



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«MiRNAs και Βιοπληροφορική ανάλυση στον Τριπλά  
Αρνητικό Καρκίνο του Μαστού»**

**ΕΛΕΝΗ ΔΡΑΓΩΝΑ**  
**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΑΣΠΑΣΙΑ ΤΣΕΖΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΑΝ/ΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ (Επιβλέπτουσα)  
ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝ/ΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ (Μέλος  
Τριμελούς Επιτροπής)  
ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝ/ΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ (Μέλος  
Τριμελούς Επιτροπής)

**ΛΑΡΙΣΑ 2018**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**«MiRNAs & bioinformatics analysis in triple negative breast cancer»**

**ELENI DRAGONA**

**BIOLOGIST**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Κυτταρογενετικής Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, στα πλαίσια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας κατά φοίτησή μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Γενική του Ανθρώπου» του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Λάρισας. Για την ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας συνέλαβε ένα σύνολο ανθρώπων, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής κα Τσέζου Ασπασία, για την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπό μου και με δέχτηκε στο μεταπτυχιακό της πρόγραμμα «Γενική του Ανθρώπου» αλλά και τη δυνατότητα που μου παρείχε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο της. Επίσης, την ευχαριστώ για όλη την καθοδήγηση που είχα όλον αυτόν τον καιρό, αλλά και όλες τις ευκαιρίες που μου έδωσε δουλεύοντας στο εργαστήριο της. Φεύγοντας από το εργαστήριο απέκτησα γνώσεις και εργαστηριακή εμπειρία που θα χρησιμοποιήσω ως εφόδια στο μέλλον και είμαι ευγνώμων για αυτό.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη μεταδιδάκτορα Ευανθία Μουρμούρα για την αμέτρητη βοήθεια που μου προσέφερε και το χρόνο που αφιέρωσε λύνοντας όλες τις απορίες μου σε κάθε επιστημονικό ή τεχνικό πρόβλημα που προέκυπτε, αλλά και παρέχοντας μου τις απαραίτητες πληροφορίες για να καταφέρω να βγάλω εις πέρας τα εργαστηριακά μου καθήκοντα.

Ευχαριστώ πολύ τον κ Δήμα Κωνσταντίνο, Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας και την κα Τραχανά Βαρβάρα, Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την υποστήριξή τους και την συμβολή τους στην δημιουργία ενός ευχάριστου και ζεστού κλίματος.

Τέλος, θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη φίλη μου Στέφη, στην οικογένεια μου και κυρίως τους γονείς μου, τον αδελφό μου Χριστόφορο και την ξαδέλφη μου Σπυριδούλα για τον θαυμασμό που μου δείχνουν όλα αυτά τα χρόνια και τη στήριξη που μου παρέχουν, καθώς βρίσκονται πάντα δίπλα μου επαινώντας κάθε επιλογή και κάθε βήμα μου, δίνοντας μου κουράγιο να προχωρήσω στο επόμενο.

Λάρισα, 2018  
Δραγώνα Ελένη

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την πιο κοινή μορφή καρκίνου μεταξύ των γυναικών αλλά και τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο. Παρά τις προόδους που έχουν σημειωθεί τα τελευταία χρόνια στις τεχνικές ανίχνευσης, αλλά και στη κατανόηση της βιολογία του καρκίνου του μαστού, το 10% των γυναικών του δυτικού κόσμου θα εμφανίσουν επιθετικό καρκίνο του μαστού κατά τη διάρκεια της ζωής τους και το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών τελικά θα οδηγηθεί στο θάνατο.

Οι καρκίνοι του μαστού μπορούν να ταξινομηθούν με βάση την έκφραση των υποδοχέων οιστογόνων (ERα), προγεστερόνης (PR) και του μεμβανικού υποδοχέα HER2. Στοχεύουσες τεχνικές είναι διαθέσιμες για ERα/PR-θετικούς και HER2-θετικούς όγκους. Όμως, οι τριπλά αρνητικοί καρκίνοι του μαστού (TNBC) εξ ορισμού δεν εκφράζουν αυτούς τους υποδοχείς και συνεπώς, δε διαθέτουν στοχεύουσες θεραπείες. Οι TNBC αποτελούν την πιο επιθετική μορφή καρκίνου της κατηγορίας αυτής. Αντιπροσωπεύουν το 10-20% του συνόλου των καρκίνων του μαστού και ο κίνδυνος μετάστασης εντός των 5 ετών από τη διάγνωση είναι αυξημένος, ενώ η επιβίωση μετά την υποτροπή είναι σημαντικά μικρότερη από ότι τις γυναίκες με άλλους τύπους καρκίνου του μαστού. Έτσι, είναι σημαντικό να κατανοήσουμε το μεταστατικό δυναμικό των TNBCs έτσι ώστε να μπορούμε να σχεδιάσουμε θεραπείες που στοχεύουν αυτούς τους μηχανισμούς.

Η απώλεια λειτουργίας διάφορων microRNAs σχετίζεται με αύξηση της μετάστασης του καρκίνου του μαστού, όμως ο μηχανισμός δράσης τους δεν είναι γνωστός. Τα microRNAs είναι μικρά, μη κωδικά μόρια RNA, μεγέθους ~ 25 νουκλεοτιδίων που ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, ελέγχοντας έτσι μια ποικιλία βιολογικών διεργασιών, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η διαφοροποίηση των κυττάρων. Η ανακάλυψη ρυθμιζόμενων από τα microRNAs μοριακών οδών για τον έλεγχο του καρκίνου του μαστού θα οδηγούσε σε καλύτερη κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου, καθώς και στη μελλοντική ανάπτυξη νέων στρατηγικών στόχευσης.

Δεδομένης της σημασίας των microRNAs στον καρκίνο, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση του ρόλου των ογκοκατασταλτικών microRNAs, miR-1 και miR-206 σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού (MCF-7, MB-231) και η πιθανή σύνδεσή τους με μονοπάτια που σχετίζονται με την απόπτωση.

Για την επίτευξη του σκοπού αυτού, η έκφραση των miR-1 και miR-206 μελετήθηκε με την μέθοδο της ποσοτικής PCR. Τα αποτελέσματα της real time PCR έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση των δύο microRNAs στις υπό μελέτη καρκινικές κυτταρικές σειρές σε σύγκριση με τις φυσιολογικές κυτταρικές σειρές του μαστού. Τα βιολογικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται τα microRNAs αυτά μελετήθηκαν με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής. Αρχικά, έγινε χαρακτηρισμός των γονιδίων-στόχων των miR-1 και miR-206 με τη χρήση της βάσης δεδομένων miWalk. Ακολούθως, με τη χρήση των προγραμμάτων PANTHER και DAVID, μελετήθηκαν οι βιολογικές διεργασίες και τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία ενέχονται τα γονίδια αυτά.

Η ανάλυση του προγράμματος DAVID έδειξε συμμετοχή των miR-1 και miR-206 σε πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών. Από αυτά, το μονοπάτι της απόπτωσης, μέσω της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών και της Notch σηματοδότησης, ελέγχθηκε περαιτέρω. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων-στόχων, c-Met, Notch3 και Bcl-2 και η επίδραση του miR-206 σε αυτά. Η έκφραση και των τριών γονιδίων παρουσίασε διαφορές μεταξύ των δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών, με τα ογκογονίδια c-Met και Bcl-2 να αυξάνονται στατιστικώς σημαντικά στα κύτταρα τριπλά αρνητικού καρκίνου μαστού (TNBC), τονίζοντας την επιθετική φύση αυτού του υποτύπου καρκίνου του μαστού. Αντιθέτως, τα επίπεδα έκφρασης του Notch3 βρέθηκαν μειωμένα στα MB-231 κύτταρα. Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής συμφωνούν με πρόσφατες μελέτες που υποστηρίζουν ένα ογκοκατασταλτικό ρόλο του Notch3, ο οποίος απουσιάζει από τα κύτταρα των TNBC όγκων, αυξάνοντας περαιτέρω την επιθετικότητα των κυττάρων αυτών.

Συμπερασματικά, τα microRNAs, miR-1 και miR-206 θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες διάγνωσης, πρόγνωσης αλλά και θεραπείας των καρκίνων του μαστού, καθώς τα επίπεδα έκφρασης τους μειώνονται δραματικά σε καταστάσεις κακοήθειας. Επιπλέον, αποτελούν ελπιδοφόρα θεραπευτικά μόρια για την αντιμετώπιση αυτών των μορφών καρκίνου, καθώς ενέχονται στη ρύθμιση πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με την καρκινογένεση. Αποκατάσταση της έκφρασης τους θα μπορούσε να οδηγήσει σε βελτίωση της κλινικής εικόνας του όγκου. Η μελέτη της ογκοκατασταλτικής δράσης του miR-206 μέσω των μονοπατιών c-Met και Notch3 χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

## ABSTRACT

Breast cancer is the most common form of cancer among women and the second leading cause of death globally. To date, there has been great progress in breast cancer diagnosis, as well as understanding breast cancer's biology. However, despite the progress in cancer research, epidemiological studies indicate that 10% of women in the Western countries will develop aggressive breast cancer during their lifetime and most of them eventually will die.

Breast cancer is classified according to the expression of estrogen receptors (ER), progesterone receptors (PR) and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). Even though there are targeted therapeutic approaches for ER/PR and HER2 positive tumors, there is no effective therapeutic treatment for Triple Negative Breast Cancer (TNBC), given that TNBC is characterized by loss of ER, PR and HER2 receptors' expression. TNBC is the most aggressive form of cancer in this category and represents 10-20% of all breast cancers. It has been reported that the risk of metastasis in TNBC patients is increased within 5 years of diagnosis, while survival rates after relapse are dramatically lower compared to other types of breast cancer. Thus, it is important to expand our knowledge concerning the molecular mechanisms involved in TNBCs in order to develop targeted treatments.

A significant number of studies has demonstrated that several microRNAs are associated with breast cancer however the molecular mechanism involved is unclear. MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNAs of approximately 25 nucleotides. They regulate the expression of target genes at a post-transcriptional level and thus, they are involved in a variety of biological processes such as cell proliferation, apoptosis and cell differentiation. Taking into consideration that a lot of studies have revealed a great proportion of miRNAs which exhibit differential expression in breast cancer, unraveling the molecular pathways regulated by the microRNAs could provide a more in depth picture of their role in cancer's pathophysiology allowing the development of new therapeutic strategies.

Taking into account the importance of microRNAs in cancer, the aim of the present Masters' thesis was to investigate the role of two tumor suppressor microRNAs, namely miR-1 and miR-206 in breast cancer cell lines (MCF-7, MB-231), as well as their possible association with apoptotic signaling pathways.

