιολογική λειτουργία παραμένει άγνωστη, και η μεταγραφή του ρυθμίζεται από τον AR. Αυτό το χαρακτηριστικό έχει υποθεθεί ότι συμβάλλει στην υψηλή συχνότητα γονιδιακών αναδιατάξεων που εμπλέκουν τον προαγωγό TMPRSS2 και μέλη της οικογένειας γονιδίων ETS, ιδιαίτερα της ERG, η οποία τοποθετεί αυτό το ογκογονίδιο υπό τον έλεγχο AR. Εκτός από τη συμβολή των ρυθμιστικών ακολουθιών TMPRSS2 σε αυτές τις αναδιατάξεις γονιδιώματος, ο ρόλος του TMPRSS2 στην καρκινογένεση δεν έχει τεκμηριωθεί [113,114]

Διάφορες κλινικές σειρές υποστηρίζουν έναν κεντρικό ρόλο για τα δίκτυα σηματοδότησης που λειτουργούν στην προαγωγή ενός μεταστατικού καταρράκτη στον καρκίνο του προστάτη που περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις AR, TMPRSS2, HGF και c-Met. Τόσο το φυσικό στρώμα του προστάτη όσο και τα συστατικά του οστού, ιδιαίτερα οι οστεοβλάστες, είναι γνωστό ότι παράγουν υψηλά επίπεδα HGF. Η δέσμευση της σηματοδότησης c-Met επάγει μια προ-επεμβατική επιθήλιο μεσεγγυματική μετάπτωση που συνοδεύεται από μια μετάβαση από την E-cadherin σε έκφραση N-cadherin. Η N-cadherin εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό από μια υποομάδα ανθρώπινων καρκίνων προστάτη με διεισδυτικές και μεταστατικές ικανότητες [115]

Η TMRSS2 είναι ένας ισχυρός ενεργοποιητής του HGF. Μέσω των αλληλεπιδράσεων με τον υποδοχέα c-Met, ο HGF ενεργοποιεί την καρκινογένεση. Η παρεκκλίνουσα σηματοδότηση c-Met έχει δείξει ότι λαμβάνει χώρα μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν ενεργοποιούμενες σημειακές μεταλλάξεις, γονιδιακή ενίσχυση και αυτοκρινή παραγωγή HGF από καρκινικά κύτταρα. Η σηματοδότηση c-Met προωθείται επίσης μέσω παρακρινών αλληλεπιδράσεων με HGF που παράγονται από συστατικά του μικροπεριβάλλοντος του όγκου όπως ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα και λευκοκύτταρα. Στην κατάσταση αυτή, το proHGF μετατρέπεται σε ώριμο HGF με πρωτεόλυση της κυτταρικής επιφάνειας. Ένας τέτοιος μηχανισμός έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζεται σε καρκίνο πλακώδους κυττάρου όπου η matrilysin της οικογένειας TMRSS2 επάγει την καρκινογένεση μέσω πρωτεολυτικής μετατροπής του proHGF, επακόλουθη ενεργοποίησηση της σηματοδότησης c-Met και εμπλοκή της οδού PI3K-Akt-mTOR[116,117]

## 9. AR ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ

Ιστορικά, τα ανδρογόνα θεωρήθηκαν ωφέλιμα για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Πριν από τη δεκαετία του 1970, ο καρκίνος του μαστού υποβλήθηκε σε θεραπεία με DHT, τεστοστερόνη και φλουοξυμεστερόνη με κάποια αποτελεσματικότητα. Εντούτοις, η θεραπεία με ανδρογόνα έπαψε να υφίσταται λόγω ανησυχιών για αρωματοποίηση των οιστρογόνων, επιδράσεις φθορισμού και τη διαθεσιμότητα της θεραπείας με στόχο τα οιστρογόνα όπως η ταμοξιφαίνη. Με την αναγνώριση της ετερογένειας του καρκίνου του μαστού, της αυξημένης γνώσης της οδού σηματοδότησης των ανδρογόνων και των καλύτερων μοντέλων μηχανισμών ανθεκτικότητας έναντι των οιστρογόνων, ανανεώθηκε το ενδιαφέρον για το ρόλο των ανδρογόνων και της στόχευσης του AR μονοπατιού [118]

Πρώιμες επιδημιολογικές μελέτες αναφέρθηκαν σε μια συσχέτιση μεταξύ της επίπτωσης της νόσου και των υψηλότερων επιπέδων κυκλοφορούντων ανδρογόνων. Οι αναδρομικές αναλύσεις δείχνουν αυξημένο κίνδυνο σε προ- και μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες με υψηλότερα επίπεδα οιστρογόνων, τεστοστερόνης. Τα ζωικά μοντέλα αποκαλύπτουν ότι η συνδυασμένη τεστοστερόνη και τα οιστρογόνα επάγουν πολλαπλασιασμό στον ιστό του μαστού, υπερέκφραση του AR και ενεργοποίηση των γονιδίων που ανταποκρίνονται στα οιστρογόνα, τα οποία αντιστρέφονται από τη θεραπεία με αντι-ανδρογόνα. In vitro, παρατηρούνται διαφορετικές αποκρίσεις στην χορήγηση ανδρογόνων σε διαφορετικές κυτταρικές καρκινικές σειρές. Η αύξηση των κυττάρων MCF-7 (υποδοχέα οιστρογόνου [ER] και ανθρώπινου υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 [HER2]-ανενεργό) και MDA-MB-453 (ER-HER2 - / +) προήχθησαν από την παρουσία ανδρογόνων, ενώ τα κύτταρα T47- $\bar{u}$  (ER + HER2-) και ZR-75-1 (ER + HER2 +) αναστέλλονται από τα ανδρογόνα. Αυτές οι αλλαγές αντιστράφηκαν από τον ανταγωνιστή AR, υδροξυφλουταμίδιο Η διαφορετική απόκριση στα ανδρογόνα στις κυτταρικές γραμμές του μαστού συνεπάγεται μεταβλητούς παράγοντες που εμπλέκονται στην σηματοδότηση AR[119]

Κλινικά, ο AR εκφράζεται σε υψηλό βαθμό τόσο σε φυσιολογικό όσο και σε κακοήγη ιστό του μαστού, με θετική έκφραση που ορίζεται ως ανοσοϊστοχημική (ICH) πυρηνική χρώση

$\geq 1\%$  ή  $\geq 10\%$ , ανάλογα με τη μελέτη .Η αναλογία όγκων που συν-εκφράζουν AR ποικίλλει ανάλογα με τον υπότυπο . Για παράδειγμα, σε ER +, HER2 + και τριπλά αρνητικούς όγκους (TNBC), ο επιπολασμός της AR χρώσης με IHC είναι 70-95%, 50-81% και 12.5-35%, αντίστοιχα[120]

Κατά την ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού με βάση τους μοριακούς υποτύπους, ο Luminal A αντιπροσωπεύει την υψηλότερη αναλογία των AR+ όγκων (91%) ο basal like τη χαμηλότερη αναλογία (32%), ο Luminal B (68%) και HER2 enriched (59%) [120]

Ενώ ο AR εκφράζεται σε όλους τους υποτύπους , ο προγνωστικός ρόλος δεν είναι πλήρως καθιερωμένος και τα στοιχεία είναι αντιφατικά. Η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης AR και της επιβίωσης φαίνεται να συνδέεται με τον υπότυπο , τη φύση της θεραπείας και το στάδιο της νόσου. Σε μια σειρά από 215 γυναίκες, η ταυτόχρονη έκφραση ER και AR προσέδωσε όφελος επιβίωσης (AR + 94% έναντι AR- 75%,  $P = 0,0002$ ), αλλά η έκφραση AR δεν είχε επίδραση στην επιβίωση στους ER- όγκους (AR + 60% έναντι AR- 70%,  $P = 0,32$ ) .Σε μια ξεχωριστή σειρά 347 γυναικών, παρατηρήθηκε βελτιωμένη επιβίωση με θετική έκφραση AR ανεξάρτητα από την έκφραση υποδοχέα ER / PR (79% σε AR + έναντι 64% σε AR-,  $P = 0.004$ ). Παρόλο που ο AR συσχετίζεται συχνά με βελτιωμένα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά συγκριτικά με τους AR - όγκους, αυτό δεν είναι καθολικό και σε ορισμένες σειρές η έκφραση του AR συνδέεται με καμία βελτίωση στο OS. Σε μια ομάδα 492 γυναικών με TNBC (17,7% AR +), η έκφραση AR συσχετίστηκε με την μεγαλύτερη ηλικία ( $P < 0,001$ ), χειρότερο OS ( $P = 0,008$ ) και μειωμένο DFS ( $P = 0,011$ ). Σε μια προηγούμενη μελέτη ασθενών που έλαβαν θεραπεία με ταμοξιφαίνη, η απουσία έκφρασης AR συσχετίστηκε με φτωχή απόκριση στη θεραπεία και με τάση προς μειωμένη επιβίωση σε σύγκριση με AR + όγκους . Σε γυναίκες που έλαβαν νεοεπικουρική χημειοθεραπεία, η θετική έκφραση AR συσχετίστηκε με βελτιωμένο DFS και OS, σε σύγκριση με AR- όγκους. Η στρωματοποίηση μετά από τη θεραπεία έδειξε ότι η θετική έκφραση AR προβλέπει καλύτερο DFS (85,7% έναντι 65,5%) και OS (95,2% έναντι 76,2%) στους TNBC. Αντίθετα, υπάρχουν ενδείξεις ότι η θετική έκφραση AR προβλέπει την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία στην ER + νόσο , με βελτιωμένο event free 5 year survival σε όγκους με υψηλή έκφραση AR mRNA (74% έναντι 57%,  $P = 0,013$ ) έναντι χαμηλής ,προσαρμοσμένη για HER2, Ki67, μέγεθος όγκου, ηλικία και βαθμού όγκου[ 121,122]

Είναι πιθανό ότι η AR έκφραση έχει έναν ρόλο σε όλους τους υποτύπους, ωστόσο η αξία του ως προγνωστικού δείκτη παραμένει ασαφής. Στην πραγματικότητα, η σημασία του AR μπορεί να ποικίλει μεταξύ των υποτύπων ως αποτέλεσμα της ποικίλης σχέσης του με το ER σε διαφορετικούς υποτύπους.

## 9.1 TNBC

Έχουν αναγνωρισθεί υποομάδες ER-όγκων με προφίλ γονιδιακής έκφρασης παρόμοια με εκείνη των ER + συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων που είναι στόχοι ή ανταποκρίνονται σε ανδρογόνα. Σε μια ξ σειρά από 587 TNBC όγκους, αναγνωρίστηκαν 6 διαφορετικές υποομάδες με βάση το μοριακό προφίλ τους. Ένα από αυτά επιβεβαίωσε τον προηγουμένως περιγραφόμενο υπότυπο ER-AR + και ονομάστηκε luminal ανδρογονικός υποδοχέας (LAR). Σε σύγκριση με άλλους υποτύπους TNBC, οι όγκοι LAR έχουν έκφραση πρωτεϊνών > 10 φορές ( $P < 0,004$ ) και είναι εμπλουτισμένα με γονίδια που εμπλέκονται στη σύνθεση στεροειδών, στο μεταβολισμό πορφυρίνης και στο μεταβολισμό ανδρογόνων / οιστρογόνων. Τα γονίδια που εκφράζονται περισσότερο είναι κατωφερέστερα του AR και ταξινομούν ένα προφίλ έκφρασης γονιδιακού γονιδίου. Ο υπότυπος LAR παρουσιάζει ομοιότητες με τον ιστολογικά διακριτό υπότυπο αποκρινούς μορφολογίας. Όταν οι όγκοι επιλέχθηκαν με βάση τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του αποκρινούς υποτύπου, το προφίλ γονιδιακής έκφρασης συσχετίστηκε σε μεγάλο βαθμό με τον υπότυπο LAR, υποδεικνύοντας ότι η ομάδα LAR TNBC περιλαμβάνει όγκους αποκρινούς μοριακού υποτύπου. Ο Doane και οι συνάδελφοί του αναγνώρισαν μια κυτταρική σειρά MDA-MB-453, η οποία ανακεφαλαιώνει το μοριακό προφίλ του υποτύπου LAR. Σε προκλινικά πειράματα, αυτά τα κύτταρα εμφανίζουν ανδρογόνο-εξαρτώμενη ανάπτυξη και αναστέλλονται από τον ανταγωνιστή AR, φλουταμίδη, με τρόπο μη εξαρτώμενο από τα οιστρογόνα. Αυτά τα δεδομένα δημιούργησαν υποθέσεις και οδήγησαν στην πρώτη κλινική δοκιμή σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού ER/PR -, AR +[123]

Η TBCRC έκανε την πρώτη μελέτη φάσης II, για έλεγχο της αντικαρκινικής δράσης της bicalutamide 150 mg ημερησίως σε γυναίκες με μεταστατικό TNBC και AR +/- . Αυτή η μελέτη έπιασε το προκαθορισμένο καταληκτικό σημείο του κλινικού οφέλους σε ποσοστό 19% (95% CI 5-42%) οριζόμενο ως το άθροισμα της πλήρους, μερική απόκριση και σταθερότητας νόσου > 24 εβδομάδες 19% με διάμεση PFS 12 εβδομάδων [124]

## 9.2 ER + ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ

Ο AR σε μεγάλο βαθμό συνυπάρχει σε ER-θετικά κύτταρα, με διακύμανση μεταξύ 70-95%. Παρόλο που η λειτουργική σχέση του AR και του ER δεν είναι πλήρως κατανοητή, η επικοινωνία μεταξύ τους έχει αποδειχθεί από προκλινικά δεδομένα. Οι περιοχές των AR και ERα μπορούν να αλληλεπιδράσουν από μόνες τους, οδηγώντας σε μεταγραφικές διεργασίες.

Σε ασθενείς με νόσο ER + που έχουν λάβει θεραπεία, η αυξημένη παραγωγή ανδρογόνων θεωρείται πιθανός δείκτης ανθεκτικότητας στην αντιοιστρογονική θεραπεία και πιθανή οδός για την ανάπτυξη και επιβίωση του όγκου σε προθεραπευμένους ασθενείς. Τα ανδρογόνα αρωματοποιούνται σε οιστρόνη και οιστραδιόλη. Οι αναστολείς της αρωματάσης (AI) παρεμποδίζουν τη μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα με αναστολή αυτού του ενζύμου, με αποτέλεσμα την αύξηση των ανδρογόνων. Στις γυναίκες

που υποβάλλονται σε θεραπεία με AI, αυξάνεται η κυκλοφορία της τεστοστερόνης, τα επίπεδα ανδροστενεδιόνης και DHEA-S και τα υψηλά επίπεδα επινεφριδιακού ανδρογόνου προ της θεραπείας είναι προβλεπτικός παράγοντας αποτυχίας της ορμονοθεραπείας.[125]

Συνολικά, η έκφραση AR σε ER+ όγκους συσχετίζεται με καλούς προγνωστικούς δείκτες συμπεριλαμβανομένου του βελτιωμένου OS και DFS, καλύτερη διαφοροποίηση, μικρότερο μέγεθος και έλλειψης συμμετοχής λεμφαδένων στη διάγνωση. Εντούτοις, το AR φαίνεται να προβλέπει αντίσταση ή μειωμένη δραστηριότητα σε θεραπεία με αντιοιστρογόνα. Αυτές οι παρατηρήσεις καθιστούν την AR και την ER στόχευση ελκυστική. [125]

### 9.3 HER2 + ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ

Η έκφραση του AR είναι αυξημένη σε ER- / HER2 + με έκφραση 77% στους HER2 + έναντι 30% στους HER2-. Πρόκλινικες παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι η υπερδραστηριοποίηση του HER2 ενισχύει τον AR και έτσι επανενισχύεται το HER2. Ο AR μεσολαβεί και προάγει την ενεργοποίηση των σημείων σηματοδότησης WNT και HER2 και μέσω της άμεσης μεταγραφής των WNT7B και HER3 και της συνεργασίας μεταξύ της μεταγραφής AR και FOXA1. Σε ορισμένες σειρές, η επιβίωση φαίνεται ανεπηρέαστη από την κατάσταση AR, ενώ σε άλλες όχι. Περαιτέρω κατανόηση του AR σε HER2 + νόσο πρέπει να μελετηθεί [126]

---

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

### 1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

#### 1.1 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι μεταβλητές ανά κατηγορία παρουσιάζονται σαν συχνότητες με αντιστοιχία σε ποσοστά, ενώ η μέση τιμή και το εύρος παρουσιάζονται σα συνεχόμενη τιμή. Chi –square και Fisher's exact τεστ χρησιμοποιήθηκαν για συγκρίσεις μεταξύ ομάδων ενώ το τεστ Wilcoxon χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση διαφορών στις συνεχόμενες μεταβλητές.

Το διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) ορίστηκε σαν ο χρόνος σε μήνες από τη στιγμή της διάγνωσης μέχρι την τεκμηριωμένη πρόοδο νόσου, θάνατο από οποιαδήποτε αιτία ή ημερομηνία τελευταίας επαφής για οποιοδήποτε λόγο. Η ολική επιβίωση ( OS ) ορίστηκε σαν το διάστημα από τη διάγνωση μέχρι το θάνατο από οποιαδήποτε αιτία. Οι ασθενείς εν ζωή εξετάστηκαν και καταγράφηκαν με ημερομηνία αυτή της τελευταίας επαφής. Οι κατανομές time- to- event υπολογίστηκαν με Kaplan – Meier καμπύλες και συγκρίθηκαν με log-rank. Hazard ratios ( HR) βάση μονοπαραγοντικών και πολυπαραγοντικών μοντέλων Cox χρησιμοποιήθηκαν για τη συσχέτιση μεταξύ των υπο μελέτη παραγόντων και των τιμών υποτροπής και θνησιμότητας. Το ίδιο μοντέλο Cox χρησιμοποιήθηκε για να εξετάσει την προβλεπτική σημασία των υπό μελέτη δεικτών με τεστ αλληλεπίδρασης λαμβάνοντας υπ όψιν τη χρήση ή όχι ορμονοθεραπείας και ακτινοθεραπείας.

Πολυπαραγοντική ανάλυση Cox πραγματοποιήθηκε περιλαμβάνοντας τις παρακάτω κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους σαν πρώτο βήμα: ηλικία ( >50 έναντι 50 και κάτω ) , ER/PR status, θετικοί λεμφαδένες ( 0-3 έναντι 4 και πάνω ), Her2 status, Ki67, χρήση ή όχι επικουρικής χημειοθεραπείας και οποιοδήποτε άλλο δείκτη που φάνηκε να είναι στατιστικά σημαντικός ή να εμφανίζει τάση προς στατιστική σημαντικότητα στην μονοπαραγοντική ανάλυση. Στο τελικό μοντέλο ανάλυσης χρησιμοποιήθηκαν αναδρομικά κριτήρια με  $p < 0.1$ .

Το πρόγραμμα SAS χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση ( SAS for Windows, v 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA )

#### 1.2 ΙΣΤΙΚΕΣ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ, ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ CUT OFF

Ο υπό μελέτη πληθυσμός απαρτίζεται από ιστολογικά block παραφίνης αδενοκαρκινώματος μαστού σε ιστικές μικροσυστοιχίες TMA (N=700). Οι ιστοί προέρχονται από ασθενείς με χ/θεν T1-4 N0-2 M0 ER any IHC Pg Rany HER2 any όγκο που έχουν



αντιμετωπιστεί σύμφωνα με τα πρότυπα θεραπευτικά πρωτόκολλα της ΕΣΟΟ που περιλαμβάνουν επικουρική θεραπεία με σχήματα βασισμένα σε ταξάνες ή/και ανθρακυκλίνες. Πλήρη κλινικά και παθολογανατομικά στοιχεία είναι διαθέσιμα στους φακέλους ασθενών. Από τα 700 δείγματα, 646 ήταν αξιολογήσιμα για χρώση και ανάγνωση έστω και μιας από τις υπό μελέτη πρωτείνες FKBP5, TMPRSS2 και PSA.

Για τη δημιουργία των ιστικών μικροσυστοιχιών χρησιμοποιήθηκε το ειδικό χειροκίνητο υψηλής ακρίβειας μηχάνημα (TMA Model I, BeecherInstruments, Sun Prairie, WI, U.S.A.) που διαθέτει το Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής Α.Π.Θ. σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και την εμπειρία των χειριστών. Ελήφθησαν 2 ιστικοί κύλινδροι ανά περίπτωση διαμέτρου 1.5 mm και εγκλείσθηκαν σε 50 κύβους παραφίνης ανά πρωτεΐνη, σύνολο 150 (πρωτόκολλο 10/00). Όπου υπήρχε επαρκές υλικό, δημιουργήθηκαν και εφεδρικά TMA καθώς και TMA από μη νεοπλασματικό μαζικό αδένα, από ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα. Μετά τη δημιουργία των TMA, οι κύβοι, τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 60°C για  $10 \pm 2'$  προκειμένου να ομογενοποιηθεί η παραφίνη και να αποκατασταθεί η συνοχή και οι μικρορωγμές της παραφίνης. Οι 150 TMA κύβοι περιείχαν από 25 έως 66 ιστικούς κυλίνδρους. Κάθε TMA περιείχε επίσης, ως μάρτυρες των *in situ* τεχνικών, ιστικούς κυλίνδρους από διάφορους νεοπλασματικούς, μη νεοπλασματικούς και αντιδραστικούς ιστούς.

Ανοσοιστοχημική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τυπικές διαδικασίες όσον αφορά τη χρώση. Η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε με σκοπό τη διατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων, της αρχιτεκτονικής των ιστών και της αντιγονικότητας των επιτόπων-στόχων και διάλυμα παραφορμαλδεΐδης χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό των ιστών. Οι ιστοί τεμαχίστηκαν σε φέτες, αλλά πριν από την τομή, τα δείγματα ενσωματώθηκαν σε ένα μέσο, όπως κηρό παραφίνης. Τα τμήματα ακολούθως τεμαχίστηκαν με ποικίλα όργανα, συνηθέστερα με μικροτόμο, σε φέτες σε μια περιοχή από 3  $\mu\text{m}$ -50  $\mu\text{m}$ . Οι φέτες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες, αφυδατωμένες χρησιμοποιώντας πλύσεις αλκοόλης αυξανόμενων συγκεντρώσεων (π.χ. 50%, 75%, 90%, 95%, 100%, και καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας απορρυπαντικό ξυλόλιο προτού απεικονιστούν στο μικροσκόπιο.

Για τους ιστούς που είναι στερεωμένοι σε φορμαλίνη παραφίνης, η ανάκτηση αντιγόνου είναι συχνά απαραίτητη και περιλαμβάνει προ-επεξεργασία των τμημάτων με θερμότητα ή χρήση πρωτεάσης. Ανάλογα με τον τύπο του ιστού και τη μέθοδο ανίχνευσης αντιγόνου, η ενδογενής βιοτίνη ή τα ένζυμα έπρεπε να μπλοκαριστούν πριν από τη χρώση του εκάστοτε αντισώματος. Αν και τα αντισώματα εμφανίζουν τροπισμό για συγκεκριμένους επιτόπους, μπορούν να δεσμευθούν εν μέρει ή ασθενώς σε θέσεις μη ειδικών πρωτεϊνών (επίσης αποκαλούμενες αντιδραστικές θέσεις) που είναι παρόμοιες με τις συγγενείς θέσεις πρόσδεσης στο αντιγόνο στόχο. Για να μειωθεί η χρώση φόντου, τα δείγματα επώαστηκαν με ένα ρυθμιστικό διάλυμα ζελατίνης το οποίο δέσμευσε τις αντιδραστικές θέσεις στις οποίες μπορεί να συνδεθούν τα πρωτογενή ή δευτερογενή αντισώματα. Μέθοδοι για την εξάλειψη χρώσης φόντου περιέλαβαν αραίωση των πρωτογενών ή δευτερογενών αντισωμάτων, αλλαγή του χρόνου ή της θερμοκρασίας επώασης και χρήση διαφορετικού

συστήματος ανίχνευσης ή διαφορετικού πρωτογενούς αντισώματος. Ο έλεγχος ποιότητας περιέλαβε τουλάχιστον ένα ιστό που είναι γνωστό ότι εκφράζει το αντιγόνο ως θετικό μάρτυρα και αρνητικούς μάρτυρες ιστού που είναι γνωστό ότι δεν εκφράζουν το υπό μελέτη αντιγόνο.

Για την χρώση της πρωτεΐνης FKBP5, χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα EPR6617 της LS Bio σε διάλυση 1:100. Πρόκειται για ένα μονοκλωνικό αντίσωμα IgG, το οποίο αναπτύχθηκε από κουνέλια έναντι ενός συνθετικού πεπτιδίου, που χρησιμοποιήθηκε ως ανοσογόνο, που αντιστοιχεί σε υπολείμματα κοντά στο Ο-άκρο της ανθρώπινης FKBP5. Για τη χρώση της πρωτεΐνης TMPRSS2, χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα EPR3862 της LS Bio σε διάλυση 1:50. Πρόκειται για ένα μονοκλωνικό αντίσωμα της οικογένειας των πρωτεασών που αναπτύχθηκε από κουνέλια έναντι του ανθρώπινου συνθετικού πεπτιδίου επιθηλιασίνης / TMPRSS2.

Για τη χρώση της πρωτεΐνης PSA, χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα LS-C154746 της LS Bio σε διάλυση 1:100. Πρόκειται για ένα μη συζευγμένο μονοκλωνικό αντίσωμα IG1 από ποντίκια έχοντας σαν ανοσογόνο το ανθρώπινο PSA.

Η αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Γούσσια εξέτασε τις ιστοικές μικροσυστοιχίες από τα τεμάχια ιστών για την καταλληλότητα του υλικού και τον υπολογισμό του ποσοστού των καρκινικών κυττάρων σε κάθε περίπτωση. Η ποιότητα της χρώσης με IHC αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας εσωτερικούς θετικούς μάρτυρες. Το ποσοστό της χρώσης υπολογίστηκε και η μέση τιμή των δύο μικροσυστοιχιών καταγράφηκε για την μελέτη της ανοσοιστοχημικής έκφρασης της πυρηνικής FKBP5, κυτταροπλασματικού PSA, μεμβρανικής/ κυτταροπλασματικής TMPRSS2. Ιστοί από άλλους νεοπλαστικούς και μη ιστούς χρησιμοποιήθηκαν σαν ομάδα ελέγχου.

