



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μικρά μη κωδικά RNA και Οστεοσάρκωμα»

ΠΑΠΑΦΙΛΙΠΠΟΥ ΔΑΜΙΑΝΟΣ, MD

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΠΘ, Επιβλέπουσα

ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΘ, Μέλος

ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΙΩΑΝΝΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΘ, Μέλος

ΛΑΡΙΣΑ, 2023



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE**



**POSTGRADUATE MASTER PROGRAM
“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”**

**MASTER’S THESIS
«MicroRNAs and Osteosarcoma»**

PAPAFILIPPOU DAMIANOS, MD

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στην Ελισάβετ, στη Βιβιάννα, στη Γεωργία, στη Μαρία, στο Παντελή

Στη Μαρία, στη Παναγιώτα, στο Χρήστο, στο Χρήστο, στο Γιάννη, στη Νεφέλη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το οστεοσάρκωμα (ΟΣ) αποτελεί τη συχνότερη κακοήθεια που προέρχεται από οστίτη ιστό. Η παθογένεση του αποτελεί μια περίπλοκη διαδικασία, στην οποία συμμετέχουν ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Η γενετική αστάθεια και η πληθώρα μεταλλάξεων αποτελούν κάποια από τα κύρια χαρακτηριστικά του όγκου. Τα miRNAs αποτελούν μη κωδικά μόρια RNA μήκους 18-25 νουκλεοτιδίων, τα οποία παίζουν καθοριστικό ρόλο σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης και της διαφοροποίησης. Η απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs αποτελεί έναν από τους κύριους μηχανισμούς που συμμετέχουν στην έναρξη και εξέλιξη της καρκινογένεσης. Στην παρούσα ανασκόπηση γίνεται αναφορά σε miRNAs τα οποία προωθούν τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, τη διεισδυτικότητα και την αποφυγή της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα του ΟΣ. Ακόμη, γίνεται αναφορά στους μηχανισμούς με τους οποίους τα miRNAs συμμετέχουν στην εμφάνιση φαινοτύπου καρκινικού βλαστικού κυττάρου και στη χημειοαντίσταση του ΟΣ. Τέλος, αναφερόμαστε στις προοπτικές των miRNAs να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί και προγνωστικοί δείκτες και στην προσπάθεια να ενταχθούν μελλοντικά τα συγκεκριμένα νουκλεϊκά οξέα στη κλινική πράξη ως θεραπευτικά μόρια ή θεραπευτικοί στόχοι.

Λέξεις- Κλειδιά: οστεοσάρκωμα, miRNAs, πολλαπλασιασμός, μεταστάσεις, απόπτωση καρκινικά βλαστικά κύτταρα, χημειοαντίσταση, βιοδείκτες

ABSTRACT

Osteosarcoma (OS) is the most common primary bone tumor. There are many signalling pathways that take part in the pathogenesis of OS and therefore the explanation of the origin of the disease is extremely complex. Genetic instability and mutations in oncogenes and tumor suppressor genes are some of the main characteristics of the tumor. MiRNAs are small non coding RNAs, which consist of no more than 25 nucleotides and take part in a series of very important cellular functions, some of which are proliferation, differentiation and apoptosis. It has been well established that the dysregulation of the expression of miRNAs plays a major role in the initiation and development of many types of cancer. In this narrative review, we refer to miRNAs that contribute to the proliferation, invasiveness and evasion of apoptosis of OS cancer cells. Furthermore, we refer to miRNAs that play an important role in the chemoresistance of OS and in the accumulation of characteristics of cancer stem cells. Finally, we explore the possible use of circulating miRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers and the mechanisms with which miRNAs can be used as therapeutic molecules or therapeutics targets.

Key words: osteosarcoma, miRNAs, proliferation, metastasis, apoptosis, chemoresistance, cancer stem cells, biomarkers

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑ.....	8
Α. ΟΡΙΣΜΟΣ-ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	10
Β. ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	10
Γ. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ-ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ.....	10
Γ1. ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ.....	11
Γ2. ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ.....	12
Γ3. ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΚΑΙ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ.....	14
Γ4. ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΟΣΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ.....	14
Δ. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ.....	17
Δ1. ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	17
Δ2. ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	17
Δ3. ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	18
Δ4. ΝΕΕΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ.....	18
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗ ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ.....	22
1.1. ΜΙΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ RNAs.....	22
1.1.1. ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ.....	22
1.1.2. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ.....	24
1.2. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ.....	27
1.3. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗΝ ΕΠΙΘΗΛΙΟ-ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΚΑΙ ΣΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΩΝ.....	30
1.4. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΘΑΝΑΤΟ.....	36
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΟ ΟΣΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.....	40
2.1. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΤΩΝ CSCs.....	41

2.2. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΤΩΝ CSCs.....	44
2.3. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΩΝ CSCs.....	46
2.4. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΟ ΟΣΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.....	49
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ.....	52
3.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΕ ΒΛΑΒΕΣ ΤΟΥ DNA (DNA DAMAGE RESPONSE, DDR).....	55
3.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΑΠΟΦΥΓΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ.....	57
3.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑΣ.....	60
3.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ.....	62
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ.....	65
4.1. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ miRNAs ΩΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ.....	66
4.2. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΕΣ ΣΕ miRNAs.....	70
 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	74
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	75

ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑ

Α. ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Το οστεοσάρκωμα (ΟΣ) αποτελεί το συχνότερο νεόπλασμα με προέλευση από τον οστίτη ιστό και αποτελείται από μεσεγχυματικά κύτταρα, τα οποία παράγουν οστεοειδές. Πρόκειται για τον τρίτο συχνότερο όγκο της παιδικής ηλικίας, μετά από τις λευχαιμίες και τους όγκους του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (Luetke et al., 2014; Moukengue et al., 2022).

Στο γενικό πληθυσμό η επίπτωση του οστεοσαρκώματος κυμαίνεται μεταξύ 0.2-3 περιπτώσεων/1.000.000 πληθυσμού/έτος (S. Bielack et al., 2009). Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση της επίπτωσης του ΟΣ ανάλογα με την ηλικία σε διάφορους πληθυσμούς, βρέθηκε πως η ηλικιακή κατανομή της επίπτωσής του είναι δικόρυφη. Πιο συγκεκριμένα, στην ηλικιακή ομάδα κάτω των 24 ετών παρατηρείται αυξημένη επίπτωση της τάξης των 4.3 περιπτώσεων/ 1.000.000 πληθυσμού/ έτος στους άνδρες και των 3.4 περιπτώσεων στις γυναίκες, ενώ η δεύτερη κορύφωση της επίπτωσης (4 περιπτώσεις/ 1.000.000 πληθυσμού/έτος στον ανδρικό πληθυσμό και 3.1 περιπτώσεις στον γυναικείο) παρατηρείται στις ηλικίες άνω των 60 ετών (Mirabello et al., 2009a). Η αύξηση της επίπτωσης στις μεγαλύτερες ηλικίες θεωρείται πιθανότατα δευτεροπαθής σε έδαφος νόσου του Paget ή ακτινοθεραπείας για αντιμετώπιση άλλων νεοπλασιών (Lindsey et al., 2017).

Συχνότερα προσβάλλονται οι μεταφύσεις των μακρών οστών (μηριαίο, κνήμη, βραχιόνιο), ενώ σε μεγαλύτερες ηλικίες οστεοσάρκωμα μπορεί να εμφανιστεί και στον αξονικό σκελετό, κυρίως στα οστά της λεκάνης. Οι ασθενείς μπορεί να παραπονούνται για πόνο στη προσβεβλημένη περιοχή, ο οποίος όμως συχνά παραβλέπεται ή αποδίδεται σε σωματική καταπόνηση ή στην οστική ανάπτυξη που συνοδεύει τη παιδική και εφηβική ηλικία. Επιπλέον μπορεί να παρατηρηθεί ψηλαφητή μάζα, τοπικό οίδημα ή και περιορισμός του εύρους κινήσεων σε περίπτωση προσβολής κάποιας άρθρωσης. Σπάνια, είναι δυνατόν να έχουμε ευρήματα από τον έλεγχο του αναπνευστικού συστήματος ή και λεμφαδενική διόγκωση, γεγονός που υποδηλώνει προχωρημένη μεταστατική νόσο (Moukengue et al., 2022).

Ανάλογα με τα ιστολογικά του χαρακτηριστικά, το οστεοσάρκωμα μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε: υψηλής κακοήθειας («κλασικό»/conventional), ενδιάμεσης κακοήθειας και χαμηλής κακοήθειας. Όλα τα υψηλής κακοήθειας οστεοσαρκώματα,

ακόμη και αν δεν ανιχνεύονται μακροσκοπικές μεταστάσεις, θα πρέπει να θεωρούνται εξ ορισμού μικρομεταστατικά και να λαμβάνουν συστηματική θεραπεία. Στα χαμηλής κακοήθειας οστεοσαρκώματα εντάσσεται το παροστεϊκό, όγκος που συνήθως περιορίζεται στην επιφάνεια του οστού και αποτελείται από κύτταρα με ινοβλαστικά χαρακτηριστικά. Ενδιάμεσης ιστολογικής κακοήθειας θεωρείται το περιοστεϊκό οστεοσάρκωμα (Lindsey et al., 2017). Το «κλασικό» οστεοσάρκωμα χαρακτηρίζεται από υψηλή ιστολογική κακοήθεια και αποτελεί το 80-90% των οστεοσαρκωμάτων που διαγιγνώσκονται. Ανάλογα με τα κύτταρα που το αποτελούν μπορεί να κατηγοριοποιηθεί επιπλέον σε οστεοβλαστικό, ινοβλαστικό ή χονδροβλαστικό (S. Bielack et al., 2009).

Έως το 1970, το οστεοσάρκωμα ήταν αποκλειστικά χειρουργική νόσος. Παρά τις ακρωτηριαστικές επεμβάσεις, τα ποσοστά επιβίωσης δεν ξεπερνούσαν το 20%, λόγω των μεταστάσεων που εμφανίζονταν σε μεταγενέστερο χρόνο (Belayneh et al., 2021). Μετά την εισαγωγή της νεοεπικουρικής και επικουρικής χημειοθεραπείας, η πενταετής επιβίωση αυξήθηκε αισθητά τις δεκαετίες 1973-1983 και 1983-1993 σε ποσοστά άνω του 50% για παιδιά και εφήβους. Ωστόσο, από τότε μέχρι σήμερα δεν έχουν παρατηρηθεί σημαντικές αλλαγές στην επιβίωση (Mirabello et al., 2009b).

Ένα από τους κύριους προγνωστικούς παράγοντες αποτελεί η ύπαρξη μεταστατικής νόσου. Η ανίχνευση μεταστατικών εστιών μειώνει την πενταετή επιβίωση στο 29%. Το οστεοσάρκωμα μεθίσταται κατά κύριο λόγο στο πνεύμονα ($\approx 80\%$ των μεταστάσεων). Οι εξωπνευμονικές μεταστάσεις και ιδιαίτερα οι οστικές συνδέονται με δυσμενή πρόγνωση (Kager et al., 2003). Η υποτροπή της νόσου αποτελεί ακόμη έναν επιβαρυντικό παράγοντα για την επιβίωση (Bacci et al., 2005).

Η πρόγνωση επηρεάζεται επιπλέον από τον ιστολογικό τύπο. Τα χαμηλής και ενδιάμεσης κακοήθειας νεοπλάσματα (παροστεϊκά και περιοστεϊκά) παρουσιάζουν πολύ ευνοϊκότερη πρόγνωση σε σχέση με τα υψηλής κακοήθειας. Παράλληλα, η αυξημένη ηλικία, η εμφάνιση οστεοσαρκώματος ως δευτερογενούς νόσου (σε έδαφος νόσου του Paget) και τα αυξημένα επίπεδα LDH φαίνεται να επιδρούν αρνητικά τόσο στην ολική επιβίωση όσο και στην επιβίωση ελεύθερη συμπτωμάτων των ασθενών (Belayneh et al., 2021).

Την πρόγνωση επιπλέον επιβαρύνουν η εντόπιση του όγκου στον αξονικό σκελετό, το μεγάλο μέγεθος του όγκου, καθώς και η αποτυχία πλήρους εκτομής του (S. S. Bielack et al., 2002).

Το ποσοστό νέκρωσης του όγκου μετά τη νεοεπικουρική χημειοθεραπεία, που αξιολογείται ιστολογικά μετά την χειρουργική εκτομή, αποτελεί δείκτη ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία και καθορίζει και αυτό σε μεγάλο βαθμό τη πρόγνωση. Ποσοστό νέκρωσης > 90% συνδέεται γενικά με ευνοϊκότερη πρόγνωση (Isakoff et al., 2015).

B. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση και η σταδιοποίηση του οστεοσακώματος απαιτεί τόσο τον έλεγχο της τοπικής νόσου όσο και την ανίχνευση των πιθανών μεταστάσεων. Σύμφωνα με το National Comprehensive Cancer Network (NCCN) ο αρχικός έλεγχος οφείλει να περιλαμβάνει απεικόνιση, με μαγνητική (MRI) ή και υπολογιστική (CT) τομογραφία, της πρωτογενούς εστίας, σπινθηρογράφημα οστών, αξονική τομογραφία θώρακος (Chest CT), καθώς και PET/CT σε ολόκληρο το σώμα. Η MRI αποτελεί την καταλληλότερη απεικονιστική τεχνική για την αρχική αξιολόγηση του όγκου, καθώς μπορεί να εκτιμήσει όχι μόνο την τοπική επέκταση του όγκου, αλλά και την εισβολή στα γειτονικά μαλακά μόρια και την ύπαρξη παρακείμενων οστικών μεταστάσεων («skip lesions»). Οι απλές ακτινογραφίες έχουν τη δυνατότητα να απεικονίσουν την καταστροφή του οστικού φλοιού αλλά και έκτοπη παραγωγή οστίτη ιστού (Agulnik et al., 2022).

Στο διαγνωστικό έλεγχο επίσης σημαντικό ρόλο έχει η μέτρηση των βιοδεικτών ALP και LDH. Οι υψηλές τιμές γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) φαίνεται να συνδέονται με την ύπαρξη μεταστάσεων. Παράλληλα, ο βιοδείκτης αυτός είναι χρήσιμος στην αξιολόγηση της ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία (Bacci et al., 2004). Σε κάθε περίπτωση, η βιοψία και η ιστολογική εξέταση είναι απαραίτητες προκειμένου να επιβεβαιωθεί η διάγνωση (Picci, 2007).

Είναι πλέον γνωστό ότι υπάρχουν κληρονομικά σύνδρομα τα οποία συνοδεύονται με προδιάθεση για εμφάνιση οστεοσαρκώματος, όπως το σύνδρομο Li-Fraumeni, το κληρονομικό ρετινοβλάστωμα, το σύνδρομο Bloom, το σύνδρομο Werner και άλλα. Για αυτό το λόγο, προτείνεται γενετικός έλεγχος σε πάσχοντες με συνοδές συγγενείς ανωμαλίες ή με οικογενειακό ιστορικό οστικών όγκων (Calvert et al., 2012).

Γ. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ-ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ

Το οστεοσάρκωμα είναι ένας ιδιαίτερα ετερογενής όγκος που χαρακτηρίζεται από γενετική αστάθεια και πολύπλοκες χρωμοσωμικές ανακατατάξεις (Martin et al., 2012). Τις περισσότερες φορές εμφανίζεται σποραδικά, χωρίς κάποιο συγκεκριμένο γενετικό

υπόβαθρο ή κάποια περιβαλλοντική έκθεση. Ωστόσο υπάρχουν ορισμένα κληρονομούμενα σύνδρομα, τα οποία αυξάνουν κατακόρυφα την πιθανότητα εμφάνισης οστεοσαρκώματος. Τα σύνδρομα αυτά είναι τα: Σύνδρομο Li-Fraumeni, Κληρονομικό Ρετινοβλάστωμα, Σύνδρομο Bloom, Σύνδρομο Werner, Σύνδρομο Rothmund-Thompson, RAPADILINO και η αναμία Diamond-Blackfan. Τα γονίδια που είναι συνδεδεμένα με τα σύνδρομα αυτά είναι πιθανό να προσφέρουν απαντήσεις αναφορικά με την ογκογένεση και το μοριακό υπόβαθρο της νόσου (Calvert et al., 2012).

Γ.1 ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΜΕ ΤΟ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑ

ο Σύνδρομο Li-Fraumeni(LFS)

Το σύνδρομο αυτό πρωτοπεριγράφηκε το 1969 και σχετίζεται με αυξημένη συχνότητα νεοπλασιών, κυρίως σαρκωμάτων, προεμμηνοπαυσιακού καρκίνου του μαστού, επινεφριδιακών όγκων καθώς και όγκων του ΚΝΣ. Οι ασθενείς εμφανίζουν εξαιρετικά αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης οποιασδήποτε νεοπλασίας, η οποία σε ηλικία 60 ετών φτάνει σε ποσοστό 90% (Hameed & Mandelker, 2018). Στο 70% των περιπτώσεων εντοπίζονται μεταλλάξεις του γονιδίου TP53, κυρίως παρερμηνεύσιμες, οι οποίες κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο. Το οστεοσάρκωμα αποτελεί το συχνότερα εμφανιζόμενο σάρκωμα, που φτάνει έως το 12% των περιπτώσεων LFS, σε ηλικία σαφώς μικρότερη από ότι στο γενικό πληθυσμό (Correa, 2016).

ο Κληρονομικό Ρετινοβλάστωμα

Το ρετινοβλάστωμα είναι ο συχνότερος ενδοοφθαλμικός όγκος. Εμφανίζεται στη παιδική ηλικία με συχνότητα 1/16.000 έως 1/18.000 (Czarnecka et al., 2020) και παρά τη κληρονομική του φύση εμφανίζει, χάρη στα σύγχρονα χημειοθεραπευτικά σχήματα, ποσοστό 5ετούς επιβίωσης έως και 95% (Broadus et al., 2009). Οφείλεται σε μεταλλάξεις του ογκοκατασταλτικού γονιδίου RB1 και η ανάλυση του γονιδίου αυτού αποτέλεσε ακρογωνιαίο λίθο για την σύγχρονη αντίληψη της γενετικής του καρκίνου. Σε περιπτώσεις κληρονομικού ρετινοβλαστώματος, ο κίνδυνος για εμφάνιση οστεοσαρκώματος αυξάνεται 400 φορές (Wong et al., 1997).

ο Σύνδρομο διαταραχών RECQ

Σε αυτή τη κατηγορία περιλαμβάνονται τα γενετικά υπολειπόμενα σύνδρομα Bloom, Werner, Rothmund-Thompson (τύπος 2) και RAPADILINO, στα οποία εντοπίζονται μεταλλάξεις των DNA ελικασών RecQ.

▪ Σύνδρομο Werner

Πρόκειται για σύνδρομο προγηρίας που συναντάται συχνότερα στην Ιαπωνία. Οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου WRN, που κωδικοποιεί μία ελικάση RecQ. (Czarnecka et al., 2020) Σε ένα σύνολο 186 κακοηθειών που προέκυψαν σε έδαφος συνδρόμου Werner εντοπίστηκαν 13 περιπτώσεις οστεοσαρκώματος (7%) (Goto et al., 1996). Αξιοσημείωτο είναι μάλιστα το γεγονός ότι το οστεοσάρκωμα σε αυτές τις περιπτώσεις εμφανίζεται σε ηλικίες 35-57 ετών, με κύρια εντόπιση την ποδοκνημική και τον άκρο πόδα. Επομένως, το οστεοσάρκωμα σε πλαίσιο συνδρόμου Werner δεν ακολουθεί την τυπική ηλικιακή κατανομή του σποραδικού οστεοσαρκώματος ούτε εμφανίζεται σε τυπικές θέσεις (Calvert et al., 2012).

- **Σύνδρομο Bloom**

Οφείλεται σε μετάλλαξη του γονιδίου BLM. Εμφανίζεται με αυξημένη συχνότητα στους Εβραίους Ασkenάζι και χαρακτηρίζεται από σημαντικά αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης οστεοσαρκώματος σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (Czarnecka et al., 2020).

- **Σύνδρομο Rothmund-Thompson (τύπος 2)**

Το σύνδρομο αυτό οφείλεται σε μεταλλάξεις της ελικάσης RecQL4, η οποία πιστεύεται ότι συμμετέχει σε επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA. Χαρακτηρίζεται από δερματικές εκδηλώσεις, νεανικό καταρράκτη και οστικές αλλοιώσεις (Calvert et al., 2012). Σε ανασκόπηση 61 περιπτώσεων καρκίνων σε ασθενείς με RTS, οστεοσάρκωμα εντοπίστηκε σε 38 ασθενείς (62%) (Stinco et al., 2008).

- **Σύνδρομο RAPADILINO**

Οφείλεται και αυτό σε μεταλλάξεις του γονιδίου RECQL4. Έχουν περιγραφεί ελάχιστες περιπτώσεις παγκοσμίως (Czarnecka et al., 2020).

- **Αναιμία Diamond-Blackfan**

Το συγκεκριμένο σύνδρομο έχει καταταγεί στην ομάδα των παθήσεων των ριβοσωμάτων. Μόνο στο 50% των περιπτώσεων είναι γνωστή η γενετική αιτία του. Σε σύνολο 700 ασθενών εντοπίστηκαν 6 περιπτώσεις οστεοσαρκώματος (Calvert et al., 2012).

Γ.2 ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΜΕ ΤΟ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑ

- **TP53**

Το TP53 αποτελεί το γονίδιο του οποίου οι μεταλλάξεις συσχετίζονται συχνότερα με την εμφάνιση καρκίνου (Hainaut & Pfeifer, 2016). Πρόκειται για

ογκοκατασταλτικό γονίδιο, κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53 και η φυσιολογική λειτουργία είναι η αναστολή του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη. Μεταλλάξεις απενεργοποίησης οδηγούν σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει γιατί μεταλλάξεις αυτές συναντώνται περίπου στο 50% των κακοηθειών. (Bert Vogelstein et al., 2000) Στις περισσότερες περιπτώσεις οι μεταλλάξεις εντοπίζονται στην περιοχή πρόσδεσης της πρωτεΐνης με το DNA (DNA binding domain) (Czarnecka et al., 2020). Σύμφωνα με μελέτη του 2019, μεταλλάξεις, όχι μόνο σημειακές μεταλλάξεις αλλά και δομικές ανακατατάξεις του γονιδίου TP53, βρέθηκαν στο 74% δειγμάτων οστεοσαρκώματος (Sayles et al., 2019). Μάλιστα, οι μεταλλάξεις αυτές φαίνεται αφορούν κυρίως το πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου (X. Chen et al., 2014; Ribí et al., 2015).

- ο RB1

Το γονίδιο RB1 κωδικοποιεί τη πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος και έχει και αυτό ογκοκατασταλτικές ιδιότητες ως ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου. Μεταλλάξεις στο γονίδιο RB1 εντοπίζονται στο 70% των σποραδικών οστεοσαρκωμάτων και αφορούν κυρίως απώλεια ετεροζυγωτίας στην περιοχή 13q (Ragland et al., 2002). Σε σύνολο 34 δειγμάτων οστεοσαρκώματος, 10 βρέθηκαν να φέρουν μεταλλάξεις του RB1, από τις οποίες 3 ήταν σημειακές και 7 δομικές (X. Chen et al., 2014).

- ο ATRX

Πρόκειται για γονίδιο που εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, την δημιουργία των νουκλεοσωμάτων και την διατήρηση του μεγέθους των τελομερών. Είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο και βρέθηκε να έχει υποστεί μεταλλάξεις σε 29% από 34 δείγματα οστεοσαρκώματος (X. Chen et al., 2014).

- ο C-MYC

Αποτελεί πρωτοογκογονίδιο το οποίο σχετίζεται με το κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση και το μεταστατικό δυναμικό (Moukengue et al., 2022). Στο οστεοσάρκωμα εμφανίζει συχνά μεταλλάξεις που ενισχύουν τη λειτουργία του και συνδέεται με αυξημένο αριθμό μεταστάσεων και πτωχή πρόγνωση. Έχει φανεί σε in vitro μοντέλο ότι η αναστολή του c-Myc αναστέλλει το πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διεισδυτικότητα των κυττάρων του οστεοσαρκώματος (D. Chen et al., 2018).

Παράλληλα, γονίδια που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και πιο συγκεκριμένα με τις κυκλινεξαρτώμενες κινάσες (CDK) συχνά εμφανίζουν μεταλλάξεις σε πολλές κακοήθειες. Στο οστεοσάρκωμα παρατηρείται αποσιώπηση γονιδίων

αναστολέων των CDKs (TP53, RB1, CDKN2A, PTEN) και παράλληλα ενίσχυση των πρωτοογκογονιδίων CDK4, MDM2, MYC, TWIST1, CCND3, CCNE1 (Kohlmeyer et al., 2020).

Γ.3 ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΚΑΙ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ

Σύμφωνα με τη κλασική θεώρηση της ογκογένεσης, ο μετασχηματισμός ενός κυττάρου σε κακόηθες προκύπτει μετά από σταδιακή συσσώρευση μεταλλάξεων. Η διαδικασία αυτή απαιτεί μεγάλο χρονικό διάστημα και μεγάλο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων. Ωστόσο, έχει αποδειχτεί ότι σε κάποιες περιπτώσεις εμφανίζεται ένα φαινόμενο όπου μεγάλος αριθμός ποικίλων χρωμοσωμικών ανακατατάξεων συμβαίνουν σε μεμονωμένα κύτταρα. Το τελικό αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής περιλαμβάνει τη δημιουργία περίπλοκων δομικών παραλλαγών αλλά και παραλλαγών αριθμού αντιγράφων (CNVs). Οι ανακατατάξεις αυτές μπορεί να αφορούν ένα ή και περισσότερα χρωμοσώματα. Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε χρωμοθρυψία (chromothripsis) (Stephens et al., 2011). Σύμφωνα με έρευνα ανάλυσης ολόκληρου του γονιδιώματος, WGS, το γονιδίωμα από 2658 δείγματα όγκων (38 συνολικά διαφορετικά είδη κακοηθειών) φάνηκε πως στο ΟΣ, η χρωμοθρυψία εμφανίζεται σε ποσοστό που φτάνει το 77%. Μάλιστα στο 61% των ΟΣ, στη χρωμοθρυψία εμπλέκονται τουλάχιστον 5 χρωμοσώματα (Cortés-Ciriano et al., 2020). Το φαινόμενο αυτό οδηγεί σε ενίσχυση έκφρασης (CDK4, MDM2, COPS3) αύξηση αριθμού αντιγράφων (RCTOR, TERT) ή και αποσιώπηση γονιδίων (TP53, NF1) με καθοριστική σημασία για την ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος (Behjati et al., 2017).

Παράλληλα, στην έρευνα των Chen και συν. , όπου ανέλυσαν με NGS το γονιδίωμα 34 δειγμάτων οστεοσαρκώματος, διαπίστωσαν ότι σε 17 περιπτώσεις εντοπίζονται περιοχές που χαρακτηρίζονται από πολύ μεγάλο αριθμό σημειακών μεταλλάξεων (SNVs) . Οι περιοχές αυτές του γονιδιώματος όμως δεν φάνηκε να είναι όμοιες ανάμεσα στα 17 αυτά δείγματα ούτε να σχετίζονται με την έκφραση γονιδίων «οδηγών» για την ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος, όπως το TP53 (X. Chen et al., 2014). Το φαινόμενο αυτό, της συγκέντρωσης πολλών μεταλλάξεων σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος, (οι οποίες τηρούν συγκεκριμένες προϋποθέσεις), έχει ονομαστεί kataegis (Nik-Zainal et al., 2012).

Γ.4 ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΟΣΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΣΤΟ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑ

Σύμφωνα με έρευνες υποστηρίζεται ότι τα σαρκώματα γενικότερα ακολουθούν το ιεραρχικό μοντέλο ανάπτυξης όγκου. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι υπάρχει ένα κυτταρικός υποπληθυσμός ο οποίος φέρει τη δυνατότητα αυτοανανέωσης και διατήρησης του όγκου. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (Basu-Roy et al., 2013). Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (Cancer Stem Cells, CSCs) πιστεύεται, σύμφωνα με την επικρατέστερη θεωρία, πως προέρχονται από την συσσώρευση επιπρόσθετων μεταλλάξεων και επιγενετικών τροποποιήσεων σε ένα πρωταρχικό κύτταρο του όγκου (Visvader, 2011).

Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα πέρα από τη δυνατότητα αυτοανανέωσης, διαθέτουν την ικανότητα εκ νέου δημιουργίας όγκου και παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία μεταστάσεων και στη χημειοαντίσταση. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι πιθανό να σχετίζονται και με τις υποτροπές της νόσου μετά από θεραπεία (Genadry et al., 2018). Η αντίσταση στη χημειοθεραπεία που παρουσιάζουν τα CSCs φαίνεται να συνδέεται αφενός με την αυξημένη ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA, αφετέρου με την ικανότητα εκροής των φαρμάκων. Στην αυξημένη ενεργητική έξοδο των μορίων φαρμάκου από τα κύτταρα συμβάλλει η ενίσχυση της δράσης των πρωτεϊνών-μεταφορέων ABC (ATP-binding cassette transporters), όπως η P-γλυκοπρωτεΐνη και η BCRP/ABCG2 (breast cancer resistant protein) (Y. Zhang et al., 2017a).

Κοινό επιφανειακό δείκτη για τον εντοπισμό των CSCs αποτελεί η πρωτεΐνη CD133. Παρόλο που ο ακριβής της ρόλος δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί, κύτταρα θετικά στο CD133 παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα δημιουργίας σφαιριδίων, αυξημένη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα OCT3/4 και δημιουργία «παράπλευρου πληθυσμού» (side population) μετά από ειδική χρώση (Izadpanah et al., 2020). Ο παράπλευρος πληθυσμός είναι η εικόνα που παίρνουμε στην κυτταρομετρία ροής από κύτταρα τα οποία αποβάλλουν χρώσεις, όπως οι 33342 Hoechst και Rhodamine123, κυρίως μέσω των μεταφορέων ABC. Η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελεί μέθοδο εντοπισμού CSCs αλλά και δείκτη χημειοαντίστασης (Tirino et al., 2013).

Άλλους σημαντικούς δείκτες αποτελούν οι πρωτεΐνες CD117 και STRO-1. Σε μελέτη δειγμάτων οστεοσαρκώματος από ποντίκια και ανθρώπους βρέθηκε πως οι παράγοντες αυτοί εκφράζονται έντονα σε διαμορφωμένα σφαιρίδια και κύτταρα ανθεκτικά στη δοξορουβικίνη. Παράλληλα, κύτταρα θετικά και για τους δύο δείκτες εμφάνισαν δυνατότητα εκ νέου δημιουργίας νεοπλασίας. Τα κύτταρα αυτά βρέθηκε να έχουν

επιπλέον υψηλή έκφραση των πρωτεϊνών CXCR4 και ABCG2 που συνδέονται με το μεταστατικό δυναμικό και τη χημειοαντίσταση, αντίστοιχα (Adhikari et al., 2010).

Παράλληλα, σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος, ο δείκτης CD271 φαίνεται να συνδέεται με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά βλαστικού κυττάρου (J. Tian et al., 2014).

Το μικροπεριβάλλον του οστού δημιουργεί μια φωλεά (niche), η οποία με τη κατάλληλη σηματοδότηση ρυθμίζει τα χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων του ΟΣ, όπως ακριβώς συμβαίνει και με τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα. Η απορρύθμιση της έκφρασης παραγόντων, όπως οι FGF, TGF- β , IGF1, BMP, VEGF, HIF1, WNT, HH και NOTCH, παίζει καίριο ρόλο στην δημιουργία των καρκινικών βλαστικών κυττάρων και στην εμφάνιση των χαρακτηριστικών που τα ξεχωρίζουν από τα υπόλοιπα κύτταρα του όγκου (Abarrategi et al., 2016).

Με τον λεγόμενο «φαύλο κύκλο» του ΟΣ τα καρκινικά κύτταρα σφετερίζονται το μηχανισμό οστικής αναδιαμόρφωσης προκειμένου να εξασφαλίσουν την ανάπτυξη τους. Πιο συγκεκριμένα, τα καρκινικά κύτταρα απελευθερώνουν αυξητικούς παράγοντες, όπως PTHrP, VEGF, IGF, FGF καθώς και Wnt, οι οποίοι αθροιστικά ασκούν ενεργοποιητική δράση στους οστεοβλάστες. Αυτοί στη συνέχεια εκκρίνουν το παράγοντα RANKL, ο οποίος προωθεί την ωρίμανση των οστεοκλαστών και την οστική απορρόφηση. Οι οστεοκλάστες ενεργοποιούνται παράλληλα απευθείας και από τα καρκινικά κύτταρα μέσω της παραγωγής ιντερλευκινών. Η αύξηση της οστεοκλαστικής δραστηριότητας και η οστική απορρόφηση οδηγούν στην απελευθέρωση στο μικροπεριβάλλον του όγκου ακόμη περισσότερων αυξητικών παραγόντων (BMP, TGF-1, FGF and PDGF κτλ) που προωθούν την επιβίωση και τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Alfranca et al., 2015; Moukengue et al., 2022).

Τέλος, το υποξικό μικροπεριβάλλον συμβάλλει και αυτό με τη σειρά του στην ανάπτυξη του όγκου. Ο συνεχής πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων δημιουργεί μία ανισορροπία ανάμεσα στις ανάγκες και στη προσφορά οξυγόνου. Υπό αυτές τις συνθήκες προωθείται η παραγωγή των HIF1a και HIF2a. Ο HIF1a έχει αντιαποπτωτική δράση, αλληλεπιδρώντας με τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2. Παράλληλα έχει φανεί πως συμμετέχει μαζί με την CXCR4 στη δημιουργία μεταστάσεων (Y. Zhang et al., 2017b). Οι HIF1a και HIF2a εμφανίζονται σε διάφορα είδη κακοήθων νεοπλασιών και η πιθανή στόχευσή τους θα μπορούσε δυνητικά να επηρεάσει την ικανότητα

πολλαπλασιασμού και αυτοανανέωσης των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (Zeng et al., 2011).

Δ. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Δ.1. ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Το χειρουργείο, παρά την ένταξη της χημειοθεραπείας στην κλασική αντιμετώπιση του οστεοσαρκώματος, παραμένει ακρογωνιαίος λίθος της θεραπευτικής παρέμβασης. Πραγματοποιείται ευρεία εκτομή της πάσχουσας περιοχής, με σκοπό την όσο το δυνατό πιο πλήρη απομάκρυνση του κακοήθους ιστού. Οι χειρουργικές επεμβάσεις που πραγματοποιούνται χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις ακρωτηριαστικές επεμβάσεις και τις επεμβάσεις διάσωσης άκρου (limb-sparing techniques) (Marulanda et al., 2008). Η δεύτερη κατηγορία επεμβάσεων αντικατοπτρίζει μία προσπάθεια να διατηρηθεί η λειτουργικότητα της εκάστοτε άρθρωσης και άκρου παρά την ευρεία εκτομή οστού. Στη διαδικασία αποκατάστασης, χάρη στη μεγάλη εξέλιξη της τεχνολογίας, καθίσταται δυνατή η εφαρμογή τεχνικών όπως αλλογενής μεταμόσχευση οστού, αυτόλογη μεταμόσχευση οστού καθώς και αποκατάσταση με τεχνητά μέλη (X. Zhao et al., 2021).

Δ.2. ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Πριν από την εισαγωγή της χημειοθεραπείας στην θεραπευτική αντιμετώπιση του οστεοσαρκώματος, η πενταετής επιβίωση των ασθενών δεν ξεπερνούσε το 20%, παρά τις ριζικές ακρωτηριαστικές επεμβάσεις που εφαρμόζονταν, καθώς εντός 6 έως 12 μηνών εντοπιζόνταν πνευμονικές μεταστάσεις. Οι μεταστάσεις αυτές συνεχίζουν ακόμη και σήμερα να αποτελούν την κύρια αιτία θανάτου από οστεοσάρκωμα (Belayneh et al., 2021).

Το 1975 σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα ενός σχήματος πολλαπλών χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε 18 ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε χειρουργική εκτομή μη μεταστατικού οστεοσαρκώματος. Το σχήμα αποτελούνταν από κυκλοφωσφαμίδη, βινκριστίνη, μoustάρδα φαινυλαλανίνης και ανδριαμυκίνη. Φάνηκε πως το ποσοστό διετούς επιβίωσης έφτασε έως το 55% (10/18) (Sutow et al., 1975). Παράλληλα έχει φανεί πως υψηλές δόσεις μεθοτρεξάτης μπορούν να μειώσουν το μέγεθος των πνευμονικών μεταστάσεων του οστεοσαρκώματος (Jaffe, 1972).

Το 1982 οι Rosen και συν. εισήγαγε την καινοτομία της νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας στο οστεοσάρκωμα καθώς και την αξιολόγηση της ιστολογικής απόκρισης του όγκου στη χημειοθεραπεία μετά την εκτομή ως καθοριστικού προγνωστικού παράγοντα επιβίωσης (Rosen et al., 1982). Λίγα χρόνια αργότερα, σε έρευνα που δημοσιεύθηκε στο Lancet συγκρίθηκε, σε δείγμα 407 χειρουργήσιμων μη μεταστατικών οστεοσαρκωμάτων η αποτελεσματικότητα σχήματος 2 παραγόντων (δοξορουβικίνη και σισπλατίνη) με ένα σχήμα πολλαπλών παραγόντων, τα οποία εφαρμόστηκαν τόσο πριν όσο και μετά τη χειρουργική επέμβαση. Τόσο η ολική επιβίωση (65% στη 3ετία και 55% στη πενταετία) όσο και η επιβίωση χωρίς πρόοδο νόσου (44% στη 5ετία) ήταν αντίστοιχη για τις 2 ομάδες. (Souhami et al., 1997) Πλέον σύμφωνα το NCCN το χημειοθεραπευτικό σχήμα πρώτης γραμμής, τόσο στη νεοεπικουρική όσο και στην επικουρική θεραπεία, αποτελείται από σισπλατίνη, δοξορουβικίνη και υψηλές δόσεις μεθοτρεξάτης (MAP) (Agulnik et al., 2022).