The expression levels of miR-1 and miR-206 were evaluated in the breast cancer cell lines MCF-7 (ER $\alpha$ ) and MB-231 (TNBC), as well as in the MCF-12F normal cell line by quantitative PCR. miR-1 and miR-206 exhibited significantly decreased expression levels in the MCF-7 and MB-231 cell lines compared to normal MCF-12F cells. Bioinformatics analysis was also performed to investigate the role of miR-1 and miR-206 in breast cancer. More specifically, target genes of miR-1 and miR-206 were identified using the miRWalk database, while using the PANTHER and DAVID bioinformatics tools the biological processes signaling pathways, as well as miR-1 and miR-206 target genes were identified.

DAVID analysis revealed that miR-1 and miR-206 participate in a variety of biological processes, as well as they were involved in the regulation of several signaling pathways. Among the identified pathways, was the pathway of apoptosis via c-Met and Notch signaling, which was further studied. In particular, the expression levels of the target genes c-Met, Notch3 and Bcl-2 of the above miRNAs were evaluated as well as and the effect of miR-206 on them.

c-Met, Notch3 and Bcl-2 mRNA levels exhibited significantly differential expression pattern between the 3 cell lines. Specifically, the expression levels of c-Met and Bcl-2 oncogenes were significantly increased in the TNBC MB-231 cells, highlighting the aggressive nature of this subtype of breast cancer. In contrast, Notch3 mRNA expression level was found to be dramatically reduced and almost diminished in the MB-231 cells. The above finding was in accordance with previous studies supporting a tumor-suppressive role of Notch3 and further increasing the aggression of these cells.

In conclusion, the present thesis provides evidence for the involvement of miR-1 and miR-206 in breast cancer pathology. The findings suggest that miR-1 and miR-206 could be considered as potential biomarkers for prognosis and/or treatment of breast cancers as their levels of expression are dramatically reduced in malignancies. In addition, they could be considered as promising therapeutic molecules for the treatment of these cancers, as they are involved in the regulation of many carcinogenic signaling pathways. It could be speculated that restoring their expression could lead to an improvement regarding the clinical picture of the tumor. The study of the tumor-suppressive effect of miR-206 via the c-Met and Notch3 pathways requires further investigation.

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>Σελίδα</b>
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	6
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
1. Ο Μαστικός Αδένας	15
1.1. Ανατομία Μαστού	15
2. Καρκίνος του Μαστού	17
2.1. Εισαγωγικά – Επιδημιολογικά Στοιχεία	17
3. Τριπλά Αρνητικός Καρκίνος του Μαστού (Triple Negative Breast Cancer, TNBC)	20
3.1. Μοριακή Ταξινόμηση του TNBC	21
3.2. Τρέχουσες Θεραπευτικές Στρατηγικές Αντιμετώπισης των TNBCs	24
3.2.1. Χημειοθεραπεία	24
3.2.2. Τοπική Θεραπεία: Χειρουργική Αφαίρεση & Ακτινοβολία	24
3.2.3. Στοχεύουσες Θεραπείες	25
4. MicroRNAs	26
4.1. Ανακάλυψη των microRNAs	27
4.2. Βιογένεση των microRNAs	29
4.3. Μηχανισμός δράσης των microRNAs	31
4.4. Ονοματολογία των microRNAs	33
5. microRNAs & Καρκίνος	34
6. Ο ρόλος των microRNAs στον Καρκίνο του Μαστού	35
6.1. Ογκοκατασταλτικά microRNAs	35
6.2. Ογκογόνα microRNAs	37
6.3. microRNAs στον TNBC	39
6.3.1. miR-1 & miR-206	40
6.3.2. miR-1 & miR-206 στον TNBC	42
7. c-Met Σηματοδότηση	45
7.1. Το μόριο c-Met	45
7.2. Δομή και λειτουργία του c-Met	46
7.3. Το Σηματοδοτικό Μονοπάτι PI3K/Akt	49
7.4. Η Notch Σηματοδότηση	52



ΣΚΟΠΟΣ	55
ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ	57
1. Κυτταρικές Σειρές	57
2. Κυτταροκαλλιέργειες	57
3. Χειρισμοί Κυττάρων	59
3.1. Πάγωμα Κυττάρων	59
3.2. Ξεπάγωμα Κυττάρων	59
4. Απομόνωση Ολικού κυτταρικού RNA από Κυτταροκαλλιέργειες	60
5. Σύνθεση Συμπληρωματικού DNA (cDNA Synthesis)	61
6. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	63
7. Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα Αγαρόζης 3%	65
8. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real time PCR)	65
8.1. Αρχή της Μεθόδου	65
8.2. Ποσοτικός Προσδιορισμός	67
8.3. Περιγραφή Μεθοδολογίας	68
9. Βιοπληροφορική Ανάλυση	69
10. Επιμόλυνση των καρκινικών κυτταρικών σειρών MB-231 και MCF7 με το miR-206 (mimic miR-206)	71
10.1. Αρχή της Μεθόδου	71
10.2. Περιγραφή Μεθοδολογίας	71
11. Στατιστική Ανάλυση	72
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	73
1. Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των microRNAs miR-1 και miR-206 σε καλλιέργειες των καρκινικών σειρών MB-231 και MCF7 και της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς MCF-12F	73
2. Βιοπληροφορική ανάλυση των μοριακών, κυτταρικών και βιολογικών λειτουργιών των υπό μελέτη microRNAs, καθώς και των σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία εμπλέκονται	74
2.1. miR-1	75
2.2. miR-206	78
3. Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων c-Met, Notch3 και Bcl-2	82

σε καλλιέργειες των καρκινικών σειρών MB-231 και MCF7 και της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς MCF-12F	
4. Ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων c-Met, Bcl-2 και Notch3 από το miR-206 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές MCF-7	84
5. Ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων c-Met, Bcl-2 και Notch3 από το miR-206 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές MB-231	85
ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	87
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	98

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

AGO	Argonaute protein
Akt	Protein kinase B (PKB)
AR	Androgen Receptor
ATP	Adenosine Triphosphate
BAD	Bcl-2-Associated Death promoter
Bcl-2	B-Cell Lymphoma 2
BCLs	Breast cancer Cells Lines
BL1	Basal-like 1
BL2	Basal-like 2
BRCA1	Breast Cancer gene 1
BRCA2	Breast Cancer gene 2
BT-ICs	Breast Tumour Initiating Cells
C20orf166	Chromosome 20 Open Reading Frame 166
CCND1	Κυκλίνη 1
CCND2	Κυκλίνη 2
Cdc42	Cell Division Control protein 42 homolog
CORO1C	Coronin-1C
CREB	cAMP response element-binding protein
CSCs	Cancer Stem Cells
CT	Cthreshold cycle
DGCR8	DiGeorge syndrome chromosomal [or critical] region 8
DI1,2,3,4	Delta- like 1,2,3,4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial–Mesenchymal Transition
ER	Estrogen Receptors
Erk1 (MAPK3)	Mitogen-Activated Protein Kinase 3
Erk2 (MAPK1)	Mitogen-Activated Protein Kinase 1

ESR1	EStrogen Receptor 1
FBS	Fetal Bovine Serum
FoxO	Forkhead Box O
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
Hes	Transcription factor HES1 (hairy and enhancer of split-1)
Hey	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HOXD10	Homeobox D10
IAP	Inhibitors of Apoptosis Proteins
IGFBP5	Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5
IHC	Ανοσοϊστοχημική Ανίχνευση
IM	IMmunomodulatory
kDa	Kilodalton
L1	Πρώτο στάδιο προνυμφών C.elegans
L2	Δεύτερο στάδιο προνυμφών C. elegans
LAR	Luminal Androgen Receptor
M	Mesenchymal
MET	Mesenchymal–Epithelial Transition
MIB1	Mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase
MRTFA	Myocardin-Related Transcription Factor A
MSL	Mesenchymal Stem Like
mTOR (1,2)	Mammalian Target of Rapamycin (1,2)
NGF	Nerve Growth Factor
NICD	Intracellular Domain of the Notch Protein
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PAX3	Paired Box 3
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDK1	3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase

PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PR	Progesterone Receptor
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
Ran	RAs-related Nuclear protein
RBP-Jκ	Recombining Binding Protein suppressor of hairless kappa
RHOC	Ras Homolog Family Member C
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNApol II	RNA Polymerase II
RNApol III	RNA Polymerase III
RNU6B	U6 small nuclear RNA
RT	Θερμοκρασία Δωματίου (25 °C)
RTKs	Receptor tyrosine kinases
Src	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
Tbx3	T-box transcription factor 3
TCGA	«The Cncer Genome Atlas»
T-ICs	Tumour Initiating Cells
TNBC	Triple Negative Breast Cancer
TSKN2	Tankyrase-2
TWF1	Twinfilin Actin Binding Protein 1
UV	Υπεριώδης Ακτινοβολία
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A
WDR1	WD Repeat Domain 1
WHO	World Health Organization

## ***A. Γενικό Μέρος***

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1. Ο Μαστικός Αδένας**

Ο μαστός είναι ένα όργανο που βρίσκεται στην πρόσθια επιφάνεια του θώρακα και αποτελεί, μαζί με τα γεννητικά όργανα, το βασικό χαρακτηριστικό διαχωρισμού των δύο φύλων. Πρόκειται για μία ημισφαιρική, λιπώδη πτυχή του δέρματος η οποία περιέχει τον μαστικό αδένα (Χατζημούγιας, 2007).

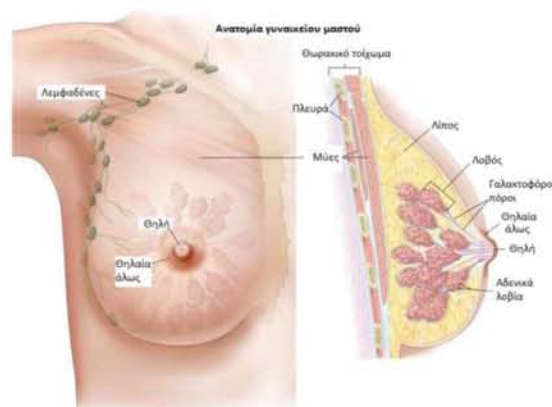
#### **1.1 Ανατομία Μαστού**

Η ανατομία του ενήλικου θηλυκού μαστού περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Cooper το 1840 (Cooper AP. 1840). Ο ενήλικος μαστός βρίσκεται στο πρόσθιο θωρακικό τοίχωμα με τη βάση του στο ύψος της έκτης ή έβδομης πλευράς. Χαρακτηριστική προεκβολή του μαστού είναι η ουρά του Spence, η οποία συχνά εκλαμβάνεται σαν όγκος καθώς εισέρχεται μέσα στη μασχαλιαία κοιλότητα.

Ο μαστός αποτελείται από δέμα, υποδόριο ιστό και τον ιστό του μαστού όπου εκεί βρίσκονται και δύο στρώματα περιτόναιου, το επιφανειακό ή επενδυτικό στρώμα και ένα βαθύτερο στρώμα. Αναλυτικά, το δέρμα αποτελεί το εξωτερικό, λεπτό στρώμα του μαστού. Συγχωνεύεται με το επενδυτικό στρώμα του περιτόναιου το οποίο βρίσκεται ακριβώς κάτω από αυτό. Το επενδυτικό στρώμα είναι η συνέχεια του περιτόναιου που καλύπτει την κοιλιακή χώρα και τον τράχηλο της μήτρας. Το επενδυτικό στρώμα, μαζί με το βαθύτερο στρώμα περιτόναιου, περιλαμβάνουν το παρέγχυμα του μαστού.