Μελετήθηκε το ποσοστό της χρώσης των κυττάρων και το H Score:  $([\% \text{ of cells } 1+] \times 1) + ([\% \text{ of cells } 2+] \times 2) + ([\% \text{ of cells } 3+] \times 3)$ , με διακύμανση από 0-300. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει επικυρωμένο σύστημα βαθμολόγησης για την ερμηνεία της χρώσης IHC και η βιβλιογραφία σχετικά με το θέμα αυτό είναι πρακτικά ανύπαρκτη, για τα προαναφερθέντα βιομόρια, οι τιμές cut off καθορίστηκαν με βάση frequency distribution.

Ιστογράμματα συχνότητας του H score και του ποσοστού των κυττάρων με θετική έκφραση πυρηνικής FKBP5, κυτταροπλασματικού PSA και κυτταροπλασματικής και μεμβρανώδους TMPRSS2 σχεδιάστηκαν και αναλύθηκαν για την αναγνώριση φυσιολογικών cut off. Θετικότητα της χρώσης θεωρήθηκε έστω και 1%. Η έκφραση της εκάστοτε πρωτεΐνης θεωρήθηκε ψηλή όταν ήταν μεγαλύτερη και χαμηλή όταν ήταν χαμηλότερη ή ίση με το βέλτιστη τιμή cut off αντίστοιχα και μελετήθηκε σαν μεταβλητός παράγοντας στην ανάλυση.

Η ανάλυση κατανομής του ποσοστού των κυττάρων με θετική έκφραση των ανωτέρω πρωτεϊνών ανέδειξε τα εξής cut off. Για την TMPRSS2 το cut off ήταν στο 80, για το κυτταροπλασματικό PSA το 15 ενώ για την πυρηνική έκφραση της FKBP5

αναγνωρίστηκαν δύο cut off, 65 και 85, όπου και τα δύο εξετάστηκαν και αναλύθηκαν για την προγνωστική και προβλεπτική τους αξία στην ανάλυση. Παρομοίως, το cut off του H-score για την TMPRSS2 ορίστηκε το 100, για το PSA το 50 και για το FKBP5 το 150.

### 1.3 ΠΡΟΦΙΛ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ AR. ΥΛΙΚΟ ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε ένα υποσύνολο 78 δειγμάτων από ασθενείς του ΠΓΝΙ ανιχνεύθηκε το προφίλ μεταλλάξεων στο γονίδιο AR. Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι υπάρχουν 10 μεταλλάξεις στο γονίδιο AR στον καρκίνο του μαστού (Πίνακας 1).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Position,CDS Mutation,AA Mutation,Mutation ID (COSM),Count,Type
31,c.93C>T,p.R31R,1491165,1,Substitution - coding silent
58,c.173A>T,p.Q58L,376477,1,Substitution - Missense
290,c.869G>A,p.C290Y,159139,1,Substitution - Missense
355,c.1063G>A,p.E355K,93902,1,Substitution - Missense
522,c.1566C>T,p.S522S,1491166,1,Substitution - coding silent
568,c.1703C>T,p.S568F,1491168,1,Substitution - Missense
638,c.1912C>A,p.L638M,457873,1,Substitution - Missense
663,c.1988C>G,p.S663*,457875,1,Substitution - Nonsense
840,c.2518G>A,p.D840N,93906,1,Substitution - Missense
865,c.2595C>A,p.D865E,457877,1,Substitution - Missense
<b>10 mutated samples in 1176 tested</b>

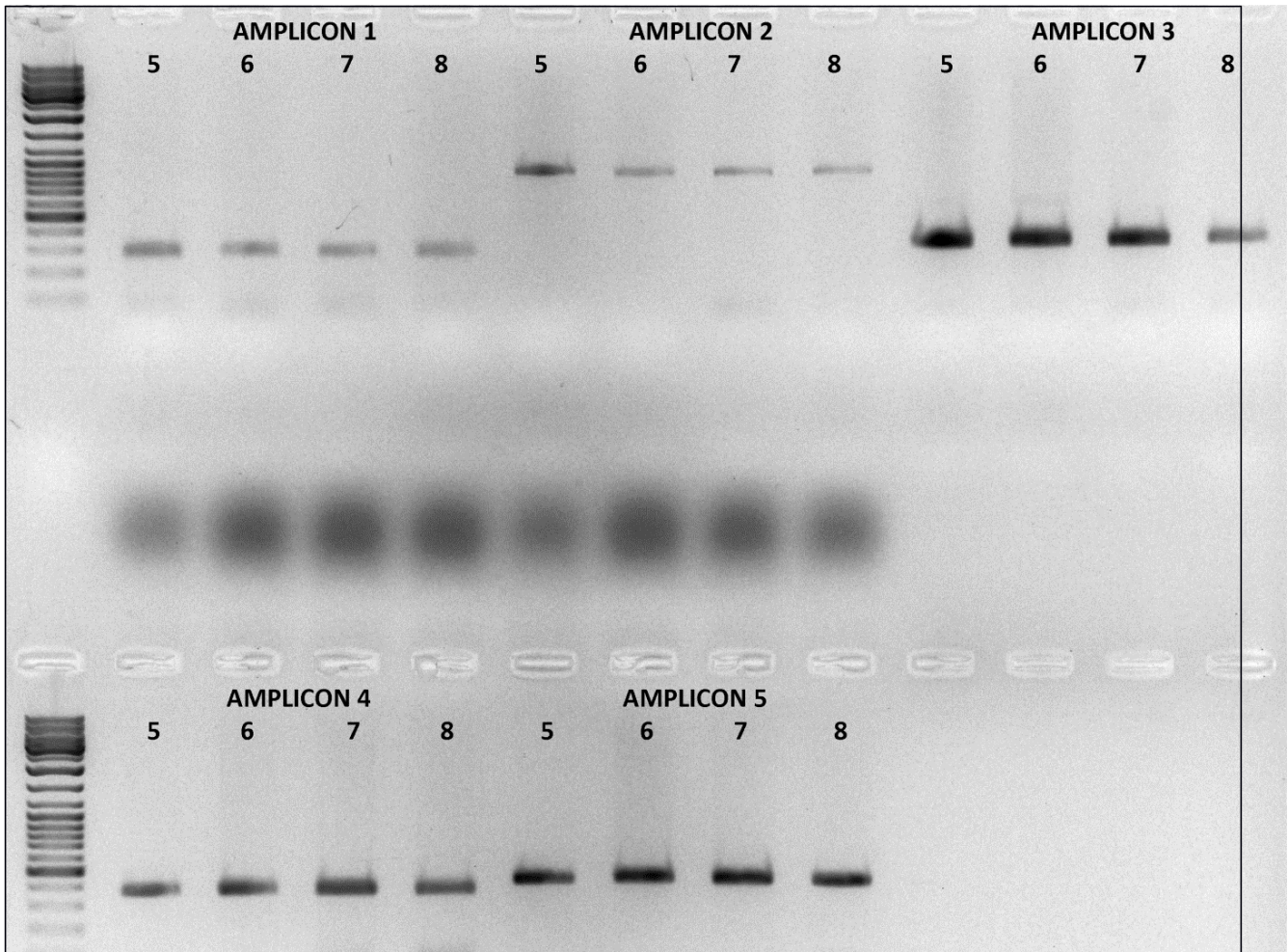
Απομονώσαμε γονιδιακό DNA από τομές 5µm από μπλοκ παραφίνης καρκίνου μαστού (QIAamp DNA FFPE tissue kit 56404, Qiagen). Ακολούθως για το screening, πέντε περιοχές ενδιαφέροντος ενισχύθηκαν και πολλαπλασιάστηκαν χρησιμοποιώντας τα κάτωθι ολιγοπεπτίδια (Πίνακας 2)

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

Screening of codons 31 and 58 (280bp amplicon)
AR Fw1: 5'-GTGCAGTTAGGGCTGGGAA-3'
AR Rv1: 5'-AGAACCATCCTCACCCCTGCT-3'
Screening of codons 290, 355 and 522 (886bp amplicon)
AR Fw2: 5'-GTGTGGAGGCGTTGGAGCA-3'
AR Rv2: 5'-GTTCTCCAGCTTGATGCGAG-3'
Screening of codon 568 (334bp amplicon)
AR Fw3: 5'-CCTGATGTGTGGTACCCTGG-3'
AR Rv3: 5'-CAGCACACACTACACCTGGC-3'
Screening of codons 638 and 663 (375bp amplicon)
AR Fw4: 5'-GTCAACTCCAGGATGCTCTAC-3'
AR Rv4: 5'-CCATGTGTGACTTGATTAGCAG-3'
Screening of codons 840 and 865 (433bp amplicon)
AR Fw5: 5'- CTTGGTGCTTTGTCTAATGCTCC -3'
AR Rv5: 5'- ACTCCTCCACCCCTTTCACAAT -3'

Πραγματοποιήσαμε PCR χρησιμοποιώντας Kapa HI-FI Hotstart DNA πολυμεράση βάση τις οδηγίες του παρασκευαστή ( περιέχωντας 5% DMSO ). Οι συνθήκες θερμοκυκλίωσης ήταν οι ακόλουθες: αρχική μετουσίωση στους 95 ° C για 3 λεπτά, μετουσίωση 98oC για 20sec, ενίσχυση για 30 κύκλους στους 98oC για 10sec / 65C για 15sec / 72 C για 15sec και τελική επέκταση στους 72 C για 1min.20% των προϊόντων PCR ελέγχθηκαν οπτικά με ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 1% προς επικύρωση των μεγέθων των amplicon και το υπόλοιπο προϊόν PCR καθαρίστηκε χρησιμοποιώντας kit καθαρισμού QIAquick PCR (# 28106, Qiagen). Η αλληλούχιση Sanger των καθαρισμένων amplicons πραγματοποιήθηκε από την StarSEQ GmbH (Mainz, Germany) ( Πίνακας 3 )

ΠΙΝΑΚΑΣ 3



780 από τις 780 θέσεις ενδιαφέροντος διαβάστηκαν, όλες φυσιολογικές καμία μεταλλαγμένη Πίνακας 4

patient ID	sample	AR amplicon 1		AR amplicon 2			AR amplicon 3	AR amplicon 4	
		mutation 1	mutation 2	mutation 3	mutation 4	mutation 5	mutation 6	mutation 7	mutation 8
7132-13 N	1	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
5327-13B	2	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
7390-13Δ	3	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
2380-13Δ	4	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
8892-13A	5	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
8644-13Γ	6	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
3373-13B	7	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
8057-13B	8	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
4545-13A2X	9	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
10420-13H1	10	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
5324-13A	11	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
8645-13Δ	12	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
9690-13Γ1	13	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
4022-12B	14	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
11019-13Z	15	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
2380-13Γ	16	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
7460-13Γ	17	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
4837-13O3	18	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
4953-13E	19	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
2017-13Γ	20	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
675-13	21	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
133-13A	22	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
7325-13Γ	23	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
5381-12E	24	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
5467-13Z	25	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
11994-12Δ	26	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
3446-13Δ	27	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
10300-13Γ	28	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
5079-13H	29	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
8407-13	30	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
9511-12H	31	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
102981 ή 102481	32	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
112602A	33	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
6623-13O	34	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
6624-13Γ	35	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
202406ER	36	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
10562-13	37	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
7134-13	38	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
7172-13	39	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
5946-13Γ1	40	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
5592-13Γ	41	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
2734-13O	42	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
3239-13O	43	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
12394-12B	44	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
6131-13Z	45	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
6494-13Γ	46	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
6708-13Γ	47	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
198904A2X	48	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
6594-13A	49	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
7462-13B	50	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
7389-13B	51	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
3714-13Δ	52	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
200489B	53	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
5823-13B	54	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
1420-12A2	55	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
204457E	56	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
7125-13B1	57	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
7222-13B	58	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
7130-13 Z1A	59	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
1999-12Γ	60	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
9950-12E	61	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
176102A	62	<i>I did not get paraffin sections to work with/missing sample from database (probably used for hospital)</i>							
6072-12A	63	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
6128-13A	64	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok

#### 1.4 FISH ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ AR. ΥΛΙΚΟ ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον υπό μελέτη πληθυσμό πραγματοποιήθηκε FISH ανάλυση στο Παθολογοανατομικό τμήμα του ΠΓΝΙ( κ . Γουσσια, κ. Γκρέπη) του AR γονιδίου και συσχέτιση με τους υπό μελέτη βιοδείκτες και κλινικές παραμέτρους.

FISH ανάλυση είναι η εναλλακτική του κλασσικού καρύοτυπου που επιτρέπει τη μορφολογική ανίχνευση και εκτίμηση των κυτταρογενετικών ανωμαλιών σε κύτταρα που βρίσκονται στη μετάφαση ή μεσόφαση. Δείκτης DNA ομόλογος έναντι χρωμοσωματικής αλληλουχίας του γονιδιώματος προστίθεται στο υπο έλεγχο παρασκεύασμα και μετά από αποδιάταξη του DNA ακολουθεί *in situ* υβριδισμός, δηλαδή σύζευξη ομόλογων αλληλουχιών του δείκτη DNA και των χρωμοσωμάτων του εξεταζόμενου υλικού. Ακολουθεί έκπλυση με σκοπό την απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων δεικτών. Οι κεντομεριακοί δείκτες έχουν περίπου μήκος 200 νουκλεοτιδίων ενώ το μήκος των ειδικών γονιδιακών δεικτών είναι μικρότερο των 50 ζευγών βάσεων νουκλεοτιδίων.

Για κάθε δείγμα, ένα εύρος από 25 έως 50 ακέραιους και μη επικαλυπτόμενους πυρήνες μεταξύ των φάσεων απαριθμήθηκαν χειροκίνητα με τη χρήση φακού εμβάπτισης. Η πραγματική ενίσχυση AR γονιδίου ορίστηκε ως ο λόγος του συνολικού αριθμού των σημάτων AR διαιρούμενος με τον συνολικό αριθμό του κεντρομερούς X χρωμοσώματος ίσο ή μεγαλύτερο από 2.

Η ανάλυση FISH της ενίσχυσης AR γονιδίου έγινε χρησιμοποιώντας τον ανιχνευτή Vysis LSI Androgen receptor gene ( Xq12) probe συνδυασμένο με το VYSIS CEP X Spectrum Orange probe ιχνηθετημένου με SpectrumGreen ChrX (DXZ1) ως τον έλεγχο (Abbott Molecular, IL).

Η κατανομή, διασπορά και η τυχόν συσχετίσεις με τους άλλους βιοδείκτες παρουσιάζονται στη συνέχεια. Συνοπτικά καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε σχέση με όφελος στο OS η DFS δε διαπιστώθηκε με AR/X ratio παρών σε 358 δείγματα ( 9 high vs 349 low , median 1.00)

## 2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Βασικά δημογραφικά χαρακτηριστικά, χαρακτηριστικά των κακοηθειών και η κατανομή των υπο μελέτη βιοδεικτών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα

ΠΙΝΑΚΑΣ 5



	N	%
<b>ΗΛΙΚΙΑ</b>		
<b>ΔΙΑΜΕΣΗ</b>	53.3 (22.4-79.1)	
<=50	261	40.4
>50	385	59.6
<b>Ki67</b>		
<b>ΕΥΡΟΣ</b>	20 (0-98)	
<b>ΕΜΜΗΝΟ ΡΥΣΗ</b>		
ΜΕΤΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΙΑΚΗ	359	55.6
ΠΡΟΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΙΑΚΗ	287	44.4
<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ</b>		
0-3	303	46.9
>=4	343	53.1
<b>ΒΑΘΜΟΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ</b>		
I	34	5.3
II	299	46.3
III	313	48.5
<b>ΧΕΙΡΟΥΡΓΕΙΟ</b>		
BCS	215	33.3
TRM	431	66.7
<b>ΜΕΓΕΘΟΣ ΟΓΚΟΥ</b>		
<=2	189	29.3
>2	455	70.4
ΑΓΝΩΣΤΟ	2	0.3
<b>ΟΡΜΟΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ</b>		
ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	139	21.5
ΘΕΤΙΚΟΙ	464	71.8
ΑΓΝΩΣΤΟ	43	6.7
<b>HER2</b>		
ΘΕΤΙΚΟΙ	139	21.5
ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	481	74.5
ΑΓΝΩΣΤΟ	26	4.0
<b>ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ</b>		
ΝΑΙ	645	99.8
ΟΧΙ	1	0.2
<b>ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ</b>		
ΝΑΙ	477	73.8
ΟΧΙ	147	22.8
ΑΓΝΩΣΤΟ	22	3.4
<b>ΟΡΜΟΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ</b>		
ΝΑΙ	464	71.8
ΟΧΙ	166	25.7
ΑΓΝΩΣΤΟ	16	2.5
<b>ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΥΠΟΤΥΠΟΙ</b>		
Luminal A	212	32.8
Luminal B	175	27.1
Luminal Her2	76	11.8
Her2-Enriched	58	9.0
TNBC	81	12.5
Unknown	44	6.8

	N	Mean	Median	Min	Max	P25	P75
AR/X ratio FISH	358	0.99	1.00	0.78	1.09	1.00	1.00
Nuclear FKBP5 % of cells	566	79.90	89.38	5.00	100.00	72.50	95.00
Cytoplasmic PSA % of cells	59	18.97	10.00	0.00	80.00	5.00	30.00
MC TMPRSS2 % cells	573	81.90	87.50	3.50	100.00	80.00	90.00
TMPRSS2 H score cyto	573	105.02	90.00	3.50	300.00	80.00	123.33
PSA H score cyto	59	25.23	12.50	0.00	160.00	5.00	33.33
FKBP5 H score nuclear	566	147.69	150.00	5.00	300.00	105.00	190.00



Στο σύνολο, 646 ασθενείς συμπεριλήφθησαν στην ανάλυση με την προϋπόθεση ότι μπορούσε να μετρηθεί τουλάχιστον ένας υπό μελέτη δείκτης. Διάμεση ηλικία διάγνωσης ήταν τα 53.3 έτη. 56% των περιπτώσεων ήταν μετεμμηνοπαυσιακές και η πλειοψηφία είχε κατά τη διάγνωση περισσότερους από 4 θετικούς λεμφαδένες και όγκο μεγαλύτερο από 2 cm. Διάμεσος χρόνος παρακολούθησης ήταν 124.7 μήνες ( 95% CI 122.39 - 126.82 ) ενώ το διάμεσο DFS και OS δεν έχει ακόμα επιτευχθεί. Μέχρι την τελευταία μέρα της καταγραφής 190 ασθενείς κατέληξαν και 200 ασθενείς είχαν πρόοδο νόσου.

## 2.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Υψηλή πυρηνική έκφραση FKBP5 (cut off 85 ) ήταν πιο συχνή σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (  $p=0.001$  ) και σε όσες είχαν υποβληθεί σε τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή (  $p=0.028$  ) ενώ χαμηλή πυρηνική έκφραση είχαν γυναίκες με ηλικία άνω των 50 (  $p<0.001$  ). Με όριο το 65 σαν cut off, υψηλή πυρηνική έκφραση FKBP5 συσχετίζεται με μεγαλύτερη ηλικία (  $p=0.038$  ), μετεμμηνοπαυσιακό status (  $p=0.001$  ), όγκο μεγαλύτερο από 2 εκ (  $p=0.012$  ) και περισσότερους από 4 λεμφαδένες (  $p=0.037$  ). Χαμηλή έκφραση με (H score 150 cut off) συσχετίζεται με μεγαλύτερη ηλικία, grade III, και μετεμμηνοπαυσιακό status (  $p=0.014, p=0.019, p=0.001$  ) ( Πίνακας 6)

Parameter	Categories	FKBP5 H score (cut-off at 150)			FKBP5 (cut-off at 65)			FKBP5 (cut-off at 85)		
		High	Low	P-value	High	Low	P-value	High	Low	P-value
ΗΛΙΚΙΑ	<=50	131 (47.5)	108 (37.2)	0.014	203 (44.3)	36 (33.3)	0.038	153 (50.3)	86 (32.8)	<0.001
	>50	145 (52.5)	182 (62.8)		255 (55.7)	72 (66.7)		151 (49.7)	176 (67.2)	
ΧΕΙΡΟΥΡΓΕΙΟ	Breast conserving surgery	99 (35.9)	85 (29.3)	0.096	157 (34.3)	27 (25.0)	0.064	111 (36.5)	73 (27.9)	0.028
	MRM	177 (64.1)	205 (70.7)		301 (65.7)	81 (75.0)		193 (63.5)	189 (72.1)	
ΒΑΘΜΟΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ	I	17 (6.2)	11 (3.8)	0.019	25 (5.5)	3 (2.8)	0.368	18 (5.9)	10 (3.8)	0.294
	II	142 (51.4)	123 (42.4)		217 (47.4)	48 (44.4)		147 (48.4)	118 (45.0)	
	III	117 (42.4)	156 (53.8)		216 (47.2)	57 (52.8)		139 (45.7)	134 (51.1)	
ΕΜΜΗΝΟ ΡΥΣΗ	Postmenopausal	128 (46.4)	175 (60.3)	0.001	230 (50.2)	73 (67.6)	0.001	143 (47.0)	160 (61.1)	0.001
	Premenopausal	148 (53.6)	115 (39.7)		228 (49.8)	35 (32.4)		161 (53.0)	102 (38.9)	
ΜΕΓΕΘΟΣ ΟΦΚΟΥ	<=2	83 (30.2)	78 (27.0)	0.401	141 (30.9)	20 (18.7)	0.012	95 (31.4)	66 (25.3)	0.112
	>2	192 (69.8)	211 (73.0)		316 (69.1)	87 (81.3)		208 (68.6)	195 (74.7)	
ΘΕΤΙΚΟΙ ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ	0-3	132 (47.8)	134 (46.2)	0.700	225 (49.1)	41 (38.0)	0.037	145 (47.7)	121 (46.2)	0.719
	>=4	144 (52.2)	156 (53.8)		233 (50.9)	67 (62.0)		159 (52.3)	141 (53.8)	

Χαμηλή έκφραση TMPRSS2 στο κυτταρόπλασμα/κυτταρική μεμβράνη ( H score 100 cut off) συσχετίστηκε με χαμηλή πυρηνική έκφραση FKBP5 ( 150 H score cut off) και με υψηλή πυρηνική έκφραση ( 65 cut off), ( $p < 0.001$  και  $p = 0.021$ ). Από την άλλη υψηλή έκφραση TMPRSS2 ( 80 cut off) συσχετίζεται με ψηλή πυρηνική έκφραση FKBP5 ( H score 150 cut off ) και υψηλή έκφραση fKBP5 γενικότερα ( 65 cut off), ( $p < 0.001$  και  $p = 0.001$ ). Υπολογίζοντας το cut off για πυρηνική έκφραση στο 85, υψηλή έκφραση TMPRSS2 ( 80 cut off ) συσχετίζεται με υψηλή έκφραση FKBP5 ( $p < 0.001$ ). Υψηλή έκφραση TMPRSS2 με το cut off σχετίζεται με θετικότητα έκφρασης στο mTOR, pAKT-473, απώλεια PTEN, θετικότητα RB, TOPOIIa και χαμηλή έκφραση κυτταροπλασματικού p16 ( $p = 0.036$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.045$ ,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.002$ ,  $p = 0.024$ ). Χαμηλή έκφραση TMPRSS2, με H

score 100 σαν cut off, σχετίζεται με θετική έκφραση pAKT-473 (  $p=0.035$  ) ( Πίνακας 7)

ΠΙΝΑΚΑΣ 7

Parameter	Categories	TMPRSS2 H score (cut-off at 100)			TMPRSS2 (cut-off at 80)		
		High	Low	P-value	High	Low	P-value
AR	negative	17 (11.3)	65 (21.0)	0.010	45 (14.2)	37 (25.7)	0.003
	positive	134 (88.7)	244 (79.0)		271 (85.8)	107 (74.3)	
mTOR	negative	48 (27.0)	96 (27.2)	0.955	89 (24.4)	55 (33.1)	0.036
	positive	130 (73.0)	257 (72.8)		276 (75.6)	111 (66.9)	
p-AKT473	either cyto or nuclei positive	127 (73.8)	227 (64.7)	0.035	263 (73.7)	91 (54.8)	<0.001
	negative	45 (26.2)	124 (35.3)		94 (26.3)	75 (45.2)	
PTEN	int 0-1 Loss	151 (88.3)	321 (92.8)	0.090	320 (89.6)	152 (95.0)	0.045
	int 2-3 No loss	20 (11.7)	25 (7.2)		37 (10.4)	8 (5.0)	
RB	absent	62 (35.8)	138 (40.5)	0.309	118 (33.9)	82 (49.4)	0.001
	positive	111 (64.2)	203 (59.5)		230 (66.1)	84 (50.6)	
TOPOIIa	negative	80 (44.4)	185 (53.3)	0.053	168 (45.8)	97 (60.6)	0.002
	positive	100 (55.6)	162 (46.7)		199 (54.2)	63 (39.4)	
p16 cytoplasmic	high	30 (17.5)	47 (13.9)	0.285	60 (17.7)	17 (10.1)	0.024
	low	141 (82.5)	290 (86.1)		279 (82.3)	152 (89.9)	

Υψηλή έκφραση FKBP5, χρησιμοποιώντας H score 150 και 65 σαν cut off, σχετίζεται με θετική έκφραση mTOR (  $p=0.016$  και  $p=0.013$  ), pAKT-473 (  $p<0.001$  και  $p=0.008$  ) και RB (  $p<0.001$  και  $p=0.005$  ). Με το cut off στο 85, θετικότητα στο FKBP5 σχετίζεται με θετική έκφραση pAKT-473 (  $p=0.002$  ) και χαμηλή έκφραση FKBP5 σχετίζεται με χαμηλή έκφραση p53 (  $p=0.002$  )(Πίνακας 8).

