

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ВЗАИМОСВЯЗИ ПАРАТГОРМОН-РОДСТВЕННОГО ПРОТЕИНА И РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Курзанов А.Н.¹, Быков И.М.¹, Ледванов М.Ю.², Филиппов Е.Ф.¹, Шатохина А.С.³, Цымбалов О.В.¹

¹ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, e-mail: kurzanov@mail.ru;

²ООО «Оргметодотдел АЕ»;

³ГБОУ «Клинический онкологический диспансер № 1» Министерства здравоохранения Краснодарского края, Краснодар

Благодаря прогрессу молекулярной и системной биологии, биохимии и геномики в последние десятилетия понимание этиологии и патогенеза рака молочной железы значительно расширилось. В представленном обзоре приведена существующая информация об участии паратгормон-родственного протеина (ПТГрП) в патобиохимических и патофизиологических механизмах, связанных с возникновением и развитием рака молочной железы, его метастазированием и влиянием на апоптоз клеток опухоли. Приведены интересные данные о том, что пролиферативные эффекты паратгормон-родственного протеина в клетках рака молочной железы опосредованы регуляцией клеточного цикла и апоптоза, что акцентирует внимание на паратгормон-родственном протеине как потенциальном факторе, определяющем предрасположенность к раку молочной железы. Клинические и экспериментальные данные указывают на то, что опухолевый паратгормон-родственный протеин является основным фактором, индуцирующим остеокластическую резорбцию кости в локусах метастатического рака молочной железы, что создает благоприятные условия для развития, и таким образом участвует в аутокринной регуляции роста опухоли. Практическая значимость: представленные в обзоре данные свидетельствуют, что паратгормон-родственный белок может быть полезным прогностическим маркером рака молочной железы, а контроль продукции ПТГрП при раке молочной железы может быть терапевтически полезным. Заключительные замечания отражают данные литературы о существующих и потенциальных возможностях использования современных представлений о паратгормон-родственном белке в клинической практике при раке молочной железы в диагностических целях, а также в качестве мишени для противораковой терапии.

Ключевые слова: паратгормон-родственный протеин (ПТГрП), рак молочной железы.

CURRENT CONCEPT OF THE CORRELATION BETWEEN PARATHORMONE-RELATED PROTEIN AND BREAST CANCER

Kurzanov A.N.¹, Bykov I.M.¹, Ledvanov M.Y.², Filippov E.F.¹, Shatokhina A. S.³, Tsymbalov O.V.¹

¹Kuban State Medical University, Krasnodar, e-mail: kurzanov@mail.ru;

²ООО «Orgmethodotdel AE»;

³SBHI COD-1 State Budgetary Healthcare Organisation «Clinical Oncology Disptnsary № 1», Krasnodar

Thanks to advances in molecular and systems biology, biochemistry and genomics, the understanding of the etiology and pathogenesis of breast cancer has significantly expanded in recent decades. This review provides existing information on the involvement of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in pathobiochemical and pathophysiological mechanisms associated with the development of breast cancer, its metastasis, and the effect on apoptosis of tumor cells. The concluding remarks reflect the academic literature data on the existing and potential possibilities of using modern concepts of the parathyroid hormone-related protein in clinical practice for diagnostic purposes in patients suffering from breast cancer, as well as a target for anticancer therapy. Thanks to advances in molecular and systems biology, biochemistry and genomics, the understanding of the etiology and pathogenesis of breast cancer has significantly expanded in recent decades. This review provides existing information on the involvement of parathyroid hormone-related protein in pathobiochemical and pathophysiological mechanisms associated with the development of breast cancer, its metastasis, and the effect on apoptosis of tumor cells. The concluding remarks reflect the academic literature data on the existing and potential possibilities of using modern concepts of the parathyroid hormone-related protein in clinical practice for diagnostic purposes in patients suffering from breast cancer, as well as a target for anticancer therapy.

Keywords: parathyroid hormone-related protein (PTHrP), breast cancer.

В течение многих лет рак молочной железы представляется наиболее распространенным онкологическим заболеванием у женщин во всем мире [1, 2], затрагивающим примерно 12% женщин и являющимся причиной почти 14% всех смертельных случаев, связанных с раком [3]. Рак молочной железы представляет собой гетерогенную совокупность различных злокачественных новообразований с различными подтипами, основанными на их молекулярном профиле [4, 5]. Существуют убедительные доказательства того, что паратгормон-родственный протеин (ПТГрП) вносит очень значительный вклад в патофизиологию рака молочной железы [6]. Рак молочной железы был одной из исходных опухолей, из которых был очищен и секвенирован ПТГрП, из-за повышенной концентрации его циркулирующей формы [7]. Обнаружено, что ПТГрП экспрессируется примерно в двух третях первичного рака молочной железы [8]. Исследования клеточных линий рака молочной железы человека (и иммунологические, и *in situ* гибридизационные) показали, что неоплазированные эпителиальные клетки экспрессируют как ПТГрП, так и рецептор РТН1R [9]. Установлено, что 100% обследованных инвазивных карцином молочной железы имели иммунореактивность ПТГрП, а 96% реагировали с антителами против рецептора РТН1R [10]. Недавние исследования показали критическую роль ПТГрП в инициации, росте и метастазировании рака молочной железы [11]. Многими иммуногистохимическими исследованиями выявлено значительное количество клеток, окрашенных положительно на ПТГрП, при карциноме молочной железы [12]. В исследованиях с использованием моноклональных антител обнаружены значительные количества иммунореактивного ПТГрП в 100% протестированных инвазивных карцином [13]. Аналогичным образом при раке молочной железы был обнаружен рецептор РТН1R [9, 14].