Το παρέγχυμα του μαστού αποτελείται από τρεις κύριους τύπους ιστού: το αδενικό επιθήλιο, το ινώδες στρώμα, καθώς και στηρικτικές δομές και λίπος. Το αδενικό επιθήλιο αποτελεί το 10-15% του συνολικού όγκου του μαστού στα ενήλικα θηλυκά άτομα. Αποτελείται από 15 με 20 λοβούς, που ο κάθε ένας διακλαδίζεται σε 20-40 λόβια (**Εικόνα 1**) (Aydiner Ad. et al. 2016). Με τη σειρά τους τα λόβια αποτελούνται από αρκετές (10-100) ομαδοποιημένες κυψελίδες. Οι κυψελίδες αναφέρονται αλλιώς και ως τερματικοί πόροι και είναι οι αδένες που παράγουν το γάλα. Κάθε κυψελίδα εκβάλλει στο μικρό εκφορητικό γαλακτοφόρο πόρου του λοβίου ενώ όλοι οι μικροί γαλακτοφόροι αδένες εκβάλλουν στο μεγάλο γαλακτοφόρο αδένα του λοβού. Κάθε λοβός απελευθερώνει το περιεχόμενο του σε έναν κύριο

γαλακτοφόρο αδένα (Pandya et al. 2011). Το αδενικό επιθήλιο περιλαμβάνεται εξολοκλήρου από λεία μυϊκά κύτταρα που εξυπηρετούν στην προώθηση του γάλακτος προς τα εμπρός, μέσω των αγωγών. Η δομή αυτή, λεία μυϊκά κύτταρα και αδενικό επιθήλιο, περιβάλλεται από μία συνεχόμενη βασική μεμβράνη (Cooper AP. 1840; Aydiner Ad. et al. 2016). Διήθηση αυτής της μεμβράνης διακρίνει το επιθητικό από το in situ καρκίνωμα (Aydiner Ad. et al. 2016). Τα λόβια, αντίθετα, δε φέρουν λεία μυϊκά κύτταρα και συνεπώς, τα επιθηλιακά κύτταρα βρίσκονται σε άμεση επαφή με τη βασική μεμβράνη (Pandya et al. 2011). Οι κύριοι γαλακτοφόροι αδένες του κάθε λοβού διευρύνονται στο τέλος της διαδρομής τους σχηματίζοντας τη γαλακτοφόρο λήκυθο, κάτω ακριβώς από τη θήλεα άλω. Η γαλακτοφόρος λήκυθος στενεύει εκ νέου σχηματίζοντας τον εκφορητικό πόρο ο οποίος και εν τέλει εκβάλλει σε οπή της θηλής.



**Εικόνα 1.** Ανατομία γυναικείου μαστού

<http://www.smyrlis-laparoscopic.gr/com/32-Xeiryrgikh-mastoy>

Η θηλή αποτελεί το σημείο από το οποίο θα γίνει η λήψη του γάλακτος κατά το θηλασμό. Έχει κυλινδροειδές σχήμα και φέρει στην κορυφή της ρωγμές με στόμια στα οποία γίνεται η εκβολή των γαλακτοφόρων πόρων. Η θηλή περιβάλλεται από τη θήλεα άλω (**Εικόνα 1**). Η θηλή και η θήλεα άλως φέρουν μεγάλη ποσότητα μελανίνης που δίνει στις περιοχές αυτές ένα καστανέρυθρο χρώμα. Η θήλεα άλως φέρει ένα συνδυασμό σμηγματογόνων και ιδρωτοποιών αδένων καθώς και τους αδένες Montgomery. Επίσης, λείες μυϊκές ίνες διασχίζουν την περιοχή και καταλήγουν στη θηλή όπου και είναι υπεύθυνοι για την ανέγερση της θηλής έπειτα από κάποιον ερεθισμό. Κατάσταση, επίσης, απαραίτητη για τον θηλασμό.



Το παρέγχυμα του μαστού περιβάλλεται από το στρώμα. Το στρώμα αποτελείται από συνδετικό ιστό, ο οποίος προσφέρει στήριξη στη δομή του μαστού. Η κύρια δομή στήριξης είναι οι ανελκτήρες σύνδεσμοι του Cooper, οι οποίες είναι συνδετικές ίνες που εκφύονται από το θώρακα, διασχίζουν το μαστικό αδένια και καταλήγουν λίγο πιο κάτω από το δέρμα του μαστού. Σύμπτυξη των ανελκτήρων συνδέσμων μπορεί να οδηγήσει σε βαθύλωμα του δέρματος που συνδέεται κλινικά με όγκους του μαστού. Το υπόλοιπο του στήθους αποτελείται από λιπώδη ιστό. Η αναλογία λιπώδους προς αδενικού ιστού αυξάνεται με την ηλικία και είναι μέγιστη στο μετεμμηνοπαυσιακό μαστό (Cooper AP. 1840; Aydiner Ad. et al. 2016).

## **2. Καρκίνος του Μαστού**

Στις μέρες μας, το φορτίο των μη μεταδοτικών ασθενειών όλο και αυξάνεται παγκοσμίως και οι κύριοι λόγοι για αυτό είναι: το αυξανόμενο προσδόκιμο επιβίωσης, η παρατεταμένη έκθεση σε παράγοντες κινδύνου, καθώς, και οι αλλαγές στον τρόπο ζωής. Μελέτες δείχνουν ότι ο καρκίνος αποτελεί μία από τις σημαντικότερες ασθένειες στον κόσμο και την πιο πολύπλοκη, λόγω της πολυπαραγοντικής του φύσης. Το 2012 ανιχνεύτηκαν 14,9 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου σε όλον τον κόσμο ενώ προβλέπεται ότι θα φτάσουν τα 22 εκατομμύρια μέσα στις επόμενες δύο δεκαετίες (Ghoncheh et al. 2016). Ένας από τους συνηθέστερους καρκίνους, κυρίως στις γυναίκες, με υψηλό ποσοστό επίπτωσης σε όλες τις χώρες, είναι ο καρκίνος του μαστού.

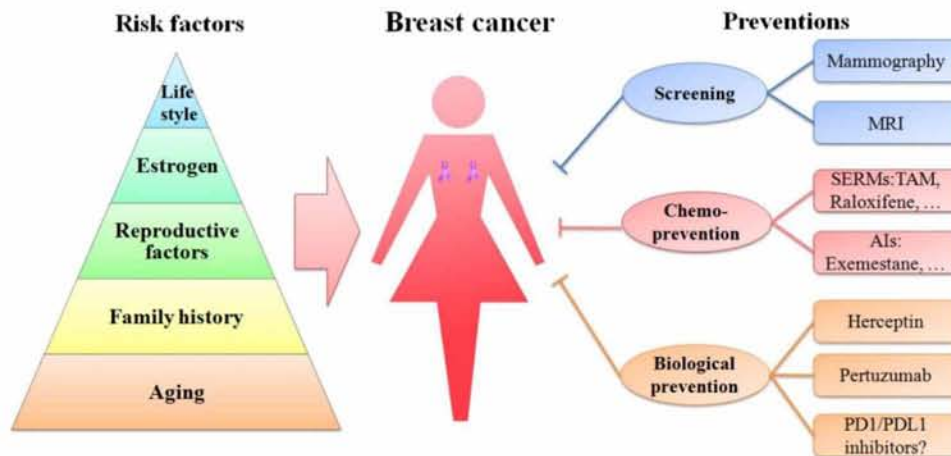
### **2.1. Εισαγωγικά – Επιδημιολογικά στοιχεία**

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί μία από τις συνηθέστερες μορφές καρκίνου στο γυναικείο πληθυσμό παγκοσμίως. Αποτελεί το 25% όλων των μορφών καρκίνου, αλλά και τη δεύτερη πιο κοινή μορφή. Η συχνότητα εμφάνισης του κυμαίνεται από 19,4 ανά 100.000 άτομα στην Ανατολική Αφρική σε 89,7 ανά 100.000 άτομα στη Δυτική Ευρώπη (WHO 2015). Κάθε χρόνο, ανά τον κόσμο εμφανίζονται 1,7 εκατομμύρια νέα περιστατικά όμως, η συχνότητα εμφάνισης και τα ποσοστά θνησιμότητας είναι πραγματικά έντονα στις αναπτυγμένες χώρες. Στις περισσότερες χώρες, ο καρκίνος του μαστού είναι μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου στις γυναίκες, με 570.000 θανάτους καταγεγραμμένους το 2015 (Ghoncheh et al.

2016)(Hon et al. 2016)(Sun et al. 2017). Συγκεκριμένα, αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο, μετά το καρκίνο του πνεύμονα, τόσο μεταξύ γυναικών όσο και παγκοσμίως.

Ο καρκίνος του μαστού είναι μία ετερογενής νόσος (Hon et al. 2016). Συνήθως ξεκινά από μία υπερπλασία του γαλακτοφόρου πόρου η οποία εξελίσσεται είτε σε καλοήγη όγκο είτε σε μεταστατικό καρκίνωμα, ύστερα από συνεχή διέγερση με καρκινογόνους παράγοντες. Στις περισσότερες περιπτώσεις πρόκειται για ένα μεταστατικό καρκίνο, με κύρια μεταστατικά όργανα να αποτελούν τα οστά, το ήπαρ, οι πνεύμονες και ο εγκέφαλος (Sun et al. 2017).

Πολλοί παράγοντες έχουν διερευνηθεί και έχουν συσχετισθεί με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού, με κάποιους να συμμετέχουν σε μεγαλύτερο και άλλους σε μικρότερο βαθμό (**Εικόνα 2**). Το φύλο αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα, μίας και οι γυναίκες έχουν 100 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με τους άντρες. Εξίσου σημαντική φαίνεται να είναι και η ηλικία. Η επίπτωση του καρκίνου του μαστού συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με την αυξανόμενη ηλικία (Siegel et al. 2017) καθώς, το 2016, το μεγαλύτερο ποσοστό θανάτων από καρκίνο του μαστού αναφερόταν σε γυναίκες άνω των 40 ετών. Σχεδόν το ένα τέταρτο όλων των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού σχετίζονται με το οικογενειακό ιστορικό. Η κληρονομική ευαισθησία στον καρκίνο του μαστού αποδίδεται εν μέρει σε μεταλλάξεις γονιδίων, όπως το BRCA1 και BRCA2. Οι αναπαραγωγικοί παράγοντες όπως η πρόωρη εμμηνόρροια, η καθυστερημένη εμμηνόπαυση, η προχωρημένη ηλικία πρώτης εγκυμοσύνης καθώς και ο μικρός αριθμός γεννήσεων μπορούν να αυξήσουν το κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Αντιθέτως, η καθυστέρηση της εμμηνόρροιας αλλά και η αύξηση του αριθμού τεκνοποίησης μειώνει σε μεγάλο ποσοστό τον κίνδυνο αυτό. Σημαντική, επίσης, επίδραση στην εμφάνιση καρκίνου του μαστού φαίνεται να έχουν τα ενδογενή και εξωγενή οιστρογόνα, αλλά και ο σύγχρονος τρόπος ζωής, που ισοδυναμεί με την αυξημένη πρόσληψη αλκοόλ αλλά και λιπαρών από τη διατροφή.