ΠΙΝΑΚΑΣ 8

Parameter	Categories	FKBP5 H score (cut-off at 150)			FKBP5 (cut-off at 65)			FKBP5 (cut-off at 85)		
		High	Low	P-value	High	Low	P-value	High	Low	P-value
AR	negative	23 (10.5)	58 (25.0)	<0.001	58 (15.8)	23 (27.1)	0.015	41 (16.2)	40 (20.1)	0.284
	positive	197 (89.5)	174 (75.0)		309 (84.2)	62 (72.9)		212 (83.8)	159 (79.9)	
mTOR	negative	54 (21.7)	85 (31.0)	0.016	102 (24.2)	37 (36.3)	0.013	67 (23.9)	72 (29.6)	0.141
	positive	195 (78.3)	189 (69.0)		319 (75.8)	65 (63.7)		213 (76.1)	171 (70.4)	
p-AKT473	either cyto or nuclei positive	185 (75.2)	165 (60.7)	<0.001	293 (70.3)	57 (56.4)	0.008	204 (73.6)	146 (60.6)	0.002
	negative	61 (24.8)	107 (39.3)		124 (29.7)	44 (43.6)		73 (26.4)	95 (39.4)	
RB	absent	77 (31.2)	125 (48.4)	<0.001	152 (37.1)	50 (52.6)	0.005	98 (36.3)	104 (44.3)	0.069
	positive	170 (68.8)	133 (51.6)		258 (62.9)	45 (47.4)		172 (63.7)	131 (55.7)	
p53	low	126 (51.4)	156 (58.9)	0.091	226 (54.6)	56 (58.3)	0.506	139 (50.5)	143 (60.9)	0.020
	high	119 (48.6)	109 (41.1)		188 (45.4)	40 (41.7)		136 (49.5)	92 (39.1)	
pRb	low	112 (46.1)	129 (53.1)	0.123	190 (47.3)	51 (60.7)	0.025	122 (45.9)	119 (54.1)	0.071
	high	131 (53.9)	114 (46.9)		212 (52.7)	33 (39.3)		144 (54.1)	101 (45.9)	

Θετική έκφραση του AR σχετίζεται με υψηλή έκφραση FKBP5, χρησιμοποιώντας το H score 150 σαν cut off και 60 σαν cut off, ( $p < 0.001$  και  $p = 0.0015$ ), χαμηλή έκφραση TMPRSS2 ( H score 100 cut off ) ( $p = 0.010$ ) και υψηλή έκφραση TMPRSS2 με cut off 80 ( $p = 0.003$ ) ( Πίνακας 9)

ΠΙΝΑΚΑΣ 9

	FKBP5 (cut-off at 65)	FKBP5 (cut-off at 85)	TMPRSS2 (cut-off at 80)	PSA (cut-off at 15)	AR/X ratio (cut-off at median)	FKBP5 H score (cut-off at 150)	PSA H score (cut-off at 50)	TMPRSS2 H score (cut-off at 100)
FKBP5 (cut-off at 65)	1	0.52308	0.14642	-0.15519	0.07286	0.47373	0.16023	0.10077
		<.0001	0.0007	0.3031	0.1979	<.0001	0.2875	0.0206
FKBP5 (cut-off at 85)	0.52308	1	0.23810	-0.06999	0.06470	0.69300	0.28000	0.12693
	<.0001		<.0001	0.6440	0.2530	<.0001	0.0595	0.0035
TMPRSS2 (cut-off at 80)	0.14642	0.23810	1	-0.06203	0.12635	0.20158	0.06087	0.35721
	0.0007	<.0001		0.6787	0.0245	<.0001	0.6844	<.0001
	528	528	573	47	317	528	47	573
PSA (cut-off at 15)	-0.15519	-0.06999	-0.06203	1	-0.18898	-0.11754	0.46188	0.06777
	0.3031	0.6440	0.6787		0.3451	0.4366	0.0002	0.6508
AR/X ratio (cut-off at median)	0.07286	0.06470	0.12635	-0.18898	1	0.05483	-0.05547	-0.03536
	0.1979	0.2530	0.0245	0.3451		0.3329	0.7835	0.5304
FKBP5 H score (cut-off at 150)	0.47373	0.69300	0.20158	-0.11754	0.05483	1	0.29295	0.19978
	<.0001	<.0001	<.0001	0.4366	0.3329		0.0482	<.0001
PSA H score (cut-off at 50)	0.16023	0.28000	0.06087	0.46188	-0.05547	0.29295	1	0.20029
	0.2875	0.0595	0.6844	0.0002	0.7835	0.0482		0.1771
TMPRSS2 H score (cut-off at 100)	0.10077	0.12693	0.35721	0.06777	-0.03536	0.19978	0.20029	1
	0.0206	0.0035	<.0001	0.6508	0.5304	<.0001	0.1771	

Τέλος υψηλή κυτταροπλασματική έκφραση PSA ( χρησιμοποιώντας 15 σαν cut off σχετίζεται με μέγεθος όγκου μικρότερο από 2 εκ (  $p=0.014$ )( Πίνακας 10)

ΠΙΝΑΚΑΣ 10

Parameter	Categories	PSA H score (cut-off at 50)			PSA (cut-off at 15)		
		High	Low	P-value	High	Low	P-value
ΜΕΓΕΘΟΣ ΟΓΚΟΥ	≤2	2 (25.0)	15 (29.4)	0.798	3 (12.0)	14 (41.2)	0.014
	>2	6 (75.0)	36 (70.6)		22 (88.0)	20 (58.8)	

## 2.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

Σχετικά με το DFS, στην μονοπαραγοντική ανάλυση, υψηλή πυρηνική έκφραση του FKb5S ( cut off 150 H score ) συσχετίζεται με χαμηλό ρίσκο προόδου νόσου ( HR=0.66,

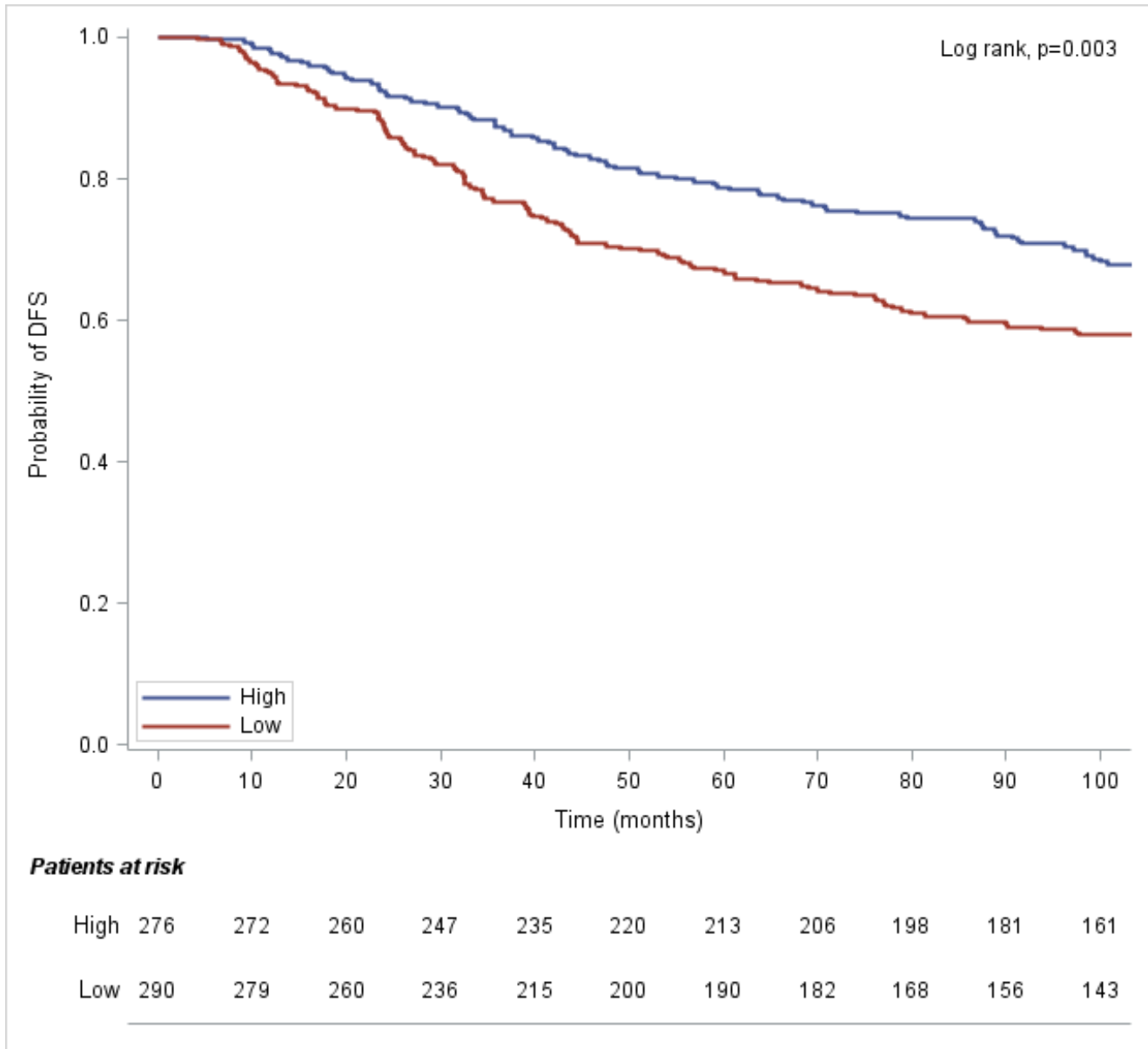


95% CI 0.50-0.87,  $p=0.003$  ) ενώ μια τάση προς χαμηλό κίνδυνο προόδου παρατηρήθηκε με υψηλή κυτταροπλασματική έκφραση PSA ( cut off H score 50, HR=2.30, 95% CI 0.86-6.18,  $p=0.099$ ). Επιπλέον, υψηλή πυρηνική έκφραση του FKBP5 ( cut off H score 50 ) είχε τάση προς μειωμένο κίνδυνο προόδου νόσου ( HR=0.74, 95% CI 0.54 – 1.03,  $p=0.072$ ).

**Cox ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΟ DFS**

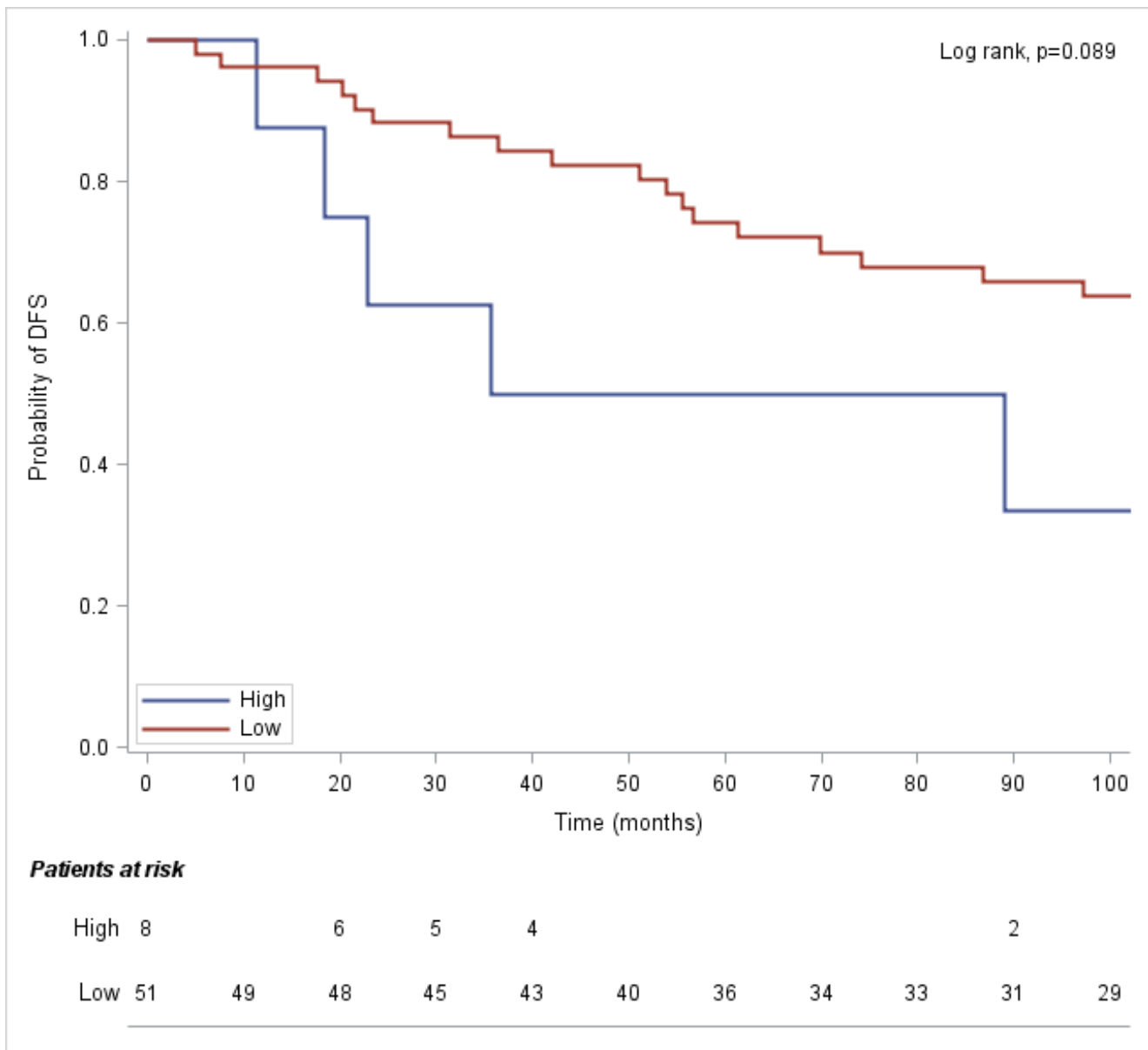
Parameter	Category vs. the reference	N patients	N events	HR	95% CI	Wald's p
AR/X ratio (cut-off at median)	High vs. Low	9 vs. 349	3 vs. 126	0.97	0.31-3.06	0.96
FKBP5 (cut-off at 65)	High vs. Low	458 vs. 108	165 vs. 47	0.74	0.54-1.03	0.072
FKBP5 (cut-off at 85)	High vs. Low	304 vs. 262	109 vs. 103	0.87	0.66-1.13	0.29
FKBP5 H score (cut-off at 150)	High vs. Low	276 vs. 290	88 vs. 124	0.66	0.50-0.87	0.003
PSA H score (cut-off at 50)	High vs. Low	8 vs. 51	5 vs. 19	2.30	0.86-6.18	0.099
PSA (cut-off at 15)	High vs. Low	25 vs. 34	12 vs. 12	1.48	0.67-3.31	0.33
TMPRSS2 H score (cut-off at 100)	High vs. Low	199 vs. 374	72 vs. 140	0.95	0.71-1.26	0.70
TMPRSS2 (cut-off at 80)	High vs. Low	394 vs. 179	145 vs. 67	0.92	0.69-1.23	0.58

Καπλαν-Meier ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΠΥΡΗΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ FKBP5 (H score 150 cut off) ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΟ DFS.

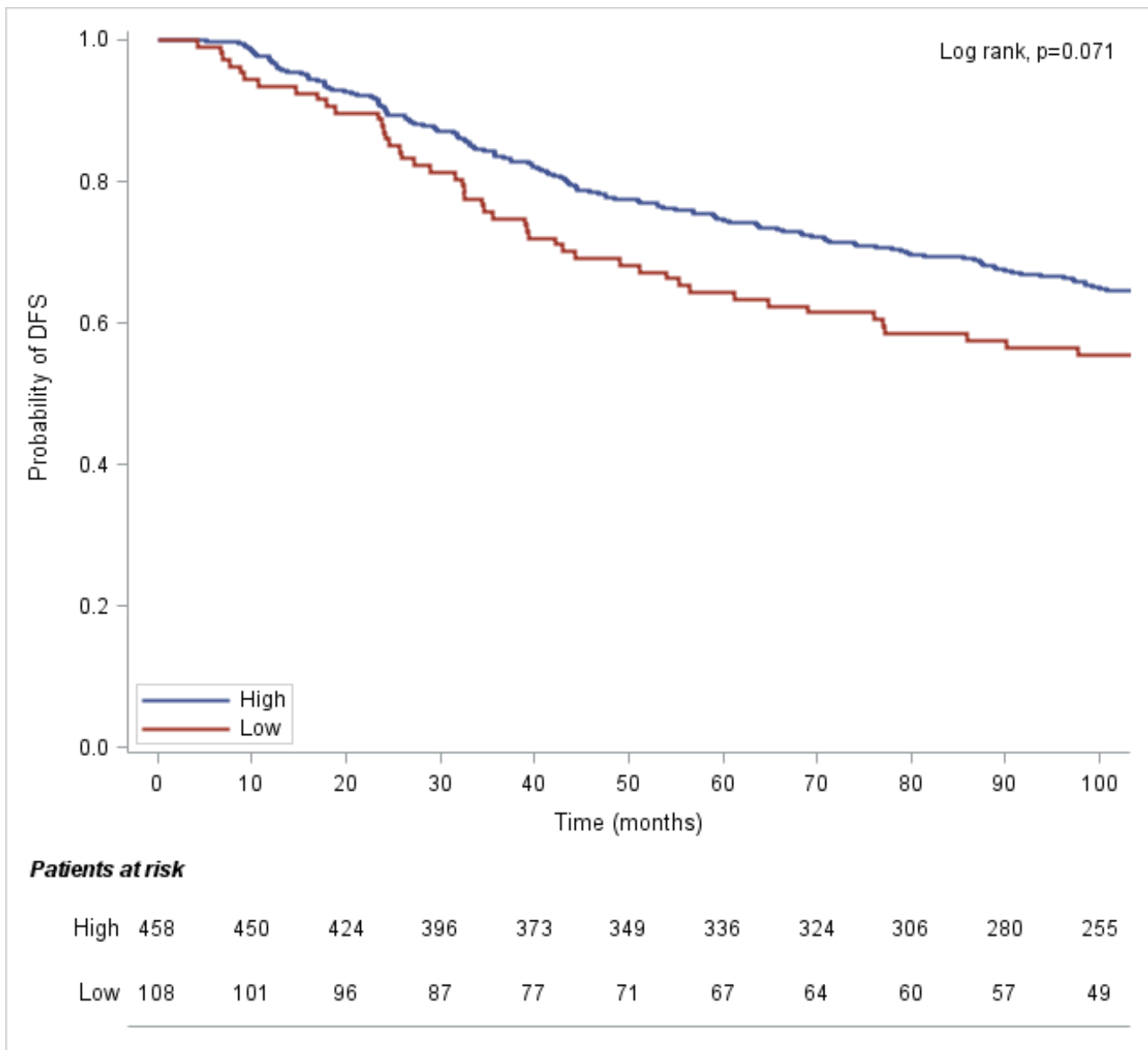


Καπλαν-Meier ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ PSA (H score 50 cut off ) ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΟ DFS





Καπλαν-Μεϊερ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΠΥΡΗΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ FKBP5 (65 cut off) ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΟ DFS.



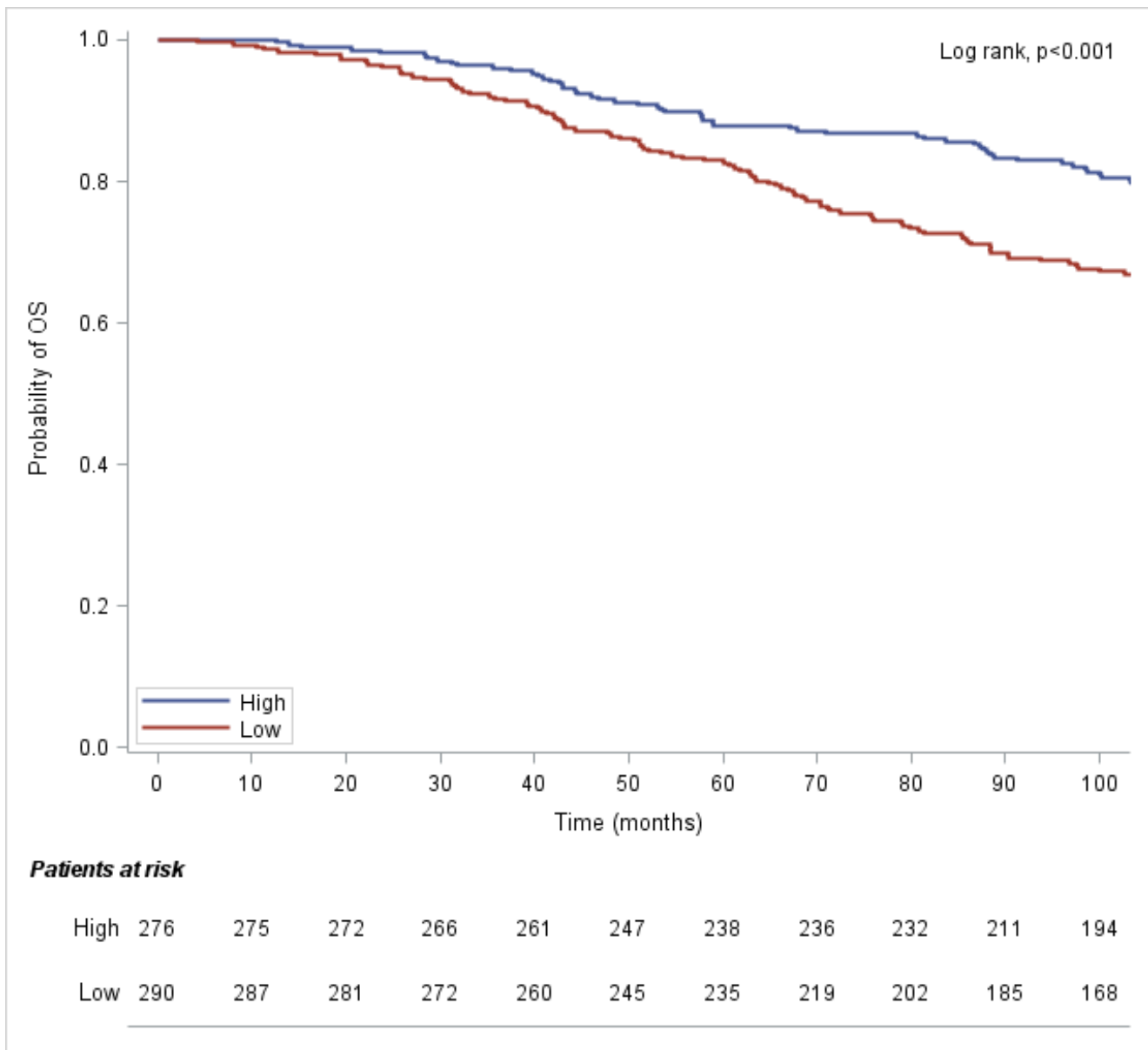
Αναφορικά με την επιβίωση, στην μονοπαραγοντική ανάλυση, υψηλή πυρηνική έκφραση του FK5S ( cut off 150 H score ), σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο θανάτου ( HR=0.57, 95% CI 0.42-0.78,  $p < 0.001$ ), ενώ τάση προς μειωμένο κίνδυνο θανάτου παρατηρήθηκε με έκφραση του FK5S στον πυρήνα με score 65 σαν cut off ( HR=0.73, 95% CI 0.51-1.05,

$p=0.088$ ) ενώ ίδια τάση παρατηρήθηκε με πυρηνική έκφραση και cut off στο 85 ( HR=0.77, 95 CI 0.57-1.05,  $p=0.094$ ).