Στο κλασικό οστεοσάρκωμα η συνολική αντιμετώπιση περιλαμβάνει σε γενικές γραμμές νεοεπικουρική χημειοθεραπεία, ευρεία εκτομή του όγκου και επακολούθως επικουρική χημειοθεραπεία. Ωστόσο, σε ειδικές περιπτώσεις, όπως όγκοι χαμηλής ιστολογικής κακοήθειας είναι δυνατό να εφαρμοστεί μόνο ευρεία εκτομή. Μεταστασεκτομή ενδείκνυται επίσης σε περιπτώσεις χειρουργήσιμων πνευμονικών μεταστατικών μαζών (Agulnik et al., 2022).

Δ.3. ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Το οστεοσάρκωμα θεωρείται εν πολλοίς ακτινοανθεκτικός όγκος. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες περιπτώσεις στις οποίες η ακτινοθεραπεία έχει χρησιμότητα. Ως παρηγορητική θεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις επώδυνων μεταστάσεων ή σε περίπτωση που υπάρχει κίνδυνος σοβαρού κατάγματος. Σε ασθενείς που λόγω χαμηλού performance status δεν μπορούν να υποβληθούν σε χειρουργική θεραπεία και σε ανεγχείρητους όγκους η ακτινοθεραπεία πιθανόν να έχει κάποιο όφελος για τον ασθενή (Whelan & Davis, 2018).

Δ.4. ΝΕΕΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Η ανοσοθεραπεία, δηλαδή η προσπάθεια ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος για την καταστροφή του όγκου, υπήρξε ζωτικής σημασίας ανακάλυψη για

αντιμετώπιση διάφορων τύπων καρκίνου (Couzin-Frankel, 2013). Η πρώτη προσπάθεια ένταξης της ανοσοθεραπείας στην θεραπευτική στρατηγική του οστεοσαρκώματος δημοσιεύτηκε το 1993, όπου χορηγήθηκε ιντερφερόνη 2a (INF-2a) ως επικουρική χημειοθεραπεία σε 72 ασθενείς με μη μεταστατικό οστεοσάρκωμα. Φάνηκε πως η ομάδα που έλαβε ιντερφερόνη είχε αντίστοιχη επιβίωση με την ομάδα που έλαβε σχήμα κλασικής χημειοθεραπείας (49% vs 54% αντίστοιχα), ωστόσο με πολύ μεγαλύτερο ποσοστό υποτροπών στην ομάδα που έλαβε ιντερφερόνη (Strander et al., 1993). Η μεγάλη πολυεθνική τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη EURAMOS αξιολόγησε την αποτελεσματικότητα της ιντερφερόνης ως προσθήκη στο κλασικό σχήμα χημειοθεραπείας MAP σε ασθενείς με καλή ανταπόκριση (ποσοστό νέκρωσης όγκου > 90%) στην νεοεπικουρική χημειοθεραπεία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στο συνδυασμό MAP και INF-2a και στην μεμονωμένη χρήση MAP (S. S. Bielack et al., 2015).

Παράλληλα, η μιφαμουρτίδη (L-MTP-PE), συνθετικό ανάλογο ανοσογονικού συστατικού του μυκοβακτηριδιακού κυτταρικού τοιχώματος, φαίνεται να έχει σημαντική δράση εναντίον του όγκου, ενεργοποιώντας μακροφάγα και τα μονοκύτταρα να εκκρίνουν κυτταροκίνες και προφλεγμονώδεις παράγοντες (Meyers, 2009). Σε κλινικό επίπεδο, έχει φανεί πως η προσθήκη μιφαμουρτίδης στο χημειοθεραπευτικό σχήμα βελτιώνει την ολική επιβίωση ασθενών χωρίς μεταστάσεις (Meyers et al., 2008). Το φάρμακο έχει εγκριθεί από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή Φαρμάκων (EMA) για ασθενείς 2-30 ετών με οστεοσάρκωμα, όχι όμως και από τον αντίστοιχο οργανισμό των Ηνωμένων Πολιτειών (FDA) (Kager et al., 2010).

Η διαφυγή από το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ένα χαρακτηριστικό που συνοδεύει πλήθος κακοηθειών. Τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν στην επιφάνεια τους μόρια όπως τα CTLA-4 (CD152) και PD-L1. Τα μόρια αυτά, όταν συνδέονται με ειδικούς υποδοχείς (CTLA-4 receptor και PD-1 αντίστοιχα) στα T λεμφοκύτταρα, οδηγούν σε καταστροφή των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων και με αυτό το τρόπο διαφεύγουν της ανοσολογικής επιτήρησης (Wagner & Adams, 2017).

Εκτός της ανοσοθεραπείας, οι στοχευμένες θεραπείες αποκτούν στις μέρες μας όλο και πιο αποφασιστικό ρόλο στην αντιμετώπιση των κακοηθειών. Έχουν εφαρμοστεί με διαφορετικό κάθε φορά βαθμό επιτυχίας στο καρκίνο του παχέος εντέρου, του μαστού, των ωοθηκών καθώς και σε λευχαιμίες (Y. T. Lee et al., 2018). Το μονοκλωνικό

αντίσωμα έναντι του Her-2, trastuzumab, παρά την επιτυχία του στην αντιμετώπιση των Her-2 θετικών καρκίνων του μαστού (Swain et al., 2015) απέτυχε να επιδείξει σημαντικά αποτελέσματα σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα, όταν προστέθηκε στο κλασικό σχήμα χημειοθεραπείας (Ebb et al., 2012). Ο αναστολέας EGFR (Her-1) gefitinib, παρόλο που όταν χορηγήθηκε μόνος δεν έδειξε να αναστέλλει το πολλαπλασιασμό σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος (J. A. Lee et al., 2012), βελτίωσε τα αποτελέσματα της μεθοτρεξάτης και της δοξορουβικίνης όταν εφαρμόστηκε σε κυτταρικές σειρές (Seveldt et al., 2015).

Ο αναστολέας τυροσινικών κινασών sorafenib παρουσιάζει πολλαπλή στόχευση εναντίον των MAPK, BRAF, VEGFRs και PDGFR. Σε κλινική μελέτη φάσης 2, όπου χορηγήθηκε σε υποτροπιάζοντα μη χειρουργήσιμα οστεοσαρκώματα μετά από αρχική θεραπεία με το σχήμα MAP, παρατηρήθηκε βελτίωση κατά 16% της επιβίωσης χωρίς πρόοδο νόσου (Grignani et al., 2012). Ωστόσο, σε προσπάθεια συγχωρήγησης με το everolimus, αναστολέα mTOR, εμφανίστηκαν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες και η επιβίωση χωρίς πρόοδο νόσου στους 6 μήνες ήταν μικρότερη σε σχέση με τον στόχο που τέθηκε (50%) (Grignani et al., 2015). Άλλος αναστολέας τυροσινικών κινασών «ευρέως φάσματος», το regorafenib έχει χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές φάσης 2 για την αντιμετώπιση μεταστατικών οστεοσαρκωμάτων με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Davis et al., 2019; Duffaud et al., 2019). Το regorafenib μάλιστα έχει πλέον προστεθεί από το NCCN στις κατευθυντήριες οδηγίες ως θεραπεία δεύτερης γραμμής (μεταστατική, υποτροπιάζουσα νόσος) με ένδειξη κατηγορίας 1 (Agulnik et al., 2022). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και το cabozantinib, αναστολέας MET και VEGFR2, το οποίο σε σύνολο 42 ασθενών με προχωρημένο οστεοσάρκωμα εμφάνισε μερική ανταπόκριση στο 12% και επιβίωση χωρίς πρόοδο νόσου μέσα σε 6 μήνες της τάξεως του 33% (Italiano et al., 2020).

Παράλληλα, η χρήση διφωσφονικών φαίνεται να επηρεάζει την δραστηριότητα κυττάρων οστεοσαρκώματος με ποικίλους τρόπους. Αυτοί περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση της απόπτωσης, αναστολή της έκφρασης των VEGF-A και VEGFR1 στα καρκινικά κύτταρα και αναστολή της αγγειογένεσης (Ohba et al., 2014). Παρ' όλα αυτά, σε μελέτη φάσης 3 που χρησιμοποιήθηκε ζολεδρονικό οξύ σε συνδυασμό με την κλασική MAPi και χειρουργική εκτομή, η τριετής επιβίωση χωρίς πρόοδο νόσου βρέθηκε μικρότερη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Piperno-Neumann et al., 2016).

Η μη μεταστική γλυκοπρωτεΐνη B (gp-NMB) φαίνεται σε υπερεκφράζεται σε κύτταρα οστεοσαρκώματος. Η στόχευση της με μόρια όπως το Glematumumab vedotin (GV) είχε ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε μελέτες σε κυτταρικές σειρές. Ωστόσο, σε μελέτη φάσης 2 δεν φάνηκε να έχει κλινικό αποτέλεσμα στο υποτροπιάζον οστεοσάρκωμα (Lilienthal & Herold, 2020). Ωστόσο, παρά τις προσπάθειες για ανάδειξη νέων πιο αποτελεσματικών θεραπειών τα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών με οστεοσάρκωμα παραμένουν χαμηλά. Πιο συγκεκριμένα, στο μη μεταστατικό ΟΣ, η πενταετής επιβίωση βρίσκεται σε ποσοστά 65-70% ενώ παρουσία μεταστάσεων τα ποσοστά πέφτουν στο 10-20% (Anninga et al., 2011).

Στο πλαίσιο λοιπόν της αναζήτησης μεθόδων για να βελτιωθεί η επιβίωση των ασθενών, προέκυψε από πολλές έρευνες πως τα μικρά μη κωδικά RNAs (miRNAs) παίζουν σημαντικό ρόλο στην διάγνωση, πρόγνωση και θεραπεία του ΟΣ (J. Wang et al., 2019). Πρόκειται για μετάγραφα RNA που παρόλο που δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνη επιδρούν στην έκφραση άλλων mRNA. Η βιογένεση και ο ρόλος τους σε όλες τις εκφάνσεις του ΟΣ θα αναλυθούν εκτενώς στα επόμενα κεφάλαια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAS ΣΤΗ ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ

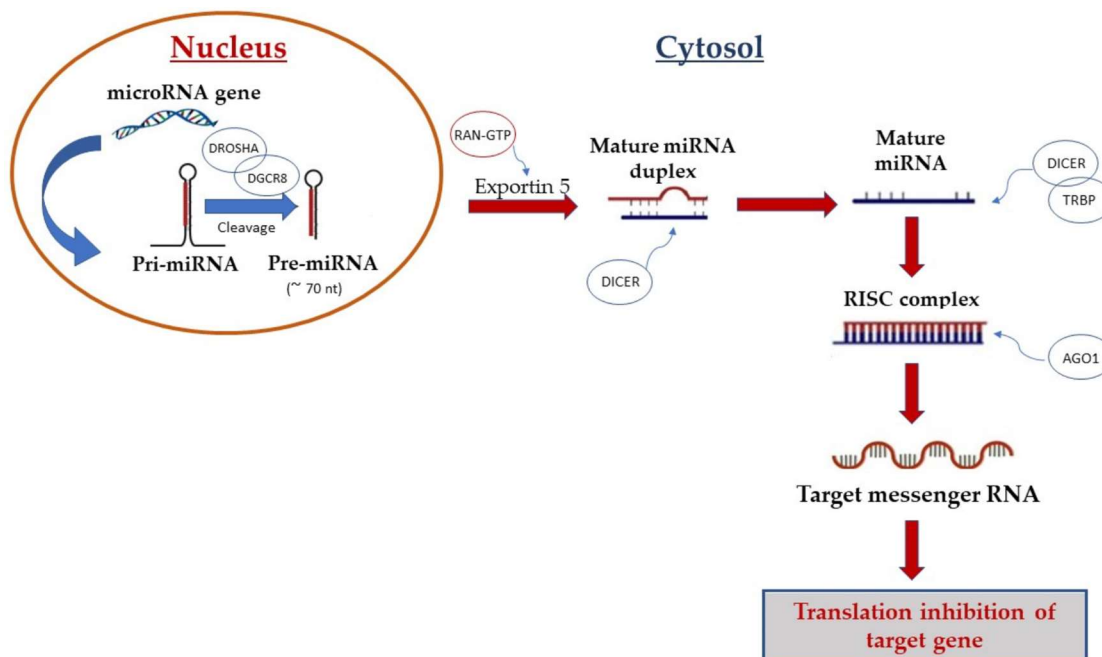
1.1. ΜΙΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ RNAs (miRNAs)

Τα μικρά μη κωδικά RNA (miRNA) αποτελούν μονόκλιωνα μόρια RNA μήκους 21-25 νουκλεοτιδίων. Σύμφωνα με τη μέχρι τώρα γνώση, φαίνεται να αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης, κυρίως στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο (L. He & Hannon, 2004). Το 1993, οι Lee και συν. εντόπισαν πως το γονίδιο *lin-4* του *C. elegans* οδηγεί στη παραγωγή ενός μορίου RNA, το οποίο παρόλο που δεν μεταφράζεται το ίδιο σε πρωτεΐνη, φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης LIN-14. Με αυτό τον τρόπο, το γονίδιο *lin-4* παίζει σημαντικό ρόλο στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια του *C. elegans*. (R. C. Lee et al., 1993). Λίγα χρόνια αργότερα, το 2000 φάνηκε πως το παράγωγο του γονιδίου *let-7*, ένα μόριο RNA μήκους 21 νουκλεοτιδίων, επηρεάζει και αυτό την διαδικασία ανάπτυξης του νηματώδους σκώληκα, επιδρώντας πιθανόν στην έκφραση των γονιδίων *lin-14*, *lin-28*, *lin-41*, *lin-42* and *daf-12* (Reinhart et al., 2000). Μέχρι σήμερα, έχουν εντοπιστεί περισσότερα από 1000 miRNAs τα οποία αλληλεπιδρούν με πολλαπλά mRNA και παίρνουν μέρος σε πολύπλοκες διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης των φυσιολογικών κυττάρων (J. Wang et al., 2019).

1.1.1. ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Η παραγωγή των miRNAs είναι μία πολύπλοκη διαδικασία στην οποία συμμετέχουν πολλά ένζυμα. Αποτελείται από δύο κύρια στάδια: την πυρηνική σύνθεση και την κυτταροπλασματική σύνθεση (Scuderi et al., 2022). Η μεταγραφή πραγματοποιείται κυρίως από την RNA πολυμεράση II. Παράγονται μεγάλα δίκλιωνα μόρια, τα πρωτογενή miRNA (primary miRNA, pri-miRNA) τα οποία μετά από την επίδραση της RNAάσης III Droscha και του συμπaráγοντα της DGCR8 κατακερματίζονται και προκύπτουν τα μικρότερα πρώιμα miRNA (premature miRNA, pre-miRNA). Τα pre-miRNA έχουν μέγεθος περίπου 65 νουκλεοτιδίων και λαμβάνουν στο χώρο δομή φουρκέτας. Εν συνεχεία το πρώιμο miRNA πρέπει να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα προκειμένου να ολοκληρωθεί η διαδικασία της ωρίμανσης. Η πρωτεΐνη εξπορτίνη 5 δημιουργεί ένα σύμπλοκο μαζί με την GTPάση RAN-GTP και το pre-miRNA. Με την υδρόλυση του GTP το pre-miRNA μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα και το σύμπλοκο αποσυναρμολογείται (Ha & Kim, 2014).

Στο κυτταρόπλασμα, η πρωτεΐνη Dicer, η οποία ανήκει επίσης στην οικογένεια των RNAσών III, μετατρέπει τα pre-miRNA σε δίκλινα ώριμα μόρια miRNA μήκους περίπου 22 νουκλεοτιδίων. Οι δύο αλυσίδες του miRNA χωρίζονται μεταξύ τους και στη συνέχεια το ώριμο μονόκλωνο μόριο miRNA συνδέεται με τη πρωτεΐνη Argonaute (AGO) και διαμορφώνεται το σύμπλοκο RISC (O'Brien et al., 2018).



Εικόνα 1. Βιογένεση των miRNA. Η σύνθεση των miRNA ξεκινάει με τη μεταγραφή του pri-miRNA από την RNA πολυμεράση II. Στη συνέχεια, το pri-miRNA κατακερματίζεται από τις Drosha και DGCR8, μετατρέπεται σε pre-miRNA και εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα μέσω της εξπορτίνης 5. Εκεί, μετά από επεξεργασία με την Dicer παράγεται το ώριμο δίκλινο miRNA. Το μόριο αυτό αφού γίνει μονόκλωνο, προσδένεται στην πρωτεΐνη AGO και δημιουργεί το σύμπλοκο RISC, το οποίο έχει τη δυνατότητα να καταστέλλει τη μετάφραση ή και να αποδομεί το εκάστοτε mRNA στόχο (Scuderì et al., 2022).

Έχει περιγραφεί πως το 52% των γονιδίων που κωδικοποιούν τα miRNA βρίσκονται μεταξύ γονιδίων (intergenic), το 40% βρίσκονται σε ιντρονικές περιοχές και το 8% σε εξωνικές περιοχές άλλων γονιδίων (Hsu et al., 2006). Επιπλέον, πολλά γονίδια miRNA στο γονιδίωμα οργανώνονται σε ομάδες (clusters), γεγονός που υποδηλώνει πως μπορεί να συνεργάζονται στη διεκπεραίωση διάφορων κυτταρικών λειτουργιών (Lagos-Quintana et al., 2003).

Η ρύθμιση της βιογένεσης των miRNAs επιτυγχάνεται σε πολλαπλά επίπεδα. Στο επίπεδο της μεταγραφής, πολύ σημαντικό ρόλο παίζουν οι μεταγραφικοί παράγοντες, που είναι απαραίτητο να προσδεθούν στις κατάλληλες ρυθμιστικές αλληλουχίες για ξεκινήσει τη δράση της η RNA πολυμεράση II. Επιπλέον, τα γονίδια των miRNA

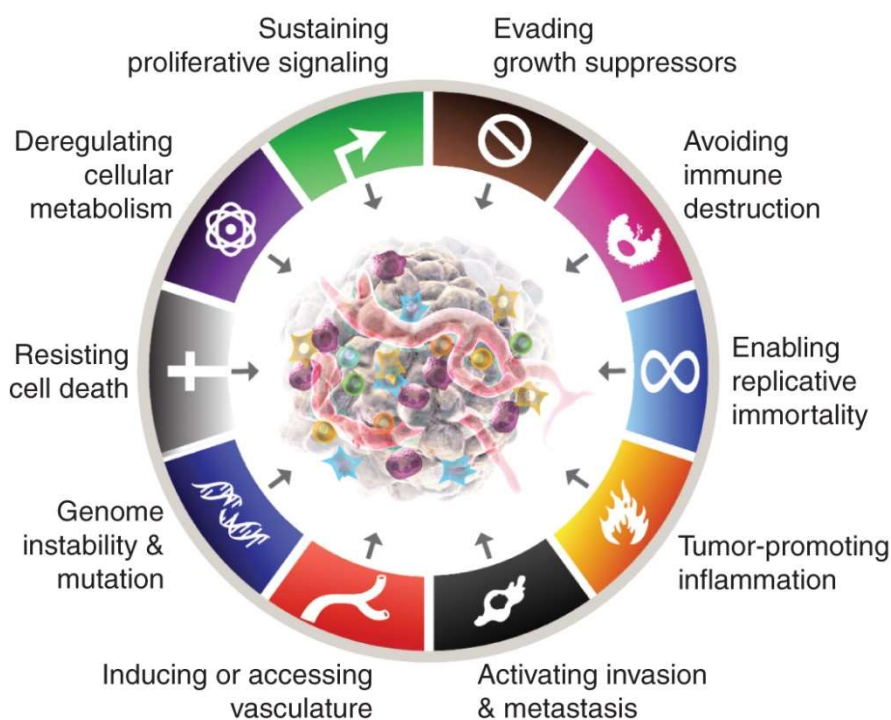
υπάρχουν σε επιγενετικές ρυθμίσεις όπως η μεθυλίωση του DNA και οι τροποποιήσεις των ιστονών. Στο επίπεδο της επεξεργασίας του pri-miRNA προς pre-miRNA και τελικά προς ώριμο miRNA, καθοριστικό είναι το επίπεδο έκφρασης, λειτουργικότητας και ειδικότητας των RNAσών III Droscha και Dicer. Άλλους μηχανισμούς ρύθμισης αποτελούν οι τροποποιήσεις του RNA, όπως η μεθυλίωση και η αδενοσύζηση, η επιλεκτική πρόσδεση στις πρωτεΐνες AGO καθώς και η ελεγχόμενη από ειδικές νουκλεάσες διάσπαση του RNA (Ha & Kim, 2014).

Η αναγνώριση του στόχου του miRNA πραγματοποιείται μέσω μια αλληλουχίας 2-8 νουκλεοτιδίων, η οποία ονομάζεται seed region και βρίσκεται στο 5' άκρο του μορίου (Grimson et al., 2007). Τα miRNA ασκούν το ρυθμιστικό τους ρόλο μέσω της αλληλεπίδρασης τους με τα στοιχεία ανταπόκρισης στο miRNA (miRNA response elements, MREs), τα οποία βρίσκονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή των mRNA των γονιδίων στόχων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, υπάρχουν δύο κύριοι μηχανισμοί με τους οποίους επιτυγχάνεται η αρνητική ρύθμιση των γονιδίων. Όταν η συμπληρωματικότητα μεταξύ miRNA και MRE είναι πλήρης, τότε ενεργοποιείται η νουκλεολυτική λειτουργία της AGO, η οποία αποδομεί το mRNA (Jo et al., 2015). Ωστόσο τις περισσότερες φορές η συμπληρωματικότητα μεταξύ των αλληλουχιών δεν είναι πλήρης. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η πρόσδεση του miRNA στο mRNA οδηγεί σε καταστολή της μετάφρασης του mRNA στόχου (O'Brien et al., 2018). Παράλληλα, έχει περιγραφεί πως ένα miRNA μπορεί να αλληλεπιδράσει με πολλαπλά mRNA και ταυτόχρονα πολλά miRNA να επηρεάζουν τη μετάφραση ενός mRNA (Bartel, 2004). Μέσω των μηχανισμών αυτών, τα μικρά μη κωδικά RNA φαίνεται να εμπλέκονται στην εμφάνιση πολλών συχνών νοσημάτων, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα και νεφρικές νόσοι (Kriegel et al., 2015; Y. Liu et al., 2010), ενώ ιδιαίτερο ρόλο παίζουν αναμφίβολα και στη γενετική του καρκίνου (G. Yang et al., 2021). Ο ρόλος των miRNA στη καρκινογένεση και πιο συγκεκριμένα στην δημιουργία και εξέλιξη του οστεοσαρκώματος αναλύεται στα επόμενα κεφάλαια.

1.1.2. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAS ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

Είναι επιστημονικά αποδεδειγμένο πως η καρκινογένεση αποτελεί μια μακρόχρονη διαδικασία, κατά την οποία σταδιακά συσσωρεύονται μεταλλάξεις σε κύτταρα, οι οποίες τους προσδίδουν κακοήγη χαρακτηριστικά. Τα χαρακτηριστικά αυτά, γνωστά και ως

Hallmarks of Cancer, περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τους Hanahan και Weinberg το 2000, οι οποίοι υποστήριξαν ότι κατά κύριο λόγο ο καρκινικός φαινότυπος αποτελεί το αποτέλεσμα 6 βασικών αλλαγών στην κυτταρική φυσιολογία, οι οποίες μάλιστα είναι κοινές μεταξύ των διάφορων καρκινικών τύπων: (1) αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα, (2) ανθεκτικότητα σε αντι-αναπτυξιακά σήματα, (3) αποφυγή του κυτταρικού θανάτου, (4) απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού, (5) διαρκή αγγειογένεση, (6) μεταστατικό δυναμικό και δυνατότητα ιστικής εισβολής (Hanahan & Weinberg, 2000). Δέκα χρόνια αργότερα, το μοντέλο αυτό επεκτάθηκε και περιέλαβε επιπλέον 4 χαρακτηριστικά: (7) την γενωμική αστάθεια, (8) την φλεγμονή ως μέσο προώθησης της ογκογένεσης, (9) την αποφυγή του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και (10) τη απορρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού (Hanahan & Weinberg, 2011).



Εικόνα 2. The Hallmarks of cancer. Σχηματική απεικόνιση των θεμελιωδών χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων έτσι όπως περιγράφηκαν από τους Hanahan και Weinberg. (Hanahan & Weinberg, 2011).

Παρόλο που μεγάλο μέρος αυτών των χαρακτηριστικών ανάγονται σε μεταλλαγές που αφορούν το mRNA και τις πρωτεΐνες των κυττάρων (Bandres et al., 2007), έχει αποδειχτεί πως συγκεκριμένα miRNA συμμετέχουν σε πολλές αν όχι σε όλες τις

παραπάνω διεργασίες (Visone & Croce, 2009). Σε αυτό το πλαίσιο, γίνεται κατανοητό πως η μελέτη των miRNA και των στόχων τους μπορεί να μας δώσει πολλές πληροφορίες και να διευρύνει σημαντικά τις γνώσεις μας σχετικά με τη βιολογία του καρκίνου.

Η πρώτη αναφορά σχετικά με τη συμβολή των miRNA στον καρκίνο δημοσιεύθηκε το 2002 και αφορούσε ασθενείς με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ). Στη συγκεκριμένη κακοήθεια, πάνω από τα μισά περιστατικά φέρουν ένα έλλειμμα στη περιοχή 13q14, σε ομόζυγη ή ετερόζυγη κατάσταση. Στην περιοχή αυτή, και πιο συγκεκριμένα, εντός του ιντρονίου 4 του γονιδίου LEU2, βρίσκονται τα γονίδια που κωδικοποιούν τα miR-15 και miR-16. Στην έρευνα αυτή λοιπόν φάνηκε πως στο 68% (41/60) των περιπτώσεων ασθενών με ΧΛΛ τα επίπεδα έκφρασης αυτών των 2 miRNA ήταν σαφώς μειωμένα σε σχέση με τα επίπεδα τους σε φυσιολογικά CD5+ λεμφοκύτταρα (Calin et al., 2002). Σε μεταγενέστερη μελέτη φάνηκε πως η περιοχή seed και των 2 αυτών miRNA είναι συμπληρωματική με το mRNA του αντιαποπτωτικού γονιδίου BCL-2 καθώς και ότι τα επίπεδα των miR-15 και miR-16 είναι αντιστρόφως ανάλογα με τα επίπεδα της πρωτεΐνης Bcl-2. Με αυτό το τρόπο, αποδείχθηκε πως αυτά τα miRNA έχουν ογκοκατασταλτική δράση, καταστέλλοντας το Bcl-2 και προωθώντας την απόπτωση, ενώ η απουσία τους μπορεί δυνητικά να συμβάλλει στην καρκινογένεση (Cimmino et al., 2005).

Στο καρκίνο του πνεύμονα, τη συχνότερη κακοήγη νεοπλασία στον άνθρωπο, πολύ σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει η έκφραση της ομάδας miRNA let-7. Η μειωμένη έκφραση let-7 έχει συνδεθεί με χειρότερη πρόγνωση στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και με χειρότερη επιβίωση μετά από χειρουργική επέμβαση (Yanaihara et al., 2006). Έχει βρεθεί μάλιστα ότι το συγκεκριμένο miRNA φέρει αλληλουχία συμπληρωματική με την 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου RAS. Η μείωση του let-7 οδηγεί σε υπερέκφραση του RAS και ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Johnson et al., 2005).

Οι αλλαγές στην έκφραση των miRNA είναι συνήθως προϊόν γενετικών και επιγενετικών τροποποιήσεων, απορρύθμισης των μεταγραφικών παραγόντων και μεταβολών στο μονοπάτι της βιοσύνθεσής τους. Παράλληλα, είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τα miRNA δεν βρίσκονται σε τυχαίες θέσεις μέσα στο γονιδίωμα αλλά εντοπίζονται συχνά σε θέσεις όπου εμφανίζονται απώλειες ετεροζυγωτίας, σε περιοχές που μπορεί να υπόκεινται σε γονιδιακή ενίσχυση αλλά και σε «εύθραυστες περιοχές» του γονιδιώματος (Di Leva et al., 2014).

Τα miRNA είναι δυνατόν να δράσουν ως ογκογονίδια, ως ογκοκατασταλτικά γονίδια, ενώ κάποιες φορές είναι δυνατόν να συνδυάσουν αυτές τις δύο λειτουργίες (Visone & Croce, 2009). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ομάδα (cluster) 6 μικρών μη κωδικών RNA, γνωστή ως miR-17-92. Το σύνολο αυτών των miRNA φαίνεται πως ενεργοποιείται από το c-Myc και 2 miRNA αυτής της ομάδας (miR-17-5p και miR-20a) δρουν ογκογενετικά, καταστέλλοντας τον παράγοντα E2F1, που είναι γνωστό πως προωθεί την απόπτωση (O'Donnell et al., 2005). Παράλληλα όμως, έχει αποδειχτεί πως το miR-17-5p αλληλεπιδρά και με το AIB1 (Amplified in Breast Cancer 1). Σε κυτταρικές σειρές από καρκίνο του μαστού φάνηκε πως το miR-17-5p είναι μειωμένο, ενώ παράλληλα η καταστολή που προκαλεί στο AIB1 συνδέθηκε με μειωμένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Hossain et al., 2006). Επομένως, γίνεται κατανοητό ότι η δράση των miRNAs καθορίζεται από το εκάστοτε μόριο-στόχο.

Στον οστίτη ιστό, που αποτελεί αντικείμενο ενδιαφέροντος στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, γνωρίζουμε πως η διατήρηση της οστικής μάζας είναι το αποτέλεσμα μίας λεπτής ισορροπίας μεταξύ της οστικής δόμησης από τους οστεοβλάστες και της οστικής απορρόφησης των οστεοκλαστών. Η ισορροπία αυτή ελέγχεται μεταξύ άλλων και από miRNAs (Scuderi et al., 2022). Τα μόρια αυτά, καθώς συγκαταλέγονται στους κύριους ρυθμιστές του οστικού μεταβολισμού, αποτελούν αναμφίβολα πεδίο ενδιαφέροντος, αναφορικά με τη συμβολή τους στη δημιουργία και στην ανάπτυξη οστικών όγκων και ειδικά του οστεοσαρκώματος (Nugent, 2015).

1.2. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAS ΣΤΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ

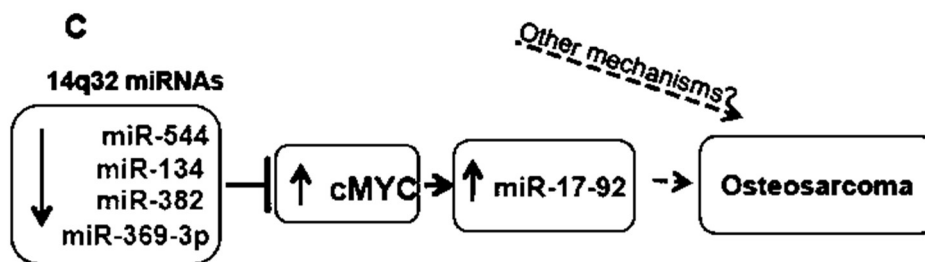
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος και η ογκογένεση γενικότερα είναι πολυσταδιακές διαδικασίες, στις οποίες συμμετέχουν πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια. Στη ρύθμιση των μονοπατιών αυτών, μεταξύ άλλων, φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο και τα miRNAs. Η ανίχνευση, επομένως, των miRNAs που δυσλειτουργούν και συμβάλουν με αυτό το τρόπο στο κακοήγη φαινότυπο μπορεί να συμβάλει μελλοντικά στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση του οστεοσαρκώματος (Nugent, 2015).

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch φαίνεται να εμπλέκεται στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση και για αυτό το λόγο η υπερλειτουργία του έχει συνδεθεί με πολλές κακοήθειες, μεταξύ των οποίων και το

οστεοσάρκωμα (Z. Wang et al., 2010). Το μονοπάτι αυτό έχει φανεί πως αποτελεί στόχο για τα μικρά μη κωδικά RNAs της ομάδας miR-34. Πιο συγκεκριμένα, τα miR-34b και 34c φέρουν αλληλουχίες συμπληρωματικές με την 3' αμετάφραστη περιοχή του Notch1 και δύνανται να προκαλέσουν σημαντική μείωση της έκφρασης του (Bae et al., 2012). Παράλληλα, έχει δειχθεί πως η πρωτεΐνη p53 δρα ως μεταγραφικός παράγοντας για την έκφραση της ομάδας miR-34 (L. He et al., 2007) και πως τα miRNAs αυτά είναι στατιστικά σημαντικά μειωμένα σε οστικά δείγματα από ασθενείς με οστεοσάρκωμα σε σχέση με φυσιολογικά δείγματα. Ως στόχοι του miR-34 στη συγκεκριμένη μελέτη αναδείχθηκαν τα CDK6, E2F3, η κυκλίνη E2 και το Bcl-2 (C. He et al., 2009). Με βάση τα παραπάνω, μπορούμε με ασφάλεια να υποθέσουμε πως πιθανότατα το miR-34 αποτελεί miRNA με ογκοκατασταλτικές ιδιότητες, που ασκεί τη δράση του με πολλαπλούς μηχανισμούς.

Επιπλέον, το miR-16 έχει βρεθεί επίσης να παρουσιάζει μειωμένη έκφραση σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος καθώς και σε δείγματα από ασθενείς. Μετά από διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς U2OS με λεντι-ικό φορέα που έφερε το γονίδιο του miR-16 παρατηρήθηκε σε μεγάλο ποσοστό κυττάρων παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G0/G1. Μεταξύ των στόχων του συγκεκριμένου miRNA βρέθηκαν να είναι οι IGF1R, Kras and Raf1, οι οποίοι παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο αυξητικό δυναμικό των κυττάρων μέσω του μονοπατιού Raf1–MEK1/2–ERK1/2 (L. Chen et al., 2013). Σε μεταγενέστερη έρευνα, φάνηκε επίσης ότι στόχος του miR-16 είναι και το RAB23, το οποίο θεωρείται ογκογονίδιο και ανήκει στην υπεροικογένεια των Ras GTPασών (Jiao et al., 2018).

Σε ανάλυση του προφίλ των miRNA από 6 δείγματα οστεοσαρκώματος και 6 δείγματα φυσιολογικού ιστού προέκυψε στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης ομάδας miRNA που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14, στη θέση 14q32 και παράλληλα αύξηση έκφρασης της ομάδας miR-17-92. Η έκφραση των miRNAs που κωδικοποιούνται από τον γενετικό τόπο 14q32 είναι αντιστρόφως ανάλογη με την έκφραση του c-MYC και μάλιστα βρέθηκε πως 4 από αυτά τα miRNA (miR-544, miR-369-3p, miR-382, miR-154 και miR-134) στοχεύουν απευθείας και αναστέλλουν μέσω συμπληρωματικότητας το συγκεκριμένο αυτό ογκογονίδιο. Παράλληλα, το c-MYC πιστεύεται ότι δρα σαν μεταγραφικός παράγοντας για την έκφραση της ομάδας miR-17-92. Η απορρύθμιση του δικτύου 14q32 miRNAs, c-MYC και miR-17-92 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη παθογένεση του οστεοσαρκώματος (Thayanithy et al., 2012).



Εικόνα 3. Δίκτυο Αλληλεπίδρασης 14q32 miRNA-cMYC-miR-17-92. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης της απώλειας έκφρασης των miRNAs στη θέση 14q32. Τα miR-544, miR-369-3p, miR-382, miR-154 και miR-134 έχουν σαν στόχο το ογκογονίδιο c-MYC και η απώλεια τους οδηγεί σε υπερέκφραση του c-MYC. Το c-MYC δρα σαν μεταγραφικός παράγοντας για την έκφραση της ομάδας miR-17-92, η οποία σε συνεργασία με άλλους παράγοντες συμβάλλει στη βιογένεση του οστεοσαρκώματος (Thayanithy et al., 2012)

Η ομάδα miR-17-92 αποτελείται από 7 miRNAs, miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a και miR-92-1, τα οποία κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 13, στη θέση c13orf25. Η ομάδα αυτή έχει βρεθεί να εμπλέκεται σε πολλές κακοήθειες, αναστέλλοντας αποπτωτικούς παράγοντες, ειδικά σε περιβάλλον υπερέκφρασης του c-MYC (Xiang & Wu, 2010). Πρόκειται για μία από τις πρώτες ομάδες miRNAs που αναγνωρίστηκαν ως πιθανά ογκογονίδια και έλαβαν την ονομασία ‘oncomiR-1’ (L. He et al., 2005). Μέλη αυτού του συμπλόκου φαίνεται να απορρυθμίζονται και κατά την παθογένεση του ΟΣ. Η έκφραση του miR-19, όταν μετρήθηκε σε 42 δείγματα οστεοσαρκώματος και 4 κυτταρικές σειρές ΟΣ, φάνηκε να είναι σημαντικά αυξημένη σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Η αύξηση του miR-19 συνδέθηκε με υψηλότερο στάδιο κατά TNM, αυξημένο μέγεθος και ενισχυμένο μεταστατικό δυναμικό του όγκου. Στη συγκεκριμένη μελέτη υποστηρίχθηκε πως το miR-19 αλληλεπιδρά με το γονίδιο SOCS6 και προωθεί την ανάπτυξη του όγκου μέσω του μονοπατιού JAK/STAT (Z. Sun et al., 2018). Άλλο μέλος του miR-17-92, το miR-17-5p έχει βρεθεί επίσης αυξημένο σε δείγματα από 116 ασθενείς με ΟΣ. Το miR-17-5p αλληλεπιδρά με το γονίδιο BRCC2 και με αυτό το τρόπο συμβάλλει στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων (W. Wang et al., 2016).