**Εικόνα 2.** Σχηματικό διάγραμμα των σημαντικότερων παραγόντων κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου του μαστού, καθώς και διάφοροι τρόποι πρόληψης (Sun et al. 2017)

Η βιολογική βάση της πρόγνωσης και της θεραπείας του καρκίνου του μαστού έχει ένα ισχυρό ιστορικό υπόβαθρο. Από το 1896 είχε παρατηρηθεί ότι η αμφοτερόπλευρη ωθηκεκτομή οδηγεί σε συρρίκνωση των όγκων του μαστού και βελτιωμένη πρόγνωση. Η επόμενη ανακάλυψη ήταν ο χαρακτηρισμός των υποδοχέων των οιστρογόνων (ER), η παρουσία των οποίων χρησιμοποιείται ως προγνωστικός παράγοντας. Η ανακάλυψη των υποδοχέων αυτών, σε συνδυασμό με την ανακάλυψη άλλων δύο τύπων υποδοχέων, της προγεστερόνης (PR) και του αυξητικού παράγοντα HER2, οδήγησε στην ταξινόμηση των διάφορων κακοηθειών του μαστού, από τους Perou et al. σε πέντε διακριτούς μοριακούς υπότυπους, τον luminal A, luminal B, HER2-enriched, claudin-low και basal-like (Horton et al. 2018). Ο luminal A προσεγγίζει τις θετικές για τους υποδοχείς ER και/ή PR αλλά αρνητικές για τον υποδοχέα του HER2 κακοήθειες, ο luminal B προσεγγίζει τις θετικές για τους υποδοχείς ER και/ή PR, καθώς και θετικές για τον υποδοχέα του HER2 κακοήθειες, ο HER2-enriched υπότυπος περιλαμβάνει τις κακοήθειες που παρουσιάζουν αύξηση των υποδοχέων HER2 αλλά είναι αρνητικοί για τους άλλους δύο υποδοχείς.

Ο basal-like υπότυπος προσεγγίζει τον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, δηλαδή παρουσιάζει παντελή έλλειψη και των τριών τύπων υποδοχέων (Hon et al. 2016). Αν και οι basal-like όγκοι τείνουν να είναι TNBC το αντίστροφο δεν φαίνεται να ισχύει, καθώς οι TNBC παρουσιάζουν σημαντική ετερογένεια στο προφίλ της γονιδιακής τους έκφρασης. Τέλος, ο claudin-low υπότυπος χαρακτηρίζεται από χαμηλή έκφραση πρωτεϊνών σύνδεσης όπως claudin 3, 4, και 7 καθώς και την E-καντερίνη. Όπως και οι basal – like όγκοι, έτσι και αυτός ο υπότυπος προσομοιάζει

τον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού καθώς το 61% - 71% των claudin-low όγκων είναι τριπλά αρνητικοί (Yam et al. 2017). Η κατάταξη των κακοηθειών στους παραπάνω υποτύπους, γεγονός που κλινικά εμφανίζει και προγνωστική αξία, γίνεται με βάση τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης και την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση (IHC) των υποδοχέων τους (ER,PR, HER2).

### **3. Τριπλά Αρνητικός Καρκίνος του Μαστού (*Triple Negative Breast Cancer, TNBC*)**

Ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (TNBC) αποτελεί μία κατηγορία καρκίνου του μαστού που χαρακτηρίζεται, ανοσοϊστοχημικώς, από παντελή έλλειψη έκφρασης του υποδοχέα των οιστρογόνων (ER), της προγεστερόνης (PR) καθώς και από την απουσία του υποδοχέα του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (HER2) (Anders et al. 2016). Αυτοί οι βιολογικοί δείκτες σε συνδυασμό με τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του όγκου, δηλαδή το μέγεθος του, την προσβολή ή όχι λεμφαδένων καθώς και την παρουσία ή απουσία μεταστάσεων, έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτες πρόγνωσης και θεραπευτικής αντιμετώπισης. Η μοριακή προσέγγιση, αυτή, βοηθάει στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων αλλά και στη λήψη σωστών θεραπευτικών προσεγγίσεων, καθώς η βιολογία των καρκίνων του μαστού που εκφράζουν υποδοχείς ορμονών (σε ποσοστό 1-10%) είναι διαφορετική από αυτή ατόμων με TNBC (Anders et al. 2016). Σε σύγκριση με τους θετικούς σε ER και PR, οι TNBC αν και είναι πιο πιθανόν να ανταποκριθούν στη χημειοθεραπεία, χωρίς αυτήν παρουσιάζουν φτωχότερη πρόγνωση και επιβίωση (Yam et al. 2017).

Ο TNBC αντιπροσωπεύει το 10-20% των συνολικών περιπτώσεων καρκίνου του μαστού. Πρόκειται για ένα επιθετικό καρκίνωμα, με υψηλό ποσοστό απομακρυσμένων σπλαχνικών (πνεύμονες) μεταστάσεων και μεταστάσεων του κεντρικού νευρικού συστήματος (Geyer et al. 2017)(Sharma 2016)(Bianchini et al. 2016). Αν και είναι ευαίσθητος στην χημειοθεραπεία χαρακτηρίζεται από πρόωμο χρόνο επανεμφάνισης και χειρότερη πρόγνωση μετά την υποτροπή (Liedtke et al. 2008)(Dent et al. 2007). Ο υψηλός βαθμός μεταστάσεων παρατηρείται, κυρίως, τα πρώτα 2-3 χρόνια από τη διάγνωση και μετά τη θεραπεία (Ahn et al. 2016). Σε αντίθεση, όμως, με τους υπόλοιπους υποτύπους καρκίνου του μαστού, άτομα με TNBC άμα ξεπεράσουν την πρώτη πενταετία μετά τη θεραπεία χωρίς καμία επιπλοκή παρουσιάζουν μικρότερη πιθανότητα υποτροπής της νόσου στα επόμενα χρόνια της

ζωής τους αλλά και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής. Ο TNBC εμφανίζεται πιο συχνά σε νεότερες ηλικίες και συνήθως προσβάλλει γυναίκες της μαύρης φυλής και Ισπανικής καταγωγής (Perou et al. 2000).

Μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 και BRCA2 σχετίζονται σημαντικά με καρκίνους του μαστού και των ωοθηκών. Ασθενείς με καρκίνο του μαστού που έχουν μετάλλαξη στο BRCA1 έχουν περισσότερες πιθανότητες να εμφανίζουν οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού και να διαγνωσθούν σε νεαρότερη ηλικία με καρκίνο από άτομα που δεν φέρουν μεταλλάξεις στο BRCA1. Περισσότερο από το 75% των όγκων που εμφανίζονται σε φορείς μετάλλαξης BRCA1 είναι πιο πιθανό να είναι τριπλά αρνητικοί (Sharma 2016)(Guney Eskiler et al. 2018). Οι TNBC εμφανίζουν, επίσης, μεγάλο επιπολασμό σε άτομα μεταλλαγμένα για το γονίδιο P53 (Geyer et al. 2017).

### ***3.1. Μοριακή Ταξινόμηση του TNBC***

Εκτός από την ανάγκη για ακριβή διάγνωση του TNBC, αυτός ο τύπος καρκίνου παρουσιάζει μια ετερογενή κλινική εικόνα και οι ασθενείς με αυτή τη νόσο έχουν συχνά κακή πρόγνωση. Έτσι, έχει γίνει μια συντονισμένη προσπάθεια να κατανοηθεί η μοριακή βάση αυτής της ανομοιογενούς νόσου και να ανακαλυφθούν μοριακοί στόχοι για τη θεραπεία ασθενών με TNBC. Πολλές από αυτές τις προσπάθειες έχουν επικεντρωθεί στην ταξινόμηση των TNBC όγκων σε υποτύπους με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά και ομοιογενή πρότυπα ευαισθησίας στη χημειοθεραπεία ή σε νέες στοχεύουσες θεραπείες.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο TNBC προσομοιάζεται με τους basal-like και claudín-low όγκους, όμως δεν ανήκει αποκλειστικά σε κάποια κατηγορία. Για την καλύτερη κατανόηση της ετερογένειας των TNBCs, αλλά και την καλύτερη θεραπευτική αντιμετώπιση των διάφορων περιστατικών, οι Lehmann et al. (Lehmann et al. 2011) στηριζόμενοι στην ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης τριπλά αρνητικών καρκίνων, προσδιόρισαν έξι υποτύπους TNBC, συμπεριλαμβανόμενων δύο basal-like (BL1 και BL2), έναν ανοσορρυθμιστικό (IM), έναν μεσεγχυματικό (M), έναν τύπου βλαστικό μεσεγχυματικό (mesenchymal stem-like, MSL), έναν υπότυπο που σχετίζεται με τον υποδοχέα ανδρογόνων του αυλού (LAR) καθώς και έναν μη ταξινομημένο υπότυπο.

Οι BL1 όγκοι αποτελούν το 18% των TNBCs και χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο αλλά και στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών του DNA. Αντίθετα, οι BL2 όγκοι αντιπροσωπεύουν το 13% των TNBCs και παρουσιάζουν αυξημένη ρύθμιση της σηματοδότησης σε μονοπάτια που σχετίζονται με αυξητικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) και του παράγοντα αύξησης των νεύρων (NGF), αλλά και σε μονοπάτια που σχετίζονται με τη MET σηματοδότηση. Επίσης, αυξημένη έκφραση παρατηρείται στον υπότυπο αυτόν σε γονίδια που εμπλέκονται στη γλυκόλυση και γλυκονογένεση. Συνεπώς, προκύπτει ότι οι BL1 υπότυποι TNBCs πιθανόν επιδεικνύουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε θεραπείες που στοχεύουν μόρια των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA, ενώ οι BL2 υπότυποι TNBCs, πιθανόν θα ανταποκρίνονται καλύτερα σε μοριακούς αναστολείς που στοχεύουν σε μόρια των σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με τους αυξητικούς παράγοντες (Lehmann et al. 2011).