Во многих исследованиях продемонстрирована роль ПТГрП в пролиферации клеток и апоптозе [15, 16, 17]. Полагают, что пролиферативные эффекты ПТГрП в клетках рака молочной железы опосредованы регуляцией клеточного цикла и апоптоза и что контроль продукции ПТГрП при раке молочной железы может быть терапевтически полезным [18]. Присутствие иммунореактивности ПТГрП при многих видах рака молочной железы обусловило предположение, что данный белок обладает аутокринным эффектом на рост опухоли. Исследования *in vitro* идентифицировали ПТГрП в первичных культурах опухолей молочной железы и в клеточных линиях рака молочной железы [19, 20, 21]. Эндогенный ПТГрП, по-видимому, стимулирует пролиферацию различных клеточных линий карциномы [22]. Влияние различных доменов ПТГрП на пролиферативное поведение клеток линии 8701-BC, происходящей от первичной протоковой инфильтрирующей карциномы молочной железы человека, протестировали [23, 24]. Полученные результаты показали, что ПТГрП (67–86) и, что более заметно, ПТГрП (107–138) и ПТГрП (1–34) в разной степени проявляли

антипролиферативные, но проинвазивные эффекты, которые были отменены при инкубации с антителом против ПТГрП. Предполагают, что злокачественная трансформация клеток молочной железы может индуцироваться фрагментом ПТГрП, содержащим последовательность ядерной локализации (NLS) [18, 25, 26]. Митогенные эффекты ПТГрП связывают с интракринным действием, поскольку мутация NLS-области ПТГрП устраняет апоптотический и пролиферативный ответ, а экзогенный ПТГрП не оказывает влияния [15]. Кроме того, эксперименты с клональными клеточными линиями, которые были выделены из родительской линии 8701-BC и наделены различными пролиферативными и инвазивными свойствами, *in vitro* продемонстрировали гетерогенность роста и инвазивного ответа различных субпопуляций на введение фрагментов ПТГрП, что свидетельствует о существовании сложных взаимодействий ПТГрП с клетками рака молочной железы в пораженной ткани [27]. В работе [28] было доказано, что введение фрагмента срединного региона ПТГрП (38–94) заметно снижает пролиферацию, инвазивность и рост клеток рака молочной железы *in vitro* и *in vivo*, тем самым представляя привлекательную мишень для молекулярного моделирования активных противоопухолевых агентов. Противоположные результаты, т.е. стимулирование роста, было обнаружено с использованием ER-позитивной линии клеток MCF-7. В частности, исследование влияния различных N-концевых доменов ПТГрП на клетки, трансфицированные рецептором эпидермального фактора роста (EGFR), продемонстрировало, что рецептор индуцирует активацию ERK через ерегулин $\beta 1$ и ПТГрП, а также ERK и PKC индуцирует митогенные эффекты через MAPKs, таким образом, потенциально объясняющие ПТГрП-зависимые пролиферативные эффекты [29].

Предполагают, что клетки рака молочной железы могут способствовать собственному росту путем продукции ПТГрП с помощью положительного механизма обратной связи. Роль экспрессии ПТГрП в модели рака молочной железы на животных, индуцированного онкогеном полиомавируса со средним T-антигеном (PvMT), который может индуцировать различные подтипы опухоли, когда широко экспрессируется в эпителиальных клетках молочной железы мыши, изучили [30]. Авторы использовали вирус опухоли молочной железы мыши (MMTV) / пеп трансгенных мышей (трансген MMTV-Cre) для нацеливания на ген ПТГрП в эпителиальных клетках молочной железы и обнаружили, что, хотя потеря экспрессии ПТГрП не влияет на частоту возникновения опухоли, она значительно увеличивает латентность опухоли, замедляет рост опухоли и уменьшает метастазы. Сдерживание роста опухоли коррелировало с уменьшением пролиферации и повышенным апоптозом, возможно, из-за изменений в циклине D₁, протеинкиназы B 1 и 2 и экспрессии B-клеточной лимфомы 2. Снижение метастазов, возможно, было связано со снижением экспрессии CXС-хемокинового рецептора 4 и ингибированием ангиогенеза. Авторы разработали блокирующее антитело к