Παράλληλα, το PTEN είναι ένα μόριο με ογκοκατασταλτικές ιδιότητες, το οποίο συχνά υποεκφράζεται σε πολλά είδη κακοηθειών. Ασκεί τη δράση του ως φωσφατάση και αναστέλλει την PIP3, επιδρώντας με αυτό το τρόπο στην σηματοδότηση PI3K/Akt. Το

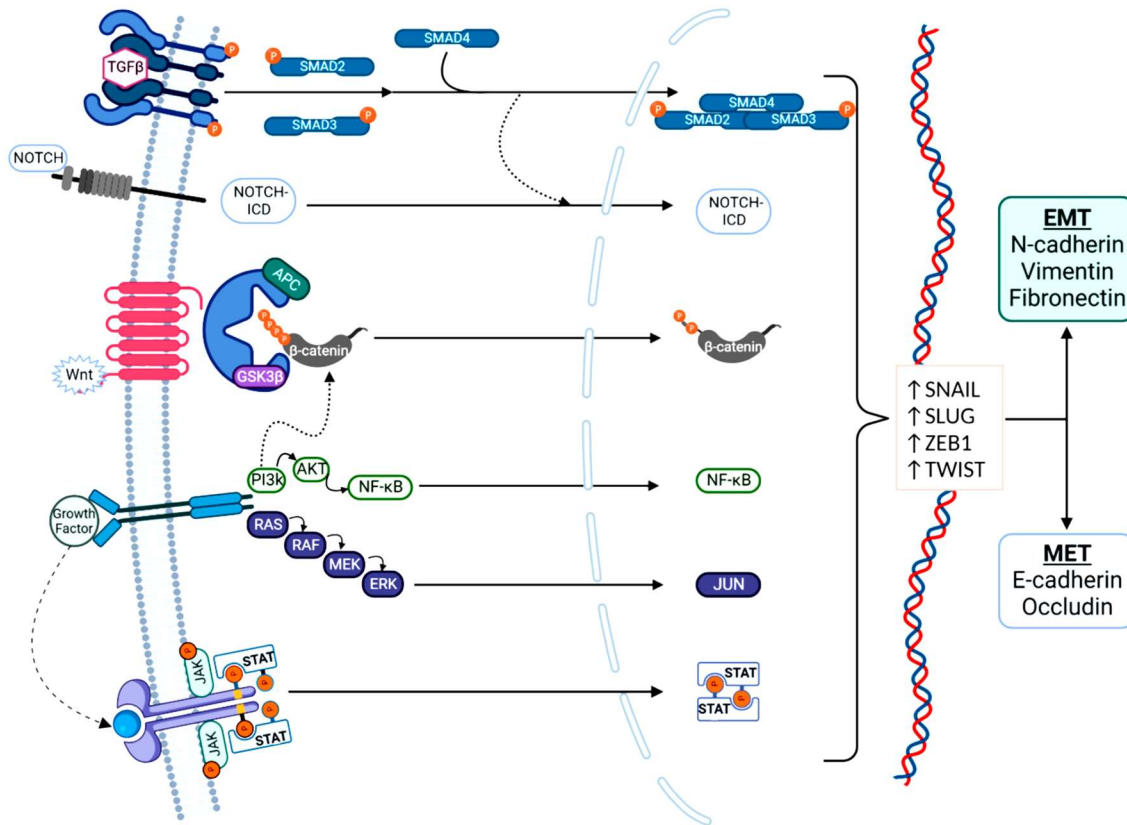
PTEN έχει βρεθεί να είναι στόχος πολλών miRNA, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται τα miR-21, miR-216, miR-155 και miR-524 (Z. Dong et al., 2022).

Στο μικροπεριβάλλον του ΟΣ, μεταξύ άλλων στηρικτικών κυττάρων εντοπίζονται μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (mesenchymal stem cells, MSCs). Αυτά έχει φανεί ότι δύνανται να επηρεάσουν τον φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων και η δράση τους αυτή στηρίζεται εν μέρει και στη δράση των εξωσωμάτων (Qi et al., 2017). Τα εξωσώματα είναι κυστίδια μεγέθους 40-100 nm τα οποία μπορεί να φέρουν μόρια όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα (mRNAs, microRNAs, long non-coding RNAs, γενωμικό DNA, cDNA ή και μιτοχονδριακό DNA) και μπορούν με αυτό το τρόπο να συμβάλλουν στη διακυτταρική επικοινωνία (Camussi et al., 2010). Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs) έχει φανεί πως παράγουν εξωσώματα τα οποία φέρουν το miR-208a. Όταν οι κυτταρικές σειρές MG-63 και Saos-2 εκτέθηκαν σε αυτά τα εξωσώματα εμφάνισαν υψηλότερη δυνατότητα επιβίωσης, δημιουργίας κλώνων και μετανάστευσης σε σχέση με κύτταρα που εκτέθηκαν σε εξωσώματα που έφεραν αναστολέα του συγκεκριμένου miRNA. Στόχος του miR-208 φάνηκε, μέσω συστημάτων βιοπληροφορικής, να είναι το PDCD4 το οποίο αναστέλλεται και με αυτό το τρόπο προωθείται η λειτουργία του σηματοδοτικού μονοπατιού ERK1/2 (Qin et al., 2020).

Παράλληλα είναι σημαντικό να τονίσουμε πως τα miRNAs δημιουργούν δίκτυα αλληλεπιδράσεων με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και με τα γονίδια στόχους τους. Ο Poos και συν. ανέλυσε την έκφραση των miRNAs, μεταγραφικών παραγόντων και μορίων στόχων σε 7 διαφορετικές κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος με σκοπό να μελετήσει τα δίκτυα αυτά και να δημιουργήσει ένα μοντέλο έκφρασης το οποίο συνδέεται με υψηλή δραστηριότητα πολλαπλασιασμού. (Δημιουργήθηκε με αυτό το τρόπο μία βάση δεδομένων για αυτό το πολύπλοκο σύστημα αλληλεπιδράσεων, η οποία είναι διαθέσιμη στην διαδικτυακή ιστοσελίδα http://www.complex-systems.uni-muenster.de/co_networks.html. Οι συγγραφείς στη συγκεκριμένη μελέτη κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μείωση της έκφρασης των miR-9-5p, miR-138, και miR-214 συνδέεται με αυξημένο δυναμικό πολλαπλασιασμού. Τα miRNAs αυτά βρέθηκε να αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι SP1 και MYC και με αυτό το τρόπο να εμπλέκονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια NFκΒ και RB1 (Poos et al., 2013).

1.3. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAS ΣΤΗΝ ΕΠΙΘΗΛΙΟΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΚΑΙ ΣΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΩΝ

Η επιθηλιομεσεγγυματική μετατροπή είναι η διαδικασία κατά την οποία επιθηλιακά κύτταρα αποκτούν χαρακτηριστικά μεσεγγυματικών κυττάρων. Με αυτό το τρόπο προωθείται η διείσδυσή τους σε βαθύτερα ιστικά στρώματα, η μετανάστευση και τελικά η εγκαθίδρυση μεταστάσεων (Brabletz et al., 2021). Τα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία παίζουν καθοριστικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία είναι τα TGFβ, NOTCH, Wnt/β-



Εικόνα 4. Σηματοδοτικά μονοπάτια στην Επιθηλιο-Μεσεγγυματική Μετατροπή (EMT). Η ρύθμιση της EMT πραγματοποιείται μέσω της ενεργοποίησης πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που συμμετέχουν είναι τα TGF/SMAD, Notch, Wnt, PI3K/Akt, RAS/RAF και JAK/STAT. Μεταγραφικοί παράγοντες με κύριο ρόλο στην EMT είναι οι Snail, Slug, ZEB1, και TWIST (Hinton et al., 2023)

catenin, PI3K/Akt καθώς και το JAK/STAT. Τελικοί στόχοι των μονοπατιών αυτών έχει φανεί πως είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες SNAIL, SLUG, ZEB1 και TWIST. Ο μεσεγγυματικός φαινότυπος εδραιώνεται με την έκφραση των δεικτών N-καντχερίνη, βιμεντίνη και ινωδονεκτίνη (O'Brien et al., 2018).

Στο οστεοσάρκωμα, του οποίου η προέλευση είναι εξ αρχής μεσεγγυματική, ο όρος EMT χρησιμοποιείται καταχρηστικά για να περιγράψει την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών

μονοπατιών και την έκφραση των κατάλληλων δεικτών που διατηρούν το μεσεγχυματικό φαινότυπο και κατ' επέκταση προωθούν την επιθετική συμπεριφορά της κακοήθειας και τελικά την ανάπτυξη απομακρυσμένων μεταστάσεων (Hinton et al., 2023).

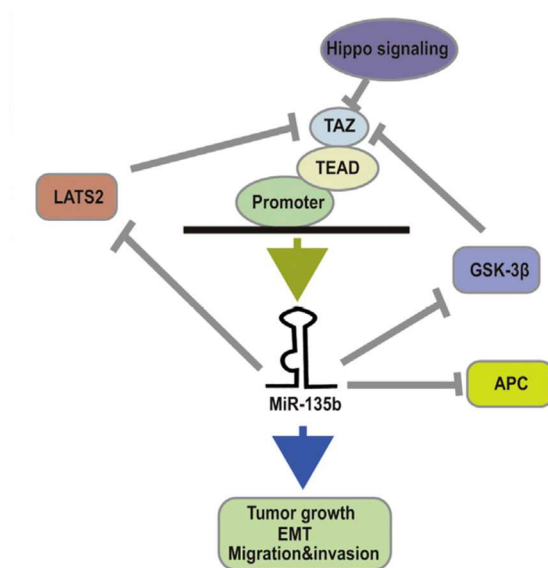
Σε μελέτη που ανέλυσε την έκφραση miRNA σε 62 δείγματα ΟΣ αλλά και σε κυτταρικές σειρές φάνηκε πως η έκφραση του miR-210-5p είναι σημαντικά αυξημένη σε σχέση με φυσιολογικούς ιστούς. Μάλιστα, στη κυτταρική σειρά HOS μετά από διαμόλυνση με miR-210-5p με τη βοήθεια λεντι-ϊκού φορέα, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης των μεσεγχυματικών δεικτών N-καντχερίνη, βιμεντίνη και MMP2, αλλά και μείωση της έκφρασης του επιθηλιακού δείκτη E-καντχερίνη, στηρίζοντας με αυτό το τρόπο την άποψη ότι το συγκεκριμένο miRNA συμμετέχει ενεργά στην EMT. Στόχος του miR-210-5p φάνηκε να είναι το PIK3R5, του οποίου η καταστολή απενεργοποιεί το μονοπάτι Akt/mTOR και προωθεί την αυτοφαγία. Το miR-210-5p τελικά βρέθηκε να συνδέεται με υψηλό στάδιο κατά TNM, πνευμονικές μεταστάσεις καθώς και αυξημένο μέγεθος όγκου (W. Liu et al., 2020). Αντιλαμβανόμαστε με αυτό το τρόπο ότι υφίσταται μία σύνδεση μεταξύ της EMT και του μονοπατιού της αυτοφαγίας. Παλαιότερα, οι διαδικασίες αυτές θεωρούνταν ανεξάρτητες. Ωστόσο, αποδείχτηκε όχι μόνο ότι σχετίζονται αλλά και ότι η αυτοφαγία μπορεί να προωθήσει ή και να καταστέλλει την EMT ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες (Gugnoni et al., 2016).

Ένζυμα με πολύ σημαντικό ρόλο στην EMT και στην εμφάνιση μεταστάσεων είναι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs). Παράλληλα, ο ιστικός αναστολέας των μεταλλοπρωτεϊνών 2 (TIMP2) έχει βρεθεί να συνδέεται με μείωση της ανάπτυξης σε πολλά είδη κακοηθειών. Ο αναστολέας αυτός έχει αναδειχθεί ως στόχος για το miRNA miR-93, το οποίο έχει βρεθεί αυξημένο σε δείγματα ασθενών με ΟΣ. Η υψηλή έκφραση του miR-93 και η χαμηλή έκφραση TIMP2 συσχετίστηκαν όχι μόνο με αυξημένο μέγεθος όγκου αλλά και με απομακρυσμένες μεταστάσεις (H. Zhang et al., 2019). Είναι επιπλέον ιδιαίτερα σημαντικό να τονίσουμε ότι το TIMP2 έχει βρεθεί να είναι στόχος και του miR-1271 (G. Lu et al., 2018). Τόσο το miR-93 όσο και το miR-1271 λειτουργούν επομένως ως ογκογονίδια.

Αντίθετα, στην κατηγορία των ογκοκατασταλτικών μορίων φαίνεται να εντάσσεται το miR-766-3p, το οποίο έχει συνδεθεί με κακοήθειες όπως το ηπατοκυτταρικό και το νεφρικό καρκίνωμα (C. Chen et al., 2017; You et al., 2018). Σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος φάνηκε πως η μείωση της έκφρασης του miR-766-3p αυξάνει την έκφραση της βιμεντίνης και της N-καντχερίνης και πιθανόν να εμπλέκεται με αυτό το

τρόπο στην EMT, τη διήθηση ιστών και στη δημιουργία μεταστάσεων. Στην ίδια έρευνα φάνηκε πως στόχος του συγκεκριμένου miRNA είναι το BCL9L, το οποίο γνωρίζουμε ότι συμμετέχει ως συν-ενεργοποιητής στο μονοπάτι Wnt/ β -catenin (S. Zhang et al., 2020). Το συγκεκριμένο μονοπάτι έχει βρεθεί πολύ συχνά να υπερλειτουργεί σε κακοήθη κύτταρα ΟΣ και πολλά miRNA εμπλέκονται στην απορρύθμιση του. Το miR-135b έχει βρεθεί επίσης να επιδρά στο συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι, μειώνοντας την έκφραση αναστολέων του, όπως οι GSK3 β , β -TrCP, CK1 α και APC. Παράλληλα, ως στόχος του συγκεκριμένου miRNA αναγνωρίστηκε και το TET3 και η καταστολή του συνέβαλε στην ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch. Η ενεργοποίηση των Wnt/ β -catenin και Notch μέσω υπερέκφρασης του miR-135b φάνηκε όχι μόνο να συνδέεται με αυξημένη διηθητική συμπεριφορά σε κυτταρικές σειρές, αλλά και με την *in vivo* δημιουργία πνευμονικών μεταστάσεων σε nude ποντίκια (Jin et al., 2017).

Το miR-135b φαίνεται να εμπλέκεται και στο μονοπάτι Hippo, άλλο ένα μονοπάτι με ιδιαίτερο ρόλο στην EMT και στη δημιουργία μεταστάσεων. Στο μονοπάτι αυτό καθοριστικής σημασίας είναι οι πρωτεΐνες YAP (Yes-associated protein) και TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif). Οι πρωτεΐνες αυτές δεν συνδέονται απευθείας με το DNA αλλά προσδένονται στους μεταγραφικούς παράγοντες TEAD, προκειμένου να αλληλεπιδράσουν με τα γονίδια στόχους τους (Pobbati & Hong, 2013). Η έκφραση της πρωτεΐνης TAZ βρέθηκε σε κυτταρικές σειρές U2OS και HOS να είναι ανάλογη με την έκφραση δεικτών EMT. Παράλληλα, μεταξύ των γονιδίων στόχων του TAZ φάνηκε να είναι και το γονίδιο που κωδικοποιεί το miR-135b. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε ότι στόχοι του miR-135b είναι τα mRNA των γονιδίων LATS2, APC, and GSK-3B, τα οποία λειτουργούν ως αναστολείς της TAZ. Διαμορφώνεται με αυτό το τρόπο ένα δίκτυο θετικής παλίνδρομης ρύθμισης όπου το TAZ προωθεί την μεταγραφή του miR-135b και στη συνέχεια το τελευταίο καταστέλλει τους αναστολείς του TAZ, προωθώντας με αυτό το τρόπο την EMT και την επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων (Shen et al., 2017).

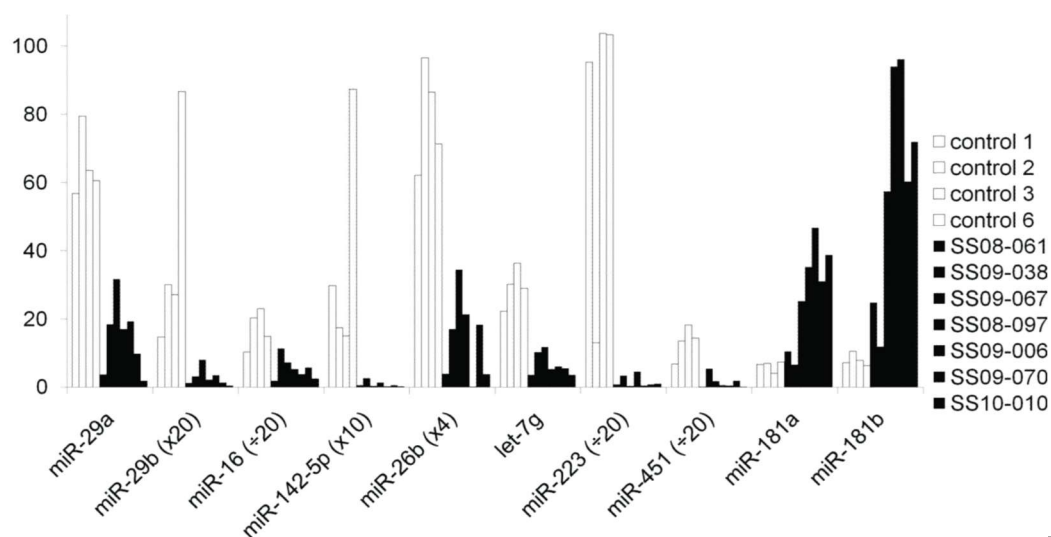


Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση του βρόγχου θετικής παλίνδρομης ρύθμισης TAZ-miR-135b. Το TAZ προωθεί την έκφραση του miR-135b, το οποίο στη συνέχεια αναστέλλει τις πρωτεΐνες LATS2, APC και GSK-3B, οι οποίες φυσιολογικά λειτουργούν ως αναστολείς της TAZ (Shen et al., 2017).

Άλλο miRNA που φαίνεται να έχει διττό ρόλο στην δημιουργία μεταστάσεων στο ΟΣ είναι το miR-143. Το 2011, οι Osaki και συν. πραγματοποίησαν ανάλυση μικροσυστοιχιών σε κυτταρικές σειρές ΟΣ για να αναδείξουν miRNAs τα οποία συνδέονται με τη δημιουργία μεταστάσεων. Το miR-143, το οποίο είχε την χαμηλότερη έκφραση από όλα τα miRNA, όταν μεταφέρθηκε σε κύτταρα ΟΣ 143B, ήταν το μόνο που μείωσε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό τη διεισδυτικότητα. Σε μία προσπάθεια να αναδειχθεί ο ρόλος του miR-143 ως πιθανό θεραπευτικό μόριο, κύτταρα 143B μεταφέρθηκαν σε 20 αθυμικά ποντίκια και μελετήθηκε η ανάπτυξη πνευμονικών μεταστάσεων. Σε 10 από αυτά χορηγήθηκε επιπλέον και μιμητικό μόριο του miR-143. Από τα 10 αυτά ποντίκια μόνο τα 2 ανέπτυξαν πνευμονικές μεταστάσεις στις 4 εβδομάδες παρακολούθησης. Σε αντίθεση, στην ομάδα ελέγχου, 2 από τα ποντίκια πέθαναν στις 3 εβδομάδες από επιβεβαιωμένες πνευμονικές μεταστάσεις, ενώ στις 4 εβδομάδες πνευμονικές μεταστάσεις εντοπίστηκαν σε 6 από τα 8 ποντίκια. Στη συγκεκριμένη μελέτη αναδείχθηκε η μεταλλοπρωτεΐνάση MMP13 ως πιθανός στόχος του miR-143 (Osaki et al., 2011).

Η μείωση του miR-143 στο ΟΣ, αλλά και ο ανασταλτικός του ρόλος στην διεισδυτικότητα και στην δημιουργία μεταστάσεων, επιβεβαιώνεται και από μεταγενέστερη μελέτη των Sun και συν., οι οποίοι μελέτησαν την έκφραση του σε ιστούς από 33 ασθενείς με ΟΣ και σε κυτταρικές σειρές. Σε αυτή τη μελέτη, στόχος του miR-143 φάνηκε πως είναι το FOSL2, το οποίο ανήκει στην οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων API (activator protein I) και έχει αποδειχθεί πως παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των θηλαστικών, στην ανοσολογική απόκριση καθώς και στη μεταβίβαση αναπαραγωγικών γνωρισμάτων (X. Sun et al., 2018).

Παράλληλα, στην προσπάθεια να μπορέσουμε να ερμηνεύσουμε την κλινική συμπεριφορά του οστεοσαρκώματος, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες για τον εντοπισμό μίας «υπογραφής» miRNA, η οποία πιθανά συνδέεται με την επιθετικότητα ή μη του νεοπλάσματος. Σε ανάλυση 18 δειγμάτων βιοψίας ασθενών με ΟΣ, που δεν είχαν λάβει χημειοθεραπεία, αναδείχθηκε πως 34 συνολικά miRNA εμφάνιζαν στατιστικά σημαντική διαφορική έκφραση σε σχέση με δείγματα μαρτύρων. Από αυτά την υψηλότερη έκφραση είχαν τα miR-181a and miR-181b και την χαμηλότερη τα miR-29b, miR-451 and miR-16. Σε 10 από αυτά τα δείγματα, οι ασθενείς είχαν εμφανίσει ήδη ή ανέπτυξαν σε μεταγενέστερο χρόνο μεταστάσεις. Στους ασθενείς αυτούς φάνηκε να είναι επιπλέον αυξημένη η έκφραση του miR-181c και του miR-27a σε σχέση με αυτούς που



Εικόνα 6. Διαφορική έκφραση miRNAs μεταξύ δειγμάτων ασθενών με ΟΣ (μαύρες στήλες) και υγιών μαρτύρων (λευκές στήλες). Τα αποτελέσματα της RT-PCR ανέδειξαν 34 miRNAs τα οποία εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση μεταξύ υγιών και ασθενών με οστεοσάρκωμα. Τα 10 miRNAs με τη μεγαλύτερη διαφορά στην έκφραση παρουσιάζονται στο παραπάνω διάγραμμα. (Jones et al., 2012)

δεν ανέπτυξαν μεταστάσεις. Προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων αυτών, το miR-27a μεταφέρθηκε μέσω λεντι-ϊικού φορέα σε κυτταρικές σειρές ΟΣ αλλά και σε NOD/SCID ποντίκια. Στις κυτταρικές σειρές φάνηκε πως το συγκεκριμένο μόριο αυξάνει το δυναμικό μετανάστευσης και τη διεισδυτικότητα των κυττάρων, ενώ τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν ανέπτυξαν τόσο μικροσκοπικές όσο και μακροσκοπικές μεταστάσεις. Υποστηρίχθηκε λοιπόν από τους συγγραφείς πως τα miR-181c και miR-27a μπορούν να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά ως δείκτες μεταστατικού δυναμικού (Jones et al., 2012).

Η ανάπτυξη μεταστάσεων και η επιθετική συμπεριφορά του οστεοσαρκώματος έχει συνδεθεί και με άλλα miRNAs, μεταξύ των οποίων είναι τα miR-26a, miR-132, miR-133a, miR-144, miR-183, miR-199a-3p, miR-206, miR-214 και miR-217 (Nugent, 2015).

1.4. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAS ΣΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΘΑΝΑΤΟ

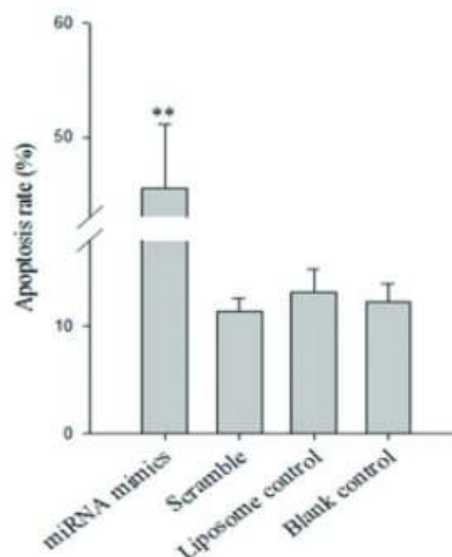
Η μελέτη του Προγραμματισμένου Κυτταρικού Θανάτου (Regulated Cell Death, RCD) ξεκίνησε το 1972 με την καθιέρωση του όρου «απόπτωση» από την ομάδα των Kerr και συν. Οι ερευνητές διαπίστωσαν πως η απόπτωση είναι ένα είδος κυτταρικού θανάτου με βασικές μορφολογικές διαφορές σε σχέση με τη νέκρωση (Kerr et al., 1972). Σήμερα γνωρίζουμε πλέον πως η απόπτωση παίζει καθοριστικό ρόλο σε ποικίλες φυσιολογικές αλλά και παθολογικές κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένων της ομοιόστασης, της ιστικής αναγέννησης αλλά και την καρκινογένεσης. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η διαφυγή από τους αποπτωτικούς μηχανισμούς αποτελεί ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων. Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα κύτταρα το επιτυγχάνουν αυτό περιλαμβάνουν σε γενικές γραμμές την ενίσχυση της έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως οι BCL-2, MCL1, BCL-X_L, BFL1 και BCL-W, αλλά και την απενεργοποίηση ή καταστολή προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως οι BIM, BID, BAX, Noxa και PUMA (Singh et al., 2019). Ωστόσο, στο προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο δεν περιλαμβάνεται μόνο η απόπτωση αλλά ένα γενικότερο σύνολο διαδικασιών που υπάγονται σε μία εκάστοτε ρύθμιση, προκειμένου να προωθήσουν την αυτοκαταστροφή του κυττάρου (Tang et al., 2019).

Τα miRNAs έχουν βρεθεί να εμπλέκονται ενεργά στην ρύθμιση του μηχανισμού της απόπτωσης (J. Li et al., 2016). Το miR-204-5p έχει βρεθεί να έχει στατιστικά σημαντικά μειωμένη έκφραση σε δείγματα οστεοσαρκώματος σε σχέση με παρακείμενους υγιείς

ιστούς. Η αύξηση της έκφρασης του συγκεκριμένου μορίου φάνηκε να παρεμποδίζει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μοντέλα. Μεταξύ των στόχων του miR-204-5p αναδείχθηκε το EBF2, το οποίο υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα και σε *in vitro* μελέτη φάνηκε να συμμετέχει στην ρύθμιση της απόπτωσης, της μετανάστευσης και του δυναμικού διείσδυσης τους (M. Li et al., 2019). Το EBF2 σε παλαιότερες έρευνες έχει φανεί να καταστέλλει την απόπτωση που συνδέεται με τον παράγοντα TRAIL (Patiño-García et al., 2009).

Στην διαφυγή της απόπτωσης φαίνεται παράλληλα να συμμετέχει και το miR-133. Σε μελέτη που ανέλυσε τη διαφορική έκφραση miRNAs σε 23 δείγματα ασθενών με ΟΣ φάνηκε πως 43 miRNAs είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση τους σε σχέση με φυσιολογικούς ιστούς και μεταξύ αυτών τα miR-133a και miR-133b ήταν αυτά με τη χαμηλότερη έκφραση. Για τη διερεύνηση του ρόλου του miR-133b, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυττάρων ΟΣ U2-OS and MG-63 με miR-133b, και φάνηκε πως τα κύτταρα που υπερέκφραζαν το συγκεκριμένο miRNA είχαν σημαντικά μειωμένη δυνατότητα μετανάστευσης και διείσδυσης και στατιστικά σημαντικά αυξημένα ποσοστά απόπτωσης σε σχέση με την ομάδα αναφοράς. Στη συγκεκριμένη έρευνα φάνηκε πως οι στόχοι του συγκεκριμένου μορίου είναι πολλαπλοί και περιλαμβάνουν τα BCL2L2 (Bcl-w), MCL-1, IGF1R, MET, phospho-Akt και FAK (H. Zhao et al., 2013). Έχει φανεί σε προηγούμενες έρευνες ότι το Bcl-w δημιουργεί σταθερά σύμπλοκα με τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες Bax και Bak (Holmgreen et al., 1999), ενώ το MCL-1 δημιουργεί ετεροδιμερές με την Bak και την αναστέλλει (Willis et al., 2005).

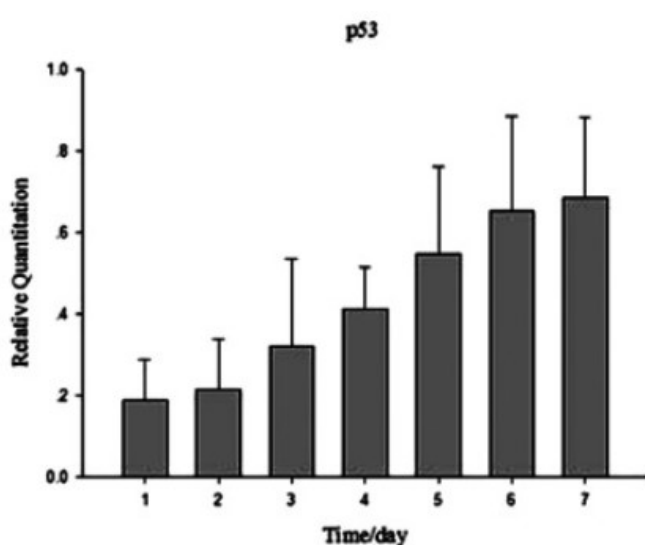
Στην διαδικασία της απόπτωσης φαίνεται να συμμετέχουν και άλλα miRNAs, όπως το miR-199a-3p και το miR-34a. Μιμητικά μόρια αυτών των miRNAs χρησιμοποιήθηκαν για να διαμολύνουν κυτταρικές σειρές



Εικόνα 7. Αύξηση του ποσοστού αποπτωτικών κυττάρων σε κυτταρικούς πληθυσμούς που διαμολύνθηκαν με μιμητικά μόρια των miR-199a-3p και miR-34a. Μέσω της μεθόδου TUNEL, που χρησιμοποιεί το κατακερματισμό του DNA ως δείκτη απόπτωσης, διαπιστώθηκε πως κυτταρικές σειρές ΟΣ που διαμολύνθηκαν με μιμητικά μόρια των miR-199a-3p και miR-34a εμφάνισαν πολύ μεγαλύτερα ποσοστά απόπτωσης σε σχέση με όλα τα δείγματα ελέγχου (Y. Tian et al., 2014).

οστεοσαρκώματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και αύξηση στα επίπεδα απόπτωσης, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 7*. Στόχοι των miRNAs αυτών φάνηκε να είναι τα mTOR, MET και MDM4. Τα mTOR και MET παίζουν σημαντικό ρόλο στην διεκπεραίωση του κυτταρικού κύκλου, ενώ η MDM4 αποτελεί αναστολέα της p53, η οποία αποτελεί μία από τις βασικότερες πρωτεΐνες στο μονοπάτι της απόπτωσης (Y. Tian et al., 2014). Στην ίδια μελέτη, μετά από ποσοτική PCR φάνηκε πως η έκφραση της p53 αυξάνεται διαρκώς μέσα σε διάστημα παρακολούθησης 7 ημερών μετά τη διαμόλυνση, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 8*.

Άλλο miRNA το οποίο φαίνεται να έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο στο ΟΣ είναι το miR-



Εικόνα 8. Αύξηση έκφρασης της p53 στα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με μιμητικά μόρια των miR-199a-3p και miR-34a. Στο διάγραμμα παρατηρείται η σταθερή αύξηση έκφρασης της κύριας αποπτωτικής πρωτεΐνης p53 σε κυτταρικές σειρές από την ημέρα 0 της διαμόλυνσης με τα μιμητικά miRNAs μέχρι και την 7η ημέρα παρακολούθησης.

490-3p. Το συγκεκριμένο miRNA έχει βρεθεί μειωμένο σε κυτταρικές σειρές ΟΣ και η υπερέκφραση του έχει συνδεθεί με μείωση της κυκλίνης D1 και αύξηση δεικτών απόπτωσης όπως η (cleaved) κασπάση 9 και η p21. Ως στόχος του miR-490-3p αναδείχθηκε η πρωτεΐνη HMGA2, η οποία τροποποιεί την δομή της χρωματίνης και έχει βρεθεί αυξημένη σε πολλά νεοπλάσματα μεσεγχυματικής προέλευσης (W. Liu et al., 2015).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στο

προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, εκτός από την απόπτωση, συμπεριλαμβάνονται και άλλες μορφές όπως η φερρόπτωση και η πυρόπτωση. Η φερρόπτωση αποτελεί μία διεργασία που παρουσιάζει σημαντικές μορφολογικές διαφορές σε σχέση με την απόπτωση, όπως για παράδειγμα η κυτταρική διόγκωση και η ρήξη της πλασματικής μεμβράνης (Dixon et al., 2012). Παίζει σημαντικό ρόλο όχι μόνο στη κακρινογένεση αλλά και σε πολλές εκφυλιστικές νόσους (Conrad et al., 2021). Έχει φανεί πως το miR-1987-5p μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό και να προωθήσει την φερρόπτωση σε κύτταρα ΟΣ, στοχεύοντας την πρωτεΐνη GPX4 (Z. Xu et al., 2021).

Η πυρόπτωση αποτελεί μία ακόμη διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου η οποία χαρακτηρίζεται από την έντονη φλεγμονώδη αντίδραση που προκαλεί. Η κινητοποίηση φλεγμονωδών παραγόντων στο μικροπεριβάλλον του όγκου είναι πιθανό να συμβάλλει στην αποτελεσματικότερη αντινεοπλασματική δράση του ανοσοποιητικού συστήματος (Tan et al., 2021). Το miR-181a έχει βρεθεί αυξημένο σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος. Η καταστολή του έχει φανεί πως προωθεί την εξαρτώμενη από την NLRP3 πυρόπτωση, αναστέλλοντας με αυτό το τρόπο το πολλαπλασιασμό των κυττάρων και μετριάζοντας τη διεισδυτική τους ικανότητα (Z. Dong et al., 2022).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAS ΣΤΗΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΟ ΟΣΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, θεωρείται πως το οστεοσάρκωμα ακολουθεί ιεραρχικό τρόπο ανάπτυξης, σύμφωνα με τον οποίο όλα τα κύτταρα του όγκου παράγονται από έναν υποπληθυσμό κυττάρων, τα οποία έχουν την ικανότητα να αυτο-ανανεώνονται και να προωθούν την ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται Καρκινικά Βλαστικά Κύτταρα (Cancer Stem Cells, CSCs) (Basu-Roy et al., 2013). Υποστηρίζεται πως προκύπτουν από συσσώρευση μεταλλάξεων σε αδιαφοροποίητα βλαστοκύτταρα ή και πιο εξειδικευμένα κύτταρα (Clarke et al., 2006). Οι μεταλλάξεις αυτές τα καθιστούν πλέον ικανά να συντηρήσουν τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, να συμβάλλουν στην δημιουργία μεταστάσεων αλλά και να αναπτύξουν μηχανισμούς αντίστασης στη χημειοθεραπεία (Brown et al., 2017).

Στους σημαντικότερους δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό των CSCs συμπεριλαμβάνονται οι CD117, Stro1, CD44, CD133, CD271, CD105, CD199, ABCG2 και Sca-1. Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά βλαστικού κυττάρου πιστεύεται πως διατηρούνται μέσω της έκφρασης και λειτουργίας των μεταγραφικών παραγόντων Sox2, Nanog και Oct3/4 (J. Liu & Shang, 2022). Στα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα, η ικανότητα της αυτοανανέωσης υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση από πολύπλοκα σήματα, προερχόμενα από το κυτταρικό μικροπεριβάλλον (Shenghui et al., 2009). Αντίστοιχα, έχει διατύπωθεί η άποψη πως και στους καρκινικούς ιστούς η διατήρηση χαρακτηριστικών των CSCs επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το μικροπεριβάλλον του όγκου, την «φωλεά» (“niche”) (Shiozawa et al., 2016). Η θεωρία της φωλεάς (“seed and soil”) διατυπώθηκε για πρώτη φορά στα τέλη του 19^{ου} αιώνα από τον Paget, ο οποίος υποστήριξε ότι το μικροπεριβάλλον παρέχει όλους τους απαραίτητους παράγοντες για την έναρξη και συντήρηση της καρκινογένεσης. Το οστικό μικροπεριβάλλον επιβεβαιώνει τη συγκεκριμένη θεωρία, καθώς έχει αποδειχθεί πως τα καρκινικά κύτταρα αλληλεπιδρούν με τους οστεοβλάστες και τους οστεοκλάστες, με αποτέλεσμα να τροποποιείται η αγγειακή μορφολογία και η ανοσολογική απόκριση. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η αύξηση της επιβίωσης των κυττάρων, του πολλαπλασιασμού και της διεισδυτικής τους ικανότητας (Heymann & Rédini, 2011).