Οι M και MLS υπότυποι TNBCs, όπως ορίζονται από τους Lehmann et al., εμφανίζουν αυξημένη ρύθμιση των οδών που εμπλέκονται στην επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση (MET). Στον M υπότυπο παρατηρείται αύξηση των μονοπατιών που σχετίζονται με την κυτταρική κινητικότητα, την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα της εξωκυττάριας μήτρας αλλά και την κυτταρική διαφοροποίηση. Από την άλλη πλευρά, ο υπότυπος MLS αν και παρουσιάζει αύξηση της ρύθμισης στα ίδια σηματοδοτικά μονοπάτια όπως ο υπότυπος M, η αυξημένη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τα βλαστικά κύτταρα, καθώς και γονιδίων που εμπλέκονται σε συγκεκριμένες οδούς σηματοδότησης και μηχανισμούς αγγειογένεσης, συνδέονται αποκλειστικά με τον MLS υπότυπο. Επίσης, ο υπότυπος MSL παρουσίασε και περιορισμένη έκφραση των claudins 3,4 και 7 κάτι το οποίο είναι παρόμοιο με τον υπότυπο καρκίνου του μαστού claudin-low. Οι δύο αυτοί υπότυποι TNBC, M και MSL, παρουσιάζουν πολλές αλλαγές στην οδό PI3K/ AKT/ mTOR αυξάνοντας τη δυνατότητα στόχευσης αυτού του άξονα για μία αποτελεσματική θεραπεία.

Οι όγκοι οι οποίοι ανήκουν στον υπότυπο που σχετίζεται με τον υποδοχέα των ανδρογόνων (LAR) παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των ανδρογόνων και των οιστρογόνων. Ο υπότυπος LAR αντιπροσωπεύει περίπου το 11% των TNBCs (Ghoncheh et al. 2016) και συνδέεται με μηδενικά ποσοστά απόκρισης στη χημειοθεραπεία. Οι Lehmann et al. επίσης, έδειξαν ότι οι TNBCs όγκοι που ανήκουν στον υπότυπο LAR παρουσίαζαν και

σημαντικά υψηλά επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα των ανδρογόνων (AR) όταν αξιολογήθηκαν με ανοσοϊστοχημεία (IHC), οδηγώντας στην χρήση του υποδοχέα αυτού ως δείκτη ανίχνευσης του υποτύπου LAR σε κλινικές δοκιμές. Πέραν της χρήσης του υποδοχέα AR ως δείκτη για την ταξινόμηση των TNBCs όγκων, σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει και στη θεραπεία, καθώς ασθενείς των οποίων οι όγκοι έδειξαν ένα γονιδιακό προφίλ που σχετίζεται με τα ανδρογόνα φάνηκε να εμφανίζουν μεγαλύτερο κλινικό όφελος με θεραπείες που μπλοκάρουν τον υποδοχέα των ανδρογόνων (enzalutamide).

Ο ανοσορρυθμιστικός υπότυπος (IM) χαρακτηρίζεται από μία αύξηση της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται σε ανοσολογικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Όμως, δεν είναι γνωστό αν αυτή η αύξηση αντιπροσωπεύει τον πραγματικό γονιδιακό προφίλ του όγκου ή είναι αποτέλεσμα ενός όγκου που παρουσιάζει σημαντική ανοσολογική διήθηση. Ανεξαιρέτως, όμως της αιτίας που προκαλεί αυτήν την αύξηση, οι όγκοι που ανήκουν στον IM υπότυπο, λόγω αυτού του χαρακτηριστικού, υποθέτουμε ότι θα ανταποκρίνονται σε θεραπείες που βασίζονται σε ανοσολογικά φαινόμενα, όπως αναστολείς σημείων ελέγχου και εμβόλια όγκου (Sharma 2016).

Υπάρχει μία κατηγορία TNBCs η οποία όμως δεν έχει ακόμα ταξινομηθεί λόγω του διαφορετικού γονιδιακού προφίλ που παρουσιάζει. Οι όγκοι της κατηγορίας αυτής εκφράζουν σε ένα μικρό ποσοστό το HER2, παρόλο που οι TNBCs εξ ορισμού είναι αρνητικοί για τον υποδοχέα αυτόν. Η αύξηση του υποδοχέα HER2 είναι πιθανό να βοηθήσει στην ταυτοποίηση ασθενών που φέρουν όγκους της κατηγορίας αυτής και θα μπορούσαν να επωφεληθούν από θεραπείες που στοχεύουν στον HER2 υποδοχέα (Yam et al. 2017).

Θεωρείται ότι η ετερογένεια τόσο του όγκου όσο και του μικροπεριβάλλοντος συμβάλλει στην ποικιλομορφία του γονιδιακού προφίλ έκφρασης που παρατηρείται στο TNBC. Επιπλέον, η ποικιλομορφία αυτή θα μπορούσε, επίσης, να προκύψει από τα διαφορετικά πρότυπα γενικής μεθυλίωσης στο TNBC. Για παράδειγμα, η πρόσφατη ανάλυση της αλληλουχίας μεθυλίωσης δειγμάτων από το «The Cancer Genome Atlas (TCGA)» έχει εντοπίσει τρία διαφορετικά επίπεδα μεθυλίωσης στο TNBC. Αυτές οι υποκατηγορίες ανταποκρίνονται διαφορετικά στην χημειοθεραπεία και πιθανότατα θα εμφανίζουν και διαφορετικές αποκρίσεις σε νέες στοχευόμενες θεραπείες (Sharma 2016).

### **3.2. Τρέχουσες Θεραπευτικές Στρατηγικές Αντιμετώπισης των TNBCs**

#### **3.2.1. Χημειοθεραπεία**

Λόγω της έλλειψης μοριακών στόχων σε αυτήν την κατηγορία καρκίνου του μαστού η χημειοθεραπεία είναι η μόνη διαθέσιμη συστηματική θεραπεία για ασθενείς με TNBC (Nielsen et al. 2004)(Hugh et al. 2009). Επί του παρόντος η χημειοθεραπεία που εφαρμόζεται στους ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο δεν είναι συγκεκριμένη για αυτόν τον υπότυπο αλλά είναι ταυτόσημη με τη χημειοθεραπεία που εφαρμόζεται και στους υπόλοιπους υποτύπους καρκίνου του μαστού, και σε ένα μεγάλο ποσοστό βασίζεται στις ανθρακυκλίνες. Άλλοι παράγοντες οι οποίοι βρίσκονται σε φάσεις κλινικών δοκιμών είναι οι αντιβουτουλίνες, παράγοντες αλκυλίωσης, οι αντιμεταβολίτες και οι πλατίνες (Andreopoulou et al. 2015).

Παρά τη συνολική κακή πρόγνωση που παρουσιάζουν οι ασθενείς με TNBC, έχουν μεγαλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία από ότι οι ασθενείς με άλλους τύπους καρκίνου του μαστού. Γενικά, όμως ο TNBC συνδέεται με αυξημένα ποσοστά υποτροπής σε σύγκριση με ορμονοεξαρτώμενους ή HER2 θετικούς καρκίνους του μαστού, ένα φαινόμενο γνωστό ως τριπλό αρνητικό παράδοξο (Dent et al. 2007)(Twelves et al. 2010). Δηλαδή, οι τριπλά αρνητικοί όγκοι ναι μεν παρουσιάζουν υψηλό κίνδυνο υποτροπής αλλά και υψηλότερη πιθανότητα να ανταποκριθούν στη χημειοθεραπεία (Carey et al. 2007). Όμως, παρά τη λήψη κλασσικής χημειοθεραπείας λιγότερα από το 30% των γυναικών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού επιβιώνουν πάνω από 5 χρόνια μετά τη διάγνωση και ουσιαστικά όλες οι γυναίκες με μεταστατικό TNBC θα πεθάνουν τελικά από τη νόσο αυτή (Bonotto et al. 2014).

#### **3.2.2. Τοπική Θεραπεία: Χειρουργική Αφαίρεση & Ακτινοβολία**

Η τοπική θεραπεία (χειρουργική αφαίρεση και ακτινοβολία) που εφαρμόζεται στον TNBC είναι παρόμοια για όλους τους υποτύπους καρκίνου του μαστού. Δεν υπάρχουν ειδικές συστάσεις για την τοπική διαχείριση των TNBC. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι περισσότερο από το 50% των γυναικών με χειρουργήσιμο TNBC επιλέγουν να υποβληθούν σε μαστεκτομή (von Minckwitz et al. 2014). Ο υψηλός επιπολασμός των γενετικών μεταλλάξεων, το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού και η περιορισμένη διαθεσιμότητα εναλλακτικών θεραπειών



είναι όλοι οι παράγοντες που πιθανώς συμβάλλουν στην αύξηση των ποσοστών μαστεκτομής, ιδιαίτερα στις νεότερες γυναίκες με TNBC.

### 3.2.3. Στοχεύουσες Θεραπείες

Μια μεγάλη κατηγορία στοχευουσών θεραπειών που έχουν εφαρμοστεί, επί του παρόντος, σε άλλες κατηγορίες καρκίνου του μαστού αναπτύσσονται τώρα και για τον TNBC. Μερικές δοκιμές βρίσκονται ακόμη σε προκλινικές φάσεις ενώ ορισμένες άλλες έχουν περάσει σε κλινικές δοκιμές φάσεις II και III. Για την επιτυχή εφαρμογή μίας στοχεύουσας θεραπείας τις περισσότερες φορές απαιτείται τόσο η μελέτη του γονιδιακού προφίλ έκφρασης του όγκου, όσο και η εύρεση συγκεκριμένων μεταλλάξεων ή άλλων απαραίτητων ευρημάτων κρίσιμων για την αποτελεσματικότητα της θεραπείας (Andreopoulou et al. 2015).

Ένας μεγάλος αριθμός μορίων έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι στιγμής ως φάρμακα για στοχεύουσα θεραπεία στον TNBC. Τα πιο καλά μελετημένα από αυτά είναι φάρμακα που στοχεύουν σε βιολογικές ιδιότητες των κυττάρων οι οποίες έχει δείχθει ότι απορυθμίζονται σε μεγάλο βαθμό στους TNBC όγκους. Μία τέτοια κατηγορία μορίων είναι οι αναστολείς του EGFR, μιας και έρευνες έχουν δείξει ότι η πλειονότητα των TNBC όγκων εκφράζουν τον υποδοχέα αυτόν (Nielsen et al. 2004)(Livasy et al. 2006). Άλλη κατηγορία είναι οι καταστολείς της αγγειογένεσης. Διαδικασία απαραίτητη για την καρκινογένεση και την μετάσταση, συνεπώς απαραίτητη και για την ανάπτυξη των δυνητικά μεταστατικών TNBC όγκων.

Οι αναστολείς του PARP αποτελούν μία ελπιδοφόρα ομάδα θεραπευτικών μορίων. Το PARP είναι ένα επιδιορθωτικό ένζυμο (Amé et al. 2004). Λόγω του ότι η πλειοψηφία των TNBC όγκων φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 και BRCA2 είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στην αναστολή του PARP, διότι καταστέλλονται όλοι οι πιθανοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA (Farmer et al. 2005). Άλλη μία κατηγορία αναστολέων των οποίων η δράση τους μελετάται σε TNBC είναι οι αναστολείς του PI3K/Akt/mTOR μονοπατιού. Το μονοπάτι αυτό είναι γνωστό ότι υπερενεργοποιείται και συμμετέχει σε διάφορες ογκογόνες διεργασίες (Andreopoulou et al. 2015).