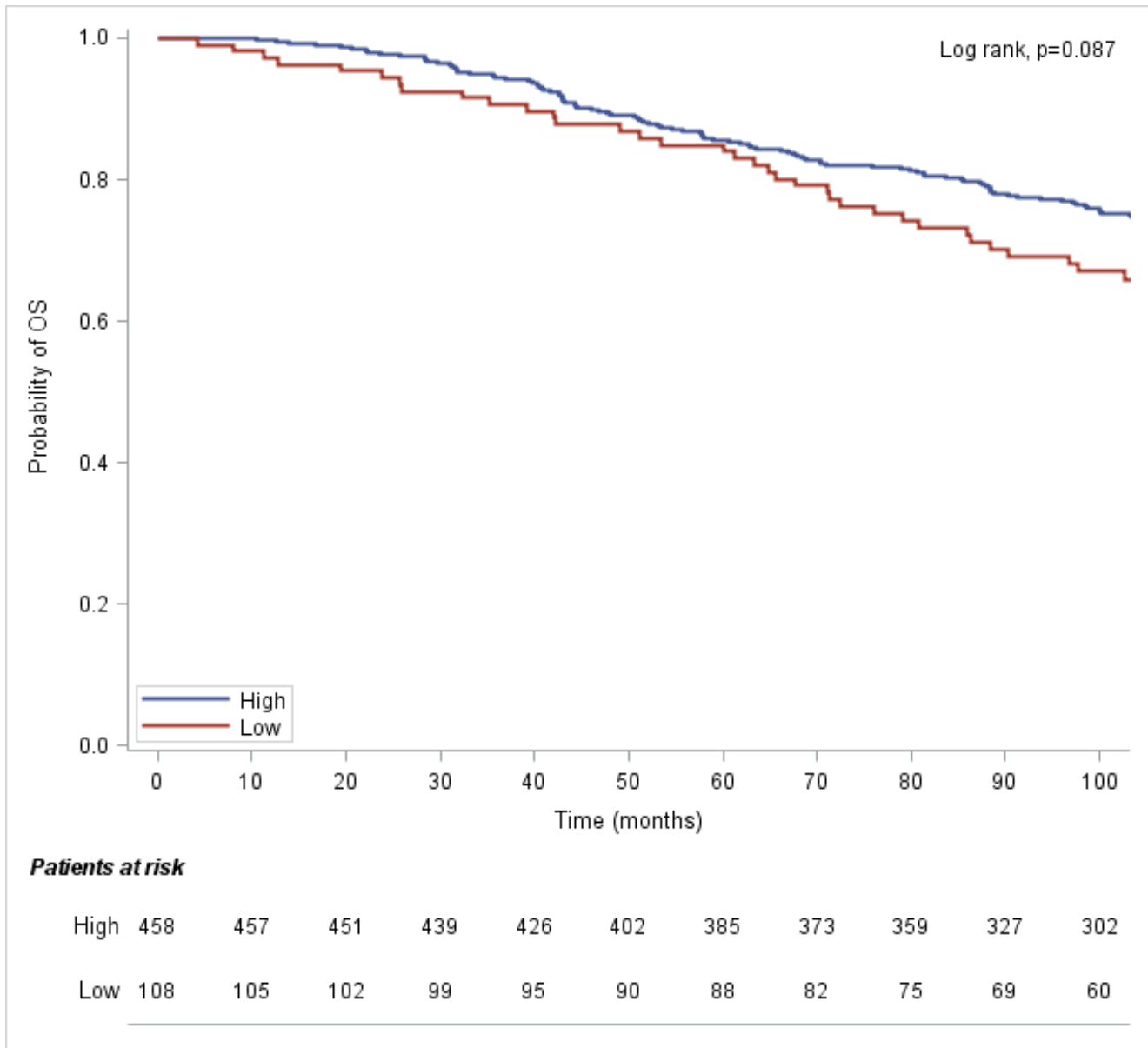
**Cox ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΟΛΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ**

Parameter	Category vs. the reference	N patients	N events	HR	95% CI	Wald's p
AR/X ratio (cut-off at median)	High vs. Low	9 vs. 349	2 vs. 101	0.69	0.17-2.79	0.60
FKBP5 (cut-off at 65)	High vs. Low	458 vs. 108	128 vs. 38	0.73	0.51-1.05	0.088
FKBP5 (cut-off at 85)	High vs. Low	304 vs. 262	81 vs. 85	0.77	0.57-1.05	0.094
FKBP5 H score (cut-off at 150)	High vs. Low	276 vs. 290	63 vs. 103	0.57	0.42-0.78	<0.001
PSA H score (cut-off at 50)	High vs. Low	8 vs. 51	4 vs. 17	1.63	0.55-4.85	0.38
PSA (cut-off at 15)	High vs. Low	25 vs. 34	11 vs. 10	1.75	0.74-4.17	0.20
TMPRSS2 H score (cut-off at 100)	High vs. Low	199 vs. 374	58 vs. 111	0.98	0.71-1.35	0.90
TMPRSS2 (cut-off at 80)	High vs. Low	394 vs. 179	113 vs. 56	0.87	0.63-1.20	0.40

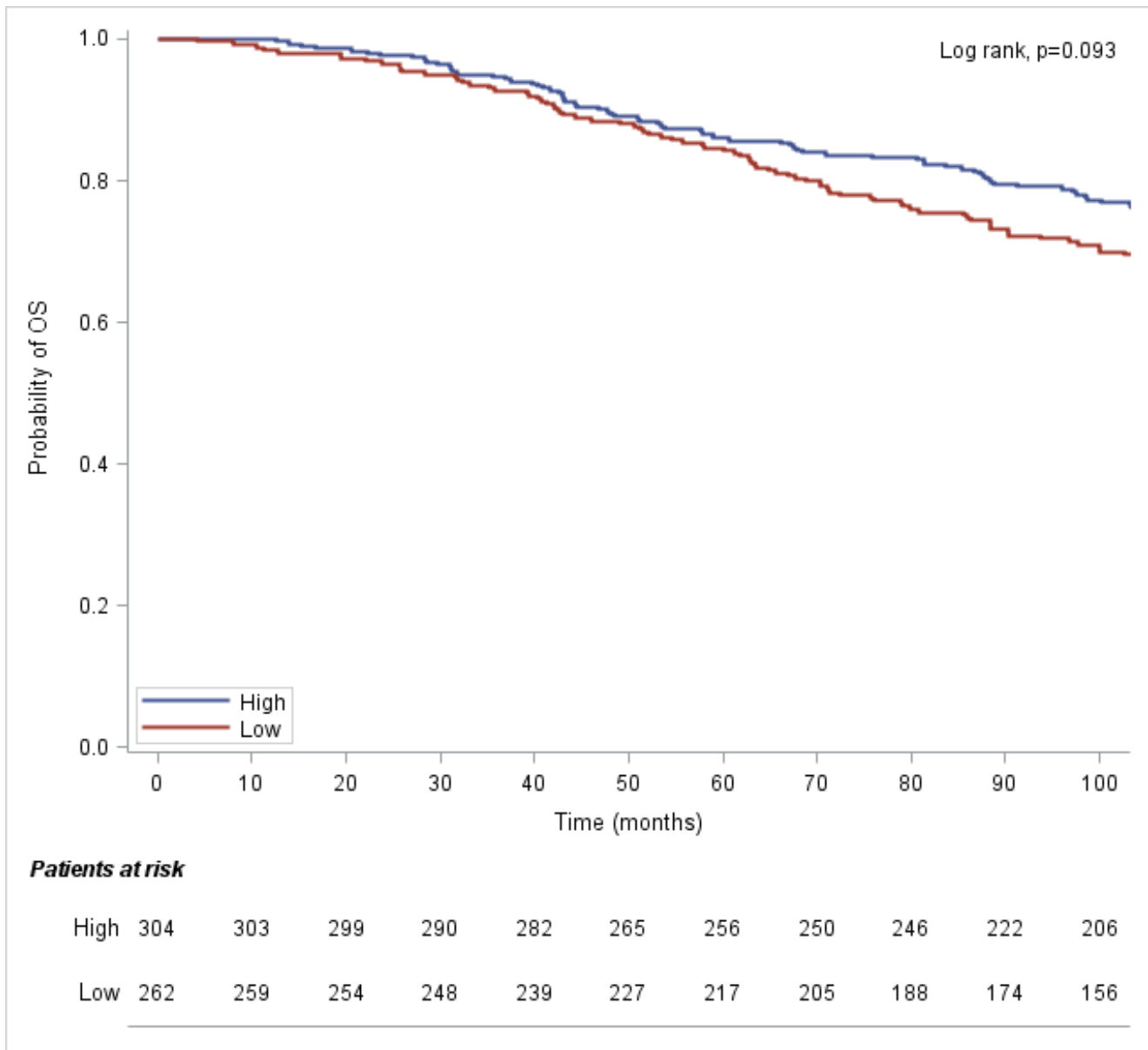
**Kaplan-Meier ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΠΥΡΗΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ FKBP5 (H score 150 cut off) ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΟΛΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ.**



**Καπλαν-Meier ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΠΥΡΗΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ FKBP5 (65 cut off) ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΟΛΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ.**



Καπλαν-Meier ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΠΥΡΗΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ FKBP5 (85 cut off) ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΟΛΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ.



Λαμβάνοντας υπ' όψιν την πολυπαραγοντική ανάλυση υψηλή πυρηνική έκφραση του FKBS ( cut off 150 H score) διατήρησε την προγνωστική αξία σε σχέση με το DFS ( HR=0.61, 95 % CI 0.44- 0.83, p=0.002) ενώ με cut off στο 65 δεν έδειξε καμία στατιστική σημαντικότητα ( p=0.24). Υψηλή πυρηνική έκφραση του FKBS ( cut off 150 H score) διατήρησε την προγνωστική του σημασία για την ολική επιβίωση ( HR=0.53, 95% CI 0.37- 0.75, p<0.001) ενώ με το cut off στο 65 και στο 85, δεν υπήρχε στατιστική σημαντικότητα στο πολυπαραγοντικό μοντέλο ανάπτυξης ( p=0.61 και p=0.15 αντίστοιχα ). Τέλος παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά την ολική επιβίωση με υψηλή κυτταροπλασματική έκφραση του PSA με cut off H score 50 ( HR=3.27, 95% CI 1.17 -9.16, p=0.024)

### Multivariate analyses for the significant markers adjusting for clinicopathological parameters.

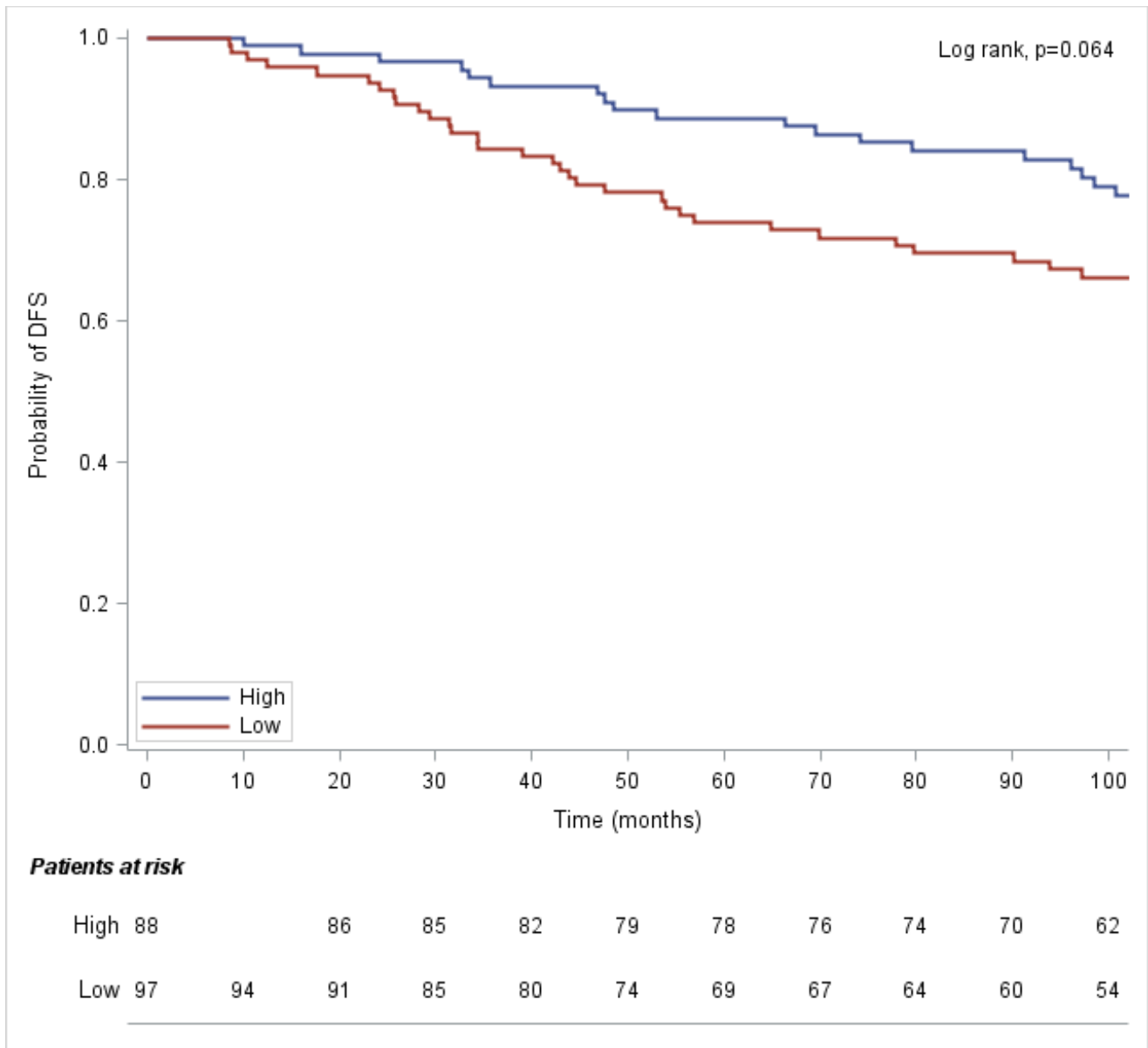
Parameter	Category vs. the reference	HR	95% CI	Wald's p
<b>1st model DFS</b>				
Nodal status	0-3 vs. >=4	0.473	0.31-0.60	<0.001
FKBP5 H score (cut-off at 150)	High vs. Low	0.61	0.44-0.83	0.002
<b>2nd model DFS</b>				
Nodal status	0-3 vs. >=4	0.25	0.08-0.75	0.014
PSA H score (cut-off at 50)	High vs. low	3.27	1.17-9.16	0.024
<b>1st model OS</b>				
Nodal status	0-3 vs. >=4	0.34	0.23-0.50	<0.001
FKBP5 H score (cut-off at 150)	High vs. Low	0.53	0.37-0.75	<0.001

Σε σχέση με την προβλεπτική σημασία, κανένας από τους υπό μελέτη δείκτες δεν είχαν προβλεπτικό όφελος αναφορικά με το DFS και το OS, από τη χρήση της ορμονοθεραπείας και ακτινοβολίας.

## 2.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ ΝΟΣΟΥ, ΟΛΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΥΠΟΤΥΠΩΝ

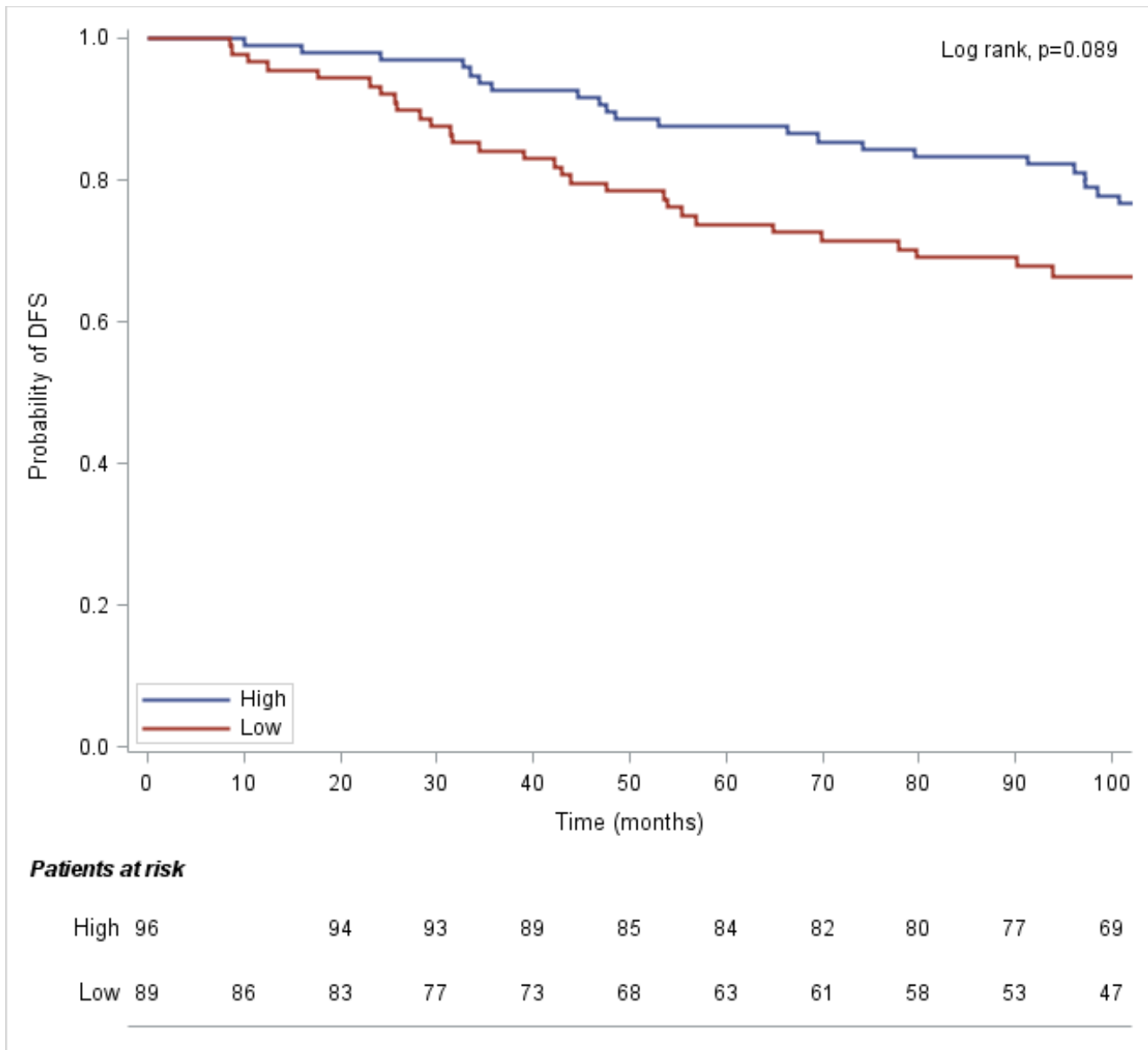
Για τους Luminal A όγκους, στην μονοπαραγοντική ανάλυση δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά την υψηλή πυρηνική έκφραση της FKBP5 και του DFS με cut off το 65 και 85 αντίστοιχα ενώ με το όριο H score 150 υπάρχει τάση προς στατιστική σημαντικότητα ( HR=0.59, 95% CI 0.34 – 1.04, p=0.067). Καμία συσχέτιση δεν αναδείχθηκε μεταξύ της κυτταροπλασματικής/μεβρανώδους έκφρασης της TMPRSS2H (cut off 100 και 80) και του DFS

Kaplan-Meier ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΠΥΡΗΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ FKBP5 (H score 150 cut off) ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΟ DFS ΣΤΟΥΣ LUMINAL A ΟΓΚΟΥΣ



Καπλαν-Meier ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΠΥΡΗΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ FKBP5 (85 cut off) ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΟ DFS ΣΤΟΥΣ LUMINAL A ΟΓΚΟΥΣ





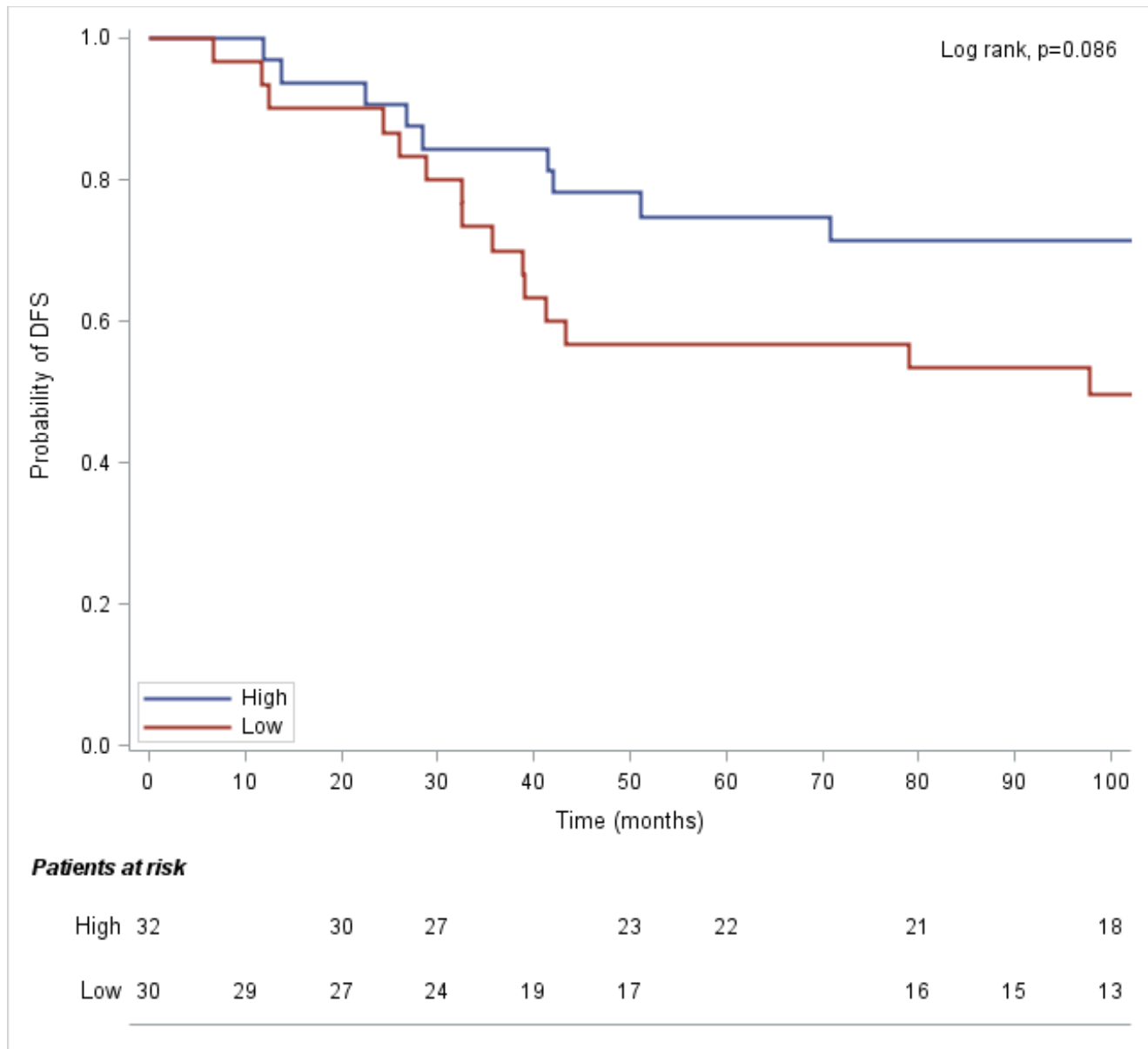
Parameter	Category vs. the reference	HR	95% CI	Wald's p
FKBP5 (cut-off at 65)	High vs. low	0.65	0.34- 1.24	0.19
FKBP5 (cut-off at 85)	High vs. low	0.62	0.36- 1.08	0.092
FKBP5 H score (cut-off at 150)	High vs. low	0.59	0.34- 1.04	0.067
TMPRSS2 H score (cut-off at 100)	High vs. low	0.86	0.47- 1.55	0.61
TMPRSS2 (cut-off at 80)	High vs. low	1.09	0.60- 2.00	0.77

Η μονοπαραγοντική ανάλυση για Luminal B όγκους και DFS δεν ανέδειξε καμία συσχέτιση για της ανωτέρω πρωτεΐνες χρησιμοποιώντας όλα τα υπό μελέτη cut off.

ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ DFS ΓΙΑ LUMINAL B ΟΓΚΟΥΣ				
Parameter	Category vs. the reference	HR	95% CI	Wald's p
FKBP5 (cut-off at 65)	High vs. low	0.94	0.51- 1.73	0.85
FKBP5 (cut-off at 85)	High vs. low	1.22	0.74- 2.00	0.44
FKBP5 H score (cut-off at 150)	High vs. low	0.71	0.43- 1.16	0.17
TMPRSS2 H score (cut-off at 100)	High vs. low	1.03	0.61- 1.74	0.92
TMPRSS2 (cut-off at 80)	High vs. low	1.05	0.61- 1.82	0.86

Στους Luminal HER2 όγκους υπήρξε τάση προς στατιστικά σημαντική διαφορά στο DFS με υψηλή πυρηνική έκφραση FKBP5 με το cut off H score 150 ( HR: 0.49, 95% CI 0.22-1.13,  $p=0.093$  ). Καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση δεν αναδείχθηκε με τα cut off 65 και 85 όπως επίσης και για την κυτταροπλασματική/ μεμβρανώδη έκφραση της πρωτεΐνης TMPRSS2 με το cut off score είτε 80 είτε H score 100.