Τα μικρά μη κωδικά RNAs, σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, εμπλέκονται στη λειτουργία των CSCs, επηρεάζοντας το πολλαπλασιασμό, το μεταστατικό δυναμικό αλλά και την αντίσταση τους στους συχνότερα χρησιμοποιούμενους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (J. Liu & Shang, 2022). Οι Fiore και συν. κατάφεραν να κατασκευάσουν την πρώτη κυτταρική σειρά καρκινικών βλαστικών κυττάρων ΟΣ, την 3AB-OS. Οι ερευνητές στη συνέχεια σύγκριναν, μεταξύ άλλων, την έκφραση miRNAs μεταξύ της σειράς 3AB-OS και της κυτταρικής σειράς από την οποία προήλθε (MG63). Με βάση τα αποτελέσματα της ποσοτικής PCR κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι 189 miRNAs εμφανίζουν διαφοροποιημένη έκφραση, από τα οποία τα 54 υπερεκφράζονται, τα 98 υποεκφράζονται και 37 εκφράζονται αποκλειστικά στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (Di Fiore et al., 2013).

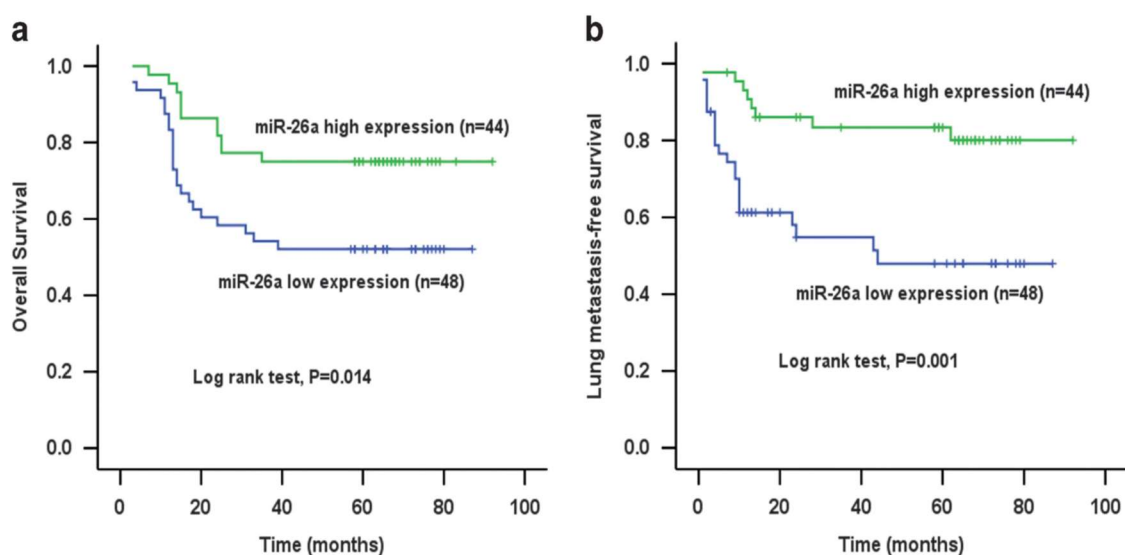
Παράλληλα, σημαντική κρίνεται και η συμβολή των συγκεκριμένων μορίων στη διεκπεραίωση της επικοινωνίας μεταξύ των καρκινικών κυττάρων ΟΣ και του οστικού μικροπεριβάλλοντος (Lei et al., 2020a). Στο παρόν κεφάλαιο διερευνούνται οι μηχανισμοί με τους οποίους τα miRNAs υπεισέρχονται σε αυτές τις κυτταρικές διεργασίες.

2.1 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΤΩΝ CSCs

Μεταξύ των miRNAs με σημαντικό ρόλο στην λειτουργία των CSCs ιδιαίτερη σημασία φαίνεται να έχει το miR-26a. Το συγκεκριμένο miRNA έχει βρεθεί να υποεκφράζεται σε κυτταρικούς πληθυσμούς CSCs σε σχέση με τις αντίστοιχες non-CSCs κυτταρικές σειρές και να συμβάλλει στην ανθεκτικότητα στη δοξορουβικίνη. Η επαγωγή της έκφρασης του, μέσω ιικών φορέων, συνδέθηκε με απώλεια των χαρακτηριστικών πολυδυναμικότητας, καθώς μείωσε την δραστικότητα της ALDH αλλά την έκφραση των δεικτών OCT3/4, NANOG, SOX2 και CD133. Παράλληλα, η διαμόλυνση CSCs, μέσω λεντι-ϊικών φορέων, με αναστολέα του miR-26a οδήγησε σε αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, ενώ η διαμόλυνση με μιμητικό μόριο του miR-26a είχε τα αντίθετα αποτελέσματα, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 9*.

Παράλληλα, το μιμητικό μόριο miR-26a οδήγησε σε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά απόπτωσης, τόσο στην κυτταρική σειρά ZOS όσο και στην 143B (J. Lu et al., 2017). Ως στόχος του miR-26a αναδείχθηκε το γονίδιο JAG1, το οποίο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη Jagged-1. Η πρωτεΐνη αυτή λειτουργεί ως προσδέτης και ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch (Engin et al., 2009). Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch έχει φανεί πως παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση του φαινοτύπου βλαστικού κυττάρου στο οστεοσάρκωμα (Pannuti et al., 2010).

Τέλος, οι Lu και συν., στην προσπάθεια να αξιολογήσουν τη χρησιμότητα του miR-26a ως κλινικά χρήσιμου δείκτη, ανέλυσαν την έκφραση του σε χειρουργικά παρασκευάσματα από 92 ασθενείς με ΟΣ. Όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 10*, η αυξημένη έκφραση miR-26a συνδέθηκε με μεγαλύτερο ποσοστό ολικής επιβίωσης καθώς και με μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης άνευ πνευμονικών μεταστάσεων (J. Lu et al., 2017).



Εικόνα 10. Κλινική σημασία του miR-26a. Με φθορίζοντα *in situ* υβριδισμό σε δείγματα από 92 ασθενείς με ΟΣ φάνηκε ότι η μειωμένη έκφραση του miR-26a συνδέεται με **a.** μειωμένη ολική επιβίωση και **b.** μειωμένη πιθανότητα επιβίωσης άνευ πνευμονικών μεταστάσεων. (J. Lu et al., 2017)

Παράλληλα, έχει φανεί πως σε κύτταρα με φαινότυπο βλαστικού κυττάρου το miRNA miR-34 είναι μειωμένο σε σχέση με τα υπόλοιπα κύτταρα οστεοσαρκώματος. Η αύξηση της έκφρασης του συγκεκριμένου μορίου συνδέθηκε με αναστολή της ανάπτυξης, μειωμένο μεταστατικό δυναμικό και μειωμένη ικανότητα αυτοανανέωσης (Zou et al., 2017). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η έκφραση των miRNAs της οικογένειας miR-34 ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη p53, που λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας (L. He et al., 2007). Ειδικά το miR-34a έχει βρεθεί πως αναστέλλει επιπλέον την αποδιαφοροποίηση των κυττάρων του ΟΣ. Η λειτουργία αυτή πιθανότατα επιτυγχάνεται μέσω απευθείας αναστολής της πρωτεΐνης PAI-1 (Plasminogen Activator Factor-1), η οποία συμβάλλει στην αύξηση της έκφρασης της Sox2. Αντιλαμβανόμαστε λοιπόν ότι η μείωση της έκφρασης του miR-34a προωθεί την αποδιαφοροποίηση των CSCs σε κύτταρα ΟΣ μέσω του άξονα miR-34a–PAI-1–Sox2 (Y. Zhang et al., 2018). Είναι επιπλέον σημαντικό να αναφερθεί πως η μεταγραφή του miR-34a επηρεάζεται και από επιγενετικές τροποποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα, η μεθυλοτρανσφεράση DNMT1, που

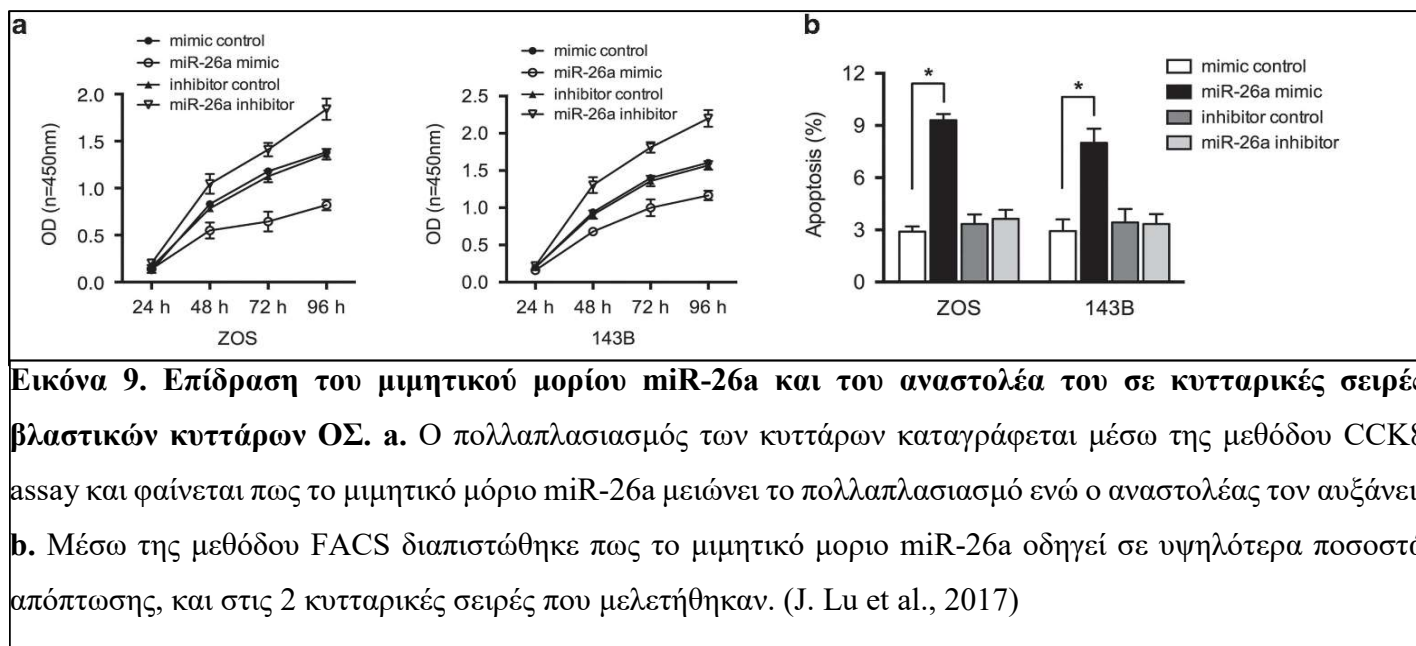
έχει βρεθεί αυξημένη σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα ΟΣ, συμμετέχει στην υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου του miR-34a. Αναστολή της DNMT1 από την 5-αζακυτιδίνη οδηγεί σε υπομεθυλίωση του υποκινητή, αυξημένη έκφραση του miR-34a και καταστολή του φαινοτύπου βλαστικού κυττάρου (Liang et al., 2019).

Επιπρόσθετα, σε ανάλυση των διαφορών στην έκφραση miRNAs ανάμεσα σε κύτταρα CD117⁺Stro-1⁺ και κύτταρα CD117⁺Stro-1⁻ φάνηκε πως τα miRNAs miR-15a, miR-302a, miR-423-5p, miR-212, miR-1247, miR-518b, miR-890 και miR-1243 είχαν στατιστικά σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση ανάμεσα στις 2 ομάδες. Το miR-1243 φάνηκε να υποεκφράζεται στα κύτταρα CD117⁺Stro-1⁺. Ως στόχος του αναδείχθηκε το mRNA της MAP3K9, το οποίο μάλιστα φέρει 2 διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης για το miRNA. Οι ερευνητές με σκοπό τη διερεύνηση της λειτουργίας του MAP3K9, πραγματοποίησαν διαμόλυνση κυτταρικών σειρών MG63 με shRNA και κατέστειλαν το MAP3K9. Η καταστολή του MAP3K9 συνδέθηκε με μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και καταστολή των χαρακτηριστικών της πολυδυναμικότητας (F. Zhao et al., 2015).

Επιπρόσθετα, σε κυτταρικές σειρές CSCs έχει παρατηρηθεί αύξηση του miR-19a σε σχέση με non-CSCs, ενώ η καταστολή του φάνηκε να μειώνει το ποσοστό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Η ανίχνευση των CSCs πραγματοποιήθηκε μέσω της έκφρασης CD133 στην επιφάνειά τους. Στην συγκεκριμένη μελέτη φάνηκε μάλιστα πως η υπερέκφραση του miR-19a αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των HOS-CSCs κατά 21,7% και η καταστολή του τον μειώνει κατά 53,5%. Παράλληλα, η επιβίωση των CSCs μετά από καταστολή του συγκεκριμένου μορίου μειώθηκε κατά 40,4%. Υποστηρίχθηκε τελικά από τους ερευνητές πως το miR-19a αποτελεί μόριο με ογκογενετικές ιδιότητες, που προωθεί την κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και την δημιουργία μεταστάσεων. Στόχος του miR-19a φάνηκε να είναι το PTEN, το οποίο αποτελεί ογκοκατασταλτικό γονίδιο που συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT (D. Zhao et al., 2017).

2.2 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΤΩΝ CSCs

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2014 από τους Fujiwara και συν., φάνηκε πως στη κυτταρική σειρά SaOS2 ο υποπληθυσμός με CD133⁺ εμφανίζει αυξημένη αντίσταση σε συνήθεις χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (δοξορουβικίνη, σισπλατίνη, μεθοτρεξάτη) και μεγαλύτερη διεισδυτική ικανότητα σε σχέση με τα κατά πολύ περισσότερα CD133⁻



κύτταρα. Μάλιστα σε μοριακό επίπεδο τα CD133⁺ κύτταρα χαρακτηρίζονταν από μεγαλύτερη έκφραση των ABCB1, ABCC2, ABCG2, που σχετίζονται με τη χημειοαντίσταση, αλλά και των β4-integrin, ezrin, MMP-13, CXCR4, που σχετίζονται με τη δημιουργία μεταστάσεων (Fujiwara et al., 2014).

Μετά από ανάλυση miRNAs με μικροσυστοιχίες φάνηκε ότι τα CD133⁺ κύτταρα είχαν αυξημένη έκφραση των miR-1, miR-10b και miR-133a. Είναι μάλιστα ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι η διαμόλυνση CD133⁻ κυττάρων με το miR-133a αυξάνει την ικανότητα διείσδυσής τους, ενώ αντίστοιχα αποσιώπηση του συγκεκριμένου miRNA στα CD133⁺ κύτταρα οδήγησε σε μειωμένη διεισδυτικότητα. Παράλληλα, οι ερευνητές, στη προσπάθεια να αποδείξουν τη δυνατότητα μείωσης της μεταστατικής ικανότητας, *in vivo*, σε ορθοτοπικά καρκινικά μοντέλα ποντικών, μέσω καταστολής του miR-133a, χορήγησαν σε ποντίκια LNA-133a (νουκλεϊκό οξύ που καταστέλλει το miR-133a) σε συνδυασμό με το χημειοθεραπευτικό CDDP (σισπλατίνη). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόνο το 30% (3/10) των ποντικών αυτών στο τέλος της θεραπείας έφερε πνευμονικές μεταστάσεις (Fujiwara et al., 2014).

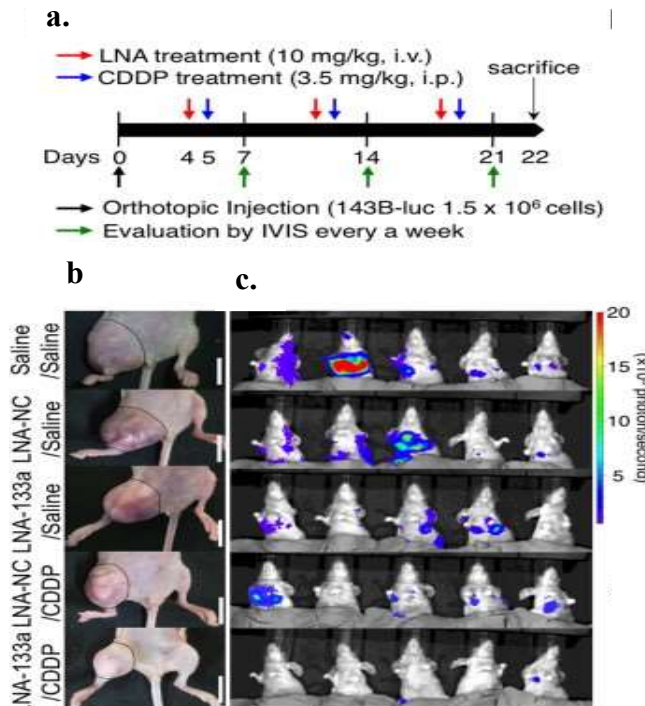
Τέλος, οι Fujiwara και συν. υποστήριξαν ότι το miR-133a ασκεί τη δράση του εν μέρει καταστέλλοντας τις πρωτεΐνες SGMS2, UBA2, SNX30 και ANXA2. Η αύξηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών συνδέθηκε με μειωμένη ικανότητα διείσδυσης σε *in vitro* μοντέλα, ενώ *in vivo* η αύξηση τους συσχετίστηκε με καλύτερη πρόγνωση και καλύτερα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών (Fujiwara et al., 2014).

Παράλληλα, άλλο miRNA με σημαντικό ρόλο στην δημιουργία μεταστάσεων και στην εμφάνιση υποτροπιάζοντων ΟΣ είναι το miR-382. Το συγκεκριμένο μόριο φάνηκε ότι υποεκφράζεται σε δείγματα από υποτροπές ΟΣ, τόσο σε τοπικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο απομακρυσμένων μεταστάσεων. Η υπερέκφραση του miR-382 σε κυτταρικές σειρές με υψηλό μεταστατικό δυναμικό (LM5 και M132) μείωσε δραστικά την ικανότητα διεισδυσης τους, αλλά και την έκφραση των δεικτών EMT και πολυδυναμικότητας. Χαρακτηριστικό είναι επίσης πως η υπερέκφραση του miR-382 σε κύτταρα LM5 μείωσε τον υποπληθυσμό CD133⁺ ενώ η καταστολή του τον αύξησε (M. Xu et al., 2015).

Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν και από το γεγονός ότι εμφύτευση, σε nude ποντίκια, κυττάρων οστεοσαρκώματος LM5, τα οποία υπερέκφραζαν το miR-382, οδήγησε στη δημιουργία όγκων με πολύ περιορισμένη δυνατότητα δημιουργίας πνευμονικών μεταστάσεων. Αντίθετα, η εμφύτευση κυττάρων SaOS2 με κατεσταλμένο το miR-382 οδήγησε σε *in vivo* μοντέλα ΟΣ με υψηλό μεταστατικό δυναμικό (M. Xu et al., 2015).

Το miR-382 φαίνεται να ασκεί τη δράση του μέσω του μεταγραφικού παράγοντα YB1, ο οποίος έχει βρεθεί αυξημένος σε πολλά είδη κακοηθειών και ρυθμίζει τόσο την EMT όσο και την λειτουργία των CSCs (Mouneimne & Brugge, 2009; Stratford et al., 2012). Στην συγκεκριμένη μελέτη, οι Xu και συν. παρατήρησαν ότι το miR-382 και το YB1 συνδέονται με αντιστρόφως ανάλογη σχέση και πως η αλληλουχία seed του miRNA είναι συμπληρωματική με το 3' άκρο του mRNA του YB1 (M. Xu et al., 2015).

Τέλος, οι μελετητές διερεύνησαν την πιθανή χρησιμότητα του miR-382 στη θεραπευτική. Διαπίστωσαν λοιπόν πως η συγχορήγηση miR-382 με δοξορουβικίνη σε μοντέλα ΟΣ nude ποντικών μειώνει σημαντικά την ανάπτυξη του όγκου και τη πιθανότητα υποτροπών σε σχέση με την μεμονωμένη χορήγηση δοξορουβικίνης. Παράλληλα μειώνεται με αυτό το τρόπο και ο πληθυσμός των CSCs στους όγκους (M. Xu et al., 2015).



Εικόνα 11. Επίδραση της χορήγησης LNA-133a και CDDP σε ορθοτοπικά μοντέλα ποντικών 22 μέρες μετά την έγχυση καρκινικών κυττάρων. α. Σχηματική αναπαράσταση του πρωτοκόλου που ακολουθήθηκε. **β.** Μέγεθος όγκου στη θέση όπου τοποθετήθηκαν τα καρκινικά κύτταρα, την 22^η ημέρα **γ.** Αξιολόγηση των πνευμονικών μεταστάσεων την 22^η μέρα με το σύστημα IVIS (in vivo imaging system) (Fujiwara et al., 2014)

2.3 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗΝ ΧΗΜΕΙΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΩΝ CSCs

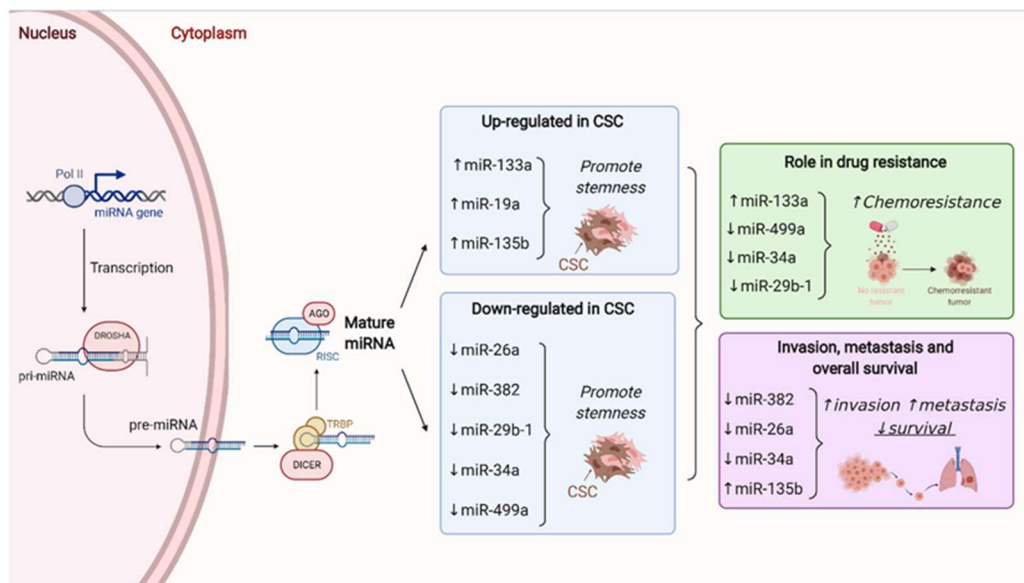
Πέρα από την σημαντική συμβολή των miRNAs στην επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των CSCs, πολλές έρευνες υποστηρίζουν πως τα μόρια αυτά παίζουν καθοριστικό ρόλο και στην ανθεκτικότητα των CSCs στις συνήθεις αντικαρκινικές θεραπείες Στο οστεοσάρκωμα, ειδικά τα τελευταία χρόνια πληθύνονται οι έρευνες που εξετάζουν τον ρόλο των διαφορετικών μορίων miRNA στην έκφραση των χαρακτηριστικών του βλαστικού φαινοτύπου, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγεται και η χημειοαντίσταση (Croce, 2009).

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2018 από τους Xu και συν., συγκρίθηκε η έκφραση των miRNAs της οικογένειας του miR-29 ανάμεσα σε 18 δείγματα ασθενών με χαμηλή ανταπόκριση στην μεθοτρεξάτη (MTX) και σε 18, αντιστοιχισμένα ως προς το στάδιο, δείγματα με καλή ανταπόκριση (>90% νέκρωση του όγκου μετά από νεοεπικουρική χημειοθεραπεία). Η έκφραση των miRNAs ήταν εμφανώς μειωμένη στα δείγματα με τη

χαμηλή ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Παράλληλα, η διαμόλυνση κυτταρικών σειρών ανθεκτικών στη μεθοτρεξάτη MG-63/MTX και U2OS/MTX με μιμητικά μόρια των miR-29abc μείωσε δραματικά την επιβίωση των κυττάρων αλλά και την IC50 (Half maximal inhibitory concentration) απέναντι στη μεθοτρεξάτη. Στόχοι των miRNAs φάνηκε πως είναι τα COL3A1 and MCL1, τα οποία βρέθηκε να υπερεκφράζονται στις κυτταρικές σειρές MG-63/MTX και U2OS/MTX (W. Xu et al., 2018).

Σε μεταγενέστερη μελέτη, επιπλέον βρέθηκε πως το miR-29b εμπλέκεται και στην χημειοαντίσταση απέναντι στη δοξορουβικίνη. Η επαγωγή της έκφρασης του μείωσε δραστικά τον πολλαπλασιασμό και την μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων ενώ ταυτόχρονα αύξησε τα επίπεδα απόπτωσης και ευαισθησίας στο συγκεκριμένο φάρμακο. Ως στόχος του miR-29b στη συγκεκριμένη περίπτωση αναδείχθηκε η MMP-9 (Luo et al., 2019).

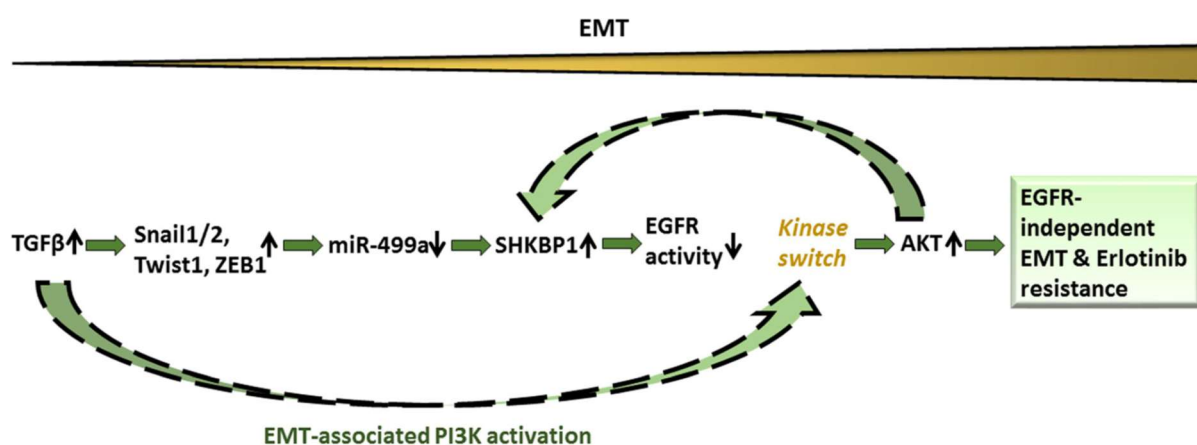
Άλλο σημαντικό miRNA στην απόκτηση ανθεκτικότητας απέναντι στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα είναι το miR-499a. Οι Wang και συν. μελέτησαν 10 δείγματα ασθενών με ΟΣ και διαπίστωσαν πως όλα τα δείγματα έφεραν έναν υποπληθυσμό κυττάρων, ο οποίος χαρακτηριζόταν από την έκφραση CD166, και εμφάνιζε όχι μόνο φαινότυπο CSC αλλά και ανθεκτικότητα στο erlotinib. Η ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο TKI βρέθηκε πως συνδέεται με την αυξημένη έκφραση TGFβ, η οποία προωθεί την EMT στα CSCs. Όλα τα κύτταρα με υψηλή έκφραση TGFβ είχαν μειωμένα επίπεδα miR-499a, και μάλιστα βρέθηκε πως η πρωτεΐνες ZEB1 και SNAIL προσδένονται στον υποκινητή του συγκεκριμένου miRNA και το αποσιωπούν.



Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση της επίδρασης ενδεικτικά ορισμένων miRNAs στην απόκτηση του καρκινικού βλαστικού φαινοτύπου. (Menéndez et al., 2021)

Το miR-499a βρέθηκε μειωμένο τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μοντέλα ΟΣ (T. Wang et al., 2019).

Ως στόχος του miR-499a αναδείχθηκε η πρωτεΐνη SHKBP1, η οποία έχει βρεθεί να είναι αυξημένη σε δείγματα ΟΣ. Η πρωτεΐνη αυτή συνδέεται με τη μείωση της δραστηριότητας του EGFR. Παράλληλα, η αύξηση της έκφρασης του TGFβ συμβάλλει στην ενεργοποίηση του PI3K/AKT μονοπατιού, ανεξάρτητα από τη δραστηριότητα της EGFR. Η ενεργοποίηση του PI3K/AKT φάνηκε να συμβάλλει και αυτή σε αύξηση των επιπέδων SHKBP1. Με αυτό το τρόπο, το δίκτυο TGFβ– miR-499a –SHKBP1 παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην EMT όσο και στην χημειοαντίσταση σε TKIs, όπως το erlotinib. Οι συγγραφείς μάλιστα υποστήριξαν πως ο λόγος SHKBP1/miR-499a μπορεί να έχει κλινική σημασία στη πρόβλεψη της ανταπόκρισης στο erlotinib. Σχηματικά, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραπάνω μορίων απεικονίζονται στην *Εικόνα 13* (T. Wang et al., 2019).



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση του δικτύου TGFβ– miR-499a –SHKBP1. (T. Wang et al., 2019)

Άλλο miRNA που έχει βρεθεί να υποεκφράζεται τόσο σε CSCs όσο και σε κυτταρικές σειρές ΟΣ ανθεκτικές στη σισπλατίνη είναι το miR-335. Η διαμόλυνση κυτταρικών σειρών MG63, U2OS και 143B με ανταγωνιστικό μόριο του miR-335 (anti-miR-335) αύξησε την έκφραση των δεικτών βλαστικότητας, την ικανότητα δημιουργίας σφαιριδίων αλλά και τη διεισδυτική τους ικανότητα. Παράλληλα, διαπιστώθηκε πως η χορήγηση σισπλατίνης σε συνδυασμό με pre-miRNA miR-335 συνδέεται με αύξηση της χημειοευαισθησίας στις κυτταρικές σειρές. Η χορήγηση σισπλατίνης μαζί με το anti-miR-335 έχει αντίθετα αποτελέσματα. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το miR-335 μαζί με τη σισπλατίνη παρουσιάζουν συνεργιστική δράση, με σκοπό να

αναστείλουν την αύξηση του όγκου. Στόχος του miR-335 θεωρήθηκε στη συγκεκριμένη έρευνα η πρωτεΐνη POU5F1 (Guo et al., 2017).

Άλλος πιθανός στόχος του miR-335 σε δείγματα από ασθενείς με ΟΣ έχει φανεί πως είναι η πρωτεΐνη Rock1. Η αυξημένη έκφραση της Rock1 έχει συσχετιστεί με αυξημένο μέγεθος όγκου, προχωρημένο στάδιο και απομακρυσμένες μεταστάσεις (Y. Wang, Wang, et al., 2017). Είναι μάλιστα ιδιαίτερα σημαντικό να αναφέρουμε ότι μακρά μη κωδικά μόρια RNAs, όπως το TUG1 και το DANCR, συμβάλλουν στην αύξηση των επιπέδων της Rock1 μέσω πρόσδεσης στο miR-335-5p (υπότυπο του miR-335) και καταστολής του (Y. Wang et al., 2018; Y. Wang, Yang, et al., 2017). Μάλιστα το DANCR βρέθηκε να καταστέλλει επιπλέον και το miR-1972 (Y. Wang et al., 2018).

Σε κάθε περίπτωση, είναι απαραίτητο να αναφερθεί ότι η χημειοαντίσταση στο οστεοσάρκωμα αποτελεί μια ιδιότητα που εκτός από τα CSCs μπορεί να προκύψει και με πολλούς άλλους μηχανισμούς. Οι μηχανισμοί αυτοί και η επιδραση των miRNAs σε αυτούς θα αναλυθούν λεπτομερώς στο επόμενο κεφάλαιο.

2.4 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΟ ΟΣΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Το οστικό μικροπεριβάλλον στο ΟΣ παίζει πολύ σημαντικό ρόλο τόσο στην έναρξη όσο και στην εξέλιξη του όγκου. Τα χαρακτηριστικά του επηρεάζουν το αποτέλεσμα τόσο της χημειο- όσο και της ανοσοθεραπείας και για αυτό το λόγο η μελέτη του μπορεί να δημιουργήσει νέες προοπτικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις (Lei et al., 2020b).

Το καρκινικό μικροπεριβάλλον αποτελείται 1) από ακυτταρικό υλικό, που περιλαμβάνει την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM), τα εξωκυττάρια κυστίδια, τις κυτοκίνες και τους αυξητικούς παράγοντες, και 2) από κύτταρα, τα κυριότερα εκ των οποίων είναι οι ινοβλάστες, τα ανοσιακά κύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λιποκύτταρα (D. Xu et al., 2019).

Τα τελευταία χρόνια υποστηρίζεται ότι, μεταξύ άλλων, τα miRNAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία των καρκινικών κυττάρων με το καρκινικό μικροπεριβάλλον (Rupaimoole et al., 2016). Η διερεύνηση του ρόλου των miRNAs στη διακυτταρική επικοινωνία εντός του οστικού μικροπεριβάλλοντος στο ΟΣ μπορεί να παρέχει κρίσιμες απαντήσεις για την βιογένεση του όγκου αλλά και για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση του.

Η ινωδονεκτίνη, πρωτεΐνη της ECM, κωδικοποιείται από το γονίδιο FN1 και έχει βρεθεί πως εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε δείγματα ΟΣ από ασθενείς ανθεκτικούς στη χημειοθεραπεία (<90% νέκρωση στο χειρουργικό παρασκεύασμα). Το mRNA του FN1 βρέθηκε πως είναι στόχος για το miR-200b-3p. Το συγκεκριμένο miRNA εκφράζεται σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα σε κυτταρικές σειρές και δείγματα ΟΣ με ανθεκτικότητα στην δοξουριβικίνη. Μάλιστα, υποστηρίχθηκε ότι το lncRNA OIP5-AS1 εξουδετερώνει το miR-200b-3p και λειτουργεί ως ογκογονίδιο, προωθώντας τη χημειοαντίσταση στο ΟΣ (Kun-Peng et al., 2019).

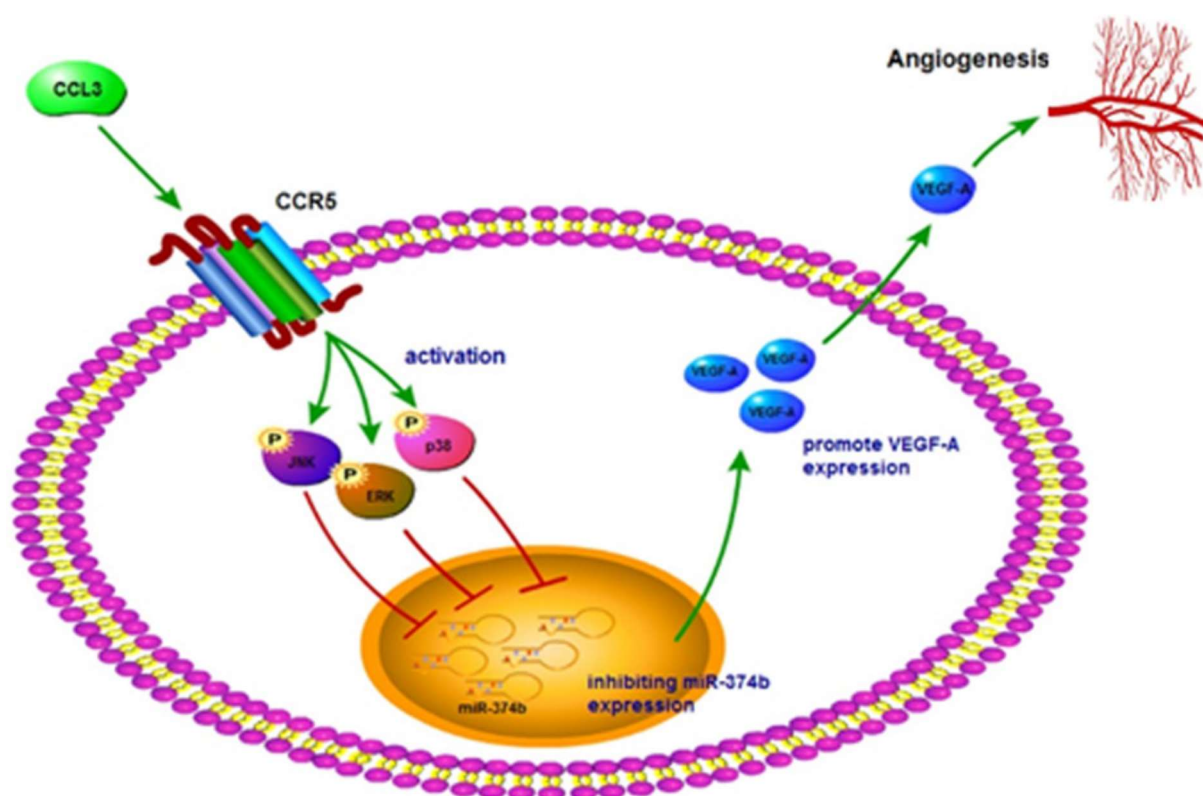
Παράλληλα, σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση της ECM και κατ' επέκταση στη δημιουργία μεταστάσεων σημαντικό ρόλο παίζουν οι MMPs. Η MMP-2 έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται σε δείγματα ΟΣ από πνευμονικές μεταστάσεις. Η MMP-2 αποτελεί στόχο του miR-3182 του οποίου η έκφραση καταστέλεται από το lncRNA ODRUL (Zhu et al., 2017). Άλλη μεταλλοπρωτεΐνάση, η MMP-16 αποτελεί στόχο για τα miRNAs miR-145 και miR-328-3p. Τα miRNAs αυτά έχουν βρεθεί να υποεκφράζονται σε δείγματα ΟΣ (B. Chen et al., 2015; M. Zhang et al., 2019).