Αν και μία ποικιλία ακόμα αναστολέων, όπως αναστολείς υποδοχέων των ανδρογόνων, αναστολείς αποκετυλασών των ιστονών, αναστολείς MAPK κινασών, μελετώνται σε προκλινικό ή κλινικό επίπεδο για τη θεραπεία των TNBC καμία από

αυτές τις κατηγορίες δεν έχει οδηγήσει σε ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Καθώς, οι περισσότερες παρουσιάζουν είτε ένα περιορισμένο όφελος, είτε σχετίζονται με ένα πολύ στενό εύρος μορφών TNBC, είτε ακόμη μπορεί και μην μεταβάλουν καθόλου την επιθετικότητα του όγκου (Andreopoulou et al. 2015).

Όπως γίνεται αντιληπτό, επί του παρόντος, οι διαθέσιμες επιλογές θεραπείας για τον TNBC παραμένουν περιορισμένες. Χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για τον εντοπισμό και τον χαρακτηρισμό ιδανικών μορίων για στοχεύουσα θεραπεία, η οποία όμως θα είναι και αποτελεσματική στις διάφορες περιπτώσεις των TNBC όγκων. Λόγω, αυτών των μη ελπιδοφόρων αποτελεσμάτων, των περισσότερων στοχευουσών θεραπειών, και της μεγάλης ετερογένειας που παρουσιάζει ο τύπος αυτός καρκίνου καθιστά την θεραπεία του μια εξαιρετικά δύσκολη διαδικασία. Για το λόγο αυτό υπάρχει άμεση ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών θεραπευτικών στόχων. Το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί σε μία κατηγορία μικρών μη κωδικών μορίων RNA, τα *microRNAs*. Τα *microRNAs* έχουν τη ικανότητα να ελέγχουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες μέσω της μεταγραφικής ρύθμισης που ασκούν σε συγκεκριμένα γονίδια στόχους. Έχουν βρεθεί *microRNAs* που προάγουν αλλά και καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό τόσο των φυσιολογικών όσο και των καρκινικών κυττάρων. Η μελέτη των *microRNAs* θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη κατάλληλων βιοδεικτών που θα μπορούσαν να παρέχουν τόσο διαγνωστικές όσο και προγνωστικές πληροφορίες αλλά και να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικοί στόχοι ή θεραπευτικά μόρια για την αντιμετώπιση αυτού του τόσο επιθετικού τύπου καρκίνου του μαστού.

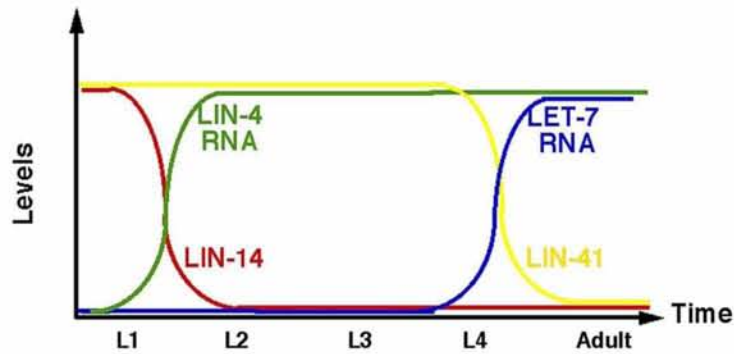
#### **4. *microRNAs***

Τα *microRNAs* ή αλλιώς *miRNAs* είναι μία κατηγορία ενδογενών, μικρών, μη κωδικών μορίων RNA, μήκους περίπου 20-24 νουκλεοτιδίων. Πρόκειται για εξαιρετικά διατηρημένα RNAs που λειτουργούν ως μετα-μεταγραφικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης. Τα *miRNAs* ασκούν τη δράση τους, κατά κύριο λόγο, με την δέσμευσή τους σε συμπληρωματικές ή ημι-συμπληρωματικές αλληλουχίες mRNA στόχων, παρεμβάλλοντας έτσι τον μηχανισμό μετάφρασης, εμποδίζοντας ή μεταβάλλοντας την παραγωγή του πρωτεϊνικού προϊόντος (Lee and Vasudevan 2013)(Iwakawa and Tomari 2015). Επίσης, μελέτες που έχουν γίνει πάνω στα *microRNAs* έδειξαν ότι εκτός από την καταστολή της μεταγραφής που προκαλούν, η δέσμευσή τους στο mRNA των γονιδίων-στόχων πυροδοτεί την πρόσληψη

παραγόντων αποσύνθεσης του mRNA, οδηγώντας στην αποσταθεροποίηση του και συνεπώς στη μείωση της έκφρασης του. Λόγω του αυστηρού πρότυπου ρύθμισης που ασκούν αυτά τα μόρια στο μηχανισμό μεταγραφής του κυττάρου, απορύθμιση της έκφρασης τους οδηγεί σε τεράστιες κλινικές συνέπειες που κυμαίνονται από ανοσολογικές κα αναπτυξιακές διαταραχές μέχρι και την ανάπτυξη διαφόρων τύπων καρκίνου (Sevignani et al. 2006) (Stitt-Cavanagh et al. 2009);(Chico et al. 2009)(Taft et al. 2010).

#### **4.1. Ανακάλυψη των *microRNAs***

Τα *microRNAs* ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά το 1993 από τον Lee και τους συνεργάτες του (Lee et al. 1993) στο νηματοειδές σκώληκα *Caenorhabditis elegans*. Σε αυτούς τους οργανισμούς παρατηρήθηκε ότι η μείωση της ρύθμισης της πρωτεΐνης LIN-14 είναι απαραίτητη για την μετάβαση από το πρώτο στάδιο των προνυμφών (L1) στο επόμενο (L2) (**Εικόνα 3**). Επιπλέον, βρέθηκε ότι η μείωση του LIN-14 εξαρτάται από την μεταγραφή ενός άλλου γονιδίου που ονομάζεται *lin-4*. Ενδιαφέρον αποτέλεσε η παρατήρηση ότι το προϊόν μεταγραφής του γονιδίου *lin-4* δε μεταφράστηκε σε βιολογικά ενεργή πρωτεΐνη. Αντί αυτού δημιούργησε δύο μικρά RNA μήκους περίπου 21 και 61 νουκλεοτίδια, το κάθε ένα αντίστοιχα. Η μακρύτερη αλυσίδα σχημάτιζε μία δομή βρόγχου (*stem-loop*) η οποία χρησίμευε ως πρόδρομος για το βραχύτερο RNA. Αργότερα, η ομάδα αυτή του Lee (Lee et al. 1993) και η ομάδα του Wightman (Wightman et al. 1993) διαπίστωσαν ότι το μικρότερο RNA φέρει συμπληρωματικές αλληλουχίες σε πολλαπλές θέσεις της 3'-UTR του mRNA LIN-14. Η δέσμευση μεταξύ αυτών των συμπληρωματικών περιοχών παρατηρήθηκε ότι μειώνει την έκφραση της πρωτεΐνης LIN-14 χωρίς να προκαλέσει σημαντική μεταβολή στα επίπεδα του mRNA. Οι δύο αυτές μελέτες παρουσίασαν ένα μοντέλο καταστολής της μετάφρασης του LIN-14 γονιδίου, μέσω σύνδεσης πολλών μικρών *lin-4* RNA στη 3'-UTR περιοχή του mRNA του, γεγονός που οδήγησε σε εξέλιξη της προνυμφικής ανάπτυξης του οργανισμού *C. elegans*.



**Εικόνα 3.** Χρονική ρύθμιση των miRNAs lin-4 και let-7 και των γονιδίων-στόχων τους στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του *C. elegans* (Vella and Slack 2005)

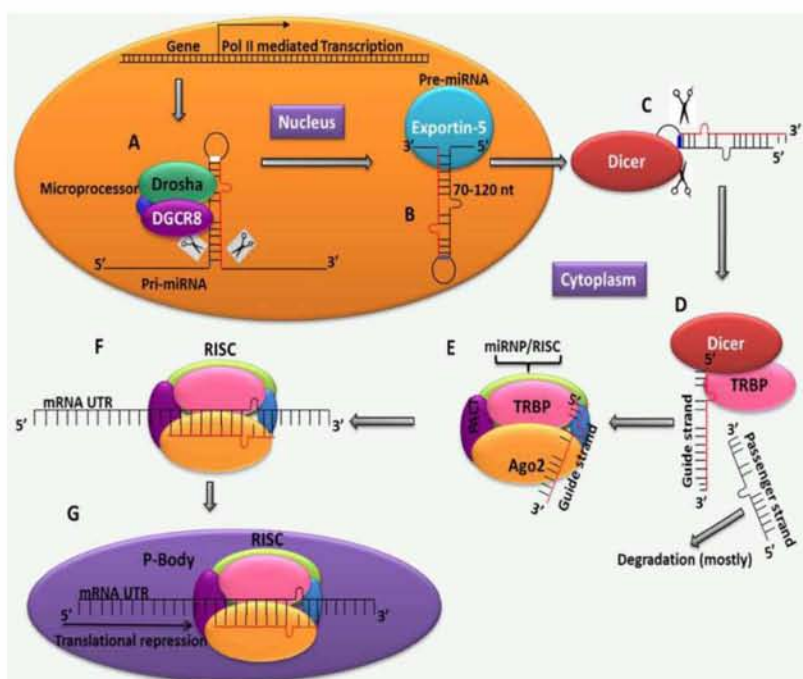
Αυτός ο νέος τρόπος ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, αρχικά, θεωρήθηκε ότι αποτελεί αποκλειστικό φαινόμενο του οργανισμού *C. elegans*. Το 2000, δύο ξεχωριστές ομάδες ερευνητών, ανακάλυψαν ένα άλλο μικρό RNA, το let-7, το οποίο φάνηκε να είναι απαραίτητο για την εξέλιξη του *C. elegans* από το στάδιο της προνύμφης στο ενήλικο άτομο (**Εικόνα 3**) (Reinhart et al. 2000)(Slack et al. 2000). Το πιο σημαντικό όμως ήταν ότι, ομόλογα αυτού του γονιδίου ανακαλύφθηκαν στη συνέχεια σε πολλούς άλλους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (Pasquinelli et al. 2000). Την περίοδο που ακολούθησε πολλά microRNAs ανακαλύφθηκαν και κλωνοποιήθηκαν σε διάφορους οργανισμούς. Πολλά βρέθηκαν να διατηρούνται εξελικτικά σε όλα τα είδη και να παρουσιάζουν ειδικότητα σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο. Η ανακάλυψη και επιβεβαίωση της ύπαρξης των microRNAs, οδήγησε σε έντονη έρευνα με στόχο τον εντοπισμό νέων μελών αυτής της οικογένειας. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την ανακάλυψη πολλαπλών miRNAs σε διάφορα είδη φυτών και ζώων. Το 2002 δημιουργήθηκε μία βάση δεδομένων για τα microRNAs, γνωστή ως miRBase. Η βάση αυτή περιλαμβάνει όλα τα μέχρι στιγμής γνωστά miRNAs καθώς και πιθανές αλληλουχίες που θα μπορούσαν να δράσουν ως miRNA αλλά και χρήσιμες πληροφορίες για τα μόρια αυτά (Bhaskaran and Mohan 2014).