**Καπλαν-Meier ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΠΥΡΗΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ FKBP5 (H score 150 cut off) ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΟ DFS ΣΤΟΥΣ LUMINAL HER2 ΟΓΚΟΥΣ**

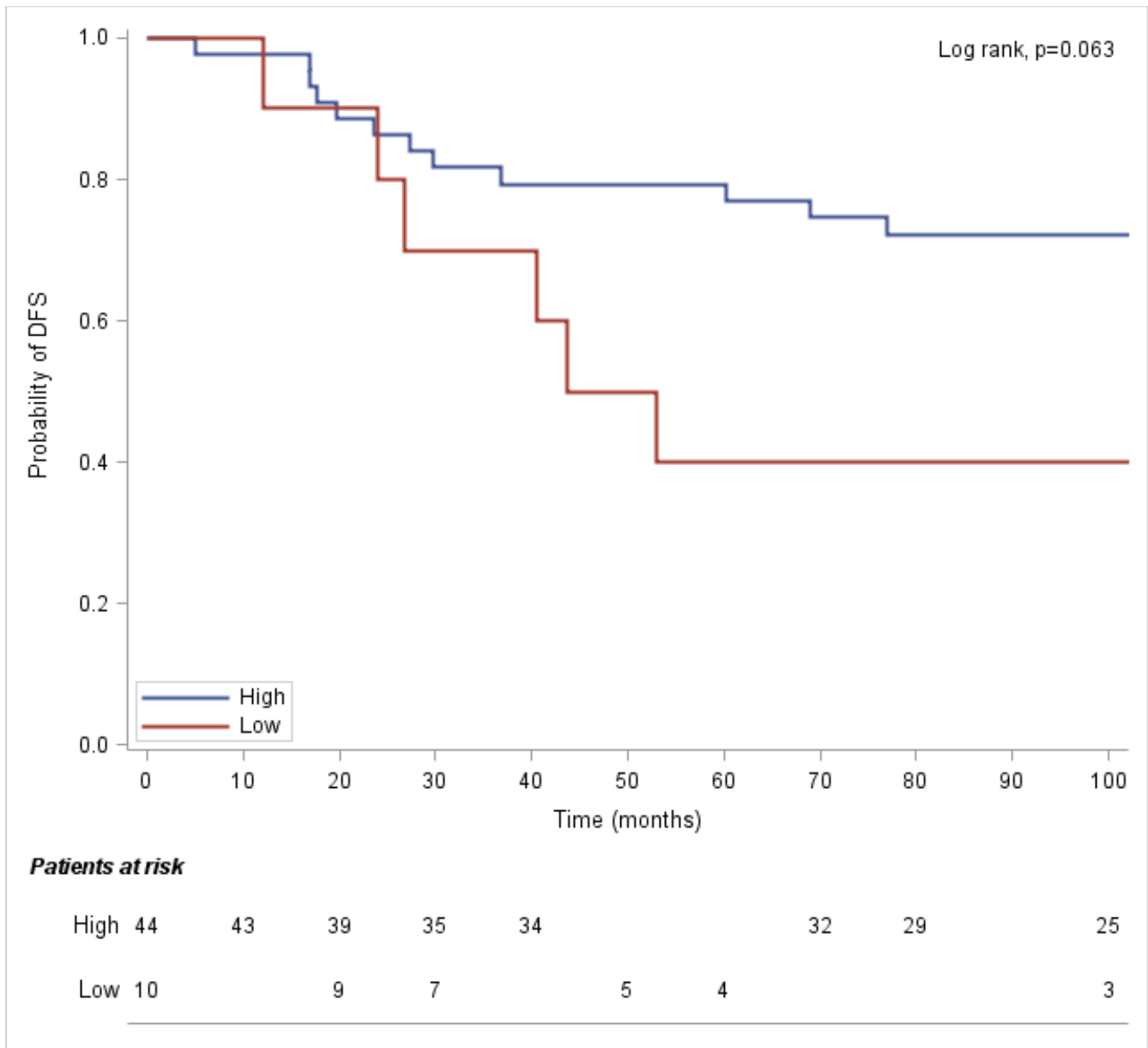


**ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ DFS ΓΙΑ LUMINAL HER2 ΟΓΚΟΥΣ**

Parameter	Category vs. the reference	HR	95% CI	Wald's p
-----------	----------------------------	----	--------	----------

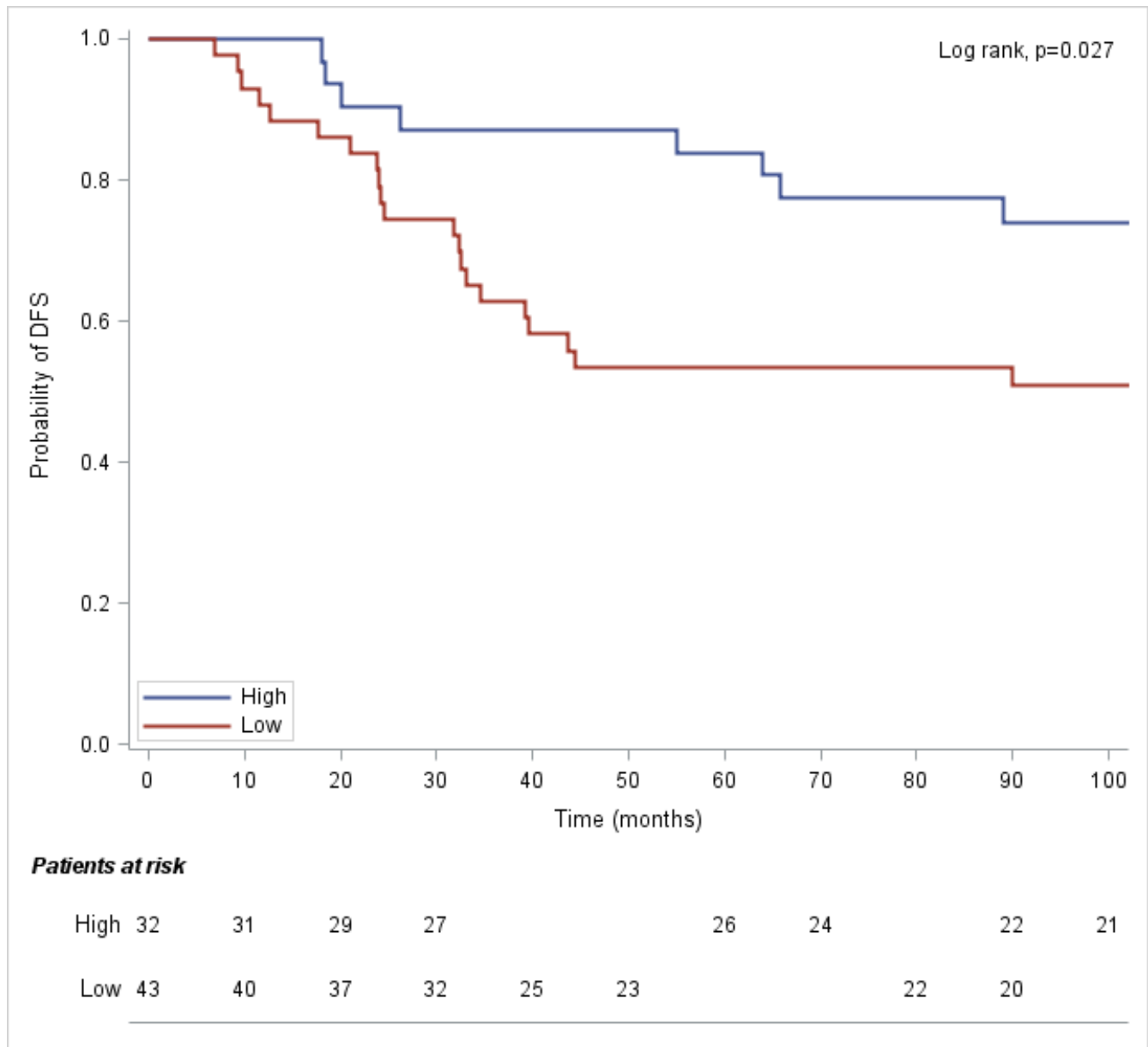
FKBP5 (cut-off at 65)	High vs. low	0.67	0.27- 1.70	0.40
FKBP5 (cut-off at 85)	High vs. low	0.69	0.31- 1.55	0.37
FKBP5 H score (cut-off at 150)	High vs. low	0.49	0.22- 1.13	0.093
TMPRSS2 H score (cut-off at 100)	High vs. low	0.89	0.35- 2.22	0.80
TMPRSS2 cut-off at 80)	High vs. low	0.80	0.36- 1.76	0.58

Στους HER2-enriched όγκους υπήρξε τάση προς στατιστικά σημαντική διαφορά στο DFS με υψηλή έκφραση TMPRSS2 και cut off 80 ( HR: 0.41, 95% CI 0.15 – 1.08, p=0.072 ) και στους TNBC όγκους παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο DFS με υψηλή πυρηνική έκφραση FKBP5 και cut off 85 ( HR:0.44, 95% CI 0.21 -0.9, p=0.025 ) και H score 150 ( HR:0.41, 95% CI 0.18 – 0.93, p=0.032 ). Για τις λοιπές πρωτεΐνες και για οποιαδήποτε έκφραση και οποιοδήποτε cut off καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση αναφορικά με το DFS δεν αναδείχθηκε.

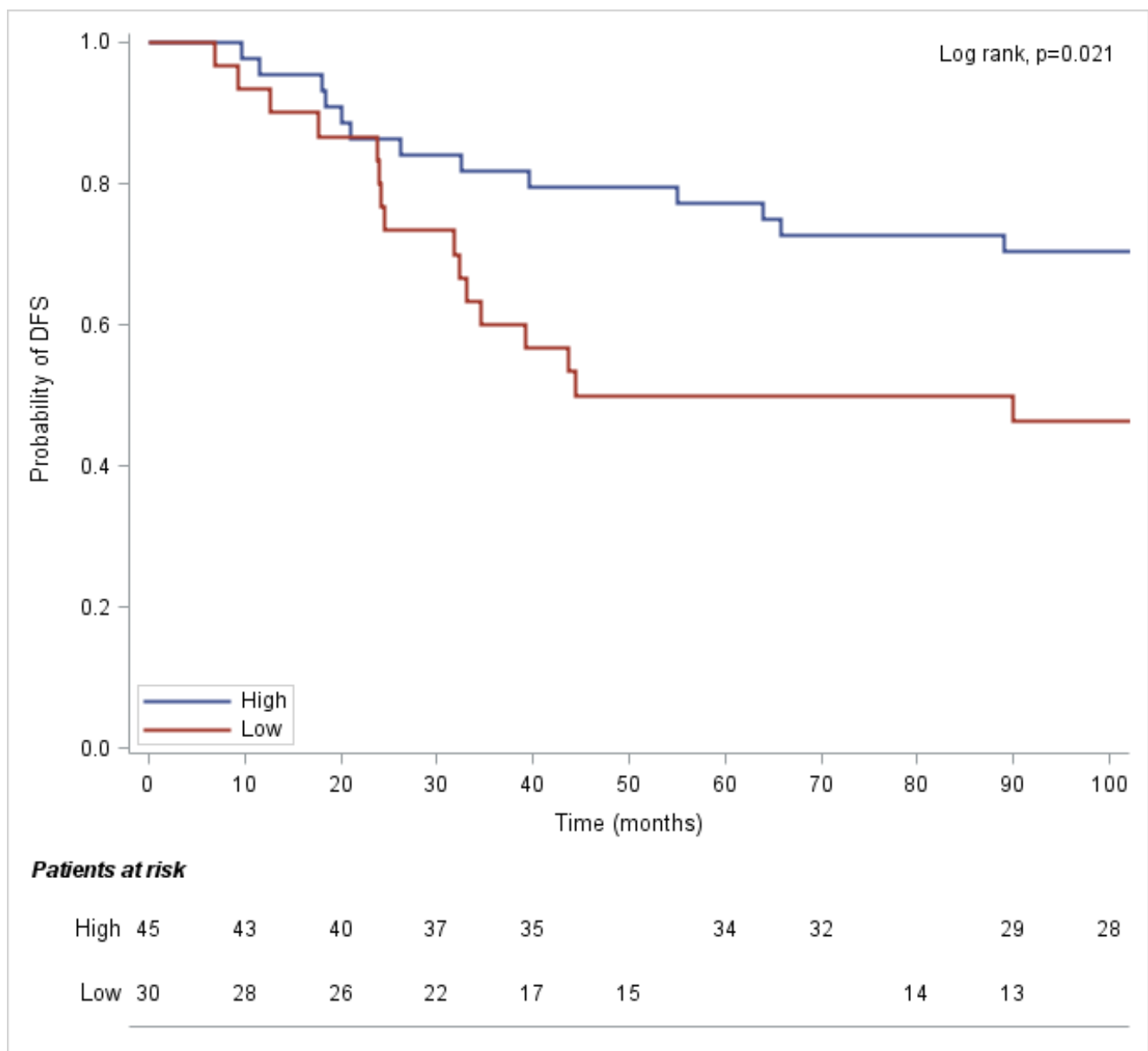


ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ DFS ΓΙΑ HER2 ENRICHED ΟΓΚΟΥΣ					
Parameter	Category vs. the reference	HR	95% CI	Wald's p	
FKBP5 (cut-off at 65)	High vs. low	0.86	0.28- 2.61	0.79	
FKBP5 (cut-off at 85)	High vs. low	1.38	0.54- 3.49	0.50	
FKBP5 H score (cut-off at 150)	High vs. low	0.93	0.37- 2.35	0.87	
TMPRSS2 H score (cut-off at 100)	High vs. low	0.55	0.20- 1.53	0.25	
TMPRSS2 (cut-off at 80)	High vs. low	0.41	0.15- 1.08	<b>0.072</b>	

Kaplan-Meier ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ FKBP5 (H score 150 cut off) ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΟ DFS ΣΤΟΥΣ ΤΝΒC ΟΓΚΟΥΣ



Καπλαν-Meier ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ FKBP5 (85 cut off) ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΟ DFS ΣΤΟΥΣ TNBC ΟΓΚΟΥΣ



<b>ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ DFS ΓΙΑ TNBC ΟΓΚΟΥΣ</b>				
<b>Parameter</b>	<b>Category vs. the reference</b>	<b>HR</b>	<b>95% CI</b>	<b>Wald's p</b>
FKBP5 (cut-off at 65)	High vs. low	0.67	0.29- 1.57	0.36
FKBP5 (cut-off at 85)	High vs. low	0.44	0.21- 0.90	0.025
FKBP5 H score (cut-off at 150)	High vs. low	0.41	0.18- 0.93	0.032
TMPRSS2 H score (cut-off at 100)	High vs. low	1.25	0.61- 2.55	0.54
TMPRSS2 ( cut-off at 80)	High vs. low	0.88	0.42- 1.84	0.74

Αναφορικά με την ολική επιβίωση στην μονοπαραγοντική ανάλυση τα αποτελέσματα ήταν τα ακόλουθα.

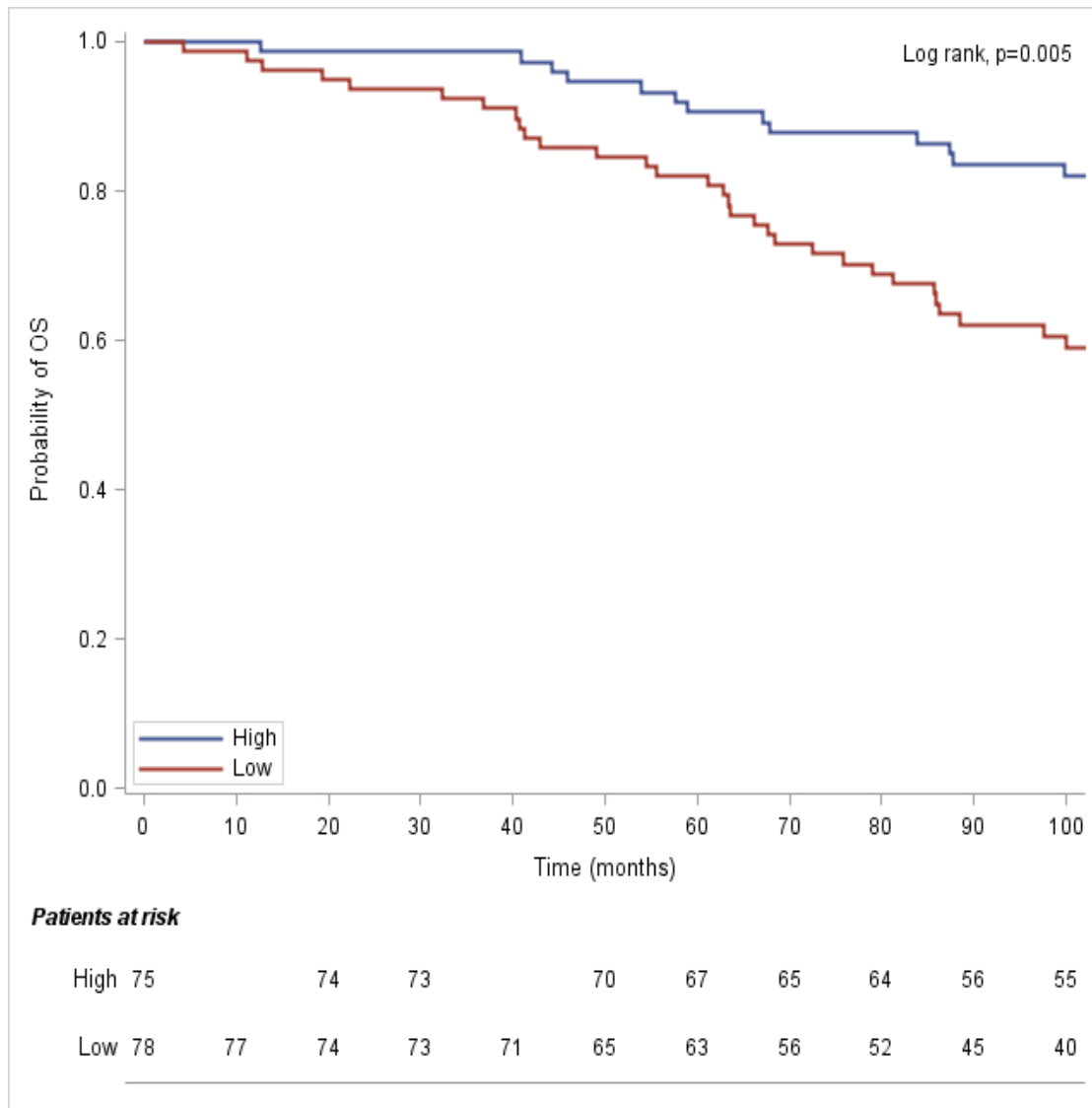
Για τους Luminal A όγκους και για τους TNBC καμία στατιστικά σημαντική διάφορα δε βρέθηκε στην OS ανεξαρτήτως υψηλής ή χαμηλής έκφρασης πρωτεϊνών FKBP5 και TMPRSS2 για όλα τα cut off στην μονοπαραγοντική ανάλυση.

<b>ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΥΣ LUMINAL A ΟΓΚΟΥΣ</b>				
<b>Parameter</b>	<b>Category vs. the reference</b>	<b>HR</b>	<b>95% CI</b>	<b>Wald's p</b>
FKBP5 (cut-off at 65)	High vs. low	0.75	0.34- 1.64	0.47
FKBP5 (cut-off at 85)	High vs. low	0.63	0.33- 1.21	0.17
FKBP5 H score (cut-off at 150)	High vs. low	0.61	0.31- 1.18	0.14
TMPRSS2 H score (cut-off at 100)	High vs. low	0.60	0.29- 1.28	0.19
TMPRSS2 ( cut-off at 80)	High vs. low	1.11	0.55- 2.25	0.77



Στους Luminal B η μονοπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ολική επιβίωση και πυρηνική έκφραση της πρωτεΐνης FKBP5 H score 150 ( HR:0.44, 95% CI 0.24 – 0.80,  $p= 0.007$  ) και για καμία άλλη πρωτεΐνη.

**Kaplan-Meier ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ FKBP5 (H score 150 cut off)  
ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΟ ΟΣ ΣΤΟΥΣ LUMINAL B ΟΓΚΟΥΣ**

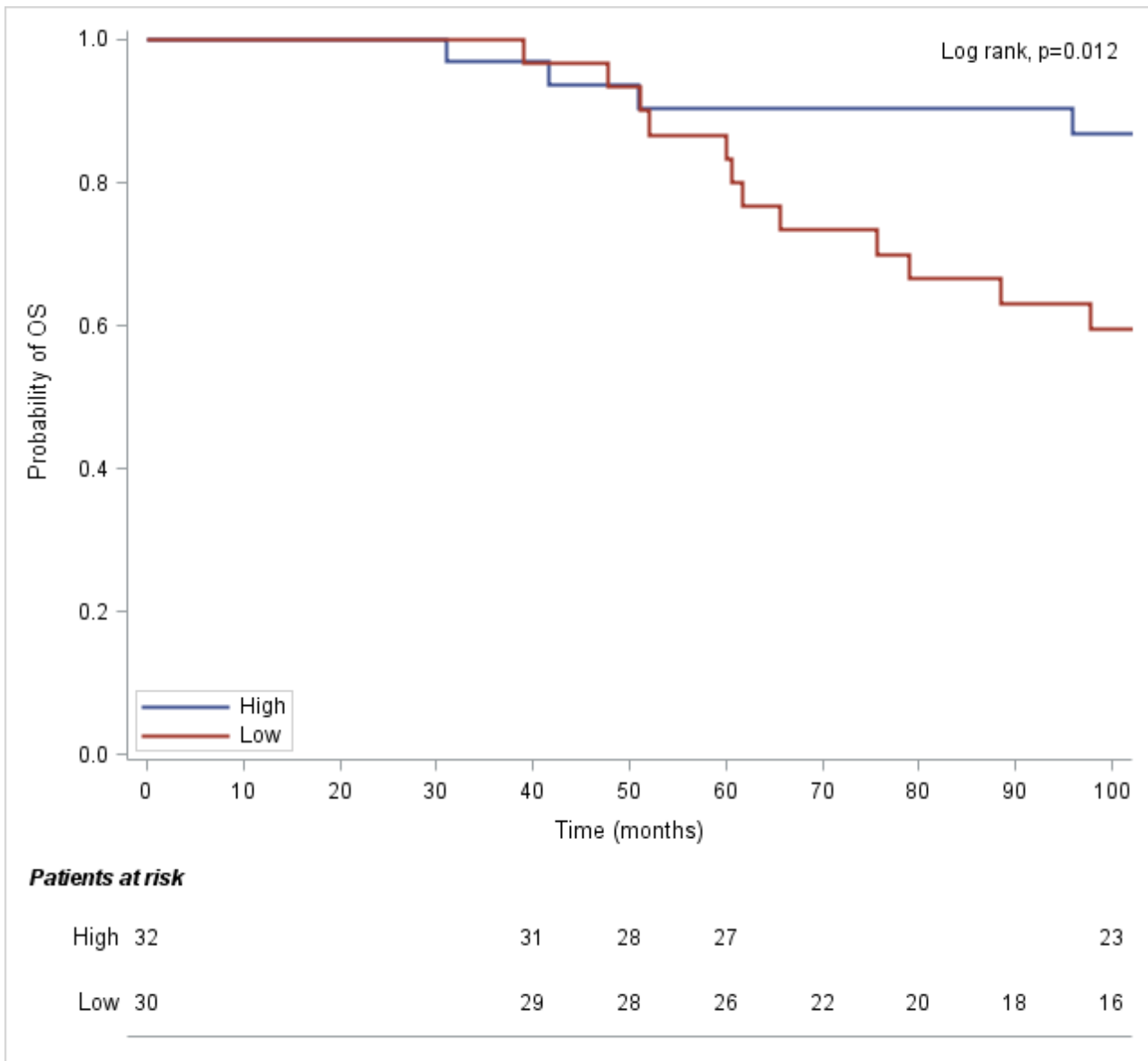

**ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΥΣ LUMINAL B ΟΓΚΟΥΣ**

Parameter	Category	HR	95% CI	Wald's p
-----------	----------	----	--------	-------------

FKBP5 (cut-off at 65)	High vs. low	0.61	0.32- 1.15	0.13
FKBP5 (cut-off at 85)	High vs. low	0.73	0.41- 1.29	0.28
FKBP5 H score (cut-off at 150)	High vs. low	0.44	0.24- 0.80	0.007
TMPRSS2 H score (cut-off at 100)	High vs. low	0.94	0.52- 1.71	0.84
TMPRSS2 ( cut-off at 80)	High vs. low	0.84	0.46- 1.53	0.56

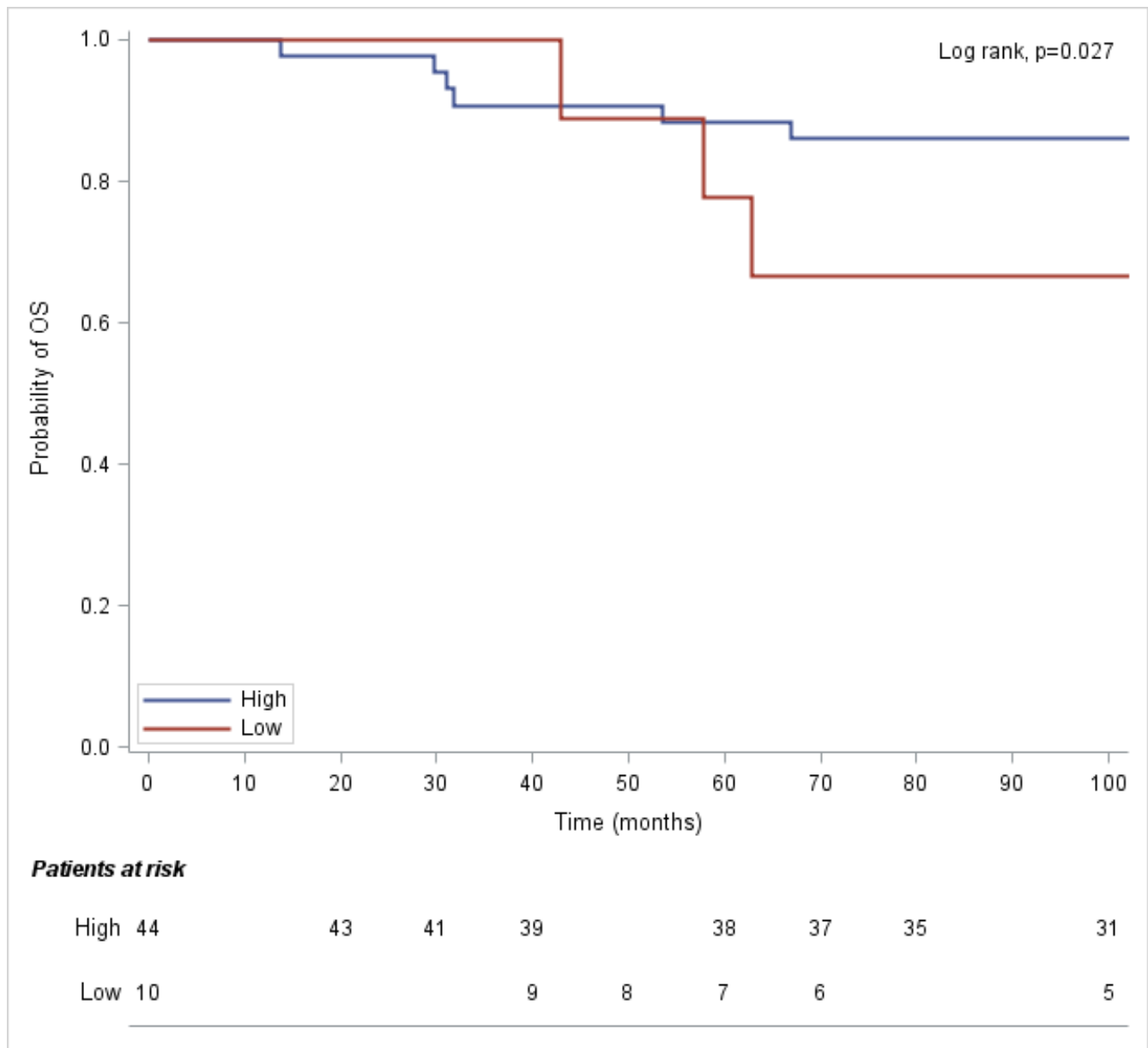
Η μονοπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ολική επιβίωση στους Luminal HER2 που έχουν υψηλή πυρηνική έκφραση της FKBP5 με H score 150 ( HR:0.31, 95% CI 0.12-0.81,  $p=0.017$ ) και στους HER2 enriched όγκους με κυτταροπλασματική/μεμβρανώδη έκφραση TMPRSS2 και cut off 80 ( HR:0.3, 95% CI 0.1-0.93,  $p=0.037$  ).