Στην καρκινογένεση ιδιαίτερο ρόλο παίζει αναμφίβολα και η νεο-αγγειογένεση, η οποία συμπεριλαμβάνεται στα θεμελιώδη χαρακτηριστικά των καρκινικών ιστών, σύμφωνα με τους Weinberg και Hanahan (Hanahan & Weinberg, 2000). Κεντρικό ρόλο στην αγγειογένεση παίζει ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας Α (Vascular Endothelial Growth Factor A, VEGFA), ο οποίος προσδένεται στους υποδοχείς VEGFR1 και VEGFR2 (Apte et al., 2019). Έχει βρεθεί πως ο VEGFA αποτελεί στόχο για το miR-374b. Η έκφραση του miR-374b καταστέλλεται από το CCL-3, το οποίο προσδένεται στον υποδοχέα CCR-5 και ενεργοποιεί τις σηματοδοτικές οδούς JNK, p38, and ERK, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 14* (Liao et al., 2016).

Ο VEGFA και ο VEGFR1 έχουν βρεθεί πως αποτελούν στόχους και για το miR-134. Υπερέκφραση του miR-134 φάνηκε πως αναστέλλει την ανάπτυξη ΟΣ σε *in vivo* μοντέλα και μειώνει την αγγειογένεση των όγκων (L. Zhang et al., 2018).

Το ανοσιακό σύστημα αποτελεί πολύ σημαντικό τμήμα του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος στο ΟΣ, στο οποίο η επίδραση των miRNAs είναι αναμφίβολα πολύ σημαντική. Τα δενδριτικά κύτταρα αποτελούν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, τα οποία ενεργοποιούν Τ λεμφοκύτταρα παρουσιάζοντας τους αντιγονικό υλικό σε συνδυασμό με τα αντιγόνα μείζονος ιστοσυμβατότητας. Σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα έχει φανεί πως αυξάνεται η έκφραση του miR-133a και αυτή η αύξηση συμβάλλει στην

αναστολή της ωρίμανσης και ενεργοποίησης των δενδριτικών κυττάρων (Gao et al., 2016). Παράλληλα, η ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων έχει φανεί να επηρεάζεται και από το miR-200a (Q.-L. Liu et al., 2015). Τέλος, η υπερέκφραση του miR-140 έχει φανεί πως αναστέλλει την ανάπτυξη όγκου σε *in vivo* μοντέλα ΟΣ, αυξάνοντας την αντιδραστικότητα του ανοσοποιητικού συστήματος εναντίον του όγκου. Η λειτουργία αυτή επιτυγχάνεται μέσω καταστολής του PD-L1. Είναι γνωστό πως η αλληλεπίδραση PD-1/PD-L1 παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από την ανοσιακή απόκριση (Ji et al., 2018).



Εικόνα 14. Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων του δικτύου CCL3/miR-374b/VEGFA. (Liao et al., 2016)

Γίνεται επομένως φανερό ότι τα miRNAs πέρα από την επίδραση τους αυστηρά στα κύτταρα του οστεοσαρκώματος, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο τόσο στην λειτουργία των επιμέρους υποπληθυσμών, όπως τα Καρκινικά Βλαστικά Κύτταρα, όσο και στην διαμόρφωση του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος. Η κατανόηση των διαδικασιών που εμπλέκονται αλλά και το πως αυτές συνδυάζονται για να καθορίσουν τη συμπεριφορά των κακοήθων κυττάρων αποτελεί ένα από τα βασικότερα στάδια για την εξέλιξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ

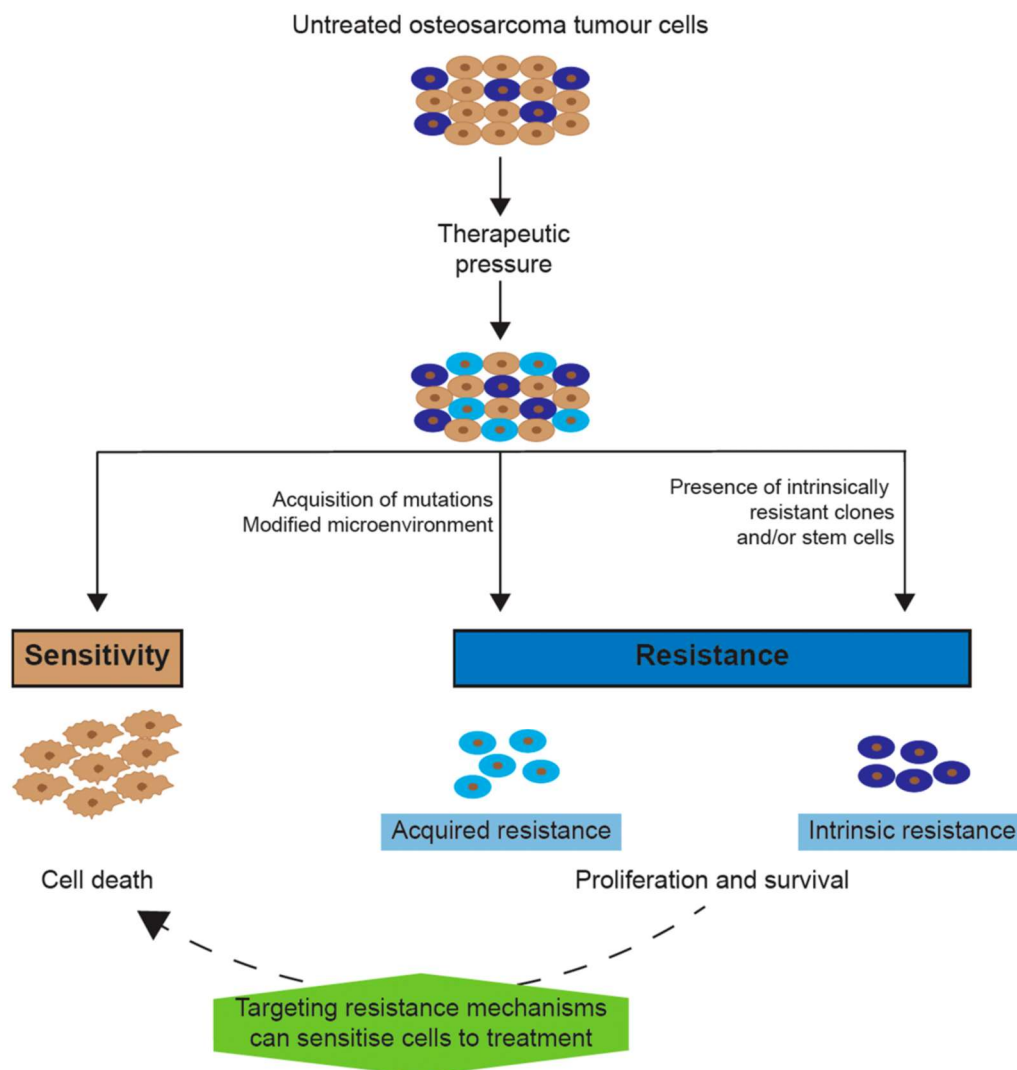
Δεν υπάρχει καμία αμφιβολία πως η έρευνα γύρω από τη βιολογία του καρκίνου τα τελευταία χρόνια έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη καινοτόμων θεραπευτικών επιλογών με σημαντικό αντίκτυπο στην επιβίωση των καρκινοπαθών. Παρόλ' αυτά είναι αλήθεια ότι η κλασική χημειοθεραπεία παραμένει στη πρώτη γραμμή της αντιμετώπισης αυτών των νοσημάτων και η χημειοαντίσταση των καρκινικών κυττάρων αποτελεί τον κύριο λόγο αποτυχίας των θεραπειών αυτών (Lilienthal & Herold, 2020). Η χημειοαντίσταση είναι ένα χαρακτηριστικό που μπορεί να υπάρχει ήδη πριν την εφαρμογή της χημειοθεραπείας (ενδογενής, intrinsic) ή να εμφανιστεί στη πορεία, ως αποτέλεσμα της πίεσης επιβίωσης στην οποία εκτίθενται τα καρκινικά κύτταρα (επίκτητη, acquired) (Lippert et al., 2011).

Το οστεοσάρκωμα αποτελεί σε γενικές γραμμές έναν χημειοανθεκτικό όγκο. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι η χορήγηση ενός μόνο χημειοθεραπευτικού παράγοντα οδηγεί σε απογοητευτικά αποτελέσματα. Είναι επομένως απαραίτητη η χρήση συνδυασμού χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε υψηλές δόσεις, προκειμένου να βελτιώσουμε τόσο την ολική επιβίωση (overall survival) όσο και την επιβίωση άνευ συμβάντων σχετικών με τον όγκο (event free survival) (Chou & Gorlick, 2006).

Μέχρι και σήμερα, βασικό σχήμα χημειοθεραπείας αποτελεί ο συνδυασμός μεθοτρεξάτης, δοξορουβικίνης και σισπλατίνης (MAP). Η ανθεκτικότητα έναντι πολλαπλών παραγόντων (Multi-Drug Resistance, MDR) αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Τα κύτταρα του οστεοσάρκωματος φαίνεται πως κατέχουν, είτε αναπτύσσουν, με τη πάροδο του χρόνου, μηχανισμούς με τους οποίους διαφεύγουν της δράσης των παραπάνω παραγόντων. Σε αυτούς τους μηχανισμούς περιλαμβάνονται η μείωση της συγκέντρωσης του εκάστοτε φαρμάκου στα καρκινικά κύτταρα, η ενδοκυττάρια εξουδετέρωση του φαρμάκου, οι αλλαγές στο στόχο των φαρμάκων, η απόπτωση, οι τροποποιήσεις στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA αλλά και στα σηματοδοτικά μονοπάτια. Σημαντικό ρόλο στην MDR παίζει επιπλέον το καρκινικό μικροπεριβάλλον και τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (CSCs), που αναλύθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Είναι μάλιστα εντυπωσιακό ότι οι μηχανισμοί αυτοί μπορούν να απευαισθητοποιήσουν τα καρκινικά

κύτταρα του ΟΣ απέναντι σε πληθώρα χημειοθεραπευτικών παραγόντων, οι οποίοι μπορεί και να ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες φαρμάκων (S. Li et al., 2015).

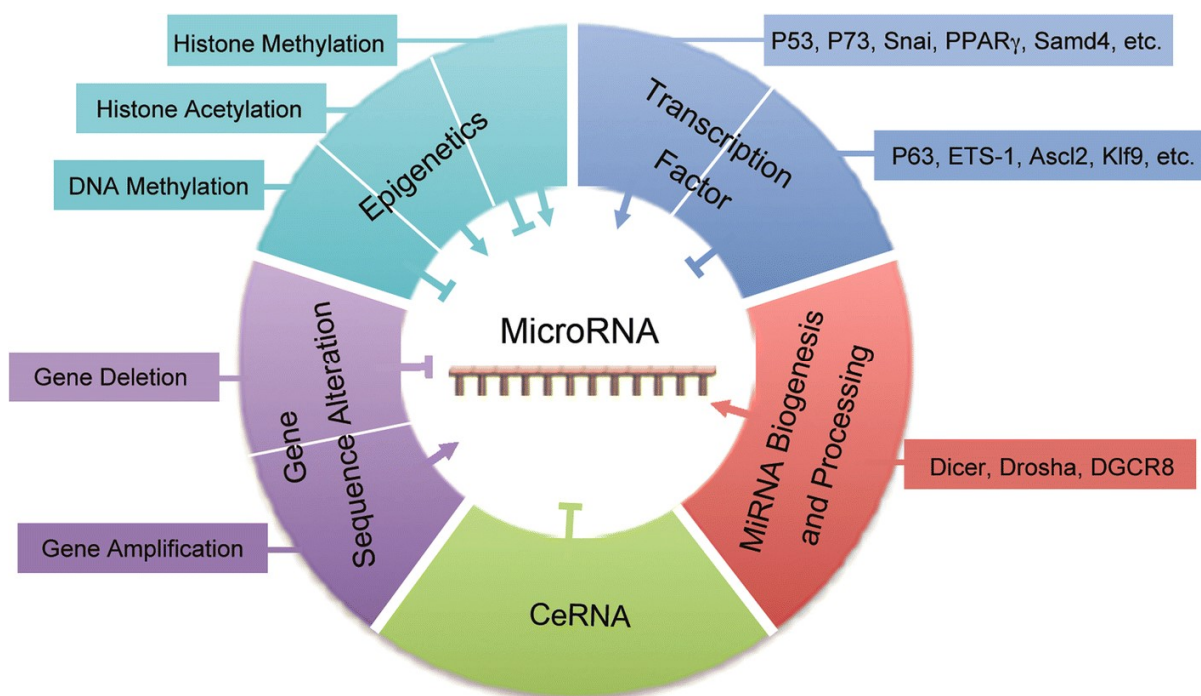
Τα μικρά μη κωδικά RNAs είναι μικρά μόρια τα οποία έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση πολλών ανθρώπινων γονιδίων, ενώ παράλληλα πολλά miRNAs μπορεί να στοχεύουν περισσότερα από ένα μόρια και η δράση τους να είναι ιστοειδική και χρονοεπαγόμενη. Με αυτό το τρόπο, όπως έχει ήδη συζητηθεί σε προηγούμενα κεφάλαια, τα συγκεκριμένα μόρια-στόχοι εμπλέκονται σε ποικιλία κυτταρικών διεργασιών, όπως ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η αντοχή στο κυτταρικό στρες και



Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου χημειοαντίστασης στο οστεοσάρκωμα. Η χημειοθεραπεία καταστρέφει τα ευαίσθητα κύτταρα, ενώ τα κύτταρα που παραμένουν διαθέτουν είτε ενδογενή είτε επίκτητη αντίσταση στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Η στόχευση των μηχανισμών αντίστασης είναι καθοριστικής σημασίας για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση της κακοήθειας (Lilienthal & Herold, 2020)

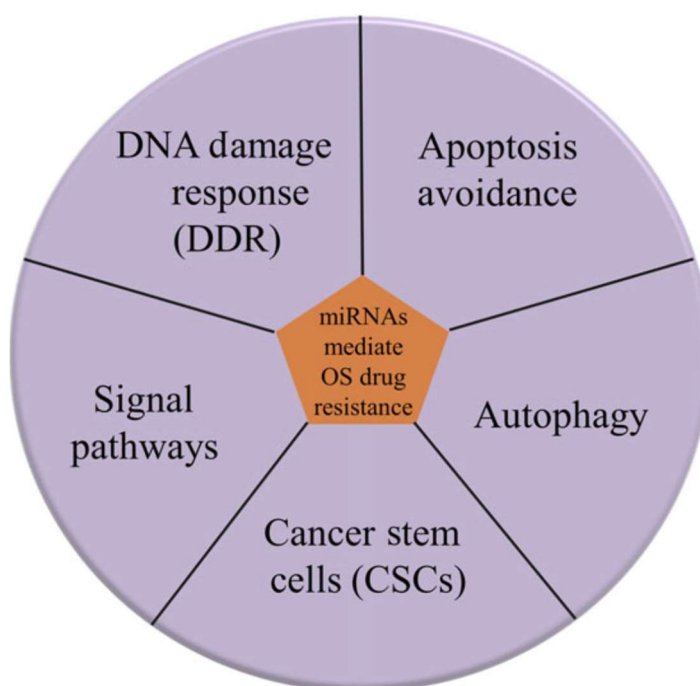
ο κυτταρικός μεταβολισμός (Si et al., 2019). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι πολλά από τα γονίδια που ρυθμίζονται από miRNAs εμπλέκονται στην ανταπόκριση των κυττάρων σε συγκεκριμένους φαρμακευτικούς παράγοντες. Σύμφωνα με ανάλυσεις του προφίλ έκφρασης των miRNAs σε διαφορετικούς όγκους και αλληλούχισης των μορίων αυτών με μεθόδους υψηλής ακρίβειας, διαπιστώθηκε πως μεγάλος αριθμός miRNAs παίζει ρόλο στην αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας στα καρκινικά κύτταρα (Allen & Weiss, 2010).

Τροποποιήσεις στην έκφραση των διάφορων miRNAs συμβάλλουν τόσο στην καρκινογένεση όσο και στην απόκτηση χαρακτηριστικών χημειοαντίστασης. Έχει υποστηριχθεί από πολλές έρευνες πως υπάρχει μεγάλη ποικιλία μηχανισμών που συμβάλλουν στην απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs, μερικοί από τους οποίους περιγράφονται στην *Εικόνα 16*. Η μελέτη των μηχανισμών αυτών μπορεί αναμφίβολα να συμβάλει στην ανάπτυξη μεθόδων για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των κακοηθειών (Si et al., 2019).



Εικόνα 16. Μηχανισμοί απορρύθμισης έκφρασης των miRNAs που συμβάλλουν στην απόκτηση χαρακτηριστικών χημειοαντίστασης. Κύριο μηχανισμό απορρύθμισης αποτελεί η ενίσχυση ή η διαγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν miRNAs. Παράλληλα σημαντικό ρόλο παίζουν επιγενετικές τροποποιήσεις, αλλαγές στην έκφραση μεταγραφικών παραγόντων αλλά και παραλλαγές στα γονίδια που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των miRNAs. Τέλος, παραλλαγές στην έκφραση αναγωνιστικών μορίων RNA (competitive endogenous RNA, ceRNA) μπορούν και αυτές να επηρεάσουν την έκφραση των miRNAs και να συμβάλλουν στην MDR (Si et al., 2019)

Στο οστεοσάρκωμα, τα miRNAs εμπλέκονται στη χημειοαντίσταση κυρίως μέσω της τροποποίησης του συστήματος επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA, μέσω αποφυγής της απόπτωσης, της προώθησης της αυτοφαγίας, της απορρύθμισης σηματοδοτικών μονοπατιών και μέσω των CSCs (R. Chen et al., 2019). Η δράση των miRNAs στη χημειοαντίσταση μέσω των CSCs αναλύθηκε στο Κεφάλαιο 2. Στο παρόν κεφάλαιο θα αναλυθεί η συμβολή των miRNAs στην χημειοαντίσταση στα κυττάρα του οστεοσαρκώματος μέσω των λοιπών μηχανισμών.



Εικόνα 17. Μηχανισμοί με τους οποίους τα miRNAs επιδρούν στη χημειοαντίσταση του οστεοσαρκώματος (R. Chen et al., 2019).

3.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΕ ΒΛΑΒΕΣ ΤΟΥ DNA (DNA DAMAGE RESPONSE, DDR)

Βλάβες στην αλληλουχία του DNA μπορεί να προκληθούν από εξωγενείς παράγοντες, ενδογενή τοξικά προϊόντα και παράγωγα του μεταβολισμού ή από αυθόρμητες χημικές αντιδράσεις. Αποτέλεσμα αυτών των βλαβών μπορεί να είναι από τη μία μεριά η παύση του κυτταρικού κύκλου, η κυτταρική γήρανση και απόπτωση αλλά από την άλλη μεριά οι βλάβες αυτές μπορεί να αποτελέσουν και το έναυσμα για καρκινογένεση. Για αυτό το λόγο τα κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα πολύπλοκο σύστημα ανταπόκρισης σε βλάβες του

DNA (DNA Damage Response, DDR). Ο όρος DDR συμπεριλαμβάνει διαφορετικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA κάθε ένας από τους οποίους ενεργοποιείται ως απάντηση σε διαφορετικά είδη βλαβών. Οι πιο γνωστοί από αυτούς είναι οι εξής: Μη Ομολογος Ανασυνδυασμός (NHEJ), Ομολογος Ανασυνδυασμός (HR), Επιδιορθωση με Εκτομή Βάσης (BER), Επιδιόρθωση με Εκτομή Νουκλεοτιδίου (NER) και Επιδιορθωση Αζευγάρωτων Βάσεων (MMR) (Hoeijmakers, 2009). Η απορρύθμιση του DDR είναι ένα φαινόμενο που επαναλαμβάνεται σε διαφορετικούς καρκίνους και σε αυτή φαίνεται να συμμετέχουν καθοριστικά και τα μικρά μη κωδικά RNAs (Wouters et al., 2011).

Στην κυτταρική σειρά U2OS φάνηκε πως το miRNA miR-124 εκφράζεται σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με την κυτταρική σειρά H184B5F5/M10, η οποία προέρχεται από αθανатоποιημένα κύτταρα καρκίνου μαστού. Για να ελεγχθεί ο ρόλος του miR-124 στη χημειοαντίσταση πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάρων με λεντι-ικό φορέα που έφερε το συγκεκριμένο miRNA και διαπιστώθηκε πως η αύξηση της έκφρασης του οδηγεί σε αύξηση της ευαισθησίας στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα σισπλατίνη, δοξορουβικίνη, ιρινοτεκάνη και ετοποσίδη. Η αύξηση της έκφρασης του miR-124 δεν επηρέασε την ευαισθησία των κυττάρων στην 5-φθοριοουρακίλη και στην τεμοζολομίδα. Στόχοι του miR-124 φάνηκε πως είναι τα γονίδια *PARP1* και *ATMIN*, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση βλαβών μονής έλικας (single strand breaks). Η υπερέκφραση του miR-124 οδήγησε σε μείωση της ποσότητας των παραγόμενων πρωτεϊνών και ελλατωματική επιδιόρθωση βλαβών του DNA, γεγονός που έκανε τα κύτταρα πιο ευαίσθητα στους προαναφερθέντες χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (S.-M. Chen et al., 2015).

Αντιλαμβανόμαστε με αυτό το τρόπο ότι το miR-124 έχει ρόλο αναστολέα PARP1. Οι αναστολείς PARP φαίνεται να έχουν σημαντικά αποτελέσματα σε πολλά είδη καρκίνου (Curtin & Szabo, 2013). Η χρήση του επομένως θα μπορούσε να αποτελέσει μια νέα καινοτόμο αντιμετώπιση του ΟΣ. Παράλληλα η πρωτεΐνη ATMIN παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της ATM με σκοπό την επιδιόρθωση βλαβών διπλής έλικας (double strand breaks) (T. Zhang et al., 2012).

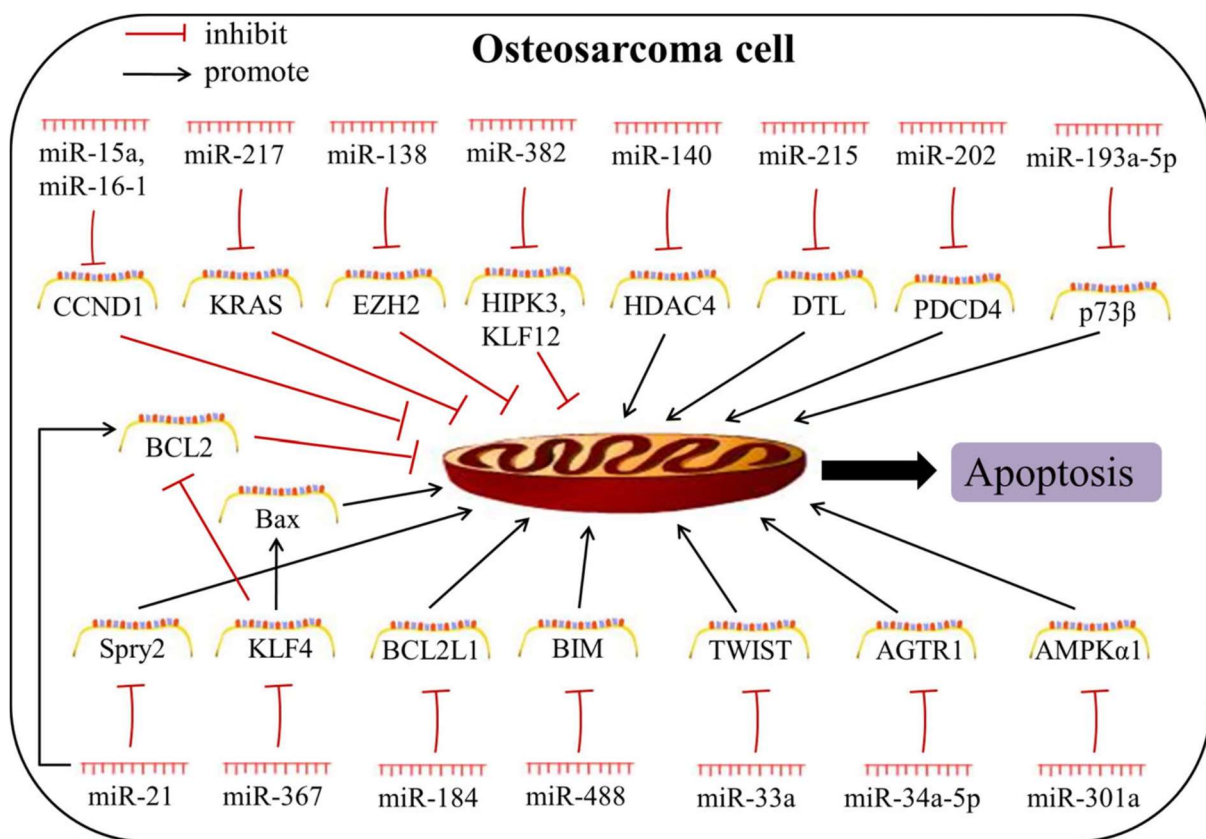
Παράλληλα, οι Duan και συν., σε έρευνα τους που δημοσιεύθηκε το 2017 σύγκριναν με τη χρήση μικροσυστοιχιών την έκφραση των miRNAs στις κυτταρικές σειρές U2OS και KHOS και στις χημειοανθεκτικές παραλλαγές τους, U2OS_{MR} και KHOS_{MR}. Βρέθηκαν 6 miRNA με στατιστικά σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση, από τα οποία το miR-15b

ήταν το μόνο που εκφραζόταν σε μικρότερο βαθμό στις χημειοανθεκτικές κυτταρικές σειρές σε σχέση με τις μη χημειοανθεκτικές. Μάλιστα διαμόλυνση των ανθεκτικών κυττάρων με μιμητικό μόριο του miR-15b οδήγησε στην αύξηση της ευαισθησίας τους στη δοξορουβικίνη. Για να επιβεβαιωθεί και *in vivo* αυτή η παρατήρηση, οι ερευνητές δημιούργησαν ένα ξενομόσχευμα απο κύτταρα KHOS_{MR}, τα οποία είχαν προηγουμένως διαμολυνθεί με μιμητικό μόριο miR-15b, και το μεταμόσχευσαν σε nude ποντίκια. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως στους όγκους που αναπτύχθηκαν ο συνδυασμός miR-15b και δοξορουβικίνης είχε σημαντική ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη του ΟΣ σε σχέση με τα μοντέλα έλεγχου. Μάλιστα σε δείγματα ΟΣ από 49 ασθενείς (14 επιζώντες και 35 μη επιζώντες) φάνηκε πως η έκφραση του miR-15b ήταν σημαντικά αυξημένη στους επιζώντες και συσχετίστηκε με αυξημένη επιβίωση (Duan et al., 2017).

Μάλιστα στη συγκεκριμένη έρευνα στόχος του miR-15b φάνηκε να είναι το Wee1. Πρόκειται για μία πρωτεϊνική κινάση η οποία παίζει ρόλο στο σημείο ελέγχου G2 και συμβάλλει στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου ως απάντηση σε βλάβες του DNA (Duan et al., 2017).

3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΑΠΟΦΥΓΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και στα προηγούμενα κεφάλαια η απόπτωση αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία ελεγχόμενου κυτταρικού θανάτου, η οποία στηρίζεται κατά βάση στην ενεργοποίηση του μονοπατιού των κασπασών (Brentnall et al., 2013). Η ακεραιότητα των επιμέρους πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη διαδικασία έχει συνδεθεί με την αποτελεσματικότητα των χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Πιο συγκεκριμένα, η στόχευση μορίων που συμμετέχουν στην αποπτωτική διαδικασία έχει υποστηριχθεί πως μπορεί να αποτελεσει μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση στην προσπάθεια αντιμετώπισης διάφορων ειδών καρκίνου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η τετραδρίνη, η οποία φάνηκε πως επάγει την απόπτωση σε κυτταρικές ΟΣ και συμβάλλει με αυτό το τρόπο στη μείωση της χημειοαντίστασης (TAO et al., 2014). Πληθώρα ερευνών έχουν δημοσιευθεί τα τελευταία χρόνια, οι οποίες υποστηρίζουν τον ενεργό ρόλο των miRNAs στην χημειοαντίσταση του ΟΣ μέσω της εμπλοκής τους στη διαδικασία της απόπτωσης (R. Chen et al., 2019). Μερικά από αυτά τα miRNAs καθώς και οι στόχοι τους φαίνονται στην *Εικόνα 18*.



Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση miRNAs τα οποία εμπλέκονται στη χημειοαντίσταση μέσω απορρύθμισης της διαδικασίας της απόπτωσης (R. Chen et al., 2019).

Σε παλιότερες έρευνες έχει υποστηριχθεί πως το φλοβονοειδές φάρμακο quercetin αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και προωθεί την απόπτωση σε κυτταρικές σειρές ΟΣ. Το 2015, οι Zhang και συν. μελέτησαν την επίδραση quercetin σε συνδυασμό με τον χημειοθεραπευτικό φάρμακο σισπλατίνη σε κυτταρικές σειρές ΟΣ (143B). Φάνηκε πως συγκέντρωση quercetin 5 μ M αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων 143B στη σισπλατίνη. Μετά από περαιτέρω ανάλυση διαπιστώθηκε ότι μεταξύ άλλων το quercetin αυξάνει την έκφραση του miR-217. Το miR-217 έχει ως στόχο το *KRAS* και η αύξηση της έκφρασης του μειώνει τα επίπεδα του *KRAS*, συμβάλλοντας τελικά σε αναστολή του πολλαπλασιασμού και απόπτωση των κυττάρων 143B. Φαίνεται λοιπόν πως το quercetin προωθεί την ευαισθησία στη σισπλατίνη μέσω του άξονα miR-217/*KRAS* (X. Zhang et al., 2015).

Παράλληλα, όπως έχει ήδη αναφερθεί και σε προηγούμενο κεφάλαιο, ο γενετικός τόπος 14q32 περιέχει γονίδια διαφόρων miRNAs όπως τα miR-544, miR-369-3p, miR-382, miR-154 και miR-134, των οποίων η έκφραση είναι συχνά μειωμένη σε ιστούς

οστεοσαρκώματος (Thayanithy et al., 2012). Μεταξύ αυτών, το miR-382 έχει φανεί πως παρουσιάζει την πιο σημαντική μείωση στην έκφρασή του και πως τα επίπεδα του συσχετίζονται με την επιβίωση ασθενών με ΟΣ αλλά και με την χημειοαντίσταση της κακοήθειας. Στη συνέχεια, μελετήθηκε σε κυτταρικές σειρές η επίδραση του miR-382 όσον αφορά την αντίσταση στη χημειοθεραπεία και διαπιστώθηκε πως τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με μιμητικό μόριο του miR-382 ήταν εμφανώς πιο ευαίσθητα στην σισπλατίνη, τη μεθοτρεξάτη και τη δοξορουβικίνη σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Ως στόχοι του συγκεκριμένου miRNA αναδείχθηκαν τα *KLF12* και *HIPK3*, τα οποία όταν υπερεκφράζονται προωθούν την κυτταρική ανάπτυξη και την χημειοαντίσταση, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν στη συνέχεια και σε in vivo μοντέλα (M. Xu, Jin, Xu, Sun, et al., 2014).

Το miR-140 είναι άλλο ένα miRNA το οποίο φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην χημειοαντίσταση του ΟΣ, ειδικά απέναντι σε φάρμακα όπως η μεθοτρεξάτη και η 5-φθοριοουρακίλη. Το μόριο αυτό συσχετίζεται με αναστολή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1 και G2, μέσω των πρωτεϊνών p53 και p21. Η δράση αυτή επιτυγχάνεται μέσω απευθείας αναστολής της πρωτεΐνης HDAC4. Όπως είναι ήδη γνωστό, η δράση των περισσότερων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων επικεντρώνεται σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα και η αναστολή του πολλαπλασιασμού πιθανόν μετριάξει την αποτελεσματικότητά τους. Βέβαια, είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι αυτός ο μηχανισμός απαιτεί την ύπαρξη μη μεταλλαγμένης (wild type) p53 (Song et al., 2009).

Με παρόμοιο μηχανισμό φαίνεται να λειτουργεί και το miR-215. Το συγκεκριμένο miRNA όταν υπερεκφράζεται προκαλεί στάση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 και συμβάλλει στη αντίσταση στην μεθοτρεξάτη. Και σε αυτή τη περίπτωση η δράση του miRNA εξαρτάται από το p53 και το p21 και σε περίπτωση μεταλλαγμένου p53 η δράση αυτή μειώνεται αισθητά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η κυτταρική σειρά MG-63 στην οποία η p53 είναι ανενεργή. Το miR-215 φαίνεται να έχει ως άμεσο στόχο την πρωτεΐνη DTL, η οποία αποτελεί παράγοντα αποσταθεροποίησης για το p53. Παράλληλα, είναι σημαντικό να αναφέρουμε πως με μεθόδους βιοπληροφορικής αναδείχθηκε συμπληρωματικότητα ανάμεσα στο miR-215 και στο mRNA της αναγωγάσης του διυδροφυλλικού (*DHFR*), η οποία αποτελεί τον στόχο δράσης της μεθοτρεξάτης (Song et al., 2010).

Το miR-21 το οποίο έχει αναφερθεί και σε προηγούμενα κεφάλαια για το ρόλο του στην αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του ΟΣ παίζει ρόλο και στην χημειοαντίσταση απέναντι στη σισπλατίνη. Πιο συγκεκριμένα, η διαμόλυνση κυττάρων της σειράς MG-63 με μιμητικά μόρια miR-21 αυξάνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων όταν εκτίθενται σε σισπλατίνη, ενώ αντίθετα η διαμόλυνση με anti-miR-21 έχει ως αποτέλεσμα την σαφή μείωση της επιβίωσης τους στις ίδιες συνθήκες. Το miR-21 ασκεί τη δράση του μέσω της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 (Ziyan & Yang, 2016).

3.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑΣ

Η κυτταρική ομοιόσταση σε γενικές γραμμές επιτυγχάνεται μέσω της ισορροπίας ανάμεσα στην βιοσύνθεση οργανικών ουσιών και στην αποδόμηση «γερασμένων» οργανιδίων και μεταβολικών προϊόντων. Η αυτοφαγία μέσω των λυσοσωμάτων αντιπροσωπεύει έναν μηχανισμό επιβίωσης και προσαρμογής των κυττάρων σε αντίξοες συνθήκες, όπως η έλλειψη θρεπτικών ουσιών και το υψηλό οξειδωτικό στρες. Τα λυσοσώματα αποτελούν εξειδικευμένα οργανίδια με την ιδιότητα να αποδομούν το περιεχόμενο τους στα επιμέρους συστατικά μέσω των υδρολασών που περιέχουν (C. He & Klionsky, 2009). Έχει υποστηριχθεί πως η αντοχή στο ενδοκυτταρικό στρες μέσω της αυτοφαγίας αποτελεί παράγοντα που συμβάλλει καθοριστικά τόσο στην ανάπτυξη του όγκου όσο και στην χημειοαντίσταση απέναντι σε ποικίλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Z. J. Yang et al., 2011). Στην παρόν κείμενο θα διερευνήσουμε το ρόλο των miRNAs στη ρύθμιση της αυτοφαγίας και την συμβολή τους στη χημειοαντίσταση του ΟΣ μέσω αυτού του μηχανισμού.

Σε κυτταρική σειρά MG-63 με χημειοαντίσταση απέναντι στη δοξορουβικίνη βρέθηκε πως το miR-30a εκφράζεται σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με την ίδια κυτταρική σειρά χωρίς χημειοαντίσταση. Παράλληλα, στη κυτταρική σειρά με τη χημειοανθεκτικότητα αποδείχθηκε πως ο μηχανισμός της αυτοφαγίας είναι ενεργοποιημένος, καθώς βρέθηκαν να εκφράζονται σε υψηλό βαθμό οι πρωτεΐνες Beclin-1, LC3-I και LC3-II, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στο συγκεκριμένο μονοπάτι. Μάλιστα, μετά από διαμόλυνση του miR-30a στα κυτταρά με χημειοανθεκτικότητα φάνηκε ότι μειώνονται τα επίπεδα των προαναφερθέντων πρωτεϊνών και την ίδια στιγμή μειώνει σαφώς και την IC₅₀ όχι μόνο της δοξορουβικίνης

αλλά και της σισπλατίνης και της μεθοτρεξάτης. Με τη βοήθεια μεθόδων βιοπληροφορικής, η *Beclin-1* αναδείχθηκε ως άμεσος στόχος του miR-30a και το δεδομένο αυτό επιβεβαιώθηκε και *in vitro* (XU et al., 2016).

Η *Beclin-1* έχει βρεθεί πως είναι στόχος και για το miR-199a-5p. Πιο συγκεκριμένα, φάνηκε πως η έκθεση κυττάρων MG-63 σε σισπλατίνη οδηγεί σε μείωση της έκφρασης του συγκεκριμένου miRNA και αύξηση των επιπέδων των σχετιζόμενων με την αυτοφαγία γονιδίων *Beclin-1*, *LC3-I* και *LC3-II*. Η διαμόλυνση των κυττάρων αυτών, που αναπτύσσουν ανθεκτικότητα απέναντι στη σισπλατίνη, με μιμητικό μόριο του miR-199a-5p καταστέλλει την αυτοφαγική δραστηριότητα και επαναφέρει την χημειοευαισθησία απέναντι στον συγκεκριμένο παράγοντα (Y. Li et al., 2016).