Μέχρι σήμερα, στο ανθρώπινο γονιδίωμα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 2000 miRs (Kozomara and Griffiths-Jones 2014) τα οποία ελέγχουν μια ευρεία σειρά βιολογικών διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης, διαφοροποίησης, πολλαπλασιασμού και της απόκρισης στο άγχος (Bushati and Cohen 2007). Τα miRNAs μπορεί να παίζουν τόσο σημαντικό ρόλο όσο και οι μεταγραφικοί

παράγοντες στη ρύθμιση και το συντονισμό της έκφρασης πολλαπλών γονιδίων σε ένα ορισμένο κυτταρικό τύπο και σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές.

#### 4.2. Βιογένεση των *microRNAs* (*nimhs*)

Η θέση των γονιδίων των *microRNAs* ποικίλει ευρέως στο γονιδίωμα των οργανισμών. Στον άνθρωπο η κατανομή των γονιδίων αυτών δεν είναι τυχαία. Αντιθέτως, το 50% αυτών βρίσκονται σε συστοιχίες και κάποια από αυτά μοιράζονται και τον ίδιο υποκινητή με γονίδια που παράγουν κωδικά μόρια RNA (Saini et al. 2007). Μελέτες έχουν αποκαλύψει τρεις κατηγορίες *microRNAs*. Τα *intergenic microRNAs* τα οποία βρίσκονται μεταξύ κωδικών γονιδίων, όμως, η μεταγραφή τους είναι ανεξάρτητη της μεταγραφής αυτών επειδή μεταγράφονται κατά κύριο λόγο από την RNApol III. Τα *intragenic microRNAs*, που βρίσκονται μέσα σε εξόνια ή ιντρόνια γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και μεταγράφονται με τον ίδιο πολλαπλασιασμό από την RNApol II. Τέλος, ένα μικρό ποσοστό των *microRNAs* γονιδίων βρίσκονται διεσπαρμένα σε περιοχές του γονιδιώματος με επαναλαμβανόμενα στοιχεία και μεταγράφονται από την RNApol III. Οι διαφορετικές αυτές κατηγορίες υπογραμμίζουν την πολυπλοκότητα των διαδικασιών που σχετίζονται με την ωρίμανση των *microRNAs*.



Εικόνα 4. Μηχανισμός βιογένεσης των *microRNAs* (*miRNAs*) (Bhaskaran and Mohan 2014)

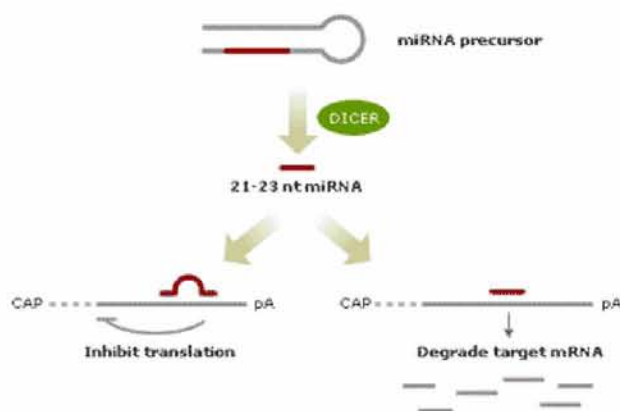
Μία γενική επισκόπηση των σταδίων που εμπλέκονται στην βιογένεση των microRNAs απεικονίζεται στην **Εικόνα 4**. Τα γονίδια των microRNAs, αρχικά, μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II ή III ως μακρά πρωτογενή miRNAs μήκους αρκετών εκατοντάδων νουκλεοτιδίων και ονομάζονται pri-miRNAs. Τα μόρια αυτά είναι πολυαδενυλιωμένα και φέρουν 5' cap. Το πρωτογενές miRNA υποβάλλεται στη συνέχεια, σε επεξεργασία από ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα που ονομάζεται μικροεπεξεργαστής (**Εικόνα 4A**). Αποτέλεσμα της επεξεργασίας αυτής είναι η παραγωγή ενός πρόδρομου miRNA (pre-RNA) μήκους περίπου 70 με 120 νουκλεοτιδίων. Το σύμπλεγμα του μικροεπεξεργαστή περιέχει ένα πυρηνικό ένζυμο με δράση νουκλεάσης RNase III που ονομάζεται Drosha. Για την ενεργοποίησή της η Drosha διμερίζεται με μία άλλη πρωτεΐνη δέσμευσης δίκλωνου RNA (dsRNA) που ονομάζεται DGCR8 ή Plasha και δημιουργούν το λειτουργικό σύμπλεγμα του μικροεπεξεργαστή (Microprocessor complex) (**Εικόνα 4A**) (Denli et al. 2004)(Landthaler et al. 2004).

Το νεομεταγραφόμενο pre-miRNA εξάγεται από τον πυρήνα με τη βοήθεια της εξπορτίνης 5, μία εξαρτώμενη από Ran πρωτεΐνη – υποδοχέα πυρηνικής μεταφοράς. Η εξπορτίνη 5 αναγνωρίζει και συνδέεται σε δύο νουκλεοτίδια του 3' άκρου του pre-miRNA. Η ενέργεια που απαιτείται για τη μεταφορά από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα εξασφαλίζεται από την υδρόλυση του GTP, το οποίο βρίσκεται συνδεδεμένο σε πρωτεΐνες Ran (**Εικόνα 4B**). Στο κυτταρόπλασμα το pre-miRNA επεξεργάζεται από ένα άλλο RNase III ένζυμο, την Dicer-1, και τελικώς παίρνει την ώριμη μορφή του, μήκους 18 έως 23 νουκλεοτίδια (**Εικόνα 4C,D**) (Chendrimada et al. 2005)(Yi et al. 2003)(Bhaskaran and Mohan 2014). Οι δύο κλώνοι του microRNA στη συνέχεια αποχωρίζονται ο ένας από τον άλλον. Ο διαχωρισμός αυτός εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η θερμοδυναμική ασυμμετρία των δύο κλώνων και η σταθερότητα του ζευγαρώματος των βάσεων στο 5' άκρο. Ο ένας από τους δύο κλώνους, ο οποίος ονομάζεται και κλώνος – οδηγός, συνδέεται με τις καταλυτικές πρωτεΐνες Argonaute (AGO) και σχηματίζει ένα σύμπλεγμα γνωστό ως RISC (**Εικόνα 4E**). Ο microRNA κλώνος με το πιο ασταθές ζεύγος βάσεων στο 5' άκρο συνήθως λειτουργεί ως κλώνος οδηγός, ενώ ο κλώνος με το πιο σταθερό ζεύγος (γνωστός και ως επιβάτης ή miR\* κλώνος) συνήθως καταστρέφεται, ή σε σπάνιες περιπτώσεις, αλληλεπιδρά με τις AGO πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα και οι δύο έλικες του pre-microRNA να οδηγούν σε ώριμα λειτουργικά microRNAs (Czech et al. 2009)(Okamura et al. 2009). Ο κλώνος οδηγός κατευθύνει το σύμπλοκο RISC στο

mRNA στόχο, μέσω συμπληρωματικότητας των βάσεων και προκαλεί τη μεταγραφική καταστολή του.

#### 4.3. Μηχανισμός Δράσης των *microRNAs*

Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για τον τρόπο λειτουργίας των miRNAs που οδηγεί σε μετα-μεταγραφική καταστολή των mRNA στόχων. Η μείωση της μετάφρασης του mRNA μπορεί να είναι είτε αποτέλεσμα καταστολής της μετάφρασης είτε αποικοδόμησης του ίδιου του mRNA στόχου. Ο βαθμός συμπληρωματικότητας μεταξύ του miRNA και της αλληλουχίας δέσμευσης του mRNA στόχου φαίνεται να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στον τρόπο καταστολής της μετάφρασης (**Εικόνα 5**). Η πλήρης συμπληρωματικότητα των δύο μορίων πιστεύεται ότι οδηγεί σε αποικοδόμηση του mRNA στόχου ενώ η μερική συμπληρωματικότητα οδηγεί σε μεταφραστική καταστολή. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν και εξαιρέσεις σε αυτόν τον κανόνα. Παραδείγματος χάριν, ακόμη και σχεδόν τέλεια συμπληρωματικότητα μπορεί να οδηγήσει σε καταστολή της μετάφρασης και όχι σε αποικοδόμηση του mRNA. Επίσης, ένας άλλος μηχανισμός δράσης που έχει προταθεί αναφέρει ότι η δέσμευση των microRNAs οδηγεί σε ταχύτερη αδενυλίωση του mRNA, μειώνοντας τη σταθερότητα του και επιταχύνοντας την αποικοδόμησή του. Η δέσμευση των microRNAs στα mRNAs στόχους αρχικά θεωρούνταν ότι γίνεται στην 3'UTR περιοχή των mRNAs. Πρόσφατες όμως μελέτες έχουν αποδείξει ότι θέσεις δέσμευσης των miRNAs μπορεί να υπάρχουν και στην 5'UTR αλλά και στις κωδικές περιοχές των mRNAs (Bhaskaran and Mohan 2014).



**Εικόνα 5.** Μηχανισμός δράσης των *microRNAs* ([www.ebiotrade.com/images/mirna-1.gif](http://www.ebiotrade.com/images/mirna-1.gif))

Πέραν της δράσης των microRNAs ως καταστολείς της μετάφρασης, μία μελέτη έδειξε ότι μπορούν να δράσουν και ως ενεργοποιητές, αλλά και ότι σε σπάνιες περιπτώσεις μερικά microRNAs μπορούν να παρουσιάσουν διττούς ρόλους (Vasudevan et al. 2007). Η βιοπληροφορική ανάλυση των microRNAs έχει δείξει ότι τα miRNAs των θηλαστικών μπορούν να ρυθμίσουν έως και το 30% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες.