**Kaplan-Meier ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ FKBP5 (H score 150 cut off) ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΟ ΟΣ ΣΤΟΥΣ LUMINAL HER2 ΟΓΚΟΥΣ**



<b>ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΥΣ LUMINAL HER2 ΟΓΚΟΥΣ</b>				
<b>Parameter</b>	<b>Category vs. the reference</b>	<b>HR</b>	<b>95% CI</b>	<b>Wald's p</b>
FKBP5 (cut-off at 65)	High vs. low	0.59	0.23- 1.52	0.27
FKBP5 (cut-off at 85)	High vs. low	0.52	0.22- 1.23	0.14
FKBP5 H score (cut-off at 150)	High vs. low	0.31	0.12- 0.81	<b>0.017</b>
TMPRSS2 H score (cut-off at 100)	High vs. low	1.21	0.47- 3.10	0.69
TMPRSS2 ( cut-off at 80)	High vs. low	0.73	0.31- 1.70	0.47

Κα Kaplan-Meier ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ TMPRSS2 (80 cut off) ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΟ OS ΣΤΟΥΣ HER2 ENRICHED ΟΓΚΟΥΣ



Parameter	Category vs. the reference	HR	95% CI	Wald's p
FKBP5 (cut-off at 65)	High vs. low	1.24	0.27-5.62	0.78
FKBP5 (cut-off at 85)	High vs. low	1.15	0.39-3.45	0.80
FKBP5 H score (cut-off at 150)	High vs. low	0.68	0.22-2.10	0.51
TMPRSS2 H score (cut-off at 100)	High vs. low	0.71	0.22-2.26	0.56
TMPRSS2 ( cut-off at 80)	High vs. low	0.30	0.10-0.93	0.037

Στην πολυπαραγοντική ανάλυση αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά του DFS για τους Luminal A όγκους με υψηλή πυρηνική έκφραση FKBP5 με cut off H score 150 ( HR:0.56, 95% CI 0.32 -0.49, p=0.045 ) και για τους TNBC με υψηλή πυρηνική έκφραση FKBP5 με cut off H score 150 ( HR:0.45, 95% CI 0.2 -1.01, p=0.052) και cut off 85 ( HR:0.44, 95% CI 0.22 – 0.92, p=0.028 ).

ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ DFS ΣΤΟΥΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥΣ ΥΠΟΤΥΠΟΥΣ.				
Parameter	Category vs. the reference	HR	95% CI	Wald's p
<i>DFS-Luminal A tumors</i>				
Nodal status	0-3 vs. >=4	0.38	0.21-	<0.001

FKBP5 (cut-off at 85)	High vs. Low	0.61	0.67 0.35- 1.06	0.078
<b>I DFS-Luminal A tumors</b>				
Nodal status	0-3 vs. >=4	0.37	0.21- 0.65	<0.001
FKBP5 H score (cut-off at 150)	High vs. Low	0.56	0.32- 0.99	0.045
<b>DFS-Luminal HER2 tumors</b>				
Nodal status	0-3 vs. >=4	0.23	0.09- 0.59	0.002
FKBP5 H score (cut-off at 150)	High vs. Low	0.47	0.20- 1.07	0.071
<b>DFS-HER2 enriched tumors</b>				
TMPRSS2 (cut-off at 80)	High vs. Low	0.41	0.16- 1.08	0.072
<b>DFS-TNBC tumors</b>				
Nodal status	0-3 vs. >=4	0.26	0.10- 0.63	0.003
FKBP5 H score (cut-off at 150)	High vs. Low	0.45	0.20- 1.01	0.052
<b>DFS-TNBC tumors</b>				
Nodal status	0-3 vs. >=4	0.25	0.10- 0.61	0.002
FKBP5 (cut-off at 85)	High vs. Low	0.44	0.22- 0.92	0.028

Στην ίδια ανάλυση στατιστική διαφορά της ολικής επιβίωσης παρουσιάστηκε στους Luminal B όγκους με υψηλή πυρηνική έκφραση FKBP5 H score 150 ( HR:0.44, 95% CI 0.24-0.80, p=0.007), στους Luminal HER2 όγκους και πυρηνική έκφραση FKBP5 H score 150 ( HR:0.32, 95% CI 0.13-0.84,p=0.02 ) και HER2 enriched όγκους με κυτταροπλασματική/μεμβρανώδη έκφραση TMPRSS2 και cut off 80 ( HR:0.3, 95% CI 0.1-0.93,p=0.037 ).

**ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ OS ΣΤΟΥΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥΣ ΥΠΟΤΥΠΟΥΣ.**

Parameter	Category vs. the reference	HR	95% CI	Wald's p
<b>OS-Luminal B tumors</b>				



Nodal status	0-3 vs. $\geq 4$	0.40	0.21-0.77	0.006
FKBP5 H score (cut-off at 150)	High vs. Low	0.44	0.24-0.80	0.007
<b><i>OS-Luminal HER2 tumors</i></b>				
Nodal status	0-3 vs. $\geq 4$	0.17	0.06-0.52	0.002
FKBP5 H score (cut-off at 150)	High vs. Low	0.32	0.13-0.84	0.020
<b><i>OS-HER2 enriched tumors</i></b>				
TMPRSS2 (cut-off at 80)	High vs. Low	0.30	0.10-0.93	0.037

### 3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 3.1 TMPRSS2

Συνοψίζοντας η έκφραση της πρωτεΐνης TMPRSS2 με το cut off στο 80 στην μονοπαραγοντική ανάλυση σχετίζεται με τάση προς όφελος στο διάστημα ελεύθερο επιβίωσης (  $p=0.072$ , HR: 0.41, 95% CI: 0.15 – 1.08 ) και όφελος στην ολική επιβίωση (  $p= 0.037$ , HR: 0.3, 95% CI: 0.1 -0.93 ) στους HER2 enriched ογκούς. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση βλέπουμε ότι επιβεβαιώνεται το όφελος στην ολική επιβίωση (  $p= 0.037$ , HR: 0.3, 95% CI: 0.1-0.93 ) στους όγκους αυτούς.

Η πρωτεΐνη TMPRSS2 εκφράζεται κατά κανόνα αρκετές φορές υψηλότερα στον προστάτη σε σχέση με οποιονδήποτε άλλο ανθρώπινο ιστό, αν και η κανονική φυσιολογική λειτουργία παραμένει άγνωστη, και η μεταγραφή του ρυθμίζεται από τον AR. Αυτό το χαρακτηριστικό έχει υποθεθεί ότι συμβάλλει στην υψηλή συχνότητα γονιδιακών αναδιατάξεων που εμπλέκουν τον προαγωγό TMPRSS2 και μέλη της οικογένειας γονιδίων ETS, ιδιαίτερα της ERG, η οποία τοποθετεί αυτό το ογκογονίδιο υπό τον έλεγχο AR . Εκτός από τη συμβολή των ρυθμιστικών ακολουθιών TMPRSS2 σε αυτές τις αναδιατάξεις

γονιδιώματος, ο ρόλος του TMPRSS2 στην καρκινογένεση δεν έχει τεκμηριωθεί [113,114]. Διάφορες κλινικές σειρές υποστηρίζουν έναν κεντρικό ρόλο για τα δίκτυα σηματοδότησης που λειτουργούν στην προαγωγή ενός μεταστατικού καταρράκτη στον καρκίνο του προστάτη που περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις AR, TMPRSS2, HGF και c-Met. Η TMPRSS2 είναι ένας ισχυρός ενεργοποιητής του HGF. Μέσω των αλληλεπιδράσεων με τον υποδοχέα c-Met, ο HGF ενορχηστρώνει την καρκινογένεση. Ένας τέτοιος μηχανισμός έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζεται σε καρκίνο πλακώδους κυττάρου όπου η matriptase της οικογένειας TMPRSS2 επάγει την καρκινογένεση μέσω πρωτεολυτικής μετατροπής του proHGF, επακόλουθη ενεργοποίηση της σηματοδότησης c-Met και εμπλοκή της οδού PI3K-Akt-mTOR[116,117]

Είναι γνωστό εδώ και αρκετά χρόνια[127] ότι για να υπάρχει η βέλτιστη αποτελεσματικότητα των anti – HER2 θεραπειών, και πιο συγκεκριμένα του trastuzumab στον υπό μελέτη πληθυσμό, πρέπει το μονοπάτι του mTOR να είναι ανενεργό ή μπλοκαρισμένο.

Σε μια μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2009 [127] ανοσοεπαρκή ποντίκια με HER2-θετικούς καρκίνους μαστού υποβλήθηκαν σε αγωγή με trastuzumab, τον αναστολέα rapamycin ή τον συνδυασμό. Έγινε απεικόνιση με [18P] FDG-PET και ειδικό σκιαγραφικό για ανίχνευση κυτταρικού θανάτου. Η σηματοδότηση και τα αποτελέσματα ανάπτυξης του αναστολέα mTOR RAD001 σε HER2 + κύτταρα που έλαβαν θεραπεία με trastuzumab ή lapatinib αξιολογήθηκαν. Η θεραπεία με trastuzumab και rapamycin ήταν πιο αποτελεσματική από τις μονοθεραπείες, προκαλώντας πλήρη υποχώρηση των όγκων σε όλα τα ποντίκια. Ο συνδυασμός προκάλεσε θάνατο στα καρκινικά κύτταρα και ανέστειλε την πρόσληψη FDG στο PET/CT. Η rapamycin ανάστειλε τον πολλαπλασιασμό του mTOR και των καρκινικών κυττάρων όπως προσδιορίστηκε μέσω ανοσοϊστοχημείας phospho-S6 και Ki67, αντίστοιχα. Στην καλλιέργεια, ο συνδυασμός RAD001/Trastuzumab ανέστειλε την κυτταρική ανάπτυξη πιο αποτελεσματικά από ότι και τα δύο φάρμακα από μόνα τους. Το trastuzumab μείωσε εν μέρει την δραστικότητα της PI3K αλλά όχι τη δραστικότητα του mTOR. Το knockdown της TSC2 κατέληξε σε ανεξάρτητη από HER2 ενεργοποίηση του mTOR και ανέστειλε την ανταπόκριση στο trastuzumab και το lapatinib. Η θεραπεία με lapatinib μείωσε την έκφραση phospho-S6 και την κυτταρική ανάπτυξη σε κύτταρα που εκφράζουν TSC2 αλλά όχι σε TSC2 - κύτταρα.

Είναι ήδη γνωστό από χρόνια το όφελος από τη χορήγηση trastuzumab τόσο στο επικουρικό όσο και στο μεταστατικό setting. Αναδυόμενα δεδομένα δείχνουν ότι η προσθήκη trastuzumab στη χημειοθεραπεία έχει ως αποτέλεσμα διαρκή οφέλη επιβίωσης για ασθενείς με HER2 + καρκίνο του μαστού. Επιπλέον δεν υπάρχει ασθενής πλέον με Her2 + καρκίνο μαστού που να μη λαμβάνει anti Her2 θεραπεία.

Αυτό αποδείχθηκε στη συνδυασμένη ανάλυση της μελέτης N9831 της (NCCTG) και στις κλινικές μελέτες B-31 NSABP) [128]. Με μέση διάρκεια μελέτης 8,4 ετών, η προσθήκη trastuzumab οδήγησε σε όφελος κατά 37% στη συνολική επιβίωση (HR 0,63, 95% CI 0,54-0,73) και 40% όφελος στο διάστημα ελεύθερο νόσου (HR 0,60,95 % CI 0,53-0,68). Θα μπορούσε να υποθέσει κανείς ότι ένας από τους λόγους του περαιτέρω οφέλους στον υπό μελέτη πληθυσμό, και πιο συγκεκριμένα με θετική έκφραση TMPRSS2 οφείλεται στην

επακόλουθη ενεργοποίηση της σηματοδότησης c-Met και εμπλοκή της οδού PI3K-Akt-mTOR.

Ένα αναδυόμενο μοντέλο μεταγραφικής ενεργοποίησης [129] υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση μεταγραφικών προγραμμάτων, για παράδειγμα με διέγερση κυττάρων του προστάτη ή του μαστού μέσω ανδρογόνων ή οιστρογόνων, αντίστοιχα, περιλαμβάνει το σχηματισμό βλάβης του DNA, περιλαμβάνοντας θραύσματα διπλής έλικας (DSB), πρόσληψη πρωτεϊνών επισκευής DSB και μετακίνηση ενεργοποιημένων γονιδίων σε μεταγραφικούς κόμβους.

Τα DSB μπορεί να αναγνωρίζονται από την τοποϊσομεράση τάξης II TOP2B, η οποία προσλαμβάνεται με υποδοχέα ανδρογόνου (AR) και υποδοχέα οιστρογόνου (ER) σε ρυθμιστικές θέσεις στα γονίδια-στόχους για αποτελεσματική μεταγραφική ενεργοποίηση αυτών των γονιδίων. Αυτά τα DSB αναγνωρίζονται από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA που ενεργοποιούν την πρόσληψη πρωτεϊνών επισκευής όπως PARP1, ATM και DNA-PK. Σε περίπτωση μη φυσιολογικής επιδιόρθωσης όπως στην καρκινογένεση, τα DSB μπορεί να προκαλέσουν το σχηματισμό γονιδιακών αναδιατάξεων όπως το ογκογονίδιο σύντηξης TMPRSS2-ERG στον καρκίνο του προστάτη [130]

Ανεξάρτητα από το ρόλο τους στη μεταγραφική ρύθμιση, είναι σαφές ότι η δημιουργία διπλών θραυσμάτων, κατά την επαγωγή μεταγραφικών προγραμμάτων, μπορεί να αντιπροσωπεύει μια ευπάθεια για τα κύτταρα. Τα διαιρεμένα διπλά σκέλη του DNA παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση: αφενός, τα DSBs μπορεί να οδηγήσουν σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου, σε γήρανση και απόπτωση, και αφετέρου, αν επιδιορθωθούν εκτός προγράμματος, τέτοιου είδους μεταλλάξεις μπορούν να προκαλέσουν σχηματισμό γονιδιακών αναδιατάξεων.[131]

Δομικές γονιδιακές αλλοιώσεις μπορούν να βρεθούν στην πλειονότητα των όγκων και ορισμένες αναδιατάξεις είναι παθογνωμικές για συγκεκριμένες κακοήθειες. Για παράδειγμα, στην περίπτωση του καρκίνου του προστάτη, τα γονίδια που ρυθμίζονται από ανδρογόνα συγχωνεύονται συχνά με παράγοντες μεταγραφής της οικογένειας ETS. Η πιο σημαντική από αυτές τις επαναλαμβανόμενες αναδιατάξεις που σχετίζονται με τον καρκίνο του προστάτη περιλαμβάνει το ανδρογόνο εξαρτώμενο γονίδιο TMPRSS2 και το ERG ,μέλος της οικογένειας ETS, που εμφανίζονται σε > 50% των περιπτώσεων καρκίνου του προστάτη. Αυτές οι αναδιατάξεις φέρνουν τους παράγοντες μεταγραφής του ETS κάτω από τον μεταγραφικό έλεγχο του AR, με αποτέλεσμα την υπερέκφραση του ογκογονιδίου σύντηξης[132]

Η δημιουργία θραυσμάτων κλώνου DNA είναι ένας από τους κύριους μηχανισμούς δράσης για τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα κατά του καρκίνου. Τα περισσότερα από τα υπάρχοντα χημειοθεραπευτικά που προκαλούν DSB στην κλινική πράξη απαιτούν κυτταρική διαίρεση.

Παρεκτείνοντας από τον καρκίνο του προστάτη και τη συσχέτιση του TMPRSS2 και των DSB, μπορούμε να υποθέσουμε ότι το ίδιο ισχύει και για άλλα καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη αυτή, όπως του μαστού. Όπως προαναφέρθηκε ένας από τα βασικότερα χημειοθεραπευτικά που αναγνωρίζουν τα DSB είναι η αναστολείς

τοποισομεράσης II, όπως οι ανθρακυκλίνες. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ασθενείς με HER2 enriched χειρουργηθέντες καρκίνους μαστού, εξ ορισμού λαμβάνουν επικουρική χημειοθεραπεία με ανθρακυκλίνη, οπότε μπορεί να υποθεθεί ότι για αυτούς τους ασθενείς με θετική έκφραση TMPRSS2, η TMPRSS2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν προβλεπτικός παράγοντας για τη χρήση ανθρακυκλίνης και ως εκ τούτου όφελος στην επιβίωση.

Τέλος οι διαμεμβρανικές πρωτεάσες σερίνης τύπου II (TTSPs) σχετίζονται με την ανάπτυξη του όγκου, την εισβολή και τη μετάσταση. Οι γενετικές παραλλαγές σε αυτά τα γονίδια μπορεί να μεταβάλλουν τη λειτουργία τους, οδηγώντας σε εμφάνιση και εξέλιξη του καρκίνου και επηρεάζοντας την έκβαση του ασθενούς. Σε 464 περιπτώσεις καρκίνου του μαστού και 370 μάρτυρες έγινε γονοτυπική ανάλυση για 82 πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου ( SNP ) σε 8 γονίδια[133]

Η συσχέτιση των γονότυπων εκτιμήθηκε για κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού, για την ειδική επιβίωση για το καρκίνο του μαστού και της επιβίωσης ανάλογα με τη θεραπεία και κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά. Στην μονοπαραγοντική ανάλυση, TMPRSS1 rs12151195 και rs12461158, TMPRSS2 rs2070788 και rs2276205, TMPRSS3 rs3814903, TMPRSS7 rs2399403, TMPRSS11E rs35293564, το HGF rs2040965 και το uPA rs2227578 συσχετίστηκαν σημαντικά με την επιβίωση ( $P = 0.002, 0.05, 0.022, 0.05, 0.026, 0.007, 0.048, 0.035$  και  $0.021$  αντίστοιχα). Στην πολυπαραγοντική ανάλυση που έλαβε υπ' όψιν την ηλικία, του βαθμού διαφοροποίησης του όγκου, τον ιστολογικό τύπο, το μέγεθος του όγκου και την κατάσταση των υποδοχέων οιστρογόνων (ER) και HER2, οι πολυμορφισμοί TMPRSS1 SNPs rs12151195 και rs12461158, TMPRSS2 SNPs rs2276205, TMPRSS3 SNP rs3814903 και TMPRSS7 SNP rs2399403 διατήρησαν την στατιστικά σημαντική σχέση με την ολική επιβίωση. ( $P = 0.008, 0.025, 0.040, 0.046$  και  $0.047$  , αντίστοιχα) [133]

### 3.2 FKBP5

Οι FK506 δεσμευτικές πρωτεΐνες (FKBPs) είναι μέλη μιας μεγάλης υπεροικογένειας πεπτιδυλ-προλυλυμεομεράσεων (PPIάσης) που είναι ευρέως κατανεμημένες στη φύση και έχουν διάφορες λειτουργίες . Ορισμένες FKBP, συμπεριλαμβανομένων των FKBP52 και FKBP51, έχουν ένα C-τερματικό τετρατρικοπεπτιδίο (TPR). Μέσω της περιοχής TPR, τα FKBP52 και FKBP51 ανταγωνίζονται για σύνδεση με σύμπλοκα Hsp90, ειδικά εκείνα που σχετίζονται με υποδοχείς στεροειδών ορμονών. Οι κύριες λειτουργίες της είναι ρύθμιση της λειτουργίας των υποδοχέων στεροειδών ορμονών, έλεγχος της τοξικότητας του β-αμυλοειδούς και της ομοιόστασης του χαλκού στη *Drosophila*, διαμόρφωση της συσσωμάτωσης της α-συνουκλείνης, έλεγχος της πρωτοεμφανιζόμενης RET στους νευρώνες, προστασία της εγκυμοσύνης από οξειδωτικό στρες, ρύθμιση των επιπέδων υπεροξειδουδοξίνης, ρύθμιση της λειτουργίας των υποδοχέων στεροειδών ορμονών, απόπτωση αναστολής σε κύτταρα ακτινοβολημένου μελανώματος, προώθηση της αποφωσφορλίωσης του Akt και καθοδική ρύθμιση της οδού Akt και σύνδεση πολυμορφισμών σε FKBP5 με συναισθηματικές και αγχωτικές διαταραχές.

Συνοπτικά στην μονοπαραγοντική ανάλυση η έκφραση της πρωτεΐνης FKBP5 βρέθηκε να έχει τάση προς στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το DFS με cut off 65 ( HR:0.74, 95% CI 0.54 – 1.03,  $p=0.072$  ), στατιστικά σημαντική συσχέτιση με H score 150 ( HR:0.66, 95% CI 0.5 -0.87,  $p=0.03$  ) ενώ αναφορικά με την OS φάνηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με H score 150 ( HR:0.61, 95% CI 0.42 – 0.78,  $p<0.001$  ). Στην πολυπαραγοντική ανάλυση φάνηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της FKBP5 με H score 150 τόσο για το DFS ( HR:0.61, 95% CI 0.44-0.83,  $p=0.002$ ) όσο και για το OS ( HR:0.53, 95% CI 0.37 -0.75,  $p<0.001$  ).

Όσον αφορά τους μοριακούς υποτύπους για τους όγκους Luminal A, στην μονοπαραγοντική ανάλυση βρέθηκε τάση προς όφελος στο DFS με έκφραση της FKBP5 με cut off 85 ( HR:0.62, 95% CI 0.36-1.08,  $p=0.092$ ) και H score 150 ( HR:0.59, 95% CI 0.34-1.04,  $p=0.067$ ). Στην πολυπαραγοντική ανάλυση επιβεβαιώθηκε το όφελος στο DFS με το H score 150 ( HR:0.56, 95% CI 0.32 -0.99,  $p=0.045$  ).

Για τους Luminal B, η FKBP5 έκφραση με H score 150, τόσο στην μονοπαραγοντική ανάλυση όσο και στην πολυπαραγοντική σχετίζεται με όφελος στην ολική επιβίωση ( HR:0.44, 95% CI 0.24 -0.80,  $p=0.007$  αντίστοιχα).

Στους Luminal HER2 όγκους η έκφραση της FKBP5 με H score 150 ανέδειξε όφελος στην OS τόσο στην μονοπαραγοντική ( HR:0.31, 95% CI 0.12-0.81,  $p=0.017$  ) όσο και στην πολυπαραγοντική ανάλυση ( HR:0.32, 95% CI 0.13-0.84,  $p=0.02$  ). Επιπλέον στην μονοπαραγοντική ανάλυση βρέθηκε τάση προς όφελος στο DFS (HR:0.49, 95% CI 0.22-1.13,  $p=0.093$  ).

Τέλος για τους TNBC όγκους στην μονοπαραγοντική ανάλυση η έκφραση της πρωτεΐνης FKBP5 είχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το DFS τόσο με το cut off 85 ( HR:0.44, 95% CI 0.21-0.9,  $p=0.025$ ) όσο και με το H score 150 ( HR:0.41, 95% CI 0.18-0.93,  $p=0.032$ ). Στην πολυπαραγοντική ανάλυση η έκφραση με cut off 85 διατήρησε το όφελος στο DFS ( HR:0.44, 95% CI 0.22 -0.92,  $p=0.028$  ) με το H score 150 είχε τάση προς όφελος στο DFS ( HR:0.45, 95% CI 0.2 -1.01,  $p=0.052$  ).

Τα καρκινικά κύτταρα μαστού έχουν ένα συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης για τους υποδοχείς E<sub>rb</sub> και τους συνδέτες της. Το E<sub>rb</sub>B6 έχει προηγουμένως χαρακτηριστεί ως μόριο υπογραφής για διηθητικά καρκινικά κύτταρα μαστού[134] Η μεταγραφή του E<sub>rb</sub>B6 δεν υφίσταται στον καρκίνο μαστού και η εκ νέου ενεργοποίηση της έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη διεισδυτικότητα[134]. Τέτοιες διαφορές στους φαινοτύπους σχετίζονται με ένα τροποποιημένο προφίλ mRNAs. Συγκριτικός υβριδισμός του ολικού RNA σε αντικειμενοφόρες πλάκες που περιέχουν όλα τα γνωστά miRNAs με χρήση πλατφόρμας miRCURY LNA έδωσε ένα σημαντικά αλλοιωμένο προφίλ των miRNAs σε κύτταρα MDA-MB-231 που είχαν επιμολυνθεί με E<sub>rb</sub>B6. Ο κατάλογος των στατιστικά σημαντικών miRNAs περιελάμβανε τα miR-16, miR-23a, miR-24, miR-26a, miR-29a, miR-100, miRPlus- miRPlus-E1258. Η βιολογική συνάφεια των mRNA στόχων επέτρεπε την ταυτοποίηση των SMARCC5, SMARCC1, eIF2C2, eIF2C4, eIF4EBP2, FKBP5, FKBP1A, TRIB1, TRIB2, TRIB3, BMPP2, BMPP1A και BMPP1B ως σημαντικούς στόχους σε ένα

υποσύνολο αλλαγμένων miRNAs. Η ποσοτική PCR αποκάλυψε ότι τα επίπεδα των μεταγραφών SMARCC1, eIFC4, eIF4EB2, FKBP1a, FKBP5, TRIB1, TRIB3, BMPR1a και BMPP2 ήταν σημαντικά μειωμένη σε κύτταρα καρκινικά κύτταρα μαστού επιμολυσμένα με ErhB6[135]

Εκτός από τις μεταβολές σε αρκετούς Erh υποδοχείς, η έκφραση του ErhB6 υποδοχέα αποσιωπείται μεταγεννητικά σε διηθητικά κύτταρα[136]. Η μεταγραφική σίγαση του ErhB6 αποδίδεται στη μεθυλίωση συγκεκριμένων δινουκλεοτιδίων CpG στον γονιδιακό προαγωγό[137]. Ενώ η μεταγραφή του γονιδίου ErhB6 δεν είναι ανιχνεύσιμη σε κύτταρα MDA-MB-231, η επιμόλυνση με ErhB6 μειώνει σημαντικά την *in vitro* επιθετικότητα αυτών των κυττάρων.

Τα προφίλ mRNA έχουν μελετηθεί για έναν αριθμό καρκίνων και έχουν χαρακτηριστεί οι μεταβολές τους. Δεδομένου του ρυθμιστικού ρόλου που διαδραματίζουν προβλέπεται ότι αυτά τα ρυθμιστικά μόρια εξυπηρετούν μια σημαντική λειτουργία στη διαμόρφωση μιας ποικιλίας διεργασιών που περιλαμβάνουν την ογκογένεση, την ανάπτυξη και τη μετάσταση. Η επιμόλυνση του ErhB6 σε κύτταρα MDA-MB-231 έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την ικανότητα εισβολής και μετάστασης. Επίσης η υπερέκφραση MiR-100 έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την οδό mTOR [138] και η FKBP5 είναι ένας κοινός στόχος του miR-100. Η FKBP5 ρυθμίζεται προς τα κάτω στον καρκίνο του μαστού [139] και η αφθονία της σε καρκινικά κύτταρα τις καθιστά ευαίσθητες ή ανθεκτικές στη γεμισιταβίνη και το AraC. Ενώ υψηλότερα επίπεδα FKBP5 προσδίδουν ευαισθησία, χαμηλές ποσότητες FKBP5 συνδέονται με αντίσταση και αναστολή του υποδοχέα TGFb τύπου 1[140].