Επιπρόσθετα σε μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2014, φάνηκε πως η έκθεση κυτταρικών σειρών ΟΣ σε 0.2 μg/ml δοξορουβικίνη ή 20 μM σισπλατίνη αυξάνει σημαντικά την έκφραση του miR-155. Η αυξημένη έκφραση του miR-155 συνδέθηκε με αυξημένο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων παρά την εφαρμογή της χημειοθεραπείας αλλά και με ενίσχυση του μηχανισμού της αυτοφαγίας. Αναλυτικότερα, στην κυτταρική σειρά Saos-2, μετά από διαμόλυνση με μιμητικό μόριο miR-155 παρατηρήθηκε αύξηση της μετατροπής της LC3-I σε LC3-II αλλά και αύξηση έκφρασης της Atg5 (autophagy related protein 5). Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο το miR-155 προκαλεί τις παραπάνω μεταβολές ακόμη δεν είναι γνωστός (CHEN et al., 2014).

Άλλο ένα miRNA το οποίο έχει την ιδιότητα να αναστέλλει την αυτοφαγία είναι το miR-101. Το συγκεκριμένο μόριο έχει βρεθεί να υποεκφράζεται σε κυτταρικές σειρές U2OS, οι οποίες εκτέθηκαν σε χημειοθεραπεία με δοξορουβικίνη. Η διαμόλυνση των κυττάρων αυτών με μιμητικό μόριο του miR-101 μείωσε τα επίπεδα της Atg4 (autophagy related protein 4) και ανέστειλε την μετατροπή της LC3-I σε LC3-II. Η αναστολή του μηχανισμού της αυτοφαγίας οδήγησε σαφώς στην αυξημένη αποτελεσματικότητα της δοξορουβικίνης σε *in vitro* μοντέλα, καταδεικνύοντας το γεγονός ότι η στόχευση του μηχανισμού αυτού αποτελεί ένα καινοτόμο πεδίο για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών επιλογών για το οστεοσάρκωμα (Chang et al., 2014).

3.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ

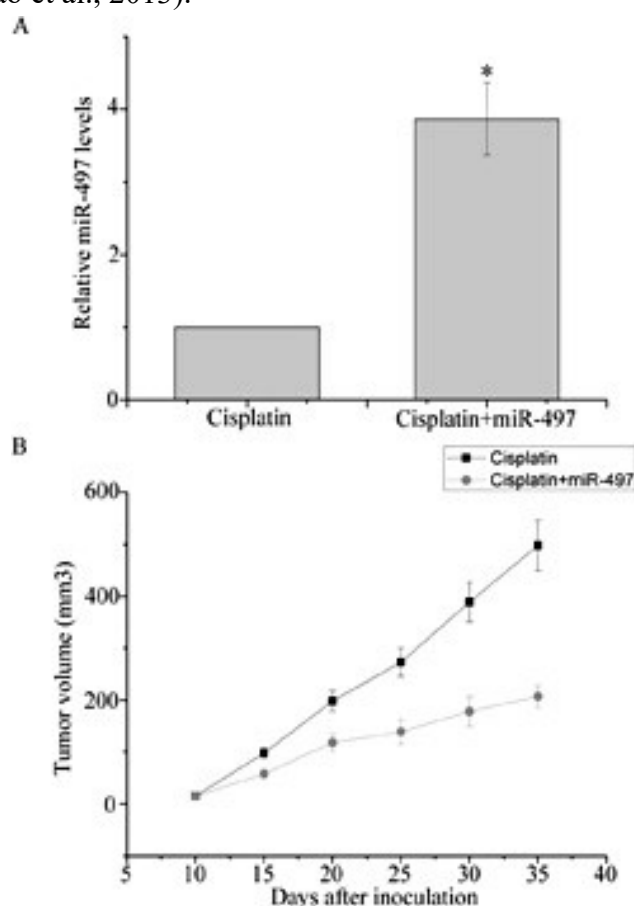
Όπως έχει ήδη αναφερθεί και σε προηγούμενα κεφάλαια, το οστεοσάρκωμα είναι μια κακοήθεια που χαρακτηρίζεται από χρωμοσωμική αστάθεια και συσσώρευση μεγάλου αριθμού μεταλλάξεων (X. Chen et al., 2014). Οι μεταλλάξεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση ποικίλων σηματοδοτικών μονοπατιών, μεταξύ των οποίων είναι τα Wnt/ β -catenin, PI3K/Akt, IGFIR, Notch, TGF- β . Τα μονοπάτια αυτά μεταξύ άλλων παίζουν σημαντικό ρόλο όχι μόνο στην έναρξη της καρκινογένεσης αλλά και στην απόκτηση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων όπως η διεισδυτική ικανότητα και η αντίσταση στη χημειοθεραπεία (R. Chen et al., 2019). Παρακάτω θα μελετήσουμε τη συμβολή των miRNAs στην λειτουργία αυτών των σηματοδοτικών μονοπατιών και πως η απορρύθμιση τους επιδρά στη χημειοαντίσταση του οστεοσαρκώματος.

Το miR-34c αποτελεί ένα μόριο που επιδρά στο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch (Bae et al., 2012), όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1. Παράλληλα, οι Xu και συν. διαπίστωσαν πως η έκφραση του συγκεκριμένου miRNA είναι στατιστικά σημαντικά μειωμένη σε ασθενείς με μεταστατική νόσο και πτωχή απάντηση στη χημειοθεραπεία. Η αύξηση της έκφρασης του miR-34c οδήγησε στην άρση της χημειοαντίστασης σε κυτταρικές σειρές, ενώ η καταστολή του συνδέθηκε με αύξηση της διεισδυτικής ικανότητας και αυξημένη ανθεκτικότητα απέναντι στο συγκεκριμένο παράγοντα. Στη συγκεκριμένη μελέτη φάνηκε πως στόχοι του miR-34c είναι οι LEF1 και Notch1. Οι συγγραφείς μάλιστα υποστήριξαν πως η αποκατάσταση της έκφρασης του miR-34c μπορεί μελλοντικά να συμβάλλει στη καταπολέμηση της χημειοαντίστασης του ΟΣ και στη μείωση της διεισδυτικής ικανότητας της νόσου (Xu et al., 2014).

Ένα άλλο σηματοδοτικό μονοπάτι με σημαντικό ρόλο στη χημειοαντίσταση του οστεοσαρκώματος είναι το PI3K/Akt. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2015, παρατηρήθηκε πως το miR-497 υποεκφράζεται τόσο σε δείγματα από 14 ασθενείς με ΟΣ όσο και σε κυτταρικές σειρές ΟΣ. Μάλιστα φάνηκε πως η χαμηλή έκφρασή του miR-497 σε κύτταρα Saos-2 συνδέεται με αντίσταση απέναντι στη σισπλατίνη ενώ η υψηλή έκφραση του συνδέεται με μεγαλύτερη χημειοευαισθησία. Η παρατήρηση αυτή επαληθεύτηκε και σε *in vivo* μοντέλα nude ποντικών, όπου διαπιστώθηκε πως ο

συνδυασμός σισπλατίνης και μιμητικού μορίου του miR-497 οδηγεί σε σημαντικά μικρότερο ρυθμό αύξησης του όγκου σε σχέση με αυτόν που παραρήθηκε σε ποντίκια που εκτέθηκαν μόνο στην σισπλατίνη. Αξιοσημειωτο είναι τέλος πως το συγκεκριμένο miRNA έχει ως στόχο τον παράγοντα VEGFA και ασκεί τη δράση του μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού VEGFA/PI3K/AKT (Shao et al., 2015).

Στο ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι επιδρά και το miRNA miR-221, το οποίο έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου συμπεριλαμβανομένου και του ΟΣ. Πιο συγκεκριμένα, η υπερέκφραση του miR-221 σε κυτταρικές σειρές ΟΣ συνδέεται με αυξημένη αντίσταση στη σισπλατίνη. Το miR-221 έχει ως άμεσο στόχο το *PTEN* και η μείωση του PTEN δημιουργεί τις συνθήκες για ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT (G. Zhao et al., 2013).



Εικόνα 19. Επίδραση του miR-497 στην αύξηση του όγκου του καρκινικού ξενομοσχεύματος σε *in vivo* μοντέλα μετά από την έκθεση σε σισπλατίνη. Α. Στο διάγραμμα φαίνεται η διαφορά στην έκφραση του miR-497 ανάμεσα στα πειραματόζωα που έλαβαν μόνο σισπλατίνη και σε αυτά που έλαβαν μιμητικό μόριο του miR-497 και σισπλατίνη. Β. Στο διάγραμμα φαίνεται η διαφορά στο ρυθμό αύξησης του όγκου ανάμεσα στα πειραματόζωα που έχουν εκτεθεί μόνο σε σισπλατίνη και σε αυτά που εκτέθηκαν σε σισπλατίνη και μιμητικό μόριο του miR-497. Είναι σαφές ότι η υψηλή έκφραση miR-497 μειώνει το ρυθμό αύξησης του όγκου και συμβάλλει στην αύξηση της αποτελεσματικότητας της σισπλατίνης (Shao et al., 2015).

Γίνεται τελικά σαφές ότι η χημειοαντίσταση αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά προβλήματα κατά την αντιμετώπιση του οστεοσαρκώματος. Τα miRNA επιδρούν στη χημειοαντίσταση με ποικίλους τρόπους και μηχανισμούς και μπορούν να συμβάλλουν στην άρση της, λειτουργώντας είτε ως θεραπευτικά μόρια είτε ως θεραπευτικοί στόχοι. Η πιθανή χρησιμότητα των miRNAs στη κλινική πράξη θα αναλυθεί εκτενέστερα στο επόμενο κεφάλαιο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ

Παρά το γεγονός ότι η εισαγωγή της νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας, πριν από περίπου τρεις δεκαετίες, αύξησε το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης των ασθενών (ηλικίας μικρότερης των 30 ετών) με οστεοσάρκωμα στο 60%, το προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών με μακροσκοπικές μεταστατικές εστίες παραμένει κάτω του 50% (Ottaviani & Jaffe, 2009). Για αυτό το λόγο, καταβάλλεται τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερη προσπάθεια έτσι ώστε να βρεθούν και να ενταχθούν στη κλινική πράξη βιοδείκτες, οι οποίοι όχι μόνο θα επιτρέπουν την πρόωπη ανίχνευση της νόσου, αλλά και θα είναι εύκολα ανιχνεύσιμοι με μη επεμβατικές μεθόδους (Botti et al., 2019).

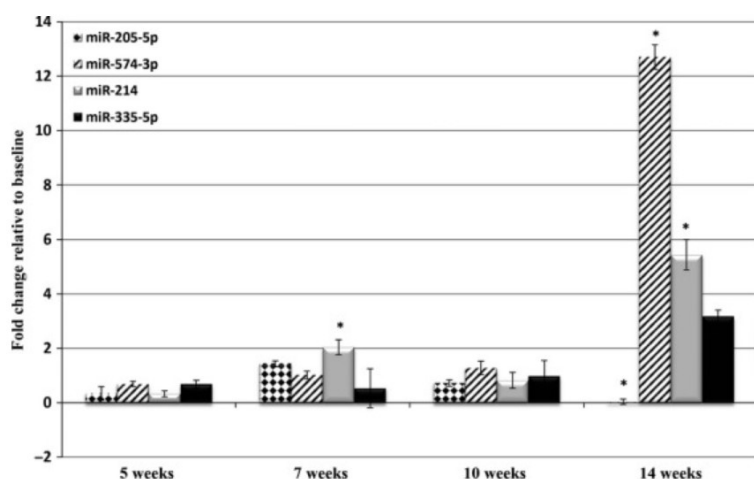
Όπως έχει γίνει κατανοητό από τα προηγούμενα κεφάλαια, τα miRNAs εκφράζονται ιστοειδικά και διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο σε ποικιλία κυτταρικών διεργασιών, καταστέλλοντας την έκφραση των εκάστοτε mRNA στόχων τους (O'Brien et al., 2018). Παράλληλα, είναι μεγάλης σημασίας το γεγονός ότι στον ορό και στο πλάσμα δειγμάτων ζώων και ανθρώπων, έχουν επίσης βρεθεί miRNAs. Τα κυκλοφορούντα miRNAs παρουσιάζουν σταθερότητα και ανθεκτικότητα απέναντι στις δυσμενείς συνθήκες και στα καταταμητικά ένζυμα του πλάσματος, όπως η RNAάση A, γεγονός που τα καθιστά ιδανικούς βιοδείκτες καθώς η ποσοτική έκφρασή τους στον ορό επηρεάζεται κατεξοχήν από ιστικές διεργασίες. Ακόμη είναι αξιοσημείωτο ότι μεταξύ υγιών μαρτύρων η έκφραση των miRNAs δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφοροποιήσεις (X. Chen et al., 2008). Μάλιστα, τα κυκλοφορούντα miRNAs πιθανολογείται πως μπορεί να έχουν μεγάλη χρησιμότητα ως διαγνωστικοί, προγνωστικοί και θεραπευτικοί βιοδείκτες σε ποικιλία κακοήθων νοσημάτων, όπως ο καρκίνος κεφαλής-τραχήλου και ο καρκίνος του παχέος εντέρου (Ristau et al., 2014; Summerer et al., 2015).

Στο οστεοσάρκωμα, η χρήση κυκλοφορούντων miRNAs υπόσχεται να συμβάλλει αποφασιστικά στην πρόωπη διάγνωση και αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση της κακοήθειας (Ram Kumar et al., 2016). Στο παρόν κεφάλαιο θα αναλύσουμε τον ρόλο που μπορούν να αποκτήσουν μελλοντικά τα miRNAs στην κλινική πράξη, λειτουργώντας όχι μόνο ως διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες αλλά και ως θεραπευτικά μόρια και θεραπευτικοί στόχοι.

4.1 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ miRNAs ΩΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ

Είναι σαφές πως αυτή τη στιγμή δεν υπάρχει κάποιος αξιόπιστος και εύκολος στην ανίχνευση βιοδείκτης για το οστεοσάρκωμα. Η δυσκολία ανάπτυξης βιοδεικτών για τη συγκεκριμένη ασθένεια έγκειται μεταξύ άλλων στο γεγονός ότι πρόκειται για ένα πολύ σπάνιο νόσημα, με περιορισμένα δείγματα για αξιολόγηση. Τα miRNAs αποτελούν ιδανικούς υποψηφίους βιοδείκτες, όχι μόνο λόγω της σταθερότητας τους αλλά κυρίως λόγω του μοναδικού προφίλ έκφρασής τους, το οποίο μεταβάλλεται ανάλογα με την κλινική κατάσταση του πάσχοντος ιστού (Allen-Rhoades et al., 2015).

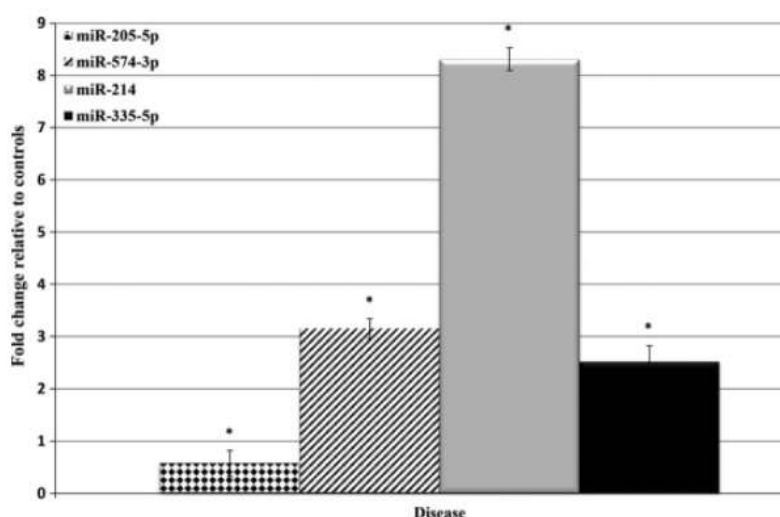
Στη προσπάθεια να αναπτύξουν ένα προφίλ έκφρασης miRNA που θα συσχετίζεται με την εμφάνιση οστεοσάρκωματος, οι Allen-Rhoades και συν. σύγκριναν με χρήση qPCR την έκφραση 752 miRNAs ανάμεσα σε γενετικά τροποποιημένα μοντέλα ποντικών με οστεοσάρκωμα (Genetically Modified Mouse Models, GEMMs) και σε αντιστοιχισμένα ως προς την ηλικία υγιή ποντίκια μάρτυρες. Τέσσερα microRNAs επιλέχθηκαν ως υποψήφιοι βιοδείκτες (miR-205-5p-5p, miR-214, miR-335-5p και miR-574-3p), με βασικά κριτήρια τα αποτελέσματα της qPCR, την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία και την ύπαρξη αντίστοιχων ομόλογων μορίων σε ανθρώπινα δείγματα. Με σκοπό να διερευνήσουν την συσχέτιση των επιλεγμένων miRNAs με την ανάπτυξη και την πρόοδο του ΟΣ, οι ερευνητές μελέτησαν την έκφραση τους σε 10 ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια, στα οποία έγινε ορθότοπη μεταμόσχευση κυττάρων ΟΣ. Στην *Εικόνα 20* φαίνονται τα αποτελέσματα της καταγραφής των miRNAs σε ένα από αυτά τα ποντίκια, το οποίο εμφάνισε κλινικά ανιχνεύσιμη νόσο στις 14 εβδομάδες μετά την μεταμόσχευση και υπέστη ευθανασία, ώστε η νόσος να επιβεβαιωθεί και ιστολογικά. Η έκφραση του miR-



Εικόνα 20. Σχετική έκφραση των miR-205-5p-5p, miR-214, miR-335-5p και miR-574-3p σε ανοσοκατεσταλμένο ποντίκι μετά από ορθότοπη έγχυση κυττάρων ΟΣ. Στις 14 εβδομάδες όπου το ποντίκι θανατώθηκε φαίνεται ότι η έκφραση του miR-205-5p-5p βρέθηκε στατιστικά σημαντικά μειωμένη, ενώ αυτή των miR-214 και miR-574-3p αυξημένη. (*P<0.05) (Allen-Rhoades et al., 2015)

miR-205-5p βρέθηκε στατιστικά σημαντικά μειωμένη, ενώ αυτή των miR-214 και miR-574-3p αυξημένη. Το miR-335-5p δεν είχε σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (Allen-Rhoades et al., 2015).

Τέλος, οι Allen-Rhoades και συν. κατέγραψαν την έκφραση των συγκεκριμένων miRNAs σε 40 παιδιά με ΟΣ σε σχέση με 30 υγιείς μάρτυρες. Και τα 4 miRNA είχαν στατιστικά σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση ανάμεσα στις δύο ομάδες, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 21*. Ακόμη είναι σημαντικό να αναφέρουμε πως από την ανάλυση προέκυψε πως η υψηλή έκφραση του miR-214 συσχετίστηκε με την εμφάνιση μεταστατικής νόσου και χαμηλότερα ποσοστά πενταετούς επιβίωσης (Allen-Rhoades et al., 2015).



Εικόνα 21. Διαφορική έκφραση των miRNAs miR-205-5p, miR-214, miR-335-5p και miR-574-3p ανάμεσα σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα και υγιείς μάρτυρες. (*P<0.05) (Allen-Rhoades et al., 2015)

Παράλληλα, με τη βοήθεια qRT-PCR έχω διαπιστωθεί πως η έκφραση του miR-223 στο ορό 112 ασθενών με ΟΣ είναι σημαντικά μειωμένη σε σχέση με την έκφραση του στον ορό 50 υγιών μαρτύρων. Μάλιστα, η AUC (Area Under the Curve) που μετρήθηκε ήταν της τάξεως του 0.926, γεγονός που υποδηλώνει πως το miR-223 αποτελεί πιθανό βιοδείκτη για το διαχωρισμό των ασθενών με ΟΣ από τον υγιή πληθυσμό. Η χαμηλή έκφραση του miR-223 συσχετίστηκε επιπλέον με την ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων, με προχωρημένο στάδιο νόσου και με μικρότερο ποσοστό πενταετούς επιβίωσης (J. Dong et al., 2016).

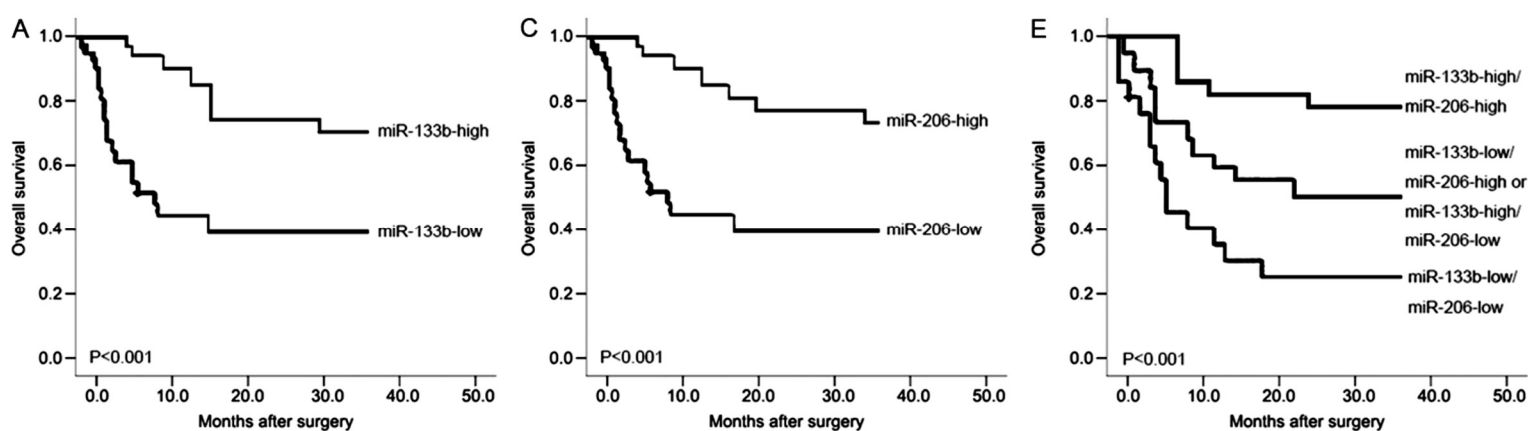
Άλλος πιθανός δείκτης δυσμενούς πρόγνωσης φαίνεται να είναι το miR-21. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2012 συγκρίθηκε η ποσότητα του miR-21 στον ορό 62

ασθενών με οστεοσάρκωμα και 30 υγιών μαρτύρων. Η ανάλυση έδειξε πως το miR-21 εκφράζεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στο ορό των ασθενών. Παράλληλα, είναι ιδιαίτερα σημαντικό το γεγονός πως στη συγκεκριμένη έρευνα το miR-21 συσχετίστηκε με προχωρημένο στάδιο του ΟΣ κατά Enneking, με πτωχή ανταπόκριση στην νεοεπικουρική χημειοθεραπεία και με μειωμένη συνολική επιβίωση των ασθενών (Yuan et al., 2012). Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενα κεφάλαια, το miR-21 έχει βρεθεί να αυξάνει το πολλαπλασιασμό των κυττάρων του οστεοσαρκόματος και να προωθεί τη χημειοαντίσταση απέναντι στη σισπλατίνη (Ziyan & Yang, 2016).

Η υπερέκφραση του miR-21 στον ορό ασθενών με ΟΣ επιβεβαιώθηκε και σε μεταγενέστερη έρευνα. Στην ίδια έρευνα επιπλέον διαπιστώθηκε πως η έκφραση των miR-143 και miR-199a-3p στον ορό είναι σημαντικά μειωμένη σε ασθενείς με ΟΣ σε σχέση με υγιείς μάρτυρες. Η ROC ανάλυση έδειξε πως η συνολική AUC αυτών των 3 miRNAs βρέθηκε να είναι της τάξης του 0.953 με 95% όρια αξιοπιστίας (95% CI) του 0.924–0.984. Η τιμή αυτή είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη AUC της BALP (οστεοειδικού κλάσματος της Αλκαλικής Φωσφατάσης) (0.922, 95% CI 0.88–0.964). Η ειδικότητα και η ευαισθησία του συγκεκριμένου προφίλ miRNAs υπολογίστηκε σε 90.5% και 93.8% αντίστοιχα. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, οι συγγραφείς κατέληξαν ότι το προφίλ των miR-21, miR-143 και miR-199a-3p είναι πιο αξιόπιστο από την BALP για ως κλινικός βιοδείκτης διάγνωσης του ΟΣ. Μάλιστα, σε δείγμα 80 ασθενών με ΟΣ τα miR-21 και miR-143 συσχετίστηκαν με την εμφάνιση μεταστατικής νόσου (Ouyang et al., 2013).

Οι Lian και συν. διαπίστωσαν πως άλλη μία ομάδα miRNAs έχει την προοπτική να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά ως διαγνωστικός βιοδείκτης. Πιο συγκεκριμένα, οι ερευνητές υποστήριξαν ότι τα miR-195-5p, miR-199a-3p, miR-320a, and miR-374a-5p υπερεκφράζονται σε ασθενείς με ΟΣ σε σχέση με υγιείς μάρτυρες και η ανίχνευση τους βρέθηκε να συμβάλλει με μεγάλη ακρίβεια στο διαχωρισμό μεταξύ των δύο αυτών ομάδων (AUC:0.9608, 95% CI 0.9307-0.9912). Σε δείγμα 50 ασθενών με ΟΣ υπολογίστηκε η έκφραση των συγκεκριμένων miRNAs πριν και μετά την χειρουργική εκτομή της κακοήθειας. Αυτό που διαπιστώθηκε είναι ότι όλα τα miRNAs παρουσίασαν στατιστικά σημαντική πτώση στην έκφρασή τους, καταδεικνύοντας το γεγονός ότι αυτή η ομάδα miRNAs μπορεί μελλοντικά να αποτελέσει βιοδείκτη απομάκρυνσης του όγκου (Lian et al., 2015).

Παράλληλα, οι Zhang και συν. διαπίστωσαν ότι η έκφραση των miR-133b και miR-206 είναι μειωμένη σε ασθενείς με ΟΣ σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να αναφέρουμε ότι η χαμηλή έκφραση των συγκεκριμένων μορίων σε αυτή τη μέλετη συσχετίστηκε με την εμφάνιση μεταστατικών εστιών, υποτροπών, με προχωρημένο στάδιο της κακοήθειας και με μειωμένη επιβίωση των ασθενών. Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 22*, ο συνδυασμός χαμηλής έκφρασης miR-133b και miR-206 είναι αυτός που συνδέεται με τη χαμηλότερη ολική επιβίωση. Το μειωμένο κυκλοφορούν miR-133b φάνηκε να συνδέεται επιπλέον με χαμηλά ποσοστά ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία (C. Zhang et al., 2014).



Εικόνα 22. Συσχέτιση της υψηλής ή χαμηλής έκφρασης των miR-133b και miR-206 με τη συνολική επιβίωση των ασθενών με ΟΣ. Α. Στο διάγραμμα φαίνεται πως οι ασθενείς με μειωμένη έκφραση miR-133b έχουν χαμηλότερη ολική επιβίωση από αυτούς με υψηλή έκφραση. Β. Στο διάγραμμα Kaplan-Meier φαίνεται πως η χαμηλή έκφραση miR-206 συνδέεται με μικρότερη ολική επιβίωση. C. Ο συνδυασμός χαμηλής έκφρασης miR-133b και miR-206 στον ορό των ασθενών με ΟΣ συσχετίζεται με τη μικρότερη ολική επιβίωση. (C. Zhang et al., 2014)

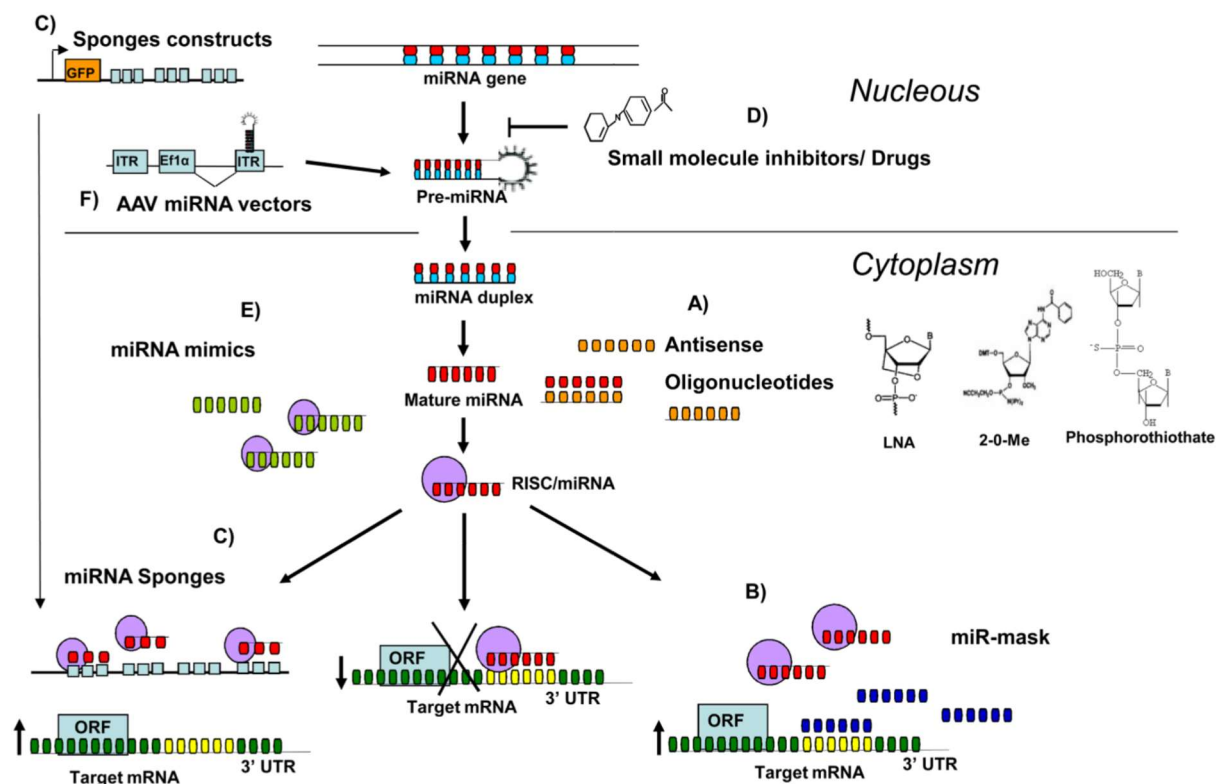
Παρά τα πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα των μελετών που παρουσιάστηκαν, είναι αναμφίβολο ότι απέχουμε ακόμη πολύ από την εισαγωγή των miRNAs στην κλινική πράξη ως βιοδείκτες διάγνωσης και πρόγνωσης. Οι περισσότερες έρευνες που έχουν δημοσιευθεί χρησιμοποιούν μικρό δείγμα πληθυσμού και για αυτό το λόγο η στατιστική τους εγκυρότητα είναι αμφισβητήσιμη. Επιπροσθέτως, δεν έχει οριστεί μία ενιαία μέθοδος κανονικοποίησης των τιμών έκφρασης των miRNAs, με αποτέλεσμα τα αποτελέσματα μεταξύ των διάφορων μελετών να μην είναι συγκρίσιμα. Είναι επομένως σημαντικό να αντιμετωπιστούν τα παραπάνω προβλήματα, προκειμένου να προχωρήσουμε σε εκτενέστερες κλινικές μελέτες για την εισαγωγή των μορίων αυτών στην καθημερινή κλινική πράξη (Ram Kumar et al., 2016).

4.2 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΕΣ ΣΕ miRNAs

Η έρευνα σχετικά με τα microRNAs και την επίδραση τους στη καρκινογένεση έχει καταλήξει σε δύο πολύ σημαντικά συμπεράσματα: (α) η απορρύθμιση των δικτύων αλληλεπίδρασης των miRNAs με τα μόρια στόχους τους αποτελεί καθοριστικό σημείο για την εγκαθίδρυση κακοήθους φαινοτύπου (β) η τροποποίηση στην έκφραση και τη λειτουργία των miRNAs μπορεί να τροποποιήσει το φαινότυπο των κυττάρων. Παράλληλα, καθοριστικής σημασίας κρίνεται και η ιδιότητα των miRNAs να στρέφονται ταυτόχρονα εναντίον πολλαπλών στόχων, γεγονός που τους δίνει τη δυνατότητα να παίζουν ρυθμιστικό ρόλο σε πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών και να ρυθμίζουν πολλές κυτταρικές διεργασίες. Υπό αυτό το πρίσμα αντιλαμβανόμαστε πως τα μικρά μη κωδικά RNAs αποτελούν πεδίο αυξανόμενου ενδιαφέροντος για την κατασκευή νέων θεραπευτικών μορίων (Garzon et al., 2010).

Η στόχευση των miRNAs μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων ή σωματιδίων βασιζόμενων σε ιούς τα οποία μπορούν να καταστείλουν την έκφραση ενός ογκογενετικού miRNA (oncomiR). Αντίθετα, η χρήση μιμητικών μορίων miRNAs μπορεί να συμβάλλει στην αποκατάσταση της έκφρασης ογκοκατασταλτικών miRNAs. Είναι παράλληλα δυνατή η χορήγηση φαρμάκων τα οποία ασκούν αντικαρκινική δράση επηρεάζοντας με διαφορετικό τρόπο κάθε φορά την έκφραση των miRNAs. Μία σύνοψη των στρατηγικών θεραπείας με βάση τα miRNAs απεικονίζεται στην *Εικόνα 23* (Garzon et al., 2010).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενα κεφάλαια, οι ισομορφές του miR-34 (miR-34a, miR-34b, miR-34c) παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση σε ιστικά δείγματα απο ασθενείς με οστεοσάρκωμα και σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος (Botti et al., 2019). Η μειωμένη έκφραση miR-34 έχει συνδεθεί με αυξημένο πολλαπλασιασμό και ενίσχυση της διεισδυτικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων (C. He et al., 2009; Y. Tian et al., 2014), ενώ ταυτόχρονα συμβάλλει στην αποδιαφοροποίηση και στην απόκτηση φαινοτύπου καρκινικού βλαστικού κυττάρου (Y. Zhang et al., 2018). Το 2014, οι Daige και συν. κατασκεύασαν ένα λιποσωμιακό σχηματισμό που έφερε μιμητικό μόριο του miR-34a (MRX34) και το χορήγησαν σε ορθοτοπικά μοντέλα NOD/SCID ποντικών με καρκίνο του ήπατος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το MRX34 μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη του όγκου (Daige et al., 2014). Μάλιστα, το 2020 δημοσιεύθηκαν τα αποτελέσματα της πρώτης κλινικής μελέτης φάσης I για τη χρήση



Εικόνα 23. Στρατηγικές αντιμετώπισης κακοήθων νοσημάτων βασιζόμενες σε miRNAs.

A) Αντι-νοσηματικά νουκλεοτίδια προσδένονται στα miRNAs σύμφωνα με το κανόνα της συμπληρωματικότητας και εμποδίζουν τη δράση τους. B) Τα miR-mask είναι ολιγονουκλεοτίδια που ανταγωνίζονται τα ενδογενή microRNAs για την πρόσδεση στους στόχους τους. C) Τα miRNA sponges φέρουν πολλαπλές αλληλουχίες συμπληρωματικές με το miRNA στόχο, το οποίο παγιδεύουν και εμποδίζουν τη δράση του. D) Μικρομοριακοί αναστολείς των miRNAs ασκούν τη δράση τους στο επίπεδο της μεταγραφής. E) miRNA mimics μιμούνται την δράση του ενδογενούς miRNA. F) Μεταγωγή γονιδίων miRNAs με τη χρήση ιικών σωματιδίων. (Garzon et al., 2010)

miRNA-based θεραπειών, κατά την οποία χορήγηθηκε MRX34 σε ασθενείς με διαφορετικά είδη συμπαγών όγκων. Η συγκεκριμένη μελέτη ωστόσο τερματίστηκε πρόωρα λόγω των πολλαπλών ανεπιθύμητων ενεργειών που εμφανίστηκαν (Hong et al., 2020). Μιμητικά μόρια miR-34 έχουν εφαρμοστεί σε προκλινικό επίπεδο και σε κυτταρικές σειρές ΟΣ. Χαρακτηριστική είναι η μελέτη των Zhang και συν. οι οποίοι απέδειξαν πως η χορήγηση μιμητικού μορίου του miR-34 σε κύτταρα U2OS αυξάνει την ευαισθησία τους απέναντι στη σισπλατίνη. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο ότι η ογκοκατασταλτική δράση του miR-34 μπορεί μελλοντικά να συμβάλλει στην καταπολέμηση της χημειοαντίστασης του ΟΣ (Q.-C. Li et al., 2017).

Επίσης είναι σημαντικό να αναφέρουμε τη παρατήρηση πως ο ανοσοκατασταλτικός παράγοντας sirolimus οδηγεί σε αύξηση της χημειοευαισθησίας κυτταρικών σειρών ΟΣ μέσω αύξησης της έκφρασης του miRNA miR-34b. Το miR-34b φάνηκε στη

συγκεκριμένη μέλετη να έχει ως άμεσο στόχο τις PAK5 and ABCB1, οι οποίες έχουν ρυθμιστικό ρόλο στο κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση και τη χημειοαντίσταση (Zhou et al., 2016).