Κατά κύριο λόγο τα microRNAs εντοπίζονται στο εσωτερικό των κυττάρων από τα οποία και συντίθενται, όπου ρυθμίζουν την έκφραση των mRNA στόχων. Όμως μελέτες έχουν δείξει ότι ένας σημαντικός αριθμός miRNAs εντοπίζονται εκτός των κυττάρων σε διάφορα σωματικά υγρά όπως ο ορός, το πλάσμα, τα ούρα, το σάλιο κ.α. (Hanson et al. 2009)(Weber et al. 2010). Η καταγωγή και η λειτουργία αυτών των miRNAs δεν είναι πλήρως κατανοητά. Υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να παίζουν κάποιον ρόλο στη διακυτταρική επικοινωνία. Μπορούν να εξαχθούν από ένα κύτταρο να αναγνωριστούν, να ληφθούν και να χρησιμοποιηθούν από ένα άλλο (Etheridge et al. 2011)(Vickers et al. 2011). Σε αντίθεση με τα συμβατικά μόρια RNA, τα κυκλοφορούντα miRNAs, είναι εξαιρετικά σταθερά και ανθεκτικά στη δραστηριότητα των RNAsων αλλά και σε ακραίες τιμές pH και θερμοκρασίας (Mitchell et al. 2008). Την ανθεκτικότητα αυτήν την αποκτούν είτε μέσω της συσκευασίας τους σε κυστίδια λιπιδίων (microvesicles και exosomes) είτε μέσω δέσμευσης με πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με RNA (Valadi et al. 2007). Το σημαντικότερο είναι ότι μπορούν να ανιχνευθούν εύκολα στα διάφορα υγρά του σώματος, καθώς ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής τους γίνεται με απλές τεχνικές (π.χ. PCR) και τα πρότυπα έκφρασής τους έχουν συσχετιστεί θετικά με διάφορες ασθένειες. Οι ιδιότητες αυτές καθιστούν τα microRNAs ιδανικούς βιοδείκτες τόσο για τη διάγνωση και πρόγνωση διαφόρων ασθενειών όσο και για την παρακολούθηση μίας θεραπείας.

Τα miRNAs δεν παίζουν σημαντικό ρόλο μόνο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης αλλά επίσης διαδραματίζουν έναν πολύ κρίσιμο ρόλο στη τελειοποίηση των βιολογικών διαδικασιών του κυττάρου. Είναι αξιοσημείωτο ότι αυτά τα μικροσκοπικά μόρια RNA με τον τόσο σημαντικό και πανταχού παρόν ρόλο στη ρύθμιση των κυτταρικών διεργασιών κατόρθωσαν να αποφύγουν το ραντάρ της επιστημονικής κοινότητας για τον μεγαλύτερο μέρος του 2<sup>ου</sup> αιώνα.



#### 4.4. Ονοματολογία των *microRNAs*

Ένα ενιαίο σύστημα ονοματολογίας έχει υιοθετηθεί για να εξασφαλιστεί η ομοιομορφία και η ευκολία καταγραφής των miRNAs (Ambros et al. 2003). Τα miRNAs αριθμούνται διαδοχικά με τη σειρά που ανακαλύφθηκαν. Σε αυτά που έχουν επιβεβαιωθεί πειραματικά αποδίδεται ένας αριθμός που συνδέεται με το πρόθεμα "miR" ακολουθούμενο από μια παύλα (π.χ. miR-21). Τα τρία γράμματα μπροστά από το όνομα του miRNA υποδηλώνουν τον οργανισμό στον οποίο ανιχνεύεται το συγκεκριμένο miRNA (π.χ. hsa για *Homo sapiens*). Το ώριμο miRNA συμβολίζεται ως miR-21 (με κεφαλαίο R), ενώ το mir-21 αναφέρεται τόσο στο γονίδιο miRNA όσο και στο προβλεπόμενο πρόδρομο miRNA. Πανομοιότυπες ώριμες ακολουθίες miRNA που προέρχονται από διακριτές πρόδρομες αλληλουχίες και γονιδιωματικούς τόπους περιέχουν ένα αριθμητικό επίθημα στο τέλος του ονόματός τους όπως hsa-miR-219-1 και hsa-miR-219-2. Από την άλλη, ώριμες αλληλουχίες που διαφέρουν κατά ένα ή δύο νουκλεοτίδια φέρουν ένα 4<sup>ο</sup> επίθεμα στο τέλος του ονόματός τους (π.χ. hsa-miR-130a και hsa-miR 130b).

Μερικά πρόδρομα miRNA δημιουργούν δύο ώριμα miRNAs μήκους 21-23 νουκλεοτιδίων. Όταν ο κλώνος οδηγός του miRNA μπορεί να οριστεί, ονομάζεται όπως αναφέρθηκε παραπάνω (π.χ. miR-136), ενώ το miRNA που προέρχεται από τον αντίθετο κλώνο παίρνει το ίδιο όνομα αλλά με έναν αστερίσκο δίπλα από αυτό (miR -136 \*). Ωστόσο, όταν δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός των κλώνων οδηγών, τα δύο miRNA που προκύπτουν από το πρόδρομο μόριο παίρνουν τα ονόματα miR-502-5p (από τον 5' κλώνο) και το miR-502-3p (από τον κλώνο 3').

Τέλος, τα miRNAs μπορούν, επίσης, να βρεθούν ως συστάδες εντός του γονιδιώματος. Για παράδειγμα, το cluster miR-17 περιέχει 6 πρόδρομα miRNAs που εντοπίζονται μέσα σε μια περιοχή 1-kilobase του χρωμοσώματος 13. Από την περιοχή αυτή του γονιδιώματος προκύπτουν 7 ώριμα miRNAs, το miR-17, miR-91, miR-18, miR-19, miR -19b, miR-20 και miR-92.96 Αυτές οι συστάδες microRNAs ονομάζονται είτε ως cluster miR-17 (παίρνουν δηλαδή το όνομα του μικρότερου σε αριθμό miRNA που περιέχουν) είτε ως cluster miR-17-92 (όνομα που περιέχει τόσο το χαμηλότερο όσο και το υψηλότερο αριθμημένο miRNA) (Bhaskaran and Mohan 2014).

## 5. *microRNAs* & Καρκίνος

Σε φυσιολογικά κύτταρα, τα miRNAs ελέγχουν τους ρυθμούς κυτταρικής ανάπτυξης, πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και απόπτωσης. Η απόπτωση παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των οργανισμών αλλά και στην εκδήλωση πολλών ασθενειών. Δυσλειτουργία αυτής της διαδικασίας έχει συσχετισθεί με την εξέλιξη διαφόρων νεοπλασματικών διεργασιών. Υπάρχουν πολλές ενδείξεις που υποστηρίζουν τον δυναμικό ρόλο των microRNAs στην καρκινογένεση. Πρώτον, τα πρώτα miRNAs που ανακαλύφθηκαν στο *Caenorhabditis elegans* και στη *Drosophila* αποδείχθηκε ότι ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση υποδηλώνοντας έτσι ότι η απορρύθμιση αυτών των miRNA μπορεί να οδηγήσει σε πολλαπλασιαστικές ασθένειες (O'Day and Lal 2010). Δεύτερον, περίπου το 50% των miRNAs εντοπίζονται σε θέσεις του γονιδιώματος που σχετίζονται με διάφορους καρκίνους (Calin et al. 2004). Τρίτον, σε κυτταρικές σειρές όγκων, αλλά και όγκους ασθενών παρατηρήθηκε εκτεταμένη απορύθμιση της έκφρασης των miRNAs (O'Day and Lal 2010). Τα παραπάνω στοιχεία υπογραμμίζουν τον πιθανό ρόλο των microRNAs ως νέους διαγνωστικούς και προγνωστικούς βιοδείκτες του καρκίνου.

Μέχρι στιγμής έχουν εντοπισθεί πολλά miRNAs που δρουν ως καταστολείς όγκων. Η έλλειψη των miRNAs αυτών προωθεί την καρκινογένεση. Επιπλέον, σε μελέτες στις οποίες έχει πραγματοποιηθεί ολική καταστολή της βιογένεσης των miRNAs μέσω στόχευσης στην *Dicer1* και του συμπαραγόνα *DGCR8*, παρατηρήθηκε αύξηση του ογκογόνου δυναμικού των κυττάρων (Farazi et al. 2011)(Kumar et al. 2009). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα περισσότερα microRNAs δρουν ως καταστολείς όγκων.

Εκτός, όμως, από την λειτουργία τους ως καταστολείς όγκων, τα microRNAs μπορούν, επίσης, να προάγουν την ογκογένεση ανάλογα με τις λειτουργίες των γονιδίων-στόχων που έχουν. Ένα παράδειγμα αυτών των ογκογόνων miRNAs είναι το miR-155 και το cluster miR-17-92 που επιταχύνουν την ανάπτυξη όγκων σε λεμφώματα Β-κυττάρων (O'Day and Lal 2010).

Οι τεχνικές υψηλής απόδοσης, όπως οι μικροσυστοιχίες miRNA, παρέχουν μοναδικές υπογραφές έκφρασης των miRNAs (miRNomes) σε διάφορους καρκίνους. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται τώρα τόσο για διαγνωστικούς όσο και για ταξινομητικούς σκοπούς. Τα miRNomes έχουν αποδειχθεί πιο αξιόπιστα από το προφίλ mRNA σε κάποιες υποκατηγορίες όγκων όπου οι συστοιχίες ~ 200 miRNA

παρέχουν καλύτερη ταξινόμηση των όγκων σε σύγκριση με την ανάλυση περισσότερων από 15.000 mRNAs (Lu et al. 2005).

## **6. Ο Ρόλος των *microRNAs* στον Καρκίνο του Μαστού**

Στατιστικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι, κατά μέσο όρο, μία στις οκτώ γυναίκες θα αναπτύξει καρκίνο του μαστού σε κάποια φάση της ζωής της. Παρόλο που έχει σημειωθεί πρόοδος όσον αφορά τη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, εξακολουθούν να υπάρχουν πολλές ανεξερεύνητες περιοχές, ιδιαίτερα στις θεραπείες του καρκίνου. Διάφορες μελέτες υποδεικνύουν ότι τα miRNAs διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στον καρκίνο του μαστού. Τα τελευταία χρόνια, τα miRNA έχουν εμπλακεί σε διάφορα στάδια της καρκινογένεσης του μαστού συμπεριλαμβανομένου τον πολλαπλασιασμό, την εισβολή, την αγγειογένεση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Tang et al. 2012).

Όπως και σε άλλους καρκίνους, μερικά miRNAs μπορούν να λειτουργούν ως καταστολείς όγκων και άλλα ως ογκογόνα. Έτσι, ο σχηματισμός όγκων μπορεί να προκύψει είτε από την εξάλειψη ενός miRNA καταστολέα όγκου είτε από την ενίσχυση ή υπερέκφραση ενός ογκογόνου miRNA. Επιπλέον, η μετάσταση όγκου μπορεί να προωθηθεί είτε με αυξημένη έκφραση ενός προ-μεταστατικού miRNA είτε με μείωση της έκφρασης αντι-μεταστατικών miRNAs (O'Day and Lal 2010). Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι υπάρχει ένας πιθανός ρόλος των miRNAs όχι μόνο στο να διευκολύνουν τη διάγνωση, πρόγνωση αλλά και πρόβλεψη των αποτελεσμάτων μίας θεραπείας, αλλά