ПТГрП и продемонстрировали, что оно может ингибировать рост первичной опухоли и метастазы в легких на модели ксенотрансплантата. Эти данные свидетельствуют о том, что ПТГрП в существенной мере способствует образованию опухолей при раке молочной железы, и помогают пониманию того, как ПТГрП может изменять восприимчивость к онкопатологии. В аналогичном исследовании [31] получены противоположные результаты, демонстрирующие, что разрушение гена ПТГрП увеличивало частоту опухолей у мышей MMTV-Neu, что согласуется с клиническим исследованием из Австралии [32]. Полагают, что молекулярный контекст, по-видимому, имеет решающее значение для определения действий ПТГрП. Хотя и MMTV-Neu, и MMTV-PyMT являются моделями рака люминального типа, пути их трансформации существенно различаются, и другие молекулы также оказывают различное влияние на формирование этих двух вариантов опухоли [33, 34]. Выяснение, почему ПТГрП производит противоположные эффекты в этих двух моделях, вероятно, даст важные подсказки для понимания молекулярной природы его эффектов при раке молочной железы [6].

ПТГрП может изменять восприимчивость клеток к апоптозу путем изменения соотношения анти- и проапоптотических факторов, включая членов семейства генов Bcl-2. Было показано, что ПТГрП индуцирует активацию проапоптотических генов Bcl-xS, Bad, Rip1 и активирует экспрессию каспаз -2, -5, -6, -7 и -8 в клетках линии MDA-MB-231 [17]. Соотношение белков, регулирующих апоптоз, Bcl-2 к Bax и Bcl-X_L к Bax было выше в клетках рака молочной железы, сверхэкспрессирующих ПТГрП [18]. Показано, что интракринный ПТГрП защищает от апоптоза, вызванного голоданием, в клетках рака молочной железы линии MCF-7 [18]. Сверхэкспрессия ПТГрП защищает эпителиальные клетки молочной железы от апоптоза, вызванного активацией чувствительного к кальцию рецептора [35]. Избыточная экспрессия ПТГрП повышает чувствительность клеток рака молочной железы к апоптозу, вызванному связыванием апоптоз-индуцирующего лиганда Apo2L / TRAIL с рецептором TRAIL-R2.

Паратгормон-родственный протеин при инвазивном раке молочной железы

Рак молочной железы, как и многие другие солидные опухоли, начинается как местное заболевание, но может распространяться на лимфатические узлы и отдаленные органы, формируя метастатический рак молочной железы [36]. Метастазы в кости, легкие и другие органы являются распространенными и катастрофическими последствиями прогрессирования рака молочной железы. Большинство пациентов умирают не от первичной опухоли, а от раковой инвазии в дистальные участки [37]. Отдаленные метастазы развиваются у 10–15% пациентов с раком молочной железы в течение 3 лет после выявления первичной опухоли. Зафиксированы случаи проявления метастазов на отдаленных участках через 10 и более лет

после постановки первоначального диагноза. Таким образом, пациенты с раком молочной железы подвергаются риску развития метастазов в течение всей своей жизни [36, 38]. При раке молочной железы характерно преимущественное метастазирование в кость (частота встречаемости на уровне 47–60%), печень (частота встречаемости на уровне 19–20%), легкое (частота встречаемости на уровне 16–34%) и мозг (частота встречаемости на уровне 10–16%) [39, 40, 41].

Детальные механизмы, лежащие в основе метастазирования рака молочной железы, не вполне понятны, но существующие данные свидетельствуют о взаимосвязи между распространением опухолевых клеток и микроокружением тканей органов, которые они колонизируют. Этот фактор играет ключевую роль в определении того, могут ли распространяющиеся опухолевые клетки выживать и расти с образованием метастатических опухолей [36, 38, 42]. Диссеминированные клетки, которые выживают после воздействия проапоптотических сигналов в их новой среде, часто остаются в состоянии покоя во вторичных органах, выходя из пролиферативного цикла на неопределенный период или достигая сбалансированного состояния пролиферации и апоптоза. Последующий выход из состояния покоя является результатом дальнейшей эволюции выживших диссеминированных клеток, накапливающих молекулярные изменения. Приобретая эти характеристики, метастатические популяции могут оптимально адаптироваться к микросреде хозяина и инициировать колонизацию [43]. Предполагается, что латентная фаза онкогенеза молочной железы может включать распространение клеток рака молочной железы на ранней, предсимптомной стадии развития первичной опухоли, когда диссеминированные раковые клетки остаются необнаруженными в костном мозге в течение многих лет, прежде чем начнут проявлять клинически идентифицируемые признаки [44, 45].