Παρόμοιο μηχανισμό δράσης φαίνεται να έχει και το miR-329-3p, το οποίο έχει βρεθεί να υποεκφράζεται σε δείγματα ασθενών με ΟΣ. Παράλληλα η χαμηλή έκφραση του συνδέθηκε με αντίσταση των κυττάρων στην σισπλατίνη. Η διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών ΟΣ με μιμητικό μόριο του miR-329-3p φάνηκε να επαναφέρει την ευαισθησία απέναντι στον συγκεκριμένο χημειοθεραπευτικό παράγοντα. Είναι μάλιστα ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι το miR-329-3p φαίνεται να ασκεί τη δράση του καταστέλλοντας το μηχανισμό της γλυκόλυσης. Ως στόχος του miR-329-3p αναδείχθηκε η *Γαλακτική Αφυδρογονάση Α (LDHA)*, η οποία αποτελεί πολύ σημαντικό ένζυμο στη διαδικασία του μεταβολισμού της γλυκόζης (G. Li et al., 2021).

Τα miRNAs, πέρα από το ρόλο τους στην άρση της χημειοαντίστασης στο ΟΣ, μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στην αντίσταση απέναντι στην ακτινοθεραπεία. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το ΟΣ θεωρείται γενικά ακτινοανθεκτικός όγκος και η ακτινοθεραπεία έχει σε γενικές γραμμές περιορισμένη χρησιμότητα. (Whelan & Davis, 2018). Οι Yang και συν. έδειξαν πως η μειωμένη έκφραση miR-328-3p συνδέεται με μειωμένη αποτελεσματικότητα της ακτινοθεραπείας σε κυτταρικές σειρές ΟΣ και η αύξηση της έκφρασης του αυξάνει τα ποσοστά απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων μετά από την επίδραση ιονίζουσας ακτινοβολίας. Στη συνέχεια, σε *in vivo* μοντέλα ποντικών με ΟΣ πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση με μιμητικό μόριο του miR-328-3p και φάνηκε πως η αύξηση του συγκεκριμένου miRNA ενισχύει την ακτινοευαισθησία του όγκου και μειώνει το ρυθμό ανάπτυξης του. Στόχος του miR-328-3p στη συγκεκριμένη έρευνα αναδείχθηκε η ιστόνη H2AX, η οποία εμπλέκεται στην επιδιόρθωση των βλαβών διπλής έλικας (double strand breaks, DSBs) που προκαλεί η ιονίζουσα ακτινοβολία (Z. Yang et al., 2017).

Στην ακτινοευαισθησία του ΟΣ φαίνεται να εμπλέκεται επιπλέον και το miR-513a-5p. Το συγκεκριμένο miRNA έχει βρεθεί να υποεκφράζεται σε δείγματα από ασθενείς με ΟΣ. Σε κυτταρικές σειρές ΟΣ διαπιστώθηκε ότι η χαμηλή έκφραση του miR-513a-5p συσχετίζεται με ανθεκτικότητα απέναντι στην ακτινοθεραπεία και η διαμόλυνση με το συγκεκριμένο μόριο καθιστά τα κύτταρα σαφώς πιο ακτινοευαίσθητα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και σε *in vivo* μοντέλα ποντικών. Παράλληλα, φάνηκε πως το

miR-513a-5p φέρει συμπληρωματική αλληλουχία με το 3' άκρο του mRNA της APE1, η οποία σχετίζεται με τη αντοχή στην ακτινοθεραπεία και θεωρήθηκε ως μόριο στόχος του miRNA (Dai et al., 2018).

Τα τελευταία χρόνια, οι γνώσεις μας πάνω στη βιογένεση και τη λειτουργία των miRNAs πληθύνονται με ιλιγγιώδη ρυθμό. Οι γνώσεις αυτές αναμφίβολα θα οδηγήσουν στη δημιουργία νέων θεραπειών βασισμένων σε miRNAs. Ωστόσο, είναι σαφές ότι ακόμη υπάρχουν προβλήματα που θα πρέπει να αντιμετωπιστούν προκειμένου αυτές οι θεραπείες να ενταχθούν στη κλινική πράξη. Βασικό ζήτημα είναι η ανίχνευση όλων των στόχων των miRNAs και των δικτύων που δημιουργούν με τα υπόλοιπα μη κωδικά RNAs, προκειμένου να αποκτήσουμε σαφή εικόνα του μηχανισμού με τον οποίο συμβάλλουν στην καρκινογένεση. Επιπλέον, ιδιαίτερα σημαντική παράμετρο αποτελεί η δημιουργία κατάλληλων φορέων. Οι συμβατικοί φορείς είναι συνυφασμένοι με χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου, off-target επιδράσεις και μεγάλα ποσοστά τοξικότητας (J. Wang et al., 2019). Παρά το ότι βρισκόμαστε ακόμη σε πολύ πρώιμο στάδιο στην ανάπτυξη των συγκεκριμένων θεραπειών, η χρήση των miRNAs ως θεραπευτικά μόρια αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο έρευνας και πηγή ελπίδας για τους ασθενείς στους οποίους οι συμβατικές μέθοδοι κρίνονται αναποτελεσματικές.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

In vitro και *in vivo* μελέτες στο οστεοσάρκωμα υποστηρίζουν ότι οι μεταβολές στην έκφραση των miRNAs συμβάλλουν στην εμφάνιση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων, όπως ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός, η διεισδυτική ικανότητα και η διαφυγή της απόπτωσης. Τα miRNAs αποτελούν ακόμη ρυθμιστές του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος στο ΟΣ, καταστέλλοντας το ανοσοποιητικό σύστημα και προωθώντας την απόκτηση από ορισμένα κύτταρα φαινοτύπου βλαστικού κυττάρου. Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα στο ΟΣ έχουν τη δυνατότητα όχι μόνο να αυτοανανεώνονται αλλά και να διαφεύγουν από τη δράση των συμβατικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Η χημειοαντίσταση αποτελεί ίσως το σημαντικότερο πρόβλημα στην αντιμετώπιση του ΟΣ και στην εμφάνιση της, πέρα από τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα, συμμετέχει πληθώρα μηχανισμών, όπως το DDR (DNA Damage Response) και η αυτοφαγία. Τα miRNAs φαίνεται πως επηρεάζουν τη λειτουργικότητα αυτών των μηχανισμών. Η έρευνα για τη διαλεύκανση του ρόλου των miRNAs στο ΟΣ αποσκοπεί αναμφίβολα στην μελλοντική χρήση τους κλινική πράξη. Η παρατήρηση ότι μεταβολές στη συγκέντρωση των κυκλοφορούντων στα πλάσμα miRNAs σχετίζονται με μεταβολές στους πάσχοντες ιστούς έχει ανοίξει το δρόμο για την ανακάλυψη νέων διαγνωστικών και προγνωστικών βιοδεικτών, εύκολα ανιχνεύσιμων και βοηθητικών για τη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων. Η χρήση, παράλληλα, των miRNAs ως θεραπευτικών μορίων ή στόχων με ποικίλες μεθόδους μπορεί να παίζει καίριο ρόλο στην αντιμετώπιση της χημειο- και ακτινοαντίστασης της συγκεκριμένης κακοήθειας. Ωστόσο, για την εισαγωγή των miRNAs στη κλινική πρακτική πρέπει να απαντηθούν ακόμη πολλά ερωτήματα. Σε κάθε περίπτωση, πρόκειται για ένα πεδίο έρευνας με ιδιαίτερο ενδιαφέρον το οποίο μελλοντικά ευελπιστούμε πως θα συμβάλλει αποφασιστικά στην βελτίωση της επιβίωσης και της ποιότητας ζωής των ασθενών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abarrategi, A., Tornin, J., Lucia, M. C., Hamilton, A., Enrique, M. C., Rodrigo, J. P., González, M. V., Baldini, N., Javier, G. C., & Rodriguez, R. (2016). Osteosarcoma: Cells-of-Origin, Cancer stem cells, and targeted therapies. In *Stem Cells International* (Vol. 2016). Hindawi Limited.
<https://doi.org/10.1155/2016/3631764>
- Adhikari, A. S., Agarwal, N., Wood, B. M., Porretta, C., Ruiz, B., Pochampally, R. R., & Iwakuma, T. (2010). CD117 and Stro-1 identify osteosarcoma tumor-initiating cells associated with metastasis and drug resistance. *Cancer Research*, 70(11), 4602. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3463>
- Agulnik, M., Bernthal, N. M., Boles, S., Brigman, B., Callan, A. K., Cranmer, L. D., Donnelly, E., Lurie, R. H., Fabbri, N., Getty, P., Groundland, J., Hiniker, S. M., Hoover-Regan, M. L., Kafchinski, L., Kuechle, J. B., Kumar, S., Lindskog, D., Lucas, D. R., Mayerson, J. L., ... Anne Bergman, M. (2022). *NCCN Guidelines Version 2.2023 Bone Cancer Continue NCCN Guidelines Panel Disclosures ϕ Diagnostic/Interventional radiology ‡ Hematology/Hematologic oncology ϐ Internal medicine † Medical oncology τ Orthopedics ≠ Pathology € Pediatric oncology § Radiotherapy/Radiation oncology ¶ Surgery/Surgical oncology * Discussion Writing Committee Member*. <https://www.nccn.org/home/member->
- Alfranca, A., Martinez-Cruzado, L., Tornin, J., Abarrategi, A., Amaral, T., De Alava, E., Menendez, P., Garcia-Castro, J., & Rodriguez, R. (2015). Bone microenvironment signals in osteosarcoma development. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 72, Issue 16, pp. 3097–3113). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1918-y>
- Allen, K. E., & Weiss, G. J. (2010). Resistance May Not Be Futile: microRNA Biomarkers for Chemoresistance and Potential Therapeutics. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(12), 3126–3136. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0397>
- Allen-Rhoades, W., Kurenbekova, L., Satterfield, L., Parikh, N., Fuja, D., Shuck, R. L., Rainusso, N., Trucco, M., Barkauskas, D. A., Jo, E., Ahern, C., Hilsenbeck, S., Donehower, L. A., & Yustein, J. T. (2015). Cross-species identification of a plasma microRNA signature for detection, therapeutic monitoring, and prognosis

- in osteosarcoma. *Cancer Medicine*, 4(7), 977–988.
<https://doi.org/10.1002/cam4.438>
- Anninga, J. K., Gelderblom, H., Fiocco, M., Kroep, J. R., Taminiau, A. H. M., Hogendoorn, P. C. W., & Egeler, R. M. (2011). Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: Where do we stand? *European Journal of Cancer*, 47(16), 2431–2445. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.05.030>
- Apte, R. S., Chen, D. S., & Ferrara, N. (2019). VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*, 176(6), 1248–1264.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021>
- Bacci, G., Briccoli, A., Longhi, A., Ferrari, S., Mercuri, M., Faggioli, F., Versari, M., & Picci, P. (2005). Treatment and outcome of recurrent osteosarcoma: Experience at Rizzoli in 235 patients initially treated with neoadjuvant chemotherapy. *Acta Oncologica*, 44(7), 748–755. <https://doi.org/10.1080/02841860500327503>
- Bacci, G., Longhi, A., Ferrari, S., Briccoli, A., Donati, D., De Paolis, M., & Versari, M. (2004). Prognostic Significance of Serum Lactate Dehydrogenase in Osteosarcoma of the Extremity: Experience at Rizzoli on 1421 Patients Treated over the Last 30 Years. *Tumori Journal*, 90(5), 478–484.
<https://doi.org/10.1177/030089160409000507>
- Bae, Y., Yang, T., Zeng, H.-C., Campeau, P. M., Chen, Y., Bertin, T., Dawson, B. C., Munivez, E., Tao, J., & Lee, B. H. (2012). miRNA-34c regulates Notch signaling during bone development. *Human Molecular Genetics*, 21(13), 2991–3000.
<https://doi.org/10.1093/hmg/dds129>
- Bandres, E., Agirre, X., Ramirez, N., Zarate, R., & Garcia-Foncillas, J. (2007). MicroRNAs as Cancer Players: Potential Clinical and Biological Effects. *DNA and Cell Biology*, 26(5), 273–282. <https://doi.org/10.1089/dna.2006.0544>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs. *Cell*, 116(2), 281–297.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Basu-Roy, U., Basilico, C., & Mansukhani, A. (2013). PERSPECTIVES ON CANCER STEM CELLS IN OSTEOSARCOMA. *Cancer Letters*, 338(1), 158.
<https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2012.05.028>

- Behjati, S., Tarpey, P. S., Haase, K., Ye, H., Young, M. D., Alexandrov, L. B., Farndon, S. J., Collord, G., Wedge, D. C., Martincorena, I., Cooke, S. L., Davies, H., Mifsud, W., Lidgren, M., Martin, S., Latimer, C., Maddison, M., Butler, A. P., Teague, J. W., ... Campbell, P. J. (2017). Recurrent mutation of IGF signalling genes and distinct patterns of genomic rearrangement in osteosarcoma. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms15936>
- Belayneh, R., Fourman, M. S., Bhogal, S., & Weiss, K. R. (2021). Update on Osteosarcoma. *Current Oncology Reports*, 23(6), 71. <https://doi.org/10.1007/s11912-021-01053-7>
- Bert Vogelstein, David Lane, & Arnold J. Levine. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, 408(6810), 307–310. <https://doi.org/10.1038/35042675>
- Bielack, S., Carrle, D., & Casali, P. G. (2009). Osteosarcoma: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 20, iv137–iv139. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp154>
- Bielack, S. S., Kempf-Bielack, B., Delling, G., Exner, G. U., Flege, S., Helmke, K., Kotz, R., Salzer-Kuntschik, M., Werner, M., Winkelmann, W., Zoubek, A., Jürgens, H., & Winkler, K. (2002). Prognostic Factors in High-Grade Osteosarcoma of the Extremities or Trunk: An Analysis of 1,702 Patients Treated on Neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group Protocols. *Journal of Clinical Oncology*, 20(3), 776–790. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.3.776>
- Bielack, S. S., Werner, M., Tunn, P. U., Helmke, K., Jürgens, H., Calaminus, G., Gerss, J., Butterfass-Bahloul, T., Reichardt, P., Smeland, S., Hall, K. S., Whelan, J. S., Jovic, G., Hook, J. M., Sydes, M. R., Seddon, B., Michelagnoli, M., Brennan, B., Picton, S., ... Dhooge, C. (2015). Methotrexate, doxorubicin, and cisplatin (MAP) plus maintenance pegylated interferon alfa-2b versus MAP alone in patients with resectable high-grade osteosarcoma and good histologic response to preoperative MAP: First results of the EURAMOS-1 good response randomized controlled trial. *Journal of Clinical Oncology*, 33(20), 2279–2287. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.0734>

- Botti, G., Giordano, A., Feroce, F., De Chiara, A. R., & Cantile, M. (2019). Noncoding RNAs as circulating biomarkers in osteosarcoma patients. *Journal of Cellular Physiology*, 234(11), 19249–19255. <https://doi.org/10.1002/jcp.28744>
- Brabletz, S., Schuhwerk, H., Brabletz, T., & Stemmler, M. P. (2021). Dynamic EMT: a multi-tool for tumor progression. *The EMBO Journal*, 40(18). <https://doi.org/10.15252/emboj.2021108647>
- Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., De Guevara, R. L., Cepero, E., & Boise, L. H. (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biology*, 14(1), 32. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-32>
- Broadbush, E., Topham, A., & Singh, A. D. (2009). Survival with retinoblastoma in the USA: 1975-2004. *British Journal of Ophthalmology*, 93(1), 24–27. <https://doi.org/10.1136/bjo.2008.143842>
- Brown, H. K., Tellez-Gabriel, M., & Heymann, D. (2017). Cancer stem cells in osteosarcoma. *Cancer Letters*, 386, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.11.019>
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., & Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15524–15529. https://doi.org/10.1073/PNAS.242606799/SUPPL_FILE/6067TABLE3.HTML
- Calvert, G. T., Randall, R. L., Jones, K. B., Cannon-Albright, L., Lessnick, S., & Schiffman, J. D. (2012). At-risk populations for osteosarcoma: The syndromes and beyond. In *Sarcoma* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/152382>
- Camussi, G., Deregibus, M. C., Bruno, S., Cantaluppi, V., & Biancone, L. (2010). Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney International*, 78(9), 838–848. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.278>

- Chang, Z., Huo, L., Li, K., Wu, Y., & Hu, Z. (2014). Blocked Autophagy by miR-101 Enhances Osteosarcoma Cell Chemosensitivity *In Vitro*. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/794756>
- Chen, B., Huang, Z., Zhang, Y., Chen, Y., & Li, Z. (2015). MicroRNA-145 Suppresses Osteosarcoma Metastasis via Targeting MMP16. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 37(6), 2183–2193. <https://doi.org/10.1159/000438575>
- Chen, C., Xue, S., Zhang, J., Chen, W., Gong, D., Zheng, J., Ma, J., Xue, W., Chen, Y., Zhai, W., & Zheng, J. (2017). DNA-methylation-mediated repression of miR-766-3p promotes cell proliferation via targeting SF2 expression in renal cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 141(9), 1867–1878. <https://doi.org/10.1002/IJC.30853>
- Chen, D., Zhao, Z., Huang, Z., Chen, D. C., Zhu, X. X., Wang, Y. Z., Yan, Y. W., Tang, S., Madhavan, S., Ni, W., Huang, Z. P., Li, W., Ji, W., Shen, H., Lin, S., & Jiang, Y. Z. (2018). Super enhancer inhibitors suppress MYC driven transcriptional amplification and tumor progression in osteosarcoma. *Bone Research*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0009-8>
- CHEN, L., JIANG, K., JIANG, H., & WEI, P. (2014). miR-155 mediates drug resistance in osteosarcoma cells via inducing autophagy. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 8(2), 527–532. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1752>
- Chen, L., Wang, Q., Wang, G. D., Wang, H. S., Huang, Y., Liu, X. M., & Cai, X. H. (2013). miR-16 inhibits cell proliferation by targeting IGF1R and the Raf1–MEK1/2–ERK1/2 pathway in osteosarcoma. *FEBS Letters*, 587(9), 1366–1372. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2013.03.007>
- Chen, R., Wang, G., Zheng, Y., Hua, Y., & Cai, Z. (2019). Drug resistance-related microRNAs in osteosarcoma: Translating basic evidence into therapeutic strategies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(4), 2280–2292. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14064>
- Chen, S.-M., Chou, W.-C., Hu, L.-Y., Hsiung, C.-N., Chu, H.-W., Huang, Y.-L., Hsu, H.-M., Yu, J.-C., & Shen, C.-Y. (2015). The Effect of MicroRNA-124 Overexpression on Anti-Tumor Drug Sensitivity. *PLOS ONE*, 10(6), e0128472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128472>

- Chen, X., Bahrami, A., Pappo, A., Easton, J., Dalton, J., Hedlund, E., Ellison, D., Shurtleff, S., Wu, G., Wei, L., Parker, M., Rusch, M., Nagahawatte, P., Wu, J., Mao, S., Boggs, K., Mulder, H., Yergeau, D., Lu, C., ... Dyer, M. A. (2014). Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma. *Cell Reports*, 7(1), 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.003>
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., ... Zhang, C.-Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*, 18(10), 997–1006. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.282>
- Chou, A. J., & Gorlick, R. (2006). Chemotherapy resistance in osteosarcoma: current challenges and future directions. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 6(7), 1075–1085. <https://doi.org/10.1586/14737140.6.7.1075>
- Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Aqeilan, R. I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C. G., Kipps, T. J., Negrini, M., & Croce, C. M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13944. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0506654102>
- Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H. M., Jones, D. L., Visvader, J., Weissman, I. L., & Wahl, G. M. (2006). Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Research*, 66(19), 9339–9344. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3126>
- Conrad, M., Lorenz, S. M., & Proneth, B. (2021). Targeting Ferroptosis: New Hope for As-Yet-Incurable Diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 27(2), 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.08.010>
- Correa, H. (2016). Li-Fraumeni Syndrome. In *Journal of Pediatric Genetics* (Vol. 5, Issue 2, pp. 84–88). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1579759>

- Cortés-Ciriano, I., Lee, J. J. K., Xi, R., Jain, D., Jung, Y. L., Yang, L., Gordenin, D., Klimczak, L. J., Zhang, C. Z., Pellman, D. S., Akdemir, K. C., Alvarez, E. G., Baez-Ortega, A., Beroukhim, R., Boutros, P. C., Bowtell, D. D. L., Brors, B., Burns, K. H., Campbell, P. J., ... Zhang, C. Z. (2020). Comprehensive analysis of chromothripsis in 2,658 human cancers using whole-genome sequencing. *Nature Genetics*, 52(3), 331–341. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0576-7>
- Couzin-Frankel, J. (2013). Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6165), 1432–1433. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.342.6165.1432>
- Croce, C. M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature Reviews Genetics*, 10(10), 704–714. <https://doi.org/10.1038/nrg2634>
- Curtin, N. J., & Szabo, C. (2013). Therapeutic applications of PARP inhibitors: Anticancer therapy and beyond. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(6), 1217–1256. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2013.01.006>
- Czarnecka, A. M., Synoradzki, K., Firlej, W., Bartnik, E., Sobczuk, P., Fiedorowicz, M., Grieb, P., & Rutkowski, P. (2020). Molecular biology of osteosarcoma. In *Cancers* (Vol. 12, Issue 8, pp. 1–27). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers12082130>
- Daige, C. L., Wiggins, J. F., Priddy, L., Nelligan-Davis, T., Zhao, J., & Brown, D. (2014). Systemic Delivery of a miR34a Mimic as a Potential Therapeutic for Liver Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(10), 2352–2360. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0209>
- Dai, N., Qing, Y., Cun, Y., Zhong, Z., Li, C., Zhang, S., Shan, J., Yang, X., Dai, X., Cheng, Y., Xiao, H., Xu, C., Li, M., & Wang, D. (2018). miR-513a-5p regulates radiosensitivity of osteosarcoma by targeting human apurinic/apyrimidinic endonuclease. *Oncotarget*, 9(39), 25414–25426. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11003>
- Davis, L. E., Bolejack, V., Ryan, C. W., Ganjoo, K. N., Loggers, E. T., Chawla, S., Agulnik, M., Livingston, M. B., Reed, D., Keedy, V., Rushing, D., Okuno, S., Reinke, D. K., Riedel, R. F., Attia, S., Mascarenhas, L., & Maki, R. G. (2019). Randomized Double-Blind Phase II Study of Regorafenib in Patients With

- Metastatic Osteosarcoma. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 37(16), 1424–1431.
<https://doi.org/10.1200/JCO.18.02374>
- Di Fiore, R., Fanale, D., Drago-Ferrante, R., Chiaradonna, F., Giuliano, M., De Blasio, A., Amodeo, V., Corsini, L. R., Bazan, V., Tesoriere, G., Vento, R., & Russo, A. (2013). Genetic and molecular characterization of the human Osteosarcoma 3AB-OS cancer stem cell line: A possible model for studying osteosarcoma origin and stemness. *Journal of Cellular Physiology*, 228(6), 1189–1201.
<https://doi.org/10.1002/jcp.24272>
- Di Leva, G., Garofalo, M., & Croce, C. M. (2014). MicroRNAs in Cancer. *Https://Doi.Org/10.1146/Annurev-Pathol-012513-104715*, 9, 287–314.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PATHOL-012513-104715>
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell*, 149(5), 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
- Dong, J., Liu, Y., Liao, W., Liu, R., Shi, P., & Wang, L. (2016). miRNA-223 is a potential diagnostic and prognostic marker for osteosarcoma. *Journal of Bone Oncology*, 5(2), 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2016.05.001>
- Dong, Z., Liao, Z., He, Y., Wu, C., Meng, Z., Qin, B., Xu, G., Li, Z., Sun, T., Wen, Y., & Li, G. (2022). Advances in the Biological Functions and Mechanisms of miRNAs in the Development of Osteosarcoma. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 21, 153303382211173. <https://doi.org/10.1177/15330338221117386>
- Duan, Z., Gao, Y., Shen, J., Choy, E., Cote, G., Harmon, D., Bernstein, K., Lozano-Calderon, S., Mankin, H., & Hornicek, F. J. (2017). miR-15b modulates multidrug resistance in human osteosarcoma *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Oncology*, 11(2), 151–166. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12015>
- Duffaud, F., Mir, O., Boudou-Rouquette, P., Piperno-Neumann, S., Penel, N., Bompas, E., Delcambre, C., Kalbacher, E., Italiano, A., Collard, O., Chevreau, C., Saada, E., Isambert, N., Delaye, J., Schiffler, C., Bouvier, C., Vidal, V., Chabaud, S., & Blay, J. Y. (2019). Efficacy and safety of regorafenib in adult patients with

- metastatic osteosarcoma: a non-comparative, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *The Lancet Oncology*, 20(1), 120–133.
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30742-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30742-3)
- Ebb, D., Meyers, P., Grier, H., Bernstein, M., Gorlick, R., Lipshultz, S. E., Krailo, M., Devidas, M., Barkauskas, D. A., Siegal, G. P., Ferguson, W. S., Letson, G. D., Marcus, K., Goorin, A., Beardsley, P., & Marina, N. (2012). Phase II trial of trastuzumab in combination with cytotoxic chemotherapy for treatment of metastatic osteosarcoma with human epidermal growth factor receptor 2 overexpression: A report from the children's oncology group. *Journal of Clinical Oncology*, 30(20), 2545–2551. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.37.4546>
- Engin, F., Bertin, T., Ma, O., Jiang, M. M., Wang, L., Sutton, R. E., Donehower, L. A., & Lee, B. (2009). Notch signaling contributes to the pathogenesis of human osteosarcomas. *Human Molecular Genetics*, 18(8), 1464–1470.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddp057>
- Fujiwara, T., Katsuda, T., Hagiwara, K., Kosaka, N., Yoshioka, Y., Takahashi, R.-U., Takeshita, F., Kubota, D., Kondo, T., Ichikawa, H., Yoshida, A., Kobayashi, E., Kawai, A., Ozaki, T., & Ochiya, T. (2014). Clinical Relevance and Therapeutic Significance of MicroRNA-133a Expression Profiles and Functions in Malignant Osteosarcoma-Initiating Cells. *Stem Cells*, 32(4), 959–973.
<https://doi.org/10.1002/stem.1618>
- Gao, X., Han, D., & Fan, W. (2016). Down-regulation of RBP-J mediated by microRNA-133a suppresses dendritic cells and functions as a potential tumor suppressor in osteosarcoma. *Experimental Cell Research*, 349(2), 264–272.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.10.019>
- Garzon, R., Marcucci, G., & Croce, C. M. (2010). Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(10), 775–789. <https://doi.org/10.1038/nrd3179>
- Genadry, K. C., Pietrobono, S., Rota, R., & Linardic, C. M. (2018). Soft tissue sarcoma cancer stem cells: An overview. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 8, Issue OCT). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00475>

- Goto, M., Miller, R. W., Ishikawa, Y., & Sugano, H. (1996). *Excess of Rare Cancers in Werner Syndrome (Adult Progeria)* (Vol. 5). <http://aacrjournals.org/cebp/article-pdf/5/4/239/2289022/239.pdf>
- Grignani, G., Palmerini, E., Dileo, P., Asaftei, S. D., D'Ambrosio, L., Pignochino, Y., Mercuri, M., Picci, P., Fagioli, F., Casali, P. G., Ferrari, S., & Aglietta, M. (2012). A phase II trial of sorafenib in relapsed and unresectable high-grade osteosarcoma after failure of standard multimodal therapy: An Italian sarcoma group study. *Annals of Oncology*, 23(2), 508–516. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr151>
- Grignani, G., Palmerini, E., Ferraresi, V., D'Ambrosio, L., Bertulli, R., Asaftei, S. D., Tamburini, A., Pignochino, Y., Sangiolo, D., Marchesi, E., Capozzi, F., Biagini, R., Garbarotti, M., Fagioli, F., Casali, P. G., Picci, P., Ferrari, S., & Aglietta, M. (2015). Sorafenib and everolimus for patients with unresectable high-grade osteosarcoma progressing after standard treatment: A non-randomised phase 2 clinical trial. *The Lancet Oncology*, 16(1), 98–107. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71136-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71136-2)
- Grimson, A., Farh, K. K. H., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., & Bartel, D. P. (2007). MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants Beyond Seed Pairing. *Molecular Cell*, 27(1), 91. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2007.06.017>
- Gugnoni, M., Sancisi, V., Manzotti, G., Gandolfi, G., & Ciarrocchi, A. (2016). Autophagy and epithelial–mesenchymal transition: an intricate interplay in cancer. *Cell Death & Disease* 2016 7:12, 7(12), e2520–e2520. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.415>
- Guo, X., Yu, L., Zhang, Z., Dai, G., Gao, T., & Guo, W. (2017). miR-335 negatively regulates osteosarcoma stem cell-like properties by targeting POU5F1. *Cancer Cell International*, 17(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s12935-017-0398-6>
- Hainaut, P., & Pfeifer, G. P. (2016). Somatic TP53 mutations in the era of genome sequencing. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026179>

- Hameed, M., & Mandelker, D. (2018). Tumor Syndromes Predisposing to Osteosarcoma. *Advances in Anatomic Pathology*, 25(4), 217–222.
<https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000190>
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013/ATTACHMENT/68024D79-3A9C-46C4-930B-640934F11E2E/MMC1.PDF>
- He, C., & Klionsky, D. J. (2009). Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 67–93.
<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102808-114910>
- He, C., Xiong, J., Xu, X., Lu, W., Liu, L., Xiao, D., & Wang, D. (2009). Functional elucidation of MiR-34 in osteosarcoma cells and primary tumor samples. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388(1), 35–40.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.07.101>
- He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 5(7), 522–531.
<https://doi.org/10.1038/nrg1379>
- He, L., He, X., Lim, L. P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., Jackson, A. L., Linsley, P. S., Chen, C., Lowe, S. W., Cleary, M. A., & Hannon, G. J. (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, 447(7148), 1130–1134.
<https://doi.org/10.1038/nature05939>
- He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S. W., Hannon, G. J., & Hammond, S. M. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 435(7043), 828–833. <https://doi.org/10.1038/NATURE03552>

- Heymann, D., & Rédini, F. (2011). Bone sarcomas: pathogenesis and new therapeutic approaches. *IBMS BoneKEy*, 8(9), 402–414. <https://doi.org/10.1138/20110531>
- Hinton, K., Kirk, A., Paul, P., & Persad, S. (2023). Regulation of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Osteosarcoma. *Biomolecules*, 13(2), 398. <https://doi.org/10.3390/biom13020398>
- Hoeijmakers, J. H. J. (2009). DNA Damage, Aging, and Cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(15), 1475–1485. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804615>
- Holmgreen, S. P., Huang, D. C., Adams, J. M., & Cory, S. (1999). Survival activity of Bcl-2 homologs Bcl-w and A1 only partially correlates with their ability to bind pro-apoptotic family members. *Cell Death & Differentiation*, 6(6), 525–532. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400519>
- Hong, D. S., Kang, Y.-K., Borad, M., Sachdev, J., Ejadi, S., Lim, H. Y., Brenner, A. J., Park, K., Lee, J.-L., Kim, T.-Y., Shin, S., Becerra, C. R., Falchook, G., Stoudemire, J., Martin, D., Kelnar, K., Peltier, H., Bonato, V., Bader, A. G., ... Beg, M. S. (2020). Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours. *British Journal of Cancer*, 122(11), 1630–1637. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0802-1>
- Hossain, A., Kuo, M. T., & Saunders, G. F. (2006). Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Molecular and Cellular Biology*, 26(21), 8191–8201. <https://doi.org/10.1128/MCB.00242-06>
- Hsu, P. W. C., Huang, H. Da, Hsu, S. Da, Lin, L. Z., Tsou, A. P., Tseng, C. P., Stadler, P. F., Washietl, S., & Hofacker, I. L. (2006). miRNAMap: genomic maps of microRNA genes and their target genes in mammalian genomes. *Nucleic Acids Research*, 34(Database issue), D135. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKJ135>
- Isakoff, M. S., Bielack, S. S., Meltzer, P., & Gorlick, R. (2015). Osteosarcoma: Current treatment and a collaborative pathway to success. In *Journal of Clinical Oncology* (Vol. 33, Issue 27, pp. 3029–3035). American Society of Clinical Oncology. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4895>
- Italiano, A., Mir, O., Mathoulin-Pelissier, S., Penel, N., Piperno-Neumann, S., Bompas, E., Chevreau, C., Duffaud, F., Entz-Werlé, N., Saada, E., Ray-Coquard, I., Lervat,

- C., Gaspar, N., Marec-Berard, P., Pacquement, H., Wright, J., Toulmonde, M., Bessede, A., Crombe, A., ... Blay, J. Y. (2020). Cabozantinib in patients with advanced Ewing sarcoma or osteosarcoma (CABONE): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 21(3), 446–455.
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30825-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30825-3)
- Izadpanah, S., Shabani, P., Aghebati-Maleki, A., Baghbanzadeh, A., Fotouhi, A., Bisadi, A., Aghebati-Maleki, L., & Baradaran, B. (2020). Prospects for the involvement of cancer stem cells in the pathogenesis of osteosarcoma. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 235, Issue 5, pp. 4167–4182). Wiley-Liss Inc.
<https://doi.org/10.1002/jcp.29344>
- Jaffe, N. (1972). Recent advances in the chemotherapy of metastatic osteogenic sarcoma. *Cancer*, 30(6), 1627–1631. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197212\)30:6<1627::AID-CNCR2820300631>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197212)30:6<1627::AID-CNCR2820300631>3.0.CO;2-H)
- Jiao, Z. H., Wang, J. D., & Wang, X. J. (2018). MicroRNA-16 suppressed the invasion and migration of osteosarcoma by directly inhibiting RAB23. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(9), 2598–2605.
https://doi.org/10.26355/EURREV_201805_14953
- Jin, H., Luo, S., Wang, Y., Liu, C., Piao, Z., Xu, M., Guan, W., Li, Q., Zou, H., Tan, Q.-Y., Yang, Z.-Z., Wang, Y., Wang, D., & Xu, C.-X. (2017). miR-135b Stimulates Osteosarcoma Recurrence and Lung Metastasis via Notch and Wnt/ β -Catenin Signaling. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 8, 111–122.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.06.008>
- Ji, X., Wang, E., & Tian, F. (2018). MicroRNA-140 suppresses osteosarcoma tumor growth by enhancing anti-tumor immune response and blocking mTOR signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1), 1342–1348.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.120>
- Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K. L., Brown, D., & Slack, F. J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120(5), 635–647.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2005.01.014>

- Jo, M. H., Shin, S., Jung, S. R., Kim, E., Song, J. J., & Hohng, S. (2015). Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. *Molecular Cell*, 59(1), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.027>
- Jones, K. B., Salah, Z., Del Mare, S., Galasso, M., Gaudio, E., Nuovo, G. J., Lovat, F., LeBlanc, K., Palatini, J., Randall, R. L., Volinia, S., Stein, G. S., Croce, C. M., Lian, J. B., & Aqeilan, R. I. (2012). miRNA Signatures Associate with Pathogenesis and Progression of Osteosarcoma. *Cancer Research*, 72(7), 1865–1877. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2663>
- Kager, L., Pötschger, U., & Bielack, S. (2010). Review of mifamurtide in the treatment of patients with osteosarcoma. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 6, 279. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S5688>
- Kager, L., Zoubek, A., Pötschger, U., Kastner, U., Flege, S., Kempf-Bielack, B., Branscheid, D., Kotz, R., Salzer-Kuntschik, M., Winkelmann, W., Jundt, G., Kabisch, H., Reichardt, P., Jürgens, H., Gadner, H., & Bielack, S. S. (2003). Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(10), 2011–2018. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.08.132>
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239–257. <https://doi.org/10.1038/BJC.1972.33>
- Kohlmeyer, J. L., Gordon, D. J., Tanas, M. R., Monga, V., Dodd, R. D., & Quelle, D. E. (2020). CDKs in Sarcoma: Mediators of Disease and Emerging Therapeutic Targets. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8). <https://doi.org/10.3390/IJMS21083018>
- Kriegel, A. J., Baker, M. A., Liu, Y., Liu, P., Cowley, A. W., & Liang, M. (2015). Endogenous MicroRNAs in Human Microvascular Endothelial Cells Regulate mRNAs Encoded by Hypertension-Related Genes. *Hypertension*, 66(4), 793–799. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05645>
- Kun-Peng, Z., Chun-Lin, Z., Xiao-Long, M., & Lei, Z. (2019). Fibronectin-1 modulated by the long noncoding RNA OIP5-AS1/miR-200b-3p axis contributes to

- doxorubicin resistance of osteosarcoma cells. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 6927–6939. <https://doi.org/10.1002/jcp.27435>
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A., & Tuschl, T. (2003). New microRNAs from mouse and human. *RNA*, 9(2), 175. <https://doi.org/10.1261/RNA.2146903>
- Lee, J. A., Ko, Y., Kim, D. H., Lim, J. S., Kong, C. B., Cho, W. H., Jeon, D. G., Lee, S. Y., & Koh, J. S. (2012). Epidermal growth factor receptor: is it a feasible target for the treatment of osteosarcoma? *Cancer Research and Treatment*, 44(3), 202–209. <https://doi.org/10.4143/CRT.2012.44.3.202>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
- Lee, Y. T., Tan, Y. J., & Oon, C. E. (2018). Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *European Journal of Pharmacology*, 834, 188–196. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2018.07.034>
- Lei, Y., Junxin, C., Yongcan, H., Xiaoguang, L., & Binsheng, Y. (2020a). Role of microRNAs in the crosstalk between osteosarcoma cells and the tumour microenvironment. *Journal of Bone Oncology*, 25, 100322. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2020.100322>
- Lei, Y., Junxin, C., Yongcan, H., Xiaoguang, L., & Binsheng, Y. (2020b). Role of microRNAs in the crosstalk between osteosarcoma cells and the tumour microenvironment. *Journal of Bone Oncology*, 25, 100322. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2020.100322>
- Lian, F., Cui, Y., Zhou, C., Gao, K., & Wu, L. (2015). Identification of a Plasma Four-microRNA Panel as Potential Noninvasive Biomarker for Osteosarcoma. *PLOS ONE*, 10(3), e0121499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121499>
- Liang, X., Xu, C., Wang, W., & Li, X. (2019). The DNMT1/miR-34a Axis Is Involved in the Stemness of Human Osteosarcoma Cells and Derived Stem-Like Cells. *Stem Cells International*, 2019, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2019/7028901>