Φαίνεται να υπάρχει μια αντίστροφη σχέση μεταξύ έκφρασης FKBP5-miRNA 100 και Erh6. Έτσι υψηλά επίπεδα FKBP5 σχετίζονται με ευαισθησία στη χημειοθεραπεία, αναστολή της οδού mTOR και αναστολή του υποδοχέα TGFb1 και ταυτόχρονα χαμηλά επίπεδα Erh6 δεν ανιχνεύονται σε καρκινικά κύτταρα παρόλο που η παρουσία της σχετίζεται με χαμηλό δυναμικό μετάστασης. Η αναστολή αυτών των μοριακών μονοπατιών και η αυξημένη ευαισθησία στη χημειοθεραπεία φαίνεται να συμβάλλουν στο όφελος στο DFS και OS ιδιαίτερα για τους υποτύπους Luminal B, Luminal Her2 και TNBC όπου η χημειοθεραπεία είναι ο κανόνας.

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Hsps) είναι γνωστό ότι συνδέονται με τους υποδοχείς οιστρογόνων (ER) και ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με τη μεσολάβηση ER. Τέσσερις Hsp70s (Hsp70-1, Hsc70, Grp75, και Grp78) είναι οι πιο πλούσιες Hsps που αναγνωρίστηκαν να σχετίζονται με ERα, ακολουθούμενες από δύο Hsp90s (Hsp90α και Hsp90β) και τρία Hsp110s (Hsp105, HspA4 και HspA4L). Μεταξύ των προαναφερθέντων Hsp, η FKBP5 (FKBP51) αποτελεί μια από τις πιο συχνές συνδεδεμένες πρωτεΐνες[141]

Μελέτες με τα δύο πιο άφθονα ERs-συνδεδεμένα Hsps, Hsp70-1 και Hsc70, χρησιμοποιώντας κύτταρα MCF7 του ανθρώπινου καρκίνου του μαστού[141], καταδεικνύουν ότι τα δύο Hsps αλληλεπιδρούν με ERα τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Είναι ενδιαφέρον ότι οι αλληλεπιδράσεις ERα-Hsp70-1 / Hsc70

ανιχνεύθηκαν μόνο στο κυτταρόπλασμα αλλά όχι στον πυρήνα υπό συνθήκες stress. Επιπλέον, η E2-αγωγή εξασθένησε την αλληλεπίδραση ERα-Hsc70 αλλά δεν είχε επίδραση στην αλληλεπίδραση ERα-Hsp70-1.

Hsp70 και Hsp90 συγκαταλέγονται στις πρωτεΐνες με την πιο άφθονη παρουσία, με κάθε μέλος να αντιπροσωπεύει 1-2% της συνολικής κυτταρικής πρωτεΐνης υπό κανονικές συνθήκες και 2-4% κάτω από συνθήκες στρες [142-144]. Παρά το γεγονός ότι οι Hsp70 και Hsp90 συγκαταλέγονται μεταξύ των κυριότερων προστατευτικών πρωτεϊνών των κυττάρων, ουσιαστικά υπερεκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα, και οι σχετίζονται με κακή πρόγνωση [145-147]. Λόγω των σημαντικών ρόλων των Hsp70 και Hsp90 στη ρύθμιση των SRs και του "εθισμού" των καρκινικών κυττάρων σε υψηλότερα επίπεδα Hsps, οι αναστολείς τους μελετώνται ενεργά για τη θεραπεία των καρκίνων [148-150]. Οι εκτεταμένες μελέτες σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις των Hsps με SRs συμπεριλαμβανομένου του ERα κατά τις τελευταίες πέντε δεκαετίες έχουν καθορίσει τους θεμελιώδεις ρόλους των Hsps, Hsp90 ειδικότερα, στη ρύθμιση των SRs [151]. Μελέτες με τα δύο πιο άφθονα ERs-συνδεδεμένα Hsps, Hsp70-1 και Hsc70, υποδηλώνουν ότι αυτά τα δύο Hsps αλληλεπιδρούν με ERα στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα όταν κύτταρα MCF7 του ανθρώπινου καρκίνου του μαστού καλλιεργήθηκαν στις συμβατικές εργαστηριακές συνθήκες [151].

Η ταυτοποίηση των Hsp90α και Hsp90β ως πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με ERα υπό τις παρούσες συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας και συγγένειας καθαρισμού υποδεικνύει ότι το Hsp90 θα μπορούσε επίσης να συμπλοκοποιηθεί με ERα, τουλάχιστον μερικώς, παρουσία οιστρογόνων προσδεμάτων. Αυτό το συμπέρασμα είναι σύμφωνο με την ιδέα ότι η δυναμική και παροδική αλληλεπίδραση των δεσμευμένων με στεροειδή SRs με Hsp90 μπορεί να απαιτηθεί για την κυτταροπλασματική-πυρηνική διακίνηση SRs σε κύτταρα [152].

Ενδεχομένως όλο αυτή η επικοινωνία μεταξύ FKBP5- Hsp – ER να εξηγεί γιατί η έκφραση FKBP5 σχετίζεται με όφελος στο DFS και στο OS στους Luminal A, Luminal B και Luminal Her2 όγκους όπου η χρήση επικουρικής ορμονοθεραπείας είναι ο κανόνας. Υψηλή έκφραση συνεπάγεται περισσότερο σύμπλοκα και ως εκ τούτου περισσότερο όφελος από την ορμονοθεραπεία.

Μελέτες έδειξαν ότι η υπερέκφραση της FKBP5 σχετίζεται με χημειοαντοχή σε διάφορους καρκίνους (συμπεριλαμβανομένου του μαστού, του προστάτη, του μυελώματος, της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, μελάνωμα) μετά από θεραπεία με αντινεοπλασματικούς παράγοντες (FK506, ραπαμυκίνη, δεξαμεθαζόνη, ακτινοβολία) [153 – 157]. Αυτές οι μελέτες περιελάμβαναν NF-κΒ ή ορμονοθεραπεία. Αντίθετα, ο Wang και οι συνάδελφοί του χρησιμοποίησαν wide screen γονιδιακή ανάλυση για να αποδείξουν ότι τα επίπεδα FKBP5 συνδέονται αντιστρόφως ανάλογα με την ανταπόκριση σε δύο ανάλογα της κυτιδίνης, τη γεμισταβίνη και την αραβινοσίδη της κυτοσίνης [158]. Επιπλέον, η χαμηλή έκφραση FKBP5 απευαισθητοποίησε καρκινικές κυτταρικές σειρές παγκρέατος και μαστού σε διάφορες κατηγορίες χημειοθεραπευτικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων όχι μόνο αναλόγων κυτιδίνης αλλά και ταξανών, ιρινοτεκάνης και

ετοποσίδης [158-159]. Αυτά τα ευρήματα μπορούν να εξηγηθούν από τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που επηρεάζουν τη δραστικότητα κινάσης Akt οι οποίοι επίσης εμπλέκονται στη χημειοευαισθησία σε καρκινικά κύτταρα [160].

Για να εκτιμηθεί ο ρόλος της FKBP5 στην έκφραση AR και η απόκριση των κυττάρων στις , έγινε μια μελέτη για την κυτταρική βιωσιμότητα μετά από σιγή ή έκτοπη έκφραση του FKBP5. Πρώτα, η σίγαση του FKBP5 μείωσε σημαντικά την έκφραση της πρωτεΐνης AR σε κύτταρα που είχαν λάβει ταξάνες . Αντίθετα, η έκτοπη έκφραση του FKBP5 επανέφερε την έκφραση AR σε φυσιολογικά επίπεδα. Είναι γνωστό ότι υψηλά επίπεδα FKBP51 οδηγούν σε μειωμένη φωσφορυλίωση / δραστικότητα Akt και αυξημένη χημειοευαισθησία, ενώ χαμηλά επίπεδα FKBP51 οδηγούν σε αυξημένη φωσφορυλίωση / δραστικότητα Akt και χημειοαντοχή των καρκινικών κυττάρων του προστάτη, του μαστού και του παγκρέατος [158-159]. Από την άλλη πλευρά, η σταθερότητα / δραστικότητα AR ρυθμίζεται από φωσφορυλίωση με μεσολάβηση Akt ανάλογα με το περιβάλλον των κυττάρων[161-163].

Φαίνεται ότι θετικότητα στη FKBP5 σχετίζεται με θετική ρύθμιση του pAkt και έκφραση AR μετα- μεταφραστικά στον οργανισμό μας. Επιπλέον υψηλή έκφραση συνεπάγεται υψηλή χημειοευαισθησία, ιδιαίτερα στις ταξάνες. Αυτοί οι παράγοντες ενδεχομένως να εξηγούν και το όφελος στο DFS που παρατηρούμε με θετική έκφραση FKBP5.

### 3.3 PSA

Το PSA βρέθηκε να εκφράζεται μόνο σε 59 από τα δείγματα. Αυτό από μόνο του είναι ένας σοβαρός περιορισμός για να εξαχθούν σοβαρά συμπεράσματα. Από τη στατιστική ανάλυση το μόνο που προέκυψε είναι όφελος στο DFS στην πολυπαραγοντική ανάλυση με το cut off στο 50 ( HR:3.27, 95% CI 1.17-9.16, p=0.024).Υπάρχουν δύο πρόσφατες μελέτες που φαίνεται να επιβεβαιώνουν αυτά τα ευρήματα και την προγνωστική αξία του PSA στον καρκίνο του μαστού, αν και οι δύο χρησιμοποιούν PSA ορού και όχι έκφραση

Στην πρώτη [164] δείγματα αίματος 55 γυναικών με καρκίνο του μαστού αναλύθηκαν προληπτικά για το PSA πριν και μετά τη χειρουργική επέμβαση μαστού με μια ομάδα ελέγχου 82 υγιών γυναικών. Τα επίπεδα του ελεύθερου PSA ήταν σημαντικά υψηλότερα στις γυναίκες με καρκίνο του μαστού (προεγχειρητικά) p <0,001). Τόσο ο TPSA του ορού όσο και η FPSA έδειξαν σημαντική πτώση στις τιμές μετά από χειρουργική επέμβαση όγκου (P <0,001).Ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών(83,6%) είχαν ελεύθερο PSA ως κυρίαρχη μοριακή μορφή στον ορό σε σύγκριση με 0% των μαρτύρων και 1,8% των μετεγχειρητικών με νεαρή ηλικία και μη προχωρημένο στάδιο , ενώ δεν βρέθηκε σημαντική σχέση μεταξύ αυτών των δύο μεταβλητών και FPSA Αυτή η μελέτη ανέδειξε κλινική σημασία της προεγχειρητικής μέτρησης των TPSA και FPSA στον ορό στη διάγνωση



γυναικών με καρκίνο του μαστού και μπορεί να είναι χρήσιμος δείκτης για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία.

Μια δεύτερη μελέτη [165] περιλάμβανε 50 άτομα με νεοδιαγνωσθείσα καλοήγη νοσο του μαστού (BBD) και 50 άτομα με καρκίνο του μαστού, ενώ στην ομάδα ελέγχου συμπεριλήφθηκαν 50 υγιή άτομα.. Εργαστηριακές δοκιμές που έγιναν ήταν ολικό PSA ορού (TPSA), ελεύθερο PSA (FPSA), γλυκόζη αίματος νηστείας (FBS), ουρία ορού, κρεατινίνη ορού και λιπιδικό προφίλ νηστείας. Τα TPSA και FPSA μετρήθηκαν και πάλι και στις δύο δοκιμαστικές ομάδες μετά από 10-14 ημέρες χειρουργικής επέμβασης / θεραπείας.

Παρατηρήθηκε πτώση στην μετεγχειρητική τιμή του συνολικού και ελεύθερου PSA στην ομάδα με καρκίνο του μαστού. Σε όγκους grade I, η μέση τιμή του συνολικού PSA (1,813 ng / ml) και του ελεύθερου PSA (1,149 ng / ml) ήταν υψηλότερη από εκείνη των όγκων με grade III (TPSA-1,07 ng / ml και FPSA-1,002 ng / ml). Η μέση τιμή της γλυκόζης αίματος νηστείας (FBG), της ολικής χοληστερόλης και της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) στην ομάδα BC ήταν υψηλότερη από την ομάδα ελέγχου.

Το συμπέρασμα είναι ότι το PSA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πιθανό νέος δείκτη διάγνωσης και πρόγνωσης του καρκίνου του μαστού.

Και στις δυο αυτές μελέτες υπάρχει ο ίδιος περιορισμός, μικρός αριθμός ατόμων και επιπλέον η μεθοδολογία είναι διαφορετική οπότε οποιαδήποτε εξαγωγή συμπερασμάτων είναι επισφαλής.

#### 4. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο υπό μελέτη πληθυσμός απαρτίζεται από ιστολογικά block παραφίνης αδενοκαρκινώματος μαστού σε ιστικές μικροσυστοιχίες TMA (N=700). Οι ιστοί προέρχονται από ασθενείς με χ/θεν T1-4 N0-2 M0 ER any IHC Pg Rany HER2 any όγκο που έχουν αντιμετωπιστεί σύμφωνα με τα πρότυπα θεραπευτικά πρωτόκολλα της ΕΣΟΟ που περιλαμβάνουν επικουρική θεραπεία με σχήματα βασισμένα σε ταξάνες ή/και ανθρακυκλίνες. Πλήρη κλινικά και παθολογοανατομικά στοιχεία είναι διαθέσιμα στους φακέλους ασθενών. Από τα 700 δείγματα, 646 ήταν αξιολογήσιμα για χρώση και ανάγνωση έστω και μιας από τις υπό μελέτη πρωτεΐνες FKBP5, TMPRSS2 και PSA.

Ιστογράμματα συχνότητας του H score και του ποσοστού των κυττάρων με θετική έκφραση πυρηνικής FKBP5, κυτταροπλασματικού PSA και κυτταροπλασματικής και μεμβρανώδους TMPRSS2 σχεδιάστηκαν και αναλύθηκαν για την αναγνώριση φυσιολογικών cut off. Θετικότητα της χρώσης θεωρήθηκε έστω και 1%. Η έκφραση της εκάστοτε πρωτεΐνης θεωρήθηκε ψηλή όταν ήταν μεγαλύτερη και χαμηλή όταν ήταν χαμηλότερη ή ίση με το βέλτιστη τιμή cut off αντίστοιχα και μελετήθηκε σαν μεταβλητός παράγοντας στην ανάλυση.

Η ανάλυση κατανομής του ποσοστού των κυττάρων με θετική έκφραση των ανωτέρω πρωτεϊνών ανέδειξε τα εξής cut off. Για την TMPRSS2 το cut off ήταν στο 80, για το κυτταροπλασματικό PSA το 15 ενώ για την πυρηνική έκφραση της FKBP5 αναγνωρίστηκαν δύο cut off, 65 και 85, όπου και τα δύο εξετάστηκαν και αναλύθηκαν για την προγνωστική και προβλεπτική τους αξία στην ανάλυση. Παρομοίως, το cut off του H-score για την TMPRSS2 ορίστηκε το 100, για το PSA το 50 και για το FKBP5 το 150. Σε ένα υποσύνολο 78 δειγμάτων από ασθενείς του ΠΓΝΙ ανιχνεύθηκε το προφίλ μεταλλάξεων στο γονίδιο AR χωρίς να αναγνωριστεί κανένα.

Αναφορικά με το κλινικό αποτέλεσμα τα ευρήματα της μελέτης είναι τα ακόλουθα,

Η έκφραση της πρωτεΐνης TMPRSS2 με το cut off στο 80 στην μονοπαραγοντική ανάλυση σχετίζεται με τάση προς όφελος στο διάστημα ελεύθερο επιβίωσης (  $p=0.072$ , HR: 0.41, 95% CI: 0.15 – 1.08 ) και όφελος στην ολική επιβίωση (  $p= 0.037$ , HR: 0.3, 95% CI: 0.1 -0.93 ) στους HER2 enriched όγκους. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση βλέπουμε ότι επιβεβαιώνεται το όφελος στην ολική επιβίωση (  $p= 0.037$ , HR: 0.3, 95% CI: 0.1-0.93 ) στους όγκους αυτούς.

Για την πρωτεΐνη FKBP5 τα αποτελέσματα είναι πιο ευκρινή. Συνοπτικά στην μονοπαραγοντική ανάλυση η έκφραση της πρωτεΐνης FKBP5 βρέθηκε να έχει τάση προς στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το DFS με cut off 65 ( HR:0.74, 95% CI 0.54 – 1.03,  $p= 0.072$  ), στατιστικά σημαντική συσχέτιση με H score 150 ( HR:0.66, 95% CI 0.5 -0.87,  $p=0.03$  ) ενώ αναφορικά με την OS φάνηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με H score 150 ( HR:0.61, 95% CI 0.42 – 0.78,  $p<0.001$  ). Στην πολυπαραγοντική ανάλυση φάνηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της FKBP5 με H score 150 τόσο για το DFS ( HR:0.61, 95% CI 0.44-0.83,  $p=0.002$ ) όσο και για το OS ( HR:0.53, 95% CI 0.37 -0.75,  $p<0.001$  ).

Όσον αφορά τους μοριακούς υποτύπους για τους όγκους Luminal A, στην μονοπαραγοντική ανάλυση βρέθηκε τάση προς όφελος στο DFS με έκφραση της FKBP5 με cut off 85 ( HR:0.62, 95% CI 0.36-1.08,  $p=0.092$ ) και H score 150 ( HR:0.59, 95% CI 0.34-1.04,  $p=0.067$ ). Στην πολυπαραγοντική ανάλυση επιβεβαιώθηκε το όφελος στο DFS με το H score 150 ( HR:0.56, 95% CI 0.32 -0.99,  $p=0.045$  ).

Για τους Luminal B, η FKBP5 έκφραση με H score 150, τόσο στην μονοπαραγοντική ανάλυση όσο και στην πολυπαραγοντική σχετίζεται με όφελος στην ολική επιβίωση ( HR:0.44, 95% CI 0.24 -0.80,  $p=0.007$  αντίστοιχα).

Στους Luminal HER2 όγκους η έκφραση της FKBP5 με H score 150 ανέδειξε όφελος στην OS τόσο στην μονοπαραγοντική ( HR:0.31, 95% CI 0.12-0.81,  $p=0.017$  ) όσο και στην πολυπαραγοντική ανάλυση ( HR:0.32, 95% CI 0.13-0.84,  $p=0.02$  ). Επιπλέον στην μονοπαραγοντική ανάλυση βρέθηκε τάση προς όφελος στο DFS (HR:0.49, 95% CI 0.22-1.13,  $p=0.093$  ).

Τέλος για τους TNBC όγκους στην μονοπαραγοντική ανάλυση η έκφραση της πρωτεΐνης FKBP5 είχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το DFS τόσο με το cut off 85 ( HR:0.44, 95% CI 0.21-0.9, p=0.025) όσο και με το H score 150 ( HR:0.41, 95% CI 0.18-0.93, p=0.032). Στην πολυπαραγοντική ανάλυση η έκφραση με cut off 85 διατήρησε το όφελος στο DFS ( HR:0.44, 95% CI 0.22 -0.92,p=0.028 ) με το H score 150 είχε τάση προς όφελος στο DFS ( HR:0.45, 95% CI 0.2 -1.01, p=0.052 ).

Τέλος για το PSA, από τη στατιστική ανάλυση το μόνο που προέκυψε είναι όφελος στο DFS στην πολυπαραγοντική ανάλυση με το cut off στο 50 ( HR:3.27, 95% CI 1.17-9.16, p=0.024), αν και βρέθηκε να εκφράζεται μόνο σε 59 από το σύνολο των δειγμάτων.

Από όσο γνωρίζουμε η διατριβή αυτή είναι η πρώτη που εξετάζει την ανοσοιστοχημική έκφραση ανδρογονικού υποδοχέα (AR), ρυθμιστών σηματοδότησης και δεικτών ενεργότητας της AR οδού και ύπαρξης μεταλλάξεων στον Καρκίνο του Μαστού σε τόσο μεγάλο πληθυσμό

Από τα παραπάνω ευρήματα φαίνεται ότι η έκφραση των FKBP5, TMPRSS2 και PSA σχετίζεται με ένα καλύτερο κλινικό αποτέλεσμα, λαμβάνοντας έτσι ένα προβλεπτικό και προγνωστικό χαρακτήρα κάτι που αποδεικνύεται για πρώτη φορά, ειδικότερα σε τόσο μεγάλο δείγμα ασθενών.

Επιπλέον μέσω της συσχέτισης τους με άλλα μοριακά μονοπάτια, πχ mTOR φαίνεται να διαδραματίζουν η εν λόγω πρωτεΐνες μεγαλύτερο ρόλο από ότι νομίζαμε στην καρκινογένεση και στην ογκοκαταστολή.

Με επαλήθριο αυτή τη διατριβή, μένει πλέον να επιβεβαιωθεί και από άλλες μελέτες ο ρόλος αυτών των βιοδεικτών σαν προγνωστικός, προβλεπτικός και γιατί όχι ο ρόλος τους σαν μόρια προς στόχευση.

Αυτό ειδικότερα αν επιβεβαιωθεί θα βοηθήσει επιπλέον στη υποκατηγορία των τριπλά αρνητικών καρκίνων μαστού που στην παρούσα φάση η μόνη θεραπεία είναι η χημειοθεραπεία.

## 5.SUMMARY

The study population consists of histological blocks of paraffin adenocarcinoma of breast tissue microarrays (TMA) (N = 700). Tissues are derived from patients with T1-4 N0-2 M0 ER any IHC Pg Rany HER2 any tumor treated according to standard therapeutic protocols of HeCOG comprising adjuvant therapy with taxane and / or anthracycline based regimens. Complete clinical and pathological data are available in patient's charts. Of the 700 samples, 646 were evaluable for staining and reading even one of the studied FKBP5, TMPRSS2 and PSA proteins.

Frequency histograms, the score and percentage of cells expressing nuclear FKBP5, cytoplasmic PSA , cytoplasmic and membraneTMPRSS2 were documented and analyzed for normal cut off value identification. Positivity of staining was considered at even 1%. The expression of the respective protein was considered high when it was higher and

lower when it was lower or equal to the optimum cut off value respectively and was studied as a variable agent in the assay.

Analysis of the percentage of cells with positive expression of the above proteins revealed the cut off. For TMPRSS2 the cut off was at 80 for the cytoplasmic PSA of 15 while for the nuclear expression of FKBP5 two cut offs, 65 and 85 were identified, both of which were examined and analyzed for their prognostic and predictive value in the analysis. Similarly, the cut-off of the H-score for TMPRSS2 was set at 100, for PSA 50 and FKBP5 150. In a subset of 78 samples from University Hospital of Ioannina patients, mutations of the AR gene was sought without any positive outcome.

Regarding the clinical outcome, the findings of the study are the following,

The expression of the TMPRSS2 protein with the cut off at 80 in the univariate analysis is associated with a tendency to benefit in the survival-free interval ( $p = 0.072$ , HR: 0.41, 95% CI: 0.15-1.08) and benefit in overall survival ( $p = 0.037$ , HR: 0.3, 95% CI: 0.1 -0.93) in HER2 enriched volumes. In multivariate analysis, we see that the benefit for OS ( $p = 0.037$ , HR: 0.3, 95% CI: 0.1-0.93) is confirmed in these tumors.

For the FKBP5 protein the results are clearer. Briefly, in the univariate analysis, expression of FKBP5 protein was found to have a trend to statistically significant correlation with DFS with cut off 65 (HR: 0.74, 95% CI 0.54-1.03,  $p = 0.072$ ), statistically significant correlation with H score 150 (HR : 0.66, 95% CI 0.5 -0.87,  $p = 0.03$ ) while with respect to OS a statistically significant correlation with H score 150 (HR: 0.61, 95% CI 0.42 - 0.78,  $p < 0.001$ ) was shown. In the multivariate analysis there was a statistically significant correlation of FKBP5 expression with H score 150 for both DFS (HR: 0.61, 95% CI 0.44-0.83,  $p = 0.002$ ) and OS (HR: 0.53, 95% CI 0.37 - 0.75,  $p \leq 0.001$ ).

With regard to the molecular subtypes for Luminal A tumors, there is a trend in favor of DFS with FKBP5 expression with cut off 85 (HR: 0.62, 95% CI 0.36-1.08,  $p = 0.092$ ) and H score 150 (HR: 0.59, 95% CI 0.34-1.04,  $p = 0.067$ ). Multivariate analysis confirmed the benefit in DFS with H score 150 (HR: 0.56, 95% CI 0.32 -0.99,  $p = 0.045$ ).

For Luminal B, FKBP5 expression with H score 150, both in univariate and multivariate, there is a benefit in overall survival (HR: 0.44, 95% CI 0.24 -0.80,  $p = 0.007$ , respectively).

In luminal HER2 tumors, expression of FKBP5 with H score of 150 showed a benefit to OS in both univariate (HR: 0.31, 95% CI 0.12-0.81,  $p = 0.017$ ) and multivariate analysis (HR: 0.32, 95 CI 0.13-0.84,  $p = 0.02$ ). In addition, univariate analysis showed a trend for DFS (HR: 0.49, 95% CI 0.22-1.13,  $p = 0.093$ ).

For TNBC tumors in univariate analysis the expression of FKBP5 protein had statistically significant correlation with DFS with both cut off 85 (HR: 0.44, 95% CI 0.21-0.9,  $p = 0.025$ ) and H score 150 HR: 0.41, 95% CI 0.18-0.93,  $p = 0.032$ ). In multivariate analysis cut-off expression 85 maintained the benefit in DFS (HR: 0.44, 95% CI 0.22 -0.92,  $p = 0.028$ ) with H score 150 tended to benefit in DFS (HR: 0.45, 95% CI 0.2 -1.01,  $p = 0.052$ ).

Finally, for PSA, the statistical analysis resulted in DFS multivariate analysis with cut off at 50 (HR: 3.27, 95% CI 1.17-9.16,  $p = 0.024$ ), although it was found to be expressed only in 59 of all samples.

From the above findings, it appears that the expression of FKBP5, Tmprss2 and PSA is associated with a better clinical outcome, thus obtaining a predictive and predictive character. In addition, through their association with other molecular pathways, such as mTOR, they appear to play a larger role than we thought in carcinogenesis and tumor suppression.