Клетки рака молочной железы продуцируют хемокиновые рецепторы, которые способствуют адгезии к специфическим клеткам, представляющим соответствующий поверхностный лиганд (известный лиганд для CXCR4 – это CXCL12). Органы с самой высокой экспрессией CXCL12 коррелируют с наиболее распространенными участками метастазирования рака молочной железы [46]. CXCR4 был идентифицирован в качестве сигнатурного гена при первичном раке молочной железы, экспрессирующего метастазирование кости [47, 48]. Исследование пациентов с раком молочной железы, у которых развились метастазы в скелет, подтвердило общую повышенную экспрессию как ПТГрП, так и CXCR4 [49]. Исследования с использованием анти-ПТГрП антител показали угнетение костного обмена и остеолитических метастазов [20]. У мышей, несущих ПТГрП-положительные ксенотрансплантаты рака молочной железы человека, антитела против ПТГрП снижали как первичный рост, так и развитие метастатической опухоли в легких.

Представленные данные [30] демонстрируют, что в модели рака молочной железы ПТГрП играет роль фактора, способствующего инициации, прогрессированию и метастазированию опухоли, частично через активацию путей CXCR4 и PKB (протеинкиназа B), которые имеют решающее значение при множестве клеточных процессов, включая апоптоз, пролиферацию клеток, транскрипцию и миграцию клеток.

***Роль паратгормон-родственного протеина в развитии метастазов рака
молочной железы в кости***

Кость является основным участком метастазирования рака молочной железы [50]. Механизмы, лежащие в основе этого остеотропизма, включают в себя некоторые характеристики как клеток рака молочной железы, так и костного матрикса, в который метастазируют эти опухоли. Клетки рака молочной железы должны обладать определенными свойствами, которые позволяют им расти в кости, а костный матрикс обеспечивает подходящую микросреду, которая способствует росту этих клеток. На всех этапах в развитии метастазов участвуют различные молекулы, в том числе: молекулы инициации метастазирования, такие как матриксные металлопротеиназы и фактор роста эндотелия сосудов [38, 51], и молекулы вирулентности метастазирования, такие как ПТГрП, интерлейкин 8 (IL-8), молекула 1 адгезии сосудистых клеток (VCAM-1) [20, 52, 53]. Среди этих молекул IL-8, VCAM-1 и ПТГрП являются факторами, участвующими в формировании и развитии костных метастазов. Определенные особенности раковых клеток считаются необходимыми для метастатического поражения кости. Одна из наиболее важных характеристик – это способность вырабатывать ПТГрП [37, 54, 55]. ПТГрП играет значительную роль в патофизиологических механизмах костного метастазирования. Существуют убедительные доказательства того, что ПТГрП способствует метастазированию в кости [20]. При раке молочной железы ПТГрП был обнаружен у 92% пациентов с метастатическим поражением костей [56, 57], что указывает на важность ПТГрП для прогрессирования метастазирования в кости [8, 56]. В многочисленных исследованиях зафиксирована продукция ПТГрП клетками костных метастазов рака молочной железы. ПТГрП был обнаружен иммуногистохимией [56] и гибридизацией *in situ* [58] в 92% костных метастазов рака молочной железы по сравнению только с 17% метастазов, локализованных вне кости. Клинические и экспериментальные данные указывают на то, что опухолевый ПТГрП является основным фактором, индуцирующим остеокластическую резорбцию кости в локусах метастатического рака молочной железы [56, 59]. Это позволило предположить, что выработка ПТГрП может способствовать возникновению остеолитических метастазов рака молочной железы и активировать локальный остеолитиз в участках кости, прилегающих к костным метастазам, что

создает благоприятные условия для развития, и таким путем ПТГрП участвует в аутокринной регуляции роста опухоли.

Костный метастаз рака молочной железы может развиваться через ряд взаимодействий в микроокружении опухоли, известных как «порочный круг»: в этом цикле ПТГрП играет важную роль. Опухолевые клетки секретируют факторы, которые стимулируют активацию остеобластов и остеокластов. Костный матрикс содержит множество факторов роста, высвобождающихся при резорбции кости. Среди них трансформирующий фактор роста β (TGF- β) и Ca^{2+} связываются соответственно с рецептором TGF- β и кальций-чувствительным рецептором раковых клеток, стимулируя выработку ПТГрП [60, 61]. Секретируемый опухолевыми клетками ПТГрП стимулирует производство остеобластами одного из ключевых активаторов остеокластов мембранно-связанного цитокина – лиганда рецепторного активатора экспрессии ядерного фактора $\kappa\beta$ (RANKL), который связывается с рецепторным активатором экспрессии ядерного фактора $\kappa\beta$ (RANK) и тем самым способствует дифференцировке незрелых остеокластов в зрелые остеокласты [62]. Наконец, резорбция кости осуществляется зрелыми активированными остеокластами, завершая «порочный круг», который ускоряет резорбцию кости, что совпадает с ростом метастатического поражения кости, стимулируемого также и другими факторами [63, 64]. Активированные остеокласты деградируют матрицу кости, продуцируя в местное микроокружение факторы роста, стимулирующие опухолевые клетки для продолжения секреции ПТГрП. Резорбированная кость высвобождает TGF- β , который стимулирует пролиферацию опухолевых клеток и, следовательно, увеличивает секрецию ПТГрП, тем самым возобновляя пул взаимодействий в микроокружении опухоли и продолжая формирование нового цикла «порочного круга» [60].