- Liao, Y.-Y., Tsai, H.-C., Chou, P.-Y., Wang, S.-W., Chen, H.-T., Lin, Y.-M., Chiang, I.-P., Chang, T.-M., Hsu, S.-K., Chou, M.-C., Tang, C.-H., & Fong, Y.-C. (2016). CCL3 promotes angiogenesis by dysregulation of miR-374b/ VEGF-A axis in human osteosarcoma cells. *Oncotarget*, 7(4), 4310–4325. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6708>
- Li, G., Li, Y., & Wang, D. (2021). Overexpression of miR-329-3p sensitizes osteosarcoma cells to cisplatin through suppression of glucose metabolism by targeting LDHA. *Cell Biology International*, 45(4), 766–774. <https://doi.org/10.1002/cbin.11476>
- Li, J., Yang, Z., Li, Y., Xia, J., Li, D., Li, H., Ren, M., Liao, Y., Yu, S., Chen, Y., Yang, Y., & Zhang, Y. (2016). Cell apoptosis, autophagy and necroptosis in osteosarcoma treatment. *Oncotarget*, 7(28), 44763–44778. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8206>
- Lilienthal, I., & Herold, N. (2020). Targeting molecular mechanisms underlying treatment efficacy and resistance in osteosarcoma: A review of current and future strategies. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 18, pp. 1–56). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21186885>
- Li, M., Shen, Y., Wang, Q., & Zhou, X. (2019). MiR-204-5p promotes apoptosis and inhibits migration of osteosarcoma via targeting EBF2. *Biochimie*, 158, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.12.003>
- Lindsey, B. A., Markel, J. E., & Kleinerman, E. S. (2017). Osteosarcoma Overview. In *Rheumatology and Therapy* (Vol. 4, Issue 1, pp. 25–43). Adis. <https://doi.org/10.1007/s40744-016-0050-2>
- Lippert, T. H., Ruoff, H.-J., & Volm, M. (2011). Current Status of Methods to Assess Cancer Drug Resistance. *International Journal of Medical Sciences*, 8(3), 245–253. <https://doi.org/10.7150/ijms.8.245>
- Li, Q.-C., Xu, H., Wang, X., Wang, T., & Wu, J. (2017). miR-34a increases cisplatin sensitivity of osteosarcoma cells in vitro through up-regulation of c-Myc and Bim signal. *Cancer Biomarkers*, 21(1), 135–144. <https://doi.org/10.3233/CBM-170452>

- Li, S., Sun, W., Wang, H., Zuo, D., Hua, Y., & Cai, Z. (2015). Research progress on the multidrug resistance mechanisms of osteosarcoma chemotherapy and reversal. *Tumor Biology*, 36(3), 1329–1338. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3181-0>
- Liu, J., & Shang, G. (2022). The Roles of Noncoding RNAs in the Development of Osteosarcoma Stem Cells and Potential Therapeutic Targets. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.773038>
- Liu, Q.-L., Zhang, J., Liu, X., & Gao, J.-Y. (2015). Role of growth hormone in maturation and activation of dendritic cells *via* miR-200a and the Keap1/Nrf2 pathway. *Cell Proliferation*, 48(5), 573–581. <https://doi.org/10.1111/cpr.12206>
- Liu, W., Jiang, D., Gong, F., Huang, Y., Luo, Y., Rong, Y., Wang, J., Ge, X., Ji, C., Fan, J., & Cai, W. (2020). miR-210-5p promotes epithelial–mesenchymal transition by inhibiting PIK3R5 thereby activating oncogenic autophagy in osteosarcoma cells. *Cell Death & Disease*, 11(2), 93. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2270-1>
- Liu, W., Xu, G., Liu, H., & Li, T. (2015). MicroRNA-490-3p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting HMGA2 in osteosarcoma. *FEBS Letters*, 589(20PartB), 3148–3153. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.034>
- Liu, Y., Taylor, N. E., Lu, L., Usa, K., Cowley, A. W., Ferreri, N. R., Yeo, N. C., & Liang, M. (2010). Renal Medullary MicroRNAs in Dahl Salt-Sensitive Rats. *Hypertension*, 55(4), 974–982. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.144428>
- Li, Y., Jiang, W., Hu, Y., Da, Z., Zeng, C., Tu, M., Deng, Z., & Xiao, W. (2016). MicroRNA-199a-5p inhibits cisplatin-induced drug resistance via inhibition of autophagy in osteosarcoma cells. *Oncology Letters*, 12(5), 4203–4208. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5172>
- Luetke, A., Meyers, P. A., Lewis, I., & Juergens, H. (2014). Osteosarcoma treatment - Where do we stand? A state of the art review. In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 40, Issue 4, pp. 523–532). <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.11.006>

- Lu, G., Du, L., Guo, Y., Xing, B., Lu, J., & Wei, Y. (2018). Expression and role of microRNA-1271 in the pathogenesis of osteosarcoma. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(2), 1934. <https://doi.org/10.3892/ETM.2017.5649>
- Lu, J., Song, G., Tang, Q., Yin, J., Zou, C., Zhao, Z., Xie, X., Xu, H., Huang, G., Wang, J., Lee, D.-F., Khokha, R., Yang, H., & Shen, J. (2017). MiR-26a inhibits stem cell-like phenotype and tumor growth of osteosarcoma by targeting Jagged1. *Oncogene*, 36(2), 231–241. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.194>
- Luo, D.-J., Li, L.-J., Huo, H.-F., Liu, X.-Q., Cui, H.-W., & Jiang, D.-M. (2019). MicroRNA-29b sensitizes osteosarcoma cells to doxorubicin by targeting matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in osteosarcoma. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(4), 1434–1442. https://doi.org/10.26355/eurev_201902_17100
- Martin, J. W., Squire, J. A., & Zielenska, M. (2012). The genetics of osteosarcoma. In *Sarcoma* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/627254>
- Marulanda, G. A., Henderson, E. R., Johnson, D. A., Letson, G. D., & Cheong, D. (2008). Orthopedic surgery options for the treatment of primary osteosarcoma. *Cancer Control : Journal of the Moffitt Cancer Center*, 15(1), 13–20. <https://doi.org/10.1177/107327480801500103>
- Menéndez, S. T., Gallego, B., Murillo, D., Rodríguez, A., & Rodríguez, R. (2021). Cancer Stem Cells as a Source of Drug Resistance in Bone Sarcomas. *Journal of Clinical Medicine*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/jcm10122621>
- Meyers, P. A. (2009). Muramyl tripeptide (mifamurtide) for the treatment of osteosarcoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 9(8), 1035–1049. <https://doi.org/10.1586/era.09.69>
- Meyers, P. A., Schwartz, C. L., Krailo, M. D., Healey, J. H., Bernstein, M. L., Betcher, D., Ferguson, W. S., Gebhardt, M. C., Goorin, A. M., Harris, M., Kleinerman, E., Link, M. P., Nadel, H., Nieder, M., Siegal, G. P., Weiner, M. A., Wells, R. J., Womer, R. B., & Grier, H. E. (2008). Osteosarcoma: The addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival - A report from the children's oncology group. *Journal of Clinical Oncology*, 26(4), 633–638. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.14.0095>

- Mirabello, L., Troisi, R. J., & Savage, S. A. (2009a). International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *International Journal of Cancer*, *125*(1), 229–234.
<https://doi.org/10.1002/ijc.24320>
- Mirabello, L., Troisi, R. J., & Savage, S. A. (2009b). Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: Data from the surveillance, epidemiology, and end results program. *Cancer*, *115*(7), 1531–1543.
<https://doi.org/10.1002/cncr.24121>
- Moukengue, B., Lallier, M., Marchandet, L., Baud’huin, M., Verrecchia, F., Ory, B., & Lamoureux, F. (2022). Origin and Therapies of Osteosarcoma. In *Cancers* (Vol. 14, Issue 14). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cancers14143503>
- Mouneimne, G., & Brugge, J. S. (2009). YB-1 Translational Control of Epithelial-Mesenchyme Transition. *Cancer Cell*, *15*(5), 357–359.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.04.006>
- Nik-Zainal, S., Alexandrov, L. B., Wedge, D. C., Van Loo, P., Greenman, C. D., Raine, K., Jones, D., Hinton, J., Marshall, J., Stebbings, L. A., Menzies, A., Martin, S., Leung, K., Chen, L., Leroy, C., Ramakrishna, M., Rance, R., Lau, K. W., Mudie, L. J., ... Stratton, M. R. (2012). Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell*, *149*(5), 979–993. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.04.024>
- Nugent, M. (2015). MicroRNA and bone cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *889*, 201–230. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23730-5_11/COVER
- O’Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology*, *9*(AUG), 402. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2018.00402/BIBTEX>
- O’Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., & Mendell, J. T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, *435*(7043), 839–843. <https://doi.org/10.1038/NATURE03677>
- Ohba, T., Cates, J. M. M., Cole, H. A., Slosky, D. A., Haro, H., Ichikawa, J., Ando, T., Schwartz, H. S., & Schoenecker, J. G. (2014). Pleiotropic effects of

- bisphosphonates on osteosarcoma. *Bone*, 63, 110–120.
<https://doi.org/10.1016/J.BONE.2014.03.005>
- Osaki, M., Takeshita, F., Sugimoto, Y., Kosaka, N., Yamamoto, Y., Yoshioka, Y., Kobayashi, E., Yamada, T., Kawai, A., Inoue, T., Ito, H., Oshimura, M., & Ochiya, T. (2011). MicroRNA-143 Regulates Human Osteosarcoma Metastasis by Regulating Matrix Metalloprotease-13 Expression. *Molecular Therapy*, 19(6), 1123–1130. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.53>
- Ottaviani, G., & Jaffe, N. (2009). The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treatment and Research*, 152, 3–13. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0284-9_1
- Ouyang, L., Liu, P., Yang, S., Ye, S., Xu, W., & Liu, X. (2013). A three-plasma miRNA signature serves as novel biomarkers for osteosarcoma. *Medical Oncology*, 30(1), 340. <https://doi.org/10.1007/s12032-012-0340-7>
- Pannuti, A., Foreman, K., Rizzo, P., Osipo, C., Golde, T., Osborne, B., & Miele, L. (2010). Targeting Notch to Target Cancer Stem Cells. *Clinical Cancer Research*, 16(12), 3141–3152. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2823>
- Patiño-García, A., Zalacain, M., Folio, C., Zanduetta, C., Sierrasesúmaga, L., San Julián, M., Toledo, G., De Las Rivas, J., & Lecanda, F. (2009). Profiling of Chemo-naïve Osteosarcoma and Paired-Normal Cells Identifies EBF2 as a Mediator of Osteoprotegerin Inhibition to Tumor Necrosis Factor–Related Apoptosis-Inducing Ligand–Induced Apoptosis. *Clinical Cancer Research*, 15(16), 5082–5091. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0300>
- Picci, P. (2007). Osteosarcoma (Osteogenic sarcoma). In *Orphanet Journal of Rare Diseases* (Vol. 2, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1750-1172-2-6>
- Piperno-Neumann, S., Le Deley, M. C., Rédini, F., Pacquement, H., Marec-Bérard, P., Petit, P., Brisse, H., Lervat, C., Gentet, J. C., Entz-Werlé, N., Italiano, A., Corradini, N., Bompas, E., Penel, N., Tabone, M. D., Gomez-Brouchet, A., Guinebretière, J. M., Mascard, E., Gouin, F., ... Brugières, L. (2016). Zoledronate in combination with chemotherapy and surgery to treat osteosarcoma (OS2006): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 17(8), 1070–1080. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30096-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30096-1)

- Pobbati, A. V., & Hong, W. (2013). Emerging roles of TEAD transcription factors and its coactivators in cancers. *Cancer Biology & Therapy*, 14(5), 390–398.
<https://doi.org/10.4161/cbt.23788>
- Poos, K., Smida, J., Nathrath, M., Maugg, D., Baumhoer, D., & Korsching, E. (2013). How MicroRNA and Transcription Factor Co-regulatory Networks Affect Osteosarcoma Cell Proliferation. *PLOS Computational Biology*, 9(8), e1003210.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1003210>
- Qi, J., Zhou, Y., Jiao, Z., Wang, X., Zhao, Y., Li, Y., Chen, H., Yang, L., Zhu, H., & Li, Y. (2017). Exosomes Derived from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Promote Tumor Growth Through Hedgehog Signaling Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 42(6), 2242–2254.
<https://doi.org/10.1159/000479998>
- Qin, F., Tang, H., Zhang, Y., Zhang, Z., Huang, P., & Zhu, J. (2020). Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-208a promotes osteosarcoma cell proliferation, migration, and invasion. *Journal of Cellular Physiology*, 235(5), 4734–4745. <https://doi.org/10.1002/jcp.29351>
- Ragland, B. D., Bell, W. C., Lopez, R. R., & Siegal, G. P. (2002). Cytogenetics and molecular biology of osteosarcoma. In *Laboratory Investigation* (Vol. 82, Issue 4, pp. 365–373). Lippincott Williams and Wilkins.
<https://doi.org/10.1038/labinvest.3780431>
- Ram Kumar, R., Boro, A., & Fuchs, B. (2016). Involvement and Clinical Aspects of MicroRNA in Osteosarcoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 877. <https://doi.org/10.3390/ijms17060877>
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquienelll, A. E., Bettlnger, J. C., Rougvle, A. E., Horvitz, H. R., & Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772), 901–906. <https://doi.org/10.1038/35002607>
- Ribi, S., Baumhoer, D., Lee, K., Teo, A. S., Madan, B., Zhang, K., Kohlmann, W. K., Yao, F., Heng Lee, W., Hoi, Q., Cai, S., Yi Woo, X., Tan, P., Jundt, G., Smida, J., Nathrath, M., Sung, W.-K., Schiffman, J. D., Virshup, D. M., & Hillmer, A. M. (2015). TP53 intron 1 hotspot rearrangements are specific to sporadic

osteosarcoma and can cause Li-Fraumeni syndrome. In *Oncotarget* (Vol. 6, Issue 10). www.impactjournals.com/oncotarget/

Ristau, J., Staffa, J., Schrotz-King, P., Gigic, B., Makar, K. W., Hoffmeister, M., Brenner, H., Ulrich, A., Schneider, M., Ulrich, C. M., & Habermann, N. (2014). Suitability of Circulating miRNAs as Potential Prognostic Markers in Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 23(12), 2632–2637. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0556>

Rosen, G., Caparros, B., Huvos, A. G., Kosloff, C., Nirenberg, A., Cacavio, A., Marcove, R. C., Lane, J. M., Mehta, B., & Urban, C. (1982). Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: Selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumor to preoperative chemotherapy. *Cancer*, 49(6), 1221–1230. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19820315\)49:6<1221::AID-CNCR2820490625>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19820315)49:6<1221::AID-CNCR2820490625>3.0.CO;2-E)

Rupaimoole, R., Calin, G. A., Lopez-Berestein, G., & Sood, A. K. (2016). miRNA Deregulation in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment. *Cancer Discovery*, 6(3), 235–246. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0893>

Sayles, L. C., Breese, M. R., Koehne, A. L., Leung, S. G., Lee, A. G., Liu, H.-Y., Spillinger, A., Shah, A. T., Tanasa, B., Straessler, K., Hazard, F. K., Spunt, S. L., Marina, N., Kim, G. E., Cho, S.-J., Avedian, R. S., Mohler, D. G., Kim, M.-O., DuBois, S. G., ... Sweet-Cordero, E. A. (2019). Genome-Informed Targeted Therapy for Osteosarcoma. *Cancer Discovery*, 9(1), 46–63. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-1152>

Scuderi, S. A., Calabrese, G., Paterniti, I., Campolo, M., Lanza, M., Capra, A. P., Pantaleo, L., Munaò, S., Colarossi, L., Forte, S., Cuzzocrea, S., & Esposito, E. (2022). The Biological Function of MicroRNAs in Bone Tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2348. <https://doi.org/10.3390/ijms23042348>

Sevela, F., Mayr, L., Kubista, B., Lötsch, D., Van Schoonhoven, S., Windhager, R., Pirker, C., Micksche, M., & Berger, W. (2015). EGFR is not a major driver for osteosarcoma cell growth in vitro but contributes to starvation and chemotherapy resistance. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 34(1). <https://doi.org/10.1186/S13046-015-0251-5>

- Shao, X., Miao, M., Xue, J., Xue, J., Ji, X., & Zhu, H. (2015). The Down-Regulation of MicroRNA-497 Contributes to Cell Growth and Cisplatin Resistance Through PI3K/Akt Pathway in Osteosarcoma. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36(5), 2051–2062. <https://doi.org/10.1159/000430172>
- Shenghui, H., Nakada, D., & Morrison, S. J. (2009). Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25(1), 377–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113248>
- Shen, S., Huang, K., Wu, Y., Ma, Y., Wang, J., Qin, F., & Ma, J. (2017). A miR-135b-TAZ positive feedback loop promotes epithelial–mesenchymal transition (EMT) and tumorigenesis in osteosarcoma. *Cancer Letters*, 407, 32–44. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.08.005>
- Shiozawa, Y., Berry, J. E., Eber, M. R., Jung, Y., Yumoto, K., Cackowski, F. C., Yoon, H. J., Parsana, P., Mehra, R., Wang, J., McGee, S., Lee, E., Nagrath, S., Pienta, K. J., & Taichman, R. S. (2016). The marrow niche controls the cancer stem cell phenotype of disseminated prostate cancer. *Oncotarget*, 7(27), 41217–41232. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9251>
- Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 175–193. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8>
- Si, W., Shen, J., Zheng, H., & Fan, W. (2019). The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clinical Epigenetics*, 11(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0587-8>
- Song, B., Wang, Y., Titmus, M. A., Botchkina, G., Formentini, A., Kornmann, M., & Ju, J. (2010). Molecular mechanism of chemoresistance by miR-215 in osteosarcoma and colon cancer cells. *Molecular Cancer*, 9(1), 96. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-96>
- Song, B., Wang, Y., Xi, Y., Kudo, K., Bruheim, S., Botchkina, G. I., Gavin, E., Wan, Y., Formentini, A., Kornmann, M., Fodstad, O., & Ju, J. (2009). Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells. *Oncogene*, 28(46), 4065–4074. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.274>

- Souhami, R. L., Craft, A. W., Van der Eijken, J. W., Nooij, M., Spooner, D., Bramwell, V. H., Wierzicki, R., Malcolm, A. J., Kirkpatrick, A., Uscinska, B. M., Van Glabbeke, M., & Machin, D. (1997). Randomised trial of two regimens of chemotherapy in operable osteosarcoma: a study of the European Osteosarcoma Intergroup. *The Lancet*, 350(9082), 911–917. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)02307-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02307-6)
- Stephens, P. J., Greenman, C. D., Fu, B., Yang, F., Bignell, G. R., Mudie, L. J., Pleasance, E. D., Lau, K. W., Beare, D., Stebbings, L. A., McLaren, S., Lin, M. L., McBride, D. J., Varela, I., Nik-Zainal, S., Leroy, C., Jia, M., Menzies, A., Butler, A. P., ... Campbell, P. J. (2011). Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development. *Cell*, 144(1), 27. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.11.055>
- Stinco, G., Governatori, G., Mattighello, P., & Patrone, P. (2008). Multiple cutaneous neoplasms in a patient with Rothmund-Thomson syndrome: Case report and published work review. In *Journal of Dermatology* (Vol. 35, Issue 3, pp. 154–161). <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2008.00436.x>
- Strander, H., Bauer, H. C., Brosjö, O., Kreicbergs, A., Lindholm, J., Nilsson, U., Silfverswärd, C., & Szamosi, A. (1993). Adjuvant interferon treatment in human osteosarcoma. *Cancer Treatment and Research*, 62, 29–32. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3518-8_5
- Stratford, A. L., Reipas, K., Hu, K., Fotovati, A., Brough, R., Frankum, J., Takhar, M., Watson, P., Ashworth, A., Lord, C. J., Lasham, A., Print, C. G., & Dunn, S. E. (2012). Targeting p90 Ribosomal S6 Kinase Eliminates Tumor-Initiating Cells by Inactivating Y-Box Binding Protein-1 in Triple-Negative Breast Cancers. *Stem Cells*, 30(7), 1338–1348. <https://doi.org/10.1002/stem.1128>
- Summerer, I., Unger, K., Braselmann, H., Schuettrumpf, L., Maihoefer, C., Baumeister, P., Kirchner, T., Niyazi, M., Sage, E., Specht, H. M., Multhoff, G., Moertl, S., Belka, C., & Zitzelsberger, H. (2015). Circulating microRNAs as prognostic therapy biomarkers in head and neck cancer patients. *British Journal of Cancer*, 113(1), 76–82. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.111>

- Sun, X., Dai, G., Yu, L., Hu, Q., Chen, J., & Guo, W. (2018). miR-143-3p inhibits the proliferation, migration and invasion in osteosarcoma by targeting FOSL2. *Scientific Reports*, 8(1), 606. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18739-3>
- Sun, Z., Liu, Q., Hong, H., Zhang, H., & Zhang, T. (2018). miR-19 promotes osteosarcoma progression by targeting SOCS6. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1), 1363–1369. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2017.10.002>
- Sutow, W. W., Sullivan, M. P., Fernbach, D. J., Cangir, A., & George, S. L. (1975). Adjuvant chemotherapy in primary treatment of osteogenic sarcoma. A southwest oncology group study. *Cancer*, 36(5), 1598–1602. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197511\)36:5<1598::AID-CNCR2820360511>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197511)36:5<1598::AID-CNCR2820360511>3.0.CO;2-N)
- Swain, S. M., Baselga, J., Kim, S.-B., Ro, J., Semiglazov, V., Campone, M., Ciruelos, E., Ferrero, J.-M., Schneeweiss, A., Heeson, S., Clark, E., Ross, G., Benyunes, M. C., & Cortés, J. (2015). Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 372(8), 724–734. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1413513>
- Tang, D., Kang, R., Berghe, T. Vanden, Vandenabeele, P., & Kroemer, G. (2019). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research*, 29(5), 347–364. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5>
- Tan, Y., Chen, Q., Li, X., Zeng, Z., Xiong, W., Li, G., Li, X., Yang, J., Xiang, B., & Yi, M. (2021). Pyroptosis: a new paradigm of cell death for fighting against cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01959-x>
- TAO, L.-J., ZHOU, X.-D., SHEN, C.-C., LIANG, C.-Z., LIU, B., TAO, Y., & TAO, H.-M. (2014). Tetrandrine induces apoptosis and triggers a caspase cascade in U2-OS and MG-63 cells through the intrinsic and extrinsic pathways. *Molecular Medicine Reports*, 9(1), 345–349. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1761>
- Thayanithy, V., Sarver, A. L., Kartha, R. V., Li, L., Angstadt, A. Y., Breen, M., Steer, C. J., Modiano, J. F., & Subramanian, S. (2012). Perturbation of 14q32 miRNAs-cMYC gene network in osteosarcoma. *Bone*, 50(1), 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.10.012>

- Tian, J., Li, X., Si, M., Liu, T., & Li, J. (2014). CD271+ osteosarcoma cells display stem-like properties. *PLoS ONE*, 9(6).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098549>
- Tian, Y., Zhang, Y.-Z., & Chen, W. (2014). MicroRNA-199a-3p and microRNA-34a regulate apoptosis in human osteosarcoma cells. *Bioscience Reports*, 34(4).
<https://doi.org/10.1042/BSR20140084>
- Tirino, V., Desiderio, V., Paino, F., De Rosa, A., Papaccio, F., La Noce, M., Laino, L., De Francesco, F., & Papaccio, G. (2013). Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *The FASEB Journal*, 27(1), 13–24. <https://doi.org/10.1096/FJ.12-218222>
- Visone, R., & Croce, C. M. (2009). MiRNAs and cancer. *American Journal of Pathology*, 174(4), 1131–1138. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080794>
- Visvader, J. E. (2011). Cells of origin in cancer. In *Nature* (Vol. 469, Issue 7330, pp. 314–322). <https://doi.org/10.1038/nature09781>
- Wagner, L. M., & Adams, V. R. (2017). Targeting the PD-1 pathway in pediatric solid tumors and brain tumors. *OncoTargets and Therapy*, 10, 2097–2106.
<https://doi.org/10.2147/OTT.S124008>
- Wang, J., Liu, S., Shi, J., Li, J., Wang, S., Liu, H., Zhao, S., Duan, K., Pan, X., & Yi, Z. (2019). The Role of miRNA in the Diagnosis, Prognosis, and Treatment of Osteosarcoma. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 34(10), 605–613.
<https://doi.org/10.1089/cbr.2019.2939>
- Wang, T., Wang, D., Zhang, L., Yang, P., Wang, J., Liu, Q., Yan, F., & Lin, F. (2019). The TGF β -miR-499a-SHKBP1 pathway induces resistance to EGFR inhibitors in osteosarcoma cancer stem cell-like cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 226. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1195-y>
- Wang, W., Zhang, L., Zheng, K., & Zhang, X. (2016). miR-17-5p promotes the growth of osteosarcoma in a BRCC2-dependent mechanism. *Oncology Reports*, 35(3), 1473–1482. <https://doi.org/10.3892/OR.2016.4542>
- Wang, Y., Wang, N., Zeng, X., Sun, J., Wang, G., Xu, H., & Zhao, W. (2017). MicroRNA-335 and its target Rock1 synergistically influence tumor progression

- and prognosis in osteosarcoma. *Oncology Letters*, 13(5), 3057–3065.
<https://doi.org/10.3892/ol.2017.5818>
- Wang, Y., Yang, T., Zhang, Z., Lu, M., Zhao, W., Zeng, X., & Zhang, W. (2017). Long non-coding RNA TUG1 promotes migration and invasion by acting as a ceRNA of miR-335-5p in osteosarcoma cells. *Cancer Science*, 108(5), 859–867.
<https://doi.org/10.1111/cas.13201>
- Wang, Y., Zeng, X., Wang, N., Zhao, W., Zhang, X., Teng, S., Zhang, Y., & Lu, Z. (2018). Long noncoding RNA DANCR, working as a competitive endogenous RNA, promotes ROCK1-mediated proliferation and metastasis via decoying of miR-335-5p and miR-1972 in osteosarcoma. *Molecular Cancer*, 17(1), 89.
<https://doi.org/10.1186/s12943-018-0837-6>
- Wang, Z., Li, Y., Kong, D., Ahmad, A., Banerjee, S., & Sarkar, F. H. (2010). Cross-talk between miRNA and Notch signaling pathways in tumor development and progression. *Cancer Letters*, 292(2), 141–148.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.11.012>
- Whelan, J. S., & Davis, L. E. (2018). Osteosarcoma, Chondrosarcoma, and Chordoma. *Journal of Clinical Oncology*, 36(2), 188–193.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2017.75.1743>
- Willis, S. N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J. I., Adams, J. M., & Huang, D. C. S. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-x_L, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes & Development*, 19(11), 1294–1305. <https://doi.org/10.1101/gad.1304105>
- Wong, F. L., Boice, J. D., Abramson, D. H., Tarone, R. E., Kleinerman, R. A., Stovall, M., Goldman, M. B., Seddon, J. M., Tarbell, N., Fraumeni, J. F., & Li, F. P. (1997). Cancer incidence after retinoblastoma. Radiation dose and sarcoma risk. *JAMA*, 278(15), 1262–1267. <https://doi.org/10.1001/JAMA.278.15.1262>
- Wouters, M. D., van Gent, D. C., Hoeijmakers, J. H. J., & Pothof, J. (2011). MicroRNAs, the DNA damage response and cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 717(1–2), 54–66. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.012>

- Xiang, J., & Wu, J. (2010). Feud or Friend? The Role of the miR-17-92 Cluster in Tumorigenesis. *Current Genomics*, 11(2), 129–135.
<https://doi.org/10.2174/138920210790886853>
- Xu, D., Dong, P., Xiong, Y., Yue, J., Ihira, K., Konno, Y., Kobayashi, N., Todo, Y., & Watari, H. (2019). MicroRNA-361: A Multifaceted Player Regulating Tumor Aggressiveness and Tumor Microenvironment Formation. *Cancers*, 11(8), 1130.
<https://doi.org/10.3390/cancers11081130>
- Xu, M., Jin, H., Xu, C.-X., Bi, W.-Z., & Wang, Y. (2014). MiR-34c inhibits osteosarcoma metastasis and chemoresistance. *Medical Oncology*, 31(6), 972.
<https://doi.org/10.1007/s12032-014-0972-x>
- Xu, M., Jin, H., Xu, C.-X., Sun, B., Mao, Z., Bi, W.-Z., & Wang, Y. (2014). miR-382 inhibits tumor growth and enhance chemosensitivity in osteosarcoma. *Oncotarget*, 5(19), 9472–9483. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2418>
- Xu, M., Jin, H., Xu, C.-X., Sun, B., Song, Z.-G., Bi, W.-Z., & Wang, Y. (2015). miR-382 Inhibits Osteosarcoma Metastasis and Relapse by Targeting Y Box-Binding Protein 1. *Molecular Therapy*, 23(1), 89–98. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.197>
- XU, R., LIU, S., CHEN, H., & LAO, L. (2016). MicroRNA-30a downregulation contributes to chemoresistance of osteosarcoma cells through activating Beclin-1-mediated autophagy. *Oncology Reports*, 35(3), 1757–1763.
<https://doi.org/10.3892/or.2015.4497>
- Xu, W., Li, Z., Zhu, X., Xu, R., & Xu, Y. (2018). miR-29 Family Inhibits Resistance to Methotrexate and Promotes Cell Apoptosis by Targeting COL3A1 and MCL1 in Osteosarcoma. *Medical Science Monitor*, 24, 8812–8821.
<https://doi.org/10.12659/MSM.911972>
- Xu, Z., Chen, L., Wang, C., Zhang, L., & Xu, W. (2021). MicroRNA-1287-5p promotes ferroptosis of osteosarcoma cells through inhibiting GPX4. *Free Radical Research*, 55(11–12), 1119–1129. <https://doi.org/10.1080/10715762.2021.2024816>
- Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R. M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., Calin, G. A., Liu, C.-G., Croce, C. M., & Harris, C. C. (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer

- diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 9(3), 189–198.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.01.025>
- Yang, G., Wu, Y., Wan, R., Sang, H., Liu, H., & Huang, W. (2021). The role of non-coding RNAs in the regulation, diagnosis, prognosis and treatment of osteosarcoma (Review). *International Journal of Oncology*, 59(3), 69.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2021.5249>
- Yang, Z. J., Chee, C. E., Huang, S., & Sinicrope, F. A. (2011). The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(9), 1533–1541. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0047>
- Yang, Z., Wa, Q.-D., Lu, C., Pan, W., Lu, Z.-M., & Ao, J. (2017). miR-328-3p enhances the radiosensitivity of osteosarcoma and regulates apoptosis and cell viability via H2AX. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6112>
- You, Y., Que, K., Zhou, Y., Zhang, Z., Zhao, X., Gong, J., & Liu, Z. (2018). MicroRNA-766-3p Inhibits Tumour Progression by Targeting Wnt3a in Hepatocellular Carcinoma. *Molecules and Cells*, 41(9), 830.
<https://doi.org/10.14348/MOLCELLS.2018.0181>
- Yuan, J., Chen, L., Chen, X., Sun, W., & Zhou, X. (2012). Identification of Serum MicroRNA-21 as a Biomarker for Chemosensitivity and Prognosis in Human Osteosarcoma. *Journal of International Medical Research*, 40(6), 2090–2097.
<https://doi.org/10.1177/030006051204000606>
- Zeng, W., Wan, R., Zheng, Y., Singh, S. R., & Wei, Y. (2011). Hypoxia, stem cells and bone tumor. *Cancer Letters*, 313(2), 129–136.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.09.023>
- Zhang, C., Yao, C., Li, H., Wang, G., & He, X. (2014). Serum levels of microRNA-133b and microRNA-206 expression predict prognosis in patients with osteosarcoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(7), 4194–4203.
- Zhang, H., Zhang, J., Meng, F., Zhu, H., Yan, H., Guo, Y., & Zhang, S. (2019). MicroRNA-93 promotes the tumorigenesis of osteosarcoma by targeting TIMP2. *Bioscience Reports*, 39(8). <https://doi.org/10.1042/BSR20191237>

- Zhang, L., Lv, Z., Xu, J., Chen, C., Ge, Q., Li, P., Wei, D., Wu, Z., & Sun, X. (2018). Micro RNA-134 inhibits osteosarcoma angiogenesis and proliferation by targeting the VEGFA / VEGFR 1 pathway. *The FEBS Journal*, 285(7), 1359–1371. <https://doi.org/10.1111/febs.14416>
- Zhang, M., Zhang, J., & Zhou, Q. (2019). Elevated expression of microRNA-328-3p suppresses aggressive malignant behaviors via targeting matrix metalloprotease 16 in osteosarcoma. *OncoTargets and Therapy*, Volume 12, 2063–2070. <https://doi.org/10.2147/OTT.S195022>
- Zhang, S., Chen, H., Liu, W., Fang, L., Qian, Z., Kong, R., Zhang, Q., Li, J., & Cao, X. (2020). miR-766-3p Targeting BCL9L Suppressed Tumorigenesis, Epithelial-Mesenchymal Transition, and Metastasis Through the β -Catenin Signaling Pathway in Osteosarcoma Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.594135>
- Zhang, T., Penicud, K., Bruhn, C., Loizou, J. I., Kanu, N., Wang, Z.-Q., & Behrens, A. (2012). Competition between NBS1 and ATMIN Controls ATM Signaling Pathway Choice. *Cell Reports*, 2(6), 1498–1504. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.11.002>
- Zhang, X., Guo, Q., Chen, J., & Chen, Z. (2015). Quercetin Enhances Cisplatin Sensitivity of Human Osteosarcoma Cells by Modulating microRNA-217-KRAS Axis. *Molecules and Cells*, 38(7), 638–642. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.0037>
- Zhang, Y., Mai, Q., Zhang, X., Xie, C., & Zhang, Y. (2017a). Microenvironment Signals and Mechanisms in the Regulation of Osteosarcoma. In *Osteosarcoma - Biology, Behavior and Mechanisms*. InTech. <https://doi.org/10.5772/67068>
- Zhang, Y., Mai, Q., Zhang, X., Xie, C., & Zhang, Y. (2017b). Microenvironment Signals and Mechanisms in the Regulation of Osteosarcoma. In *Osteosarcoma - Biology, Behavior and Mechanisms*. InTech. <https://doi.org/10.5772/67068>
- Zhang, Y., Pan, Y., Xie, C., & Zhang, Y. (2018). miR-34a exerts as a key regulator in the dedifferentiation of osteosarcoma via PAI-1–Sox2 axis. *Cell Death & Disease*, 9(7), 777. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0778-4>

- Zhao, D., Chen, Y., Chen, S., Zheng, C., Hu, J., & Luo, S. (2017). MiR-19a regulates the cell growth and apoptosis of osteosarcoma stem cells by targeting PTEN. *Tumor Biology*, 39(5), 101042831770534. <https://doi.org/10.1177/1010428317705341>
- Zhao, F., Lv, J., Gan, H., Li, Y., Wang, R., Zhang, H., Wu, Q., & Chen, Y. (2015). MiRNA profile of osteosarcoma with CD117 and stro-1 expression: miR-1247 functions as an onco-miRNA by targeting MAP3K9. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(2), 1451–1458.
- Zhao, G., Cai, C., Yang, T., Qiu, X., Liao, B., Li, W., Ji, Z., Zhao, J., Zhao, H., Guo, M., Ma, Q., Xiao, C., Fan, Q., & Ma, B. (2013). MicroRNA-221 Induces Cell Survival and Cisplatin Resistance through PI3K/Akt Pathway in Human Osteosarcoma. *PLoS ONE*, 8(1), e53906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053906>
- Zhao, H., Li, M., Li, L., Yang, X., Lan, G., & Zhang, Y. (2013). MiR-133b Is Down-Regulated in Human Osteosarcoma and Inhibits Osteosarcoma Cells Proliferation, Migration and Invasion, and Promotes Apoptosis. *PLoS ONE*, 8(12), e83571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083571>
- Zhao, X., Wu, Q., Gong, X., Liu, J., & Ma, Y. (2021). Osteosarcoma: a review of current and future therapeutic approaches. In *BioMedical Engineering Online* (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12938-021-00860-0>
- Zhou, Y., Zhao, R., Tseng, K.-F., Li, K., Lu, Z., Liu, Y., Han, K., Gan, Z., Lin, S., Hu, H., & Min, D. (2016). Sirolimus induces apoptosis and reverses multidrug resistance in human osteosarcoma cells in vitro via increasing microRNA-34b expression. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37(4), 519–529. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.153>
- Zhu, K.-P., Ma, X.-L., & Zhang, C.-L. (2017). LncRNA ODRUL Contributes to Osteosarcoma Progression through the miR-3182/MMP2 Axis. *Molecular Therapy*, 25(10), 2383–2393. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.06.027>

Ziyan, W., & Yang, L. (2016). MicroRNA-21 regulates the sensitivity to cisplatin in a human osteosarcoma cell line. *Irish Journal of Medical Science (1971 -)*, 185(1), 85–91. <https://doi.org/10.1007/s11845-014-1225-x>

Zou, Y., Huang, Y., Yang, J., Wu, J., & Luo, C. (2017). miR-34a is downregulated in human osteosarcoma stem-like cells and promotes invasion, tumorigenic ability and self-renewal capacity. *Molecular Medicine Reports*, 15(4), 1631–1637. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6187>