It remains to be confirmed by other studies that the role of these biomarkers is predictive, predictive and why not molecular targets.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Globocan 2012. Fast Stats. Most frequent cancers: both sexes.
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65:87.
3. Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, et al. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med* 2007; 356:1670.
4. Kohler BA, Ward E, McCarthy BJ, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103:714.
5. Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, et al. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med* 2007; 356:1670.
6. Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, et al. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med* 2007; 356:1670.
7. Kohler BA, Sherman RL, Howlader N, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *J Natl Cancer Inst* 2015; 107:djv048. Esserman LJ, Shieh Y, Rutgers EJ, et al. Impact of mammographic screening on the detection of good and poor prognosis breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 130:725.
8. Stavros AT, Thickman D, Rapp CL, et al. Solid breast nodules: use of sonography to distinguish between benign and malignant lesions. *Radiology* 1995; 196:123.
9. Macura KJ, Ouwerkerk R, Jacobs MA, Bluemke DA. Patterns of enhancement on breast MR images: interpretation and imaging pitfalls. *Radiographics* 2006; 26:1719.

10. Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer* 2005; 93:1046.
11. Dillon DA, Guidi AJ, Schnitt SJ. Pathology of invasive breast cancer. In: *Diseases of the Breast*, 4th, Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK (Eds), Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia 2009. p.386.
12. Gasparini G, Pozza F, Harris AL. Evaluating the potential usefulness of new prognostic and predictive indicators in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:1206.
13. Hayes DF, Trock B, Harris AL. Assessing the clinical impact of prognostic factors: when is "statistically significant" clinically useful? *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52:305.
14. Fisher B, Slack NH, Bross ID. Cancer of the breast: size of neoplasm and prognosis. *Cancer* 1969; 24:1071.
15. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63:181.
16. Koscielny S, Tubiana M, Lê MG, et al. Breast cancer: relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination. *Br J Cancer* 1984; 49:709.
17. Weissenbacher TM, Zschage M, Janni W, et al. Multicentric and multifocal versus unifocal breast cancer: is the tumor-node-metastasis classification justified? *Breast Cancer Res Treat* 2010; 122:27.
18. Lynch SP, Lei X, Chavez-MacGregor M, et al. Multifocality and multicentricity in breast cancer and survival outcomes. *Ann Oncol* 2012; 23:3063.
19. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2017; 67:7.
20. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63:181.
21. Andersson Y, Frisell J, Sylvan M, et al. Breast cancer survival in relation to the metastatic tumor burden in axillary lymph nodes. *J Clin Oncol* 2010; 28:2868.
22. de Boer M, van Dijck JA, Bult P, et al. Breast cancer prognosis and occult lymph node metastases, isolated tumor cells, and micrometastases. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102:410.
23. Weaver DL, Ashikaga T, Krag DN, et al. Effect of occult metastases on survival in node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2011; 364:412.
24. Pestalozzi BC, Zahrieh D, Mallon E, et al. Distinct clinical and prognostic features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: combined results of 15 International Breast Cancer Study Group clinical trials. *J Clin Oncol* 2008; 26:3006.
25. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19:403.
26. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH, et al. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* 2008; 26:3153.
27. Singletary SE, Allred C, Ashley P, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20:3628.
28. Pinder SE, Ellis IO, Galea M, et al. Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1994; 24:41.
29. Bartlett JM, Brookes CL, Robson T, et al. Estrogen receptor and progesterone receptor as predictive biomarkers of response to endocrine therapy: a prospectively powered pathology study in the Tamoxifen and Exemestane Adjuvant Multinational trial. *J Clin Oncol* 2011; 29:1531.
30. Colzani E, Liljegren A, Johansson AL, et al. Prognosis of patients with breast cancer: causes of death and effects of time since diagnosis, age, and tumor characteristics. *J Clin Oncol* 2011; 29:4014.
31. Colleoni M, Sun Z, Price KN, et al. Annual Hazard Rates of Recurrence for Breast Cancer During 24 Years of Follow-Up: Results From the International Breast Cancer Study Group Trials I to V. *J Clin Oncol* 2016; 34:927.
32. Insa A, Lluch A, Prosper F, et al. Prognostic factors predicting survival from first recurrence in patients with metastatic breast cancer: analysis of 439 patients. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 56:67.

33. Ferrero-Poüs M, Trassard M, Le Doussal V, et al. Comparison of enzyme immunoassay and immunohistochemical measurements of estrogen and progesterone receptors in breast cancer patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001; 9:267.
34. Chu KC, Anderson WF, Fritz A, et al. Frequency distributions of breast cancer characteristics classified by estrogen receptor and progesterone receptor status for eight racial/ethnic groups. *Cancer* 2001; 92:37.
35. Knoop AS, Bentzen SM, Nielsen MM, et al. Value of epidermal growth factor receptor, HER2, p53, and steroid receptors in predicting the efficacy of tamoxifen in high-risk postmenopausal breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2001; 19:3376.
36. Wenger CR, Beardslee S, Owens MA, et al. DNA ploidy, S-phase, and steroid receptors in more than 127,000 breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 28:9.
37. Falette N, Paperin MP, Treilleux I, et al. Prognostic value of P53 gene mutations in a large series of node-negative breast cancer patients. *Cancer Res* 1998; 58:1451.
38. Elledge RM, Fuqua SA, Clark GM, et al. Prognostic significance of p53 gene alterations in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 26:225.
39. Andrulis IL, Bull SB, Blackstein ME, et al. neu/erbB-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer. Toronto Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1998; 16:1340.
40. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, et al. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol* 1989; 7:1120.
41. Ferrero-Poüs M, Hacène K, Bouchet C, et al. Relationship between c-erbB-2 and other tumor characteristics in breast cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 2000; 6:4745.
42. Bolla M, Chedin M, Souvignet C, et al. Estimation of epidermal growth factor receptor in 177 breast cancers: correlation with prognostic factors. *Breast Cancer Res Treat* 1990; 16:97.
43. Pawlowski V, Révillion F, Hebbar M, et al. Prognostic value of the type I growth factor receptors in a large series of human primary breast cancers quantified with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Clin Cancer Res* 2000; 6:4217.
44. Clark GM, McGuire WL, Hubay CA, et al. Progesterone receptors as a prognostic factor in Stage II breast cancer. *N Engl J Med* 1983; 309:1343.
45. Petit AM, Rak J, Hung MC, et al. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 1997; 151:1523.
46. Chia S, Norris B, Speers C, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *J Clin Oncol* 2008; 26:5697.
47. Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010; 12:R68.
48. Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol* 2004; 203:661.
49. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406:747.
50. Perreard L, Fan C, Quackenbush JF, et al. Classification and risk stratification of invasive breast carcinomas using a real-time quantitative RT-PCR assay. *Breast Cancer Res* 2006; 8:R23.
51. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:10869.
52. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:8418.
53. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:10393.
54. Yu K, Lee CH, Tan PH, Tan P. Conservation of breast cancer molecular subtypes and transcriptional patterns of tumor progression across distinct ethnic populations. *Clin Cancer Res* 2004; 10:5508.

55. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature 2012; 490:61.
56. Fan C, Oh DS, Wessels L, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. N Engl J Med 2006; 355:560.
57. Hu Z, Fan C, Oh DS, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. BMC Genomics 2006; 7:96.
58. Loi S, Haibe-Kains B, Desmedt C, et al. Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. J Clin Oncol 2007; 25:1239.
59. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. J Clin Oncol 2010; 28:1684.
60. O'Brien KM, Cole SR, Tse CK, et al. Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study. Clin Cancer Res 2010; 16:6100.
61. Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. Breast Cancer Res 2010; 12:R68.
62. Teschendorff AE, Miremadi A, Pinder SE, et al. An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. Genome Biol 2007; 8:R157.
63. Luporsi E, André F, Spyrtos F, et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. Breast Cancer Res Treat 2012; 132:895.
64. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. Br J Cancer 2007; 96:1504.
65. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. Breast 2008; 17:323.
66. Polley MY, Leung SC, McShane LM, et al. An international Ki67 reproducibility study. J Natl Cancer Inst 2013; 105:1897.
67. Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. J Clin Oncol 2007; 25:5287.
68. Guiu S, Michiels S, André F, et al. Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. Ann Oncol 2012; 23:2997.
69. E. Senkus, S. Kyriakides, S. Ohno et al. Primary Breast Cancer. Annals of Oncology 26 v8–v30, 2015
70. Petitjean A, Mathe E, Kato S, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. Hum Mutat 2007; 28:622.
71. Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, et al. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. Oncogene 2007; 26:2157.
72. Bonnefoi H, Piccart M, Bogaerts J, et al. TP53 status for prediction of sensitivity to taxane versus non-taxane neoadjuvant chemotherapy in breast cancer (EORTC 10994/BIG 1-00): a randomised phase 3 trial. Lancet Oncol 2011; 12:527.
73. Olivier M, Langerød A, Carrieri P, et al. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. Clin Cancer Res 2006; 12:1157.
74. Emi M, Yoshimoto M, Sato T, et al. Allelic loss at 1p34, 13q12, 17p13.3, and 17q21.1 correlates with poor postoperative prognosis in breast cancer. Genes Chromosomes Cancer 1999; 26:134.
75. Utada Y, Emi M, Yoshimoto M, et al. Allelic loss at 1p34-36 predicts poor prognosis in node-negative breast cancer. Clin Cancer Res 2000; 6:3193.
76. Hui R, Macmillan RD, Kenny FS, et al. INK4a gene expression and methylation in primary breast cancer: overexpression of p16INK4a messenger RNA is a marker of poor prognosis. Clin Cancer Res 2000; 6:2777.
77. Yang X, Yan L, Davidson NE. DNA methylation in breast cancer. Endocr Relat Cancer 2001; 8:115.



78. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Davies C, Godwin J, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. Lancet 2011; 378:771.
79. LHRH-agonists in Early Breast Cancer Overview group, Cuzick J, Ambrosine L, et al. Use of luteinising-hormone-releasing hormone agonists as adjuvant treatment in premenopausal patients with hormone-receptor-positive breast cancer: a meta-analysis of individual patient data from randomised adjuvant trials. Lancet 2007; 369:1711.
80. Davidson NE, O'Neill AM, Vukov AM, et al. Chemoendocrine therapy for premenopausal women with axillary lymph node-positive, steroid hormone receptor-positive breast cancer: results from INT 0101 (E5188). J Clin Oncol 2005; 23:5973.
81. Arriagada R, Lê MG, Spielmann M, et al. Randomized trial of adjuvant ovarian suppression in 926 premenopausal patients with early breast cancer treated with adjuvant chemotherapy. Ann Oncol 2005; 16:389.
82. Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. J Clin Oncol 2007; 25:5287.
83. Dawood S, Broglio K, Buzdar AU, et al. Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review. J Clin Oncol 2010; 28:92.
84. Balduzzi S, Mantarro S, Guarneri V, et al. Trastuzumab-containing regimens for metastatic breast cancer. Cochrane Database Syst Rev 2014; :CD006242.
85. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. J Clin Oncol 1999; 17:2639.
86. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl J Med 2001; 344:783.
87. Mass RD, Press MF, Anderson S, et al. Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. Clin Breast Cancer 2005; 6:240.
88. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. N Engl J Med 2005; 353:1673.
89. Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. N Engl J Med 2011; 365:1273.
90. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl J Med 2001; 344:783.
91. Verma S, Miles D, Gianni L, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. N Engl J Med 2012; 367:1783.
92. Baselga J, Cortés J, Kim SB, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. N Engl J Med 2012; 366:109.
93. Peto R, Davies C et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. Lancet 2012; 379: 432–444.
94. Blamey RW, Pinder SE, Ball GR et al. Reading the prognosis of the individual with breast cancer. Eur J Cancer 2007; 43: 1545–1547
95. Tolaney SM, Barry WT, Dang CT et al. Adjuvant paclitaxel and trastuzumab for node-negative, HER2-positive breast cancer. N Engl J Med 2015; 372: 134–141.
96. Berry DA, Cirincione C, Henderson IC et al. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. JAMA 2006; 295: 1658–1667.
97. Harbeck N, Sotlar K, Wuerstlein R, Doisneau-Sixou S. Molecular and protein markers for clinical decision making in breast cancer: today and tomorrow. Cancer Treat Rev 2014; 40: 434–444.
98. Association of Breast Surgery at Baso 2009. Surgical guidelines for the management of breast cancer. Eur J Surg Oncol 2009; 35(Suppl 1): 1–22.
99. Schnitt SJ, Moran MS, Houssami N, Morrow M. The Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology Consensus Guideline on margins for breast-conserving surgery with whole-breast irradiation in stages I and II invasive breast cancer: perspectives for pathologists. Arch Pathol Lab Med 2015; 139: 575–577.

100. S. Coates, E. P. Winer, A. Goldhirsch et al. Tailoring therapies improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015
101. [Burstein HJ, Lacchetti C, Anderson H, et al. Adjuvant Endocrine Therapy for Women With Hormone Receptor-Positive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update on Ovarian Suppression. J Clin Oncol 2016; 34:1689.](#)
102. [Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group \(EBCTCG\), Peto R, Davies C, et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. Lancet 2012; 379:432.](#)
103. [Shulman LN, Cirincione CT, Berry DA, et al. Six cycles of doxorubicin and cyclophosphamide or Paclitaxel are not superior to four cycles as adjuvant chemotherapy for breast cancer in women with zero to three positive axillary nodes: Cancer and Leukemia Group B 40101. J Clin Oncol 2012; 30:4071.](#)
104. [Jones SE, Savin MA, Holmes FA, et al. Phase III trial comparing doxorubicin plus cyclophosphamide with docetaxel plus cyclophosphamide as adjuvant therapy for operable breast cancer. J Clin Oncol 2006; 24:5381.](#)
105. [Moja L, Tagliabue L, Balduzzi S, et al. Trastuzumab containing regimens for early breast cancer. Cochrane Database Syst Rev 2012; :CD006243.](#)
106. R Ferraldeschi, J Welti, J Luo et al. Targeting the androgen receptor pathway in castration-resistant prostate cancer: progresses and prospects. *Oncogene*. 2015 April 2; 34(14): 1745–1757.
107. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 2005; 310:644–648. [PubMed: 16254181]
108. Palanisamy N, Ateeq B, Kalyana-Sundaram S, Pflueger D et al. Rearrangements of the RAF kinase pathway in prostate cancer, gastric cancer and melanoma. *Nat Med*. 2010; 16:793–798. [PubMed: 20526349]
109. Galat A. Functional drift of sequence attributes in the FK506-binding proteins (FKBPs). *J Chem Inf Model*. 2008; 48:1118–1130.
110. Wu B, Li P, Liu Y, Lou Z, Ding Y, Shu C, Ye S, Bartlam M, Shen B, Rao Z. 3D structure of human FK506-binding protein 52: implications for the assembly of the glucocorticoid receptor Hsp90/immunophilin heterocomplex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:8348–8353.
111. Donna I. Cioffi, Tina R. Hubler, and Jonathan G. Scammell. Organization and function of the fkbp52 and fkbp51 genes. *Curr Opin Pharmacol*. 2011 August ; 11(4): 308–313.
112. Mitchell G. Lawrence, John Lai, Judith A. Clements. Kallikreins on Steroids. Structure, Function and hormonal regulation of Prostate specific antigen. *Endocrine Reviews* 31: 407 – 446, 2010
113. Weimar IS, Miranda N, Muller EJ, Hekman A, Kerst JM, de Gast GC, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells (CD34+). *Exp Hematol*. 1998; 26:885–94.
114. Knudsen BS, Gmyrek GA, Inra J, Scherr DS, Vaughan ED, Nanus DM, et al. High expression of the Met receptor in prostate cancer metastasis to bone. *Urology*. 2002; 60:1113–7.
115. Gordon MS, Vogelzang NJ, Schoffski P, Daud A, Spira AI, O'Keeffe BA, et al. Activity of cabozantinib (XL184) in soft tissue and bone: Results of a phase II randomized discontinuation trial (RDT) in patients (pts) with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*. 2011; 29:3010.
116. Tanaka H, Kono E, Tran CP, Miyazaki H, Yamashiro J, Shimomura T, et al. Monoclonal antibody targeting of N-cadherin inhibits prostate cancer growth, metastasis and castration resistance. *Nature medicine*. 2010; 16:1414–20.
117. Beltran H, Tomlins S, Aparicio A, Arora V, Rickman D, Ayala G, et al. Aggressive variants of castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014; 20:2846–50.
118. McNamara KM, Moore NL, Hickey TE, Sasano H, Tilley WD. Complexities of androgen receptor signalling in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2014; 21:T161–T181
119. Dorgan JF, Stanczyk FZ, Kahle LL, Brinton LA. Prospective case-control study of premenopausal serum estradiol and testosterone levels and breast cancer risk. *Breast Cancer Res*. 2010; 12:R98.
120. Safarpour D, Pakneshan S, Tavassoli FA. Androgen receptor (AR) expression in 400 breast carcinomas: is routine AR assessment justified? *American Journal of Cancer Research*. 2014; 4:353–368.
121. Choi JE, Kang SH, Lee SJ, Bae YK. Androgen receptor expression predicts decreased survival in early stage triple-negative breast cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2015; 22:82–89.

122. Witzel I, Graeser M, Karn T, Schmidt M, Wirtz R, Schutze D, Rausch A, Janicke F, Milde-Langosch K, Muller V. Androgen receptor expression is a predictive marker in chemotherapy-treated patients with endocrine receptor-positive primary breast cancers. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013; 139:809–816.
123. Doane AS, Danso M, Lal P, Donaton M, Zhang L, Hudis C, Gerald WL. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene*. 2006; 25:3994–4008.
124. Lehmann BD, Pietenpol JA. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes. *J Pathol*. 2014; 232:142–150.
125. Fioretti FM, Sita-Lumsden A, Bevan CL, Brooke GN. Revising the role of the androgen receptor in breast cancer. *J Mol Endocrinol*. 2014; 52: R257–R265.
126. Arslan C, Isik M, Guler G, Kulac I, Solak M, Turker B, Ozisik Y, Altundag K. Does androgen receptor have a prognostic role in patients with estrogen/progesterone-negative and c-erbB-2-positive breast cancer? *Am Surg*. 2012; 78:992–999.
127. Todd Miller, James Forbes, Chirayu Shah et al. Inhibition of mTOR is required for optimal antitumor effect of HER2 inhibitors against HER2 over expressing cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2009 December 1; 15(23): 7266–7276
- 128.** Perez EA, Romond EH, Suman VJ, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J Clin Oncol* 2014; 32:3744.
129. Michael C. Haffner, Angelo M. De Marzo, Alan K. Meeker. Transcription-induced DNA double strand breaks: both oncogenic force and potential therapeutic target? *Clin Cancer Res*. 2011 June 15; 17(12): 3858–3864.
130. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7:233–45.
131. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 2005; 310:644–8.
132. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009; 461:1071–8.
- 133.** Luostari K, Hartikainen JM, Tengström M et al. Type II transmembrane serine protease gene variants associate with breast cancer. *PLoS One*. 2014 Jul 16;9(7):e102519
134. Fox BP, Kandpal RP (2009) EphB6 receptor significantly alters invasiveness and other phenotypic characteristics of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 28:1706–1713.
- 135.** Bhushan L, Kandpal RP. EphB6 receptor modulates micro RNA profile of breast carcinoma cells. *PLoS One*. 2011;6(7):e22484
136. Fox BP, Kandpal RP (2004) Invasiveness of breast carcinoma cells and transcript profile: Eph receptors and ephrin ligands as molecular markers of potential diagnostic and prognostic application. *Biochem Biophys Res Commun* 318: 82–892.
137. Fox BP, Kandpal RP (2006) Transcriptional silencing of EphB6 receptor tyrosine kinase in invasive breast carcinoma cells and detection of methylated promoter by methylation specific PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 340: 268–276.
138. Nagaraja AK, Creighton CJ, Yu Z, Zhu H, Gunaratne PH, et al. (2010) A link between mir-100 and FRAP1/mTOR in clear cell ovarian cancer. *Mol Endocrinol* 24: 447–463.
139. Li L, Lou Z, Wang L (2011) The role of FKBP5 in cancer aetiology and chemoresistance. *Br J Cancer* 104: 19–23.
140. Okadome T, Oeda E, Saitoh M, Ichijo H, Moses HL, et al. (1996) Characterization of the interaction of FKBP12 with the transforming growth factor-beta type I receptor in vivo. *J Biol Chem* 271: 21687–21690.
141. Bhushan L, Kandpal RP (2011) EphB6 Receptor Modulates Micro RNA Profile of Breast Carcinoma Cells. *PLoS ONE* 6(7): e22484.
142. Andersen CL, Christensen LL, Thorsen K, Schepeler T, Sorensen FB, et al. Dysregulation of the transcription factors SOX4, CBFβ and SMARCC1 correlates with outcome of colorectal cancer. *Br J Cancer* 100: 511–523.
143. Stopka T, Zakova D, Fuchs O, Kubrova O, Blafkova J, et al. (2000) Chromatin remodeling gene SMARCA5 is dysregulated in primitive hematopoietic cells of acute leukemia. *Leukemia* 14: 1247–1252.

144. Klein A, Wessel R, Graessmann M, Jurgens M, Petersen I, et al. (2007) Comparison of gene expression data from human and mouse breast cancers: identification of a conserved breast tumor gene set. *Int J Cancer* 121: 683–688.
145. Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin SF, et al. (2007) MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol* 8: R214.
146. Kinyamu HK, Collins JB, Grissom SF, Hebbar PB, Archer TK (2008) Genome wide transcriptional profiling in breast cancer cells reveals distinct changes in hormone receptor target genes and chromatin modifying enzymes after proteasome inhibition. *Mol Carcinog* 47: 845–885.
147. Li L, Lou Z, Wang L (2011) The role of FKBP5 in cancer aetiology and chemoresistance. *Br J Cancer* 104: 19–23.
148. Okadome T, Oeda E, Saitoh M, Ichijo H, Moses HL, et al. (1996) Characterization of the interaction of FKBP12 with the transforming growth factor-beta type I receptor in vivo. *J Biol Chem* 271: 21687–21690.
149. Khatua S, Peterson KM, Brown KM, Lawlor C, Santi MR, et al. (2003) Overexpression of the EGFR/FKBP12/HIF-2alpha pathway identified in childhood astrocytomas by angiogenesis gene profiling. *Cancer Res* 63:1865–1870.
150. Jin G, Yamazaki Y, Takuwa M, Takahara T, Kaneko K, et al. (2007) Trib1 and Evi1 cooperate with Hoxa and Meis1 in myeloid leukemogenesis. *Blood* 109: 3998–4005.
151. Puiiffe ML, Le Page C, Filali-Mouhim A, Zietarska M, Ouellet V, et al. (2007) Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an in vitro model of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia* 9: 820–829.
152. Pratt WB. The role of the hsp-90 based chaperon system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997; 37:297-326
153. Le Bihan S, Marsaud V, Mercier-Bodard C, Baulieu EE, Mader S, White JH, Renoir JM. Calcium/calmodulin kinase inhibitors and immunosuppressant macrolides rapamycin and FK506 inhibit progesterin- and glucocorticosteroid receptor-mediated transcription in human breast cancer T47D cells. *Mol Endocrinol.* 1998; 12: 986–1001.
- 154.19. Ni L, Yang CS, Gioeli D, Frierson H, Toft DO, Paschal BM. FKBP51 Promotes Assembly of the Hsp90 Chaperone Complex and Regulates Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer Cells. *Mol Cell Biol.* 2010; 30: 1243–1253.
- 155.20. Rees-Unwin KS, Craven RA, Davenport E, Hanrahan S, Totty NF, Dring AM, Banks RE, Morgan GJ, Davies FE. Proteomic evaluation of pathways associated with dexamethasone-mediated apoptosis and resistance in multiple myeloma. *Brit J Haematol.* 2007; 139:559–567.
- 156.21. Romano MF, Avellino R, Petrella A, Bisogni R, Romano S, Venuta S. Rapamycin inhibits doxorubicin-induced NF-kappaB/Rel nuclear activity and enhances the apoptosis of melanoma cells. *Eur J Cancer.* 2004; 40:2829–2836.
- 157.22. Avellino R, Romano S, Parasole R, Bisogni R, Lamberti A, Poggi V, Venuta S, Romano MF. Rapamycin stimulates apoptosis of childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood.* 2005; 106:1400–1406.
- 158.23. Romano S, D'Angelillo A, Pacelli R, Staibano S, De Luna E, Bisogni R, Eskelinen EL, Mascolo M, Cali G, Arra C, Romano MF. Role of FK506-binding protein 51 in the control of apoptosis of irradiated melanoma cells. *Cell Death Diff.* 2010; 17:145–157.
159. Li L, Fridley BL, Kalari K, Jenkins G, Batzler A, Weinshilboum RM, Wang L. Gemcitabine and arabinosylcytosin pharmacogenomics: genome-wide association and drug response biomarkers. *PLoS One.* 2009;4:e7765.
160. Pei H, Li L, Fridley B.L, Jenkins G.D, Kalari K.R, Lingle W, Petersen G, Lou Z, Wang L. FKBP51 affects cancer cell response to chemotherapy by negatively regulating Akt. *Cancer Cell.* 2009; 16:259–266.
161. Dibble CC, Manning BD. A Molecular Link between AKT Regulation and Chemotherapeutic Response. *Cancer Cell.* 2009; 16:178–180.
162. Manin M, Baron S, Goossens K, Beaudoin C, Jean C, Veyssiere G, Verhoeven G, Morel L. Androgen receptor expression is regulated by the phosphoinositide 3-kinase/ Akt pathway in normal and tumoral epithelial cells. *Biochem J.* 2002; 366:729–736.
163. Lin HK, Wang L, Hu YC, Altuwajiri S, Chang C. Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *EMBO J.* 2002; 21:4037–4048.
164. Mashkooor FC, Al-Asadi JN, Al-Naama LM. Serum level of prostate-specific antigen (PSA) in women with breast cancer. *Cancer Epidemiol.* 2013 Oct;37(5):613-8
165. Jahir ET, Devi R, Borthakur BB. Study of Serum Total PSA and Free PSA as an Oncological Marker in Breast Tumour. *J Clin Diagn Res.* 2017 Mar;11(3):BC13-BC16