Показано, что ПТГрП может участвовать в метастазировании рака молочной железы независимо от его роли в усилении остеокластической функции. ПТГрП играет важную роль в модулировании ангиогенного и костного остеолитического действия VEGF [65]. Кроме того, ПТГрП усиливает экспрессию в клетках рака молочной железы матриксной металлопротеиназы-13, которая может разрушать костный матрикс, таким способом добавляя дополнительные инвазивные признаки метастатическому процессу в кости [66]. Эти данные демонстрируют, что ПТГрП представляет собой рациональную цель для исследования возможностей лечения метастазов в кости при раке молочной железы. В мышинной модели нейтрализующие антитела против ПТГрП уменьшали как размер остеолитических повреждений, так и площадь опухоли в кости [67]. Гуманизированное моноклональное антитело, нацеленное на ПТГрП, находилось в разработке в Японии [68]. В экспериментах с использованием линии клеток рака молочной железы человека MDA-MB-231 показано [69], что лигнаны тетрагидрофуранового типа, полученные из цветков магнолии, обычно

используемых в традиционной азиатской медицине для лечения воспалительных заболеваний, могут блокировать опосредованную раком молочной железы потерю костной массы. Асхатин, фаргезин, диметиловый эфир лириорезинола В и магнолин в нецитотоксических концентрациях подавляли экспрессию мРНК и секрецию ПТГрП в метастатических клетках рака молочной железы человека MDA-MB-231. Асхатин, магнолин, фаргезин и диметиловый эфир лириорезинола В существенно снижали остеорезорбирующую активность остеокластов, ингибируя активность ММР-9 и катепсина К, блокировали инициацию и прогрессирование «порочного цикла» между метастазами рака молочной железы и микроокружением кости путем ингибирования продукции ПТГрП в клетках рака молочной железы и остеокластической резорбции кости. Следовательно, эти лигнаны тетрагидрофуранового типа могут служить полезными агентами для предотвращения и лечения вызванного раком разрушения кости у пациентов с раком молочной железы. В другом исследовании с использованием той же клеточной культуры продемонстрировано, что нокдаун экспрессии ПТГрП в клетках рака молочной железы поразительно ингибирует образование опухолей у мышей [70]. Нокдаун ПТГрП резко снизил уровни циклинов D1 и A1 и остановил прогрессию клеточного цикла на стадии G1, индуцировал апоптоз опухолевых клеток и способствовал формированию автофагосомы. Ингибирование продукции ПТГрП значительно уменьшило способности клеток рака молочной железы для торможения дифференцировки остеобластов. В совокупности эти исследования показали, что таргетинг ПТГрП в опухолевых клетках может быть потенциальной терапевтической стратегией для рака молочной железы, особенно с костными метастазами.

Список литературы

1. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68(1):7-30.
2. Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65(2):87-108.
3. McGuire A., Brown J.A., Kerin M.J. Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring. *Cancer Metastasis Rev.* 2015; 34:145-155. doi: 10.1007/s10555-015-9551-7.
4. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012 Oct 4; 490(7418):61-70. doi: 10.1038/nature11412.
5. Feng Y., Spezia M., Huang S., Yuan C., Zeng Z., Zhang L., Ji X., Liu W., Huang B., Luo W., Liu B., Lei Y., Du S., Vuppapapati A., Luu H.H., Haydon R.C., He T.C., Ren G. Breast cancer

development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis.* 2018 Jun; 5(2): 77-106. doi: 10.1016/j.gendis.2018.05.001.

6. Boras-Granic K., Wysolmerski J.J. PTHrP and breast cancer: more than hypercalcemia and bone metastases. *Breast Cancer Res.* 2012; 14(2):307.

7. Stewart A.F., Wu T., Burtis W.J., Weir E.C., Broadus A.E., Insogna K.L. The relative potency of a human tumor-derived PTH-like adenylate cyclase-stimulating preparation in three bioassays. *J. Bone Miner. Res.* 1987; 2:37-43.

8. Southby J., Kissin M.W., Danks J.A., Hayman J.A., Moseley J.M., Henderson M.A., Bennett R.C., Martin T.J. Immunohistochemical localization of parathyroid hormone-related protein in human breast cancer. *Cancer Res.* 1990; 50:7710-7716.

9. Iezzoni J. C., Bruns M. E., Frierson H. F., Scott M. G., Pence R. A., Deftos L. J., Bruns D.E. Coexpression of parathyroid hormone-related protein and its receptor in breast carcinoma: a potential autocrine effector system. *Mod Pathol.* 1998; 11:265-270.

10. Downey S.E., Hoyland J., Freemont A.J., Knox F., Walls J., Bundred N.J. Expression of the receptor for parathyroid hormone-related protein in normal and malignant breast tissue. *J Pathol.* 1997; 183:212-217.

11. Zhang R, Li J, Assaker G, Camirand A, Sabri S, Karaplis AC, Kremer R. Parathyroid Hormone-Related Protein (PTHrP): An Emerging Target in Cancer Progression and Metastasis. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1164:161-178. doi: 10.1007/978-3-030-22254-3_13. PMID: 31576548.

12. Liapis H., Crouch E.C., Grosso L.E., Kitazawa S., Wick M.R. Expression of parathyroidlike protein in normal, proliferative, and neoplastic human breast tissues. *Am J Pathol.* 1993; 143:1169-1178.

13. Surowiak P., Dziegiel P., Matkowski R., Sopol M., Wojnar A., Kornafel J., Zabel M. Prognostic value of immunocytochemical determination of parathyroid hormone-related peptide expression in cells of mammary ductal carcinoma. Analysis of 7 years of the disease course. *Virchows Arch.* 2003; 442:245-251.

14. Linforth R., Anderson N., Hoey R., Nolan T., Downey S., Brady G., Ashcroft L., Bundred, N. Coexpression of parathyroid hormone related protein and its receptor in early breast cancer predicts poor patient survival. *Clin Cancer Res.* 2002; 8:3172-3177.

15. Ye Y., Falzon M., Seitz P.K., Cooper C.W. Overexpression of parathyroid hormone-related protein promotes cell growth in the rat intestinal cell line IEC-6. *Regulatory Peptides.* 2001; 99: 169-174.

16. Okoumassoun L.E., Russo C., Denizeau F., Averill-Bates D., Henderson J.E. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) inhibits mitochondrial-dependent apoptosis through CK2. *Journal of Cellular Physiology.* 2007; 212: 591-599.

17. Luparello C. Midregion PTHrP and human breast cancer cells. *ScientificWorldJournal*. 2010; 10:1016-1028. doi:10.1100/tsw.2010.97.
18. Tovar Sepulveda V.A., Shen X., Falzon M. Intracrine PTHrP protects against serum starvation-induced apoptosis and regulates the cell cycle in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology*. 2002; 143: 596-606.
19. Birch M. A. Carron J. A. Scott M. Fraser W. D. and Gallagher J. A. Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein (PTHrP) receptor expression and mitogenic responses in human breast cancer cell lines. *Br J Cancer*. 1995; 72: pp.90-95.
20. Guise T.A., Yin J.J., Taylor S.D., Kumagai Y., Dallas M., Boyce B.F., Yoneda T., Mundy G.R. Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J Clin Invest*. 1996; 98:1544-1549.
21. Cataisson C., Lieberherr M., Cotton J., Calvo F., Cros M., de Vernejoul M.C., Foley J., Bouizar Z. Parathyroid hormone-related peptide stimulates proliferation of highly tumorigenic human SV40-immortalized breast epithelial cells. *J Bone Miner Res*. 2000; 15:2129-2139.
22. Martin T.J. Moseley, J.M. and Williams, E.D. Parathyroid hormone-related protein: hormone and cytokine. *J Endocrinol*. 1997; 154:S23-S37.
23. Luparello C., Burtis W. J., Raue F., Birch M. A., Gallagher J. A. Parathyroid hormone-related peptide and 8701-BC breast cancer cell growth and invasion in vitro: evidence for growth-inhibiting and invasion-promoting effects. *Mol. Cell. Endocrinol*. 1995; 111: 225-232.
24. Minafra S., Morello V., Glorioso F., La Fiura A.M., Tomasino R.M., Feo S., McIntosh D., Woolley D.E. A new cell line (8701-BC) from primary ductal infiltrating carcinoma of human breast. *Br. J. Cancer*. 1989; 60:185-192.
25. Falzon M., Du P. Enhanced growth of MCF-7 breast cancer cells overexpressing parathyroid hormone-related peptide. *Endocrinology*. 2000; 141: 1882-1892.
26. Shen X., Falzon M. PTH-related protein upregulates integrin $\alpha 6 \beta 4$ expression and activates Akt in breast cancer cells. *Exp Cell Res*. 2006; 312: 3822-3834.
27. Luparello C., Birch M.A., Gallagher J.A., Burtis W.J. Clonal heterogeneity of the growth and invasive response of a human breast carcinoma cell line to parathyroid hormone-related peptide fragments. *Carcinogenesis*. 1997; 18:23-29.
28. Luparello C., Romanotto R., Tipa A., Sirchia R., Olmo N., López de Silanes I., Turnay J., Lizarbe M.A., Stewart A.F. Midregion parathyroid hormone-related protein inhibits growth and invasion in vitro and tumorigenesis in vivo of human breast cancer cells. *J. Bone Miner. Res*. 2001; 16:2173-2181.
29. Alokail M.S. The role of PTHrP in mitogenic signaling via EGFR-dependent pathways in breast cancer cells. *Mol. Cell. Pharmacol*. 2009; 1:278-289.

30. Li J., Karaplis A.C., Huang D.C., Siegel P.M., Camirand A., Yang X.F., Muller W.J., Kremer R. PTHrP drives breast tumor initiation, progression, and metastasis in mice and is a potential therapy target. *J Clin Invest.* 2011; 121(12):4655-4669. doi: 10.1172/JCI46134.
31. Fleming N.I., Trivett M.K., George J., Slavin J.L., Murray W.K., Moseley J.M., Anderson R.L., Thomas D.M. Parathyroid Hormone-Related Protein Protects against Mammary Tumor Emergence and Is Associated with Monocyte Infiltration in Ductal Carcinoma In situ. *Cancer Res.* 2009; 69(18): 7473-7479. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0194.
32. Henderson M.A., Danks J.A., J.L. Slavin J.L., Byrnes G.B., Choong P.F., Spillane J.B., Hopper J.L., Martin T.J. Parathyroid hormone-related protein localization in breast cancers predict improved prognosis. *Cancer Res.* 2006; 66: 2250-2256. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2814.
33. Lim E., Wu D., Pal B., Bouras T., Asselin-Labat M.L., Vaillant F., Yagita H., Lindeman G.J., Smyth G.K., Visvader J.E. Transcriptome analyses of mouse and human mammary cell subpopulations reveal multiple conserved genes and pathways. *Breast Cancer Res.* 2010; 12:R21. doi: 10.1186/bcr2560.
34. Prosperi J.R., Khramtsov A.I., Khramtsova G.F., Goss K.H. Apc mutation enhances PyMT-induced mammary tumorigenesis. *PLoS One.* 2011; 6:e29339. doi: 10.1371/journal.pone.0029339.
35. Li H., Sun Y., Zheng H., Li L., Yu Q., Yao X. Parathyroid hormone-related protein overexpression protects goat mammary gland epithelial cells from calcium-sensing receptor activation-induced apoptosis. *Molecular biology reports.* 2015; 42:233-43.
36. Weigelt B., Peterse J.L. Van 't Veer L.J. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5(8):591-602.
37. Mundy G.R. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 584-93.
38. Scully O.J., Bay B.H., Yip G., Yu Y. Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics Proteomics.* 2012; 9(5):311-320.
39. Chambers A.F., Groom A.C., MacDonald I.C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(8):563-572.
40. Riggi N., Aguet M., Stamenkovic I. Cancer metastasis: a reappraisal of its underlying mechanisms and their relevance to treatment. *Annu Rev Pathol.* 2018; 13:117-140.
41. Chen W., Hoffmann A.D., Liu H., Liu X. Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. *NPJ Precision Oncology.* 2018; 2(4) doi: 10.1038/s41698-018-0047-0.
42. Santa-Maria C.A., Gradishar W.J. Changing treatment paradigms in metastatic breast cancer: lessons learned. *JAMA Oncol.* 2015; 1(4):528-534. quiz 549.

43. Giancotti F.G. Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. *Cell*. 2013; 155(4):750-64. doi:10.1016/j.cell.2013.10.029.
44. Hosseini H., Obradovic M.M., Hoffmann M. Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. *Nature*. 2016; 540(7634):552.
45. Hartkopf A.D., Stefanescu D., Wallwiener M. Tumor cell dissemination to the bone marrow and blood is associated with poor outcome in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2014; 147(2):345-351.
46. Luker K.E., Luker G.D. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Lett*. 2006; 238(1):30-41. doi: 10.1016/j.canlet.2005.06.021.
47. Kang Y., Siegel P.M., Shu W., Drobnjak M., Kakonen S.M., Cordon-Cardo C., Guise T.A., Massagué J. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*. 2003; 3:537-549. doi: 10.1016/S1535-6108(03)00132-6.
48. Minn A.J., Gupta G.P., Siegel P.M. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 2005b; 436(7050):518-524. doi: 10.1038/nature03799.
49. Bohn O.L., Nasir I., Brufsky A., Tseng G.C., Bhargava R., MacManus K., Chivukula M. Biomarker profile in breast carcinomas presenting with bone metastasis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2010; 3(2):139-146.
50. Awolaran O., Brooks S.A., Lavender V. Breast cancer osteomimicry and its role in bone specific metastasis; an integrative, systematic review of preclinical evidence. *Breast*. 2016 Dec; 30:156-171. doi: 10.1016/j.breast.2016.09.017.
51. Wan L., Pantel K., Kang Y. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic. *Nat. Med*. 2013; 19:1450-1464. doi: 10.1038/nm.3391.
52. Bendre M.S., Gaddy-Kurten D., Mon-Foote T., et al. Expression of interleukin 8 and not parathyroid hormone-related protein by human breast cancer cells correlates with bone metastasis in vivo. *Cancer Res* 2002; 62: 5571-9.
53. Lu X., Mu E., Wei Y., Riethdorf S., Yang Q., Yuan M., Yan J., Hua Y., Tiede B.J., Lu X., Haffty B.G., Pantel K., Massagué J., Kang Y. VCAM-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging $\alpha 4\beta 1$ -positive osteoclast progenitors. *Cancer Cell*. 2011; 20:701-714. doi: 10.1016/j.ccr.2011.11.002.
54. Yoneda T., Hiraga T.. Crosstalk between cancer cells and bone microenvironment in bone metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 328:679-687.
55. Kremer R., Li J., Camirand A., Karaplis A.C. Parathyroid hormone related protein (PTHrP) in tumor progression. *Adv Exp Med Biol*. 2011; 720:145-60. doi: 10.1007/978-1-4614-0254-1_12.

56. Powell G.J., Southby J., Danks J.A., Stillwell R.G., Hayman J.A., Henderson M.A., Bennett R.C., Martin T.J. Localization of parathyroid hormone-related protein in breast cancer metastases: Increased incidence in bone compared with other sites. *Cancer Res.* 1991; 51:3059-3061.
57. Yoshida A., Nakamura Y, Shimizu A, Harada M, Kameda Y, Nagano A, Inaba M, Asaga T., 2000. Significance of the parathyroid hormone-related protein expression in breast carcinoma. *Breast Cancer Res.* 2000; 7:215-220.
58. Vargas S. Gillespie M.T. Poweli G.J. Southby J. Danks J.A. Moseley J.M. Martin T.J. Localization of parathyroid hormone-related protein mRNA expression in breast cancer and metastatic lesions by in situ hybridization. *J Bone Miner Res.* 1992; 7:971-979.
59. Bouizar Z, Spyrtos F, Deytieux S, de Vernejoul CM, Jullienne A. Polymerase chain reaction analysis of parathyroid hormone-related protein gene expression in breast cancer patients and occurrence of bone metastases. *Cancer Res* 1993; 53(21): 5076-5078.
60. Yin J.J. Selander K. Chirgwin J.M. Dallas M. Grubbs B.G. Wieser, R. Massague J. Mundy G.R., Guise, T.A. TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest.* 1999;103(2):197-206.
61. Sanders J.L., Chattopadhyay N., Kifor O., Yamaguchi T., Butters R.R., Brown E.M. Extracellular calcium-sensing receptor expression and its potential role in regulating parathyroid hormone-related peptide secretion in human breast cancer cell lines. *Endocrinology.* 2000; 141: 4357-64.
62. Suda T., Takahashi N. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.* 1999; 20:345-357.
63. Wong M.H.; Pavlakis N. Optimal management of bone metastases in breast cancer patients. *Breast Cancer Targets Ther.* 2011; 3:35-60.
64. Li B.T., Wong M.H., Pavlakis N. Treatment and Prevention of Bone Metastases from Breast Cancer: A Comprehensive Review of Evidence for Clinical Practice. *J. Clin. Med.* 2014, 3(1), 1-24; doi.org/10.3390/jcm3010001.
65. Isowa S., Shimo T., Ibaragi S., Kurio N., Okui T., Matsubara K., Hassan N.M., Kishimoto K., Sasaki A. PTHrP regulates angiogenesis and bone resorption via VEGF expression. *Anticancer Res* 2010; 30(7):2755-67.
66. Ibaragi, S., Shimo, T., Iwamoto, M., Hassan, N., Kodama, S., Isowa, S., & Sasaki, A. (2010). Parathyroid hormone-related peptide regulates matrix metalloproteinase-13 gene expression in bone metastatic breast cancer cells. *Anticancer Research*, 30(12), 5029-5036.
67. Guise T.A., Mohammad K.S., Clines G., Stebbins E.G., Wong D.H., Higgins L.S., Vessella R., Corey E., Padalecki .S, Suva L., Chirgwin J.M. Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(20 Pt 2):6213s-6216s.

68. Onishi T., Hayashi N., Theriault R. Future directions of bonetargeted therapy for metastatic breast cancer. *Nat Rev Clin. Oncol.* 2010; 7:641-51.
69. Jun A.Y., Kim H., Park K., Son K.H., Lee D.H., Woo M., Chung W. Tetrahydrofurofuran-type lignans inhibit breast cancer-mediated bone destruction by blocking the vicious cycle between cancer cells, osteoblasts and osteoclasts. *Invest New Drugs.* 2014; 32:1-13. doi:10.1007/s10637-013-9969-0.
70. Zheng L., Zhu K., Jiao H., Zhao Z., Zhang L., Liu M., Deng W., Chen D., Zhi Yao Z., Xiao G. PTHrP Expression in Human MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Is Critical for Tumor Growth and Survival and Osteoblast Inhibition. *Int J Biol Sci.* 2013; 9(8): 830-841. doi: 10.7150/ijbs.7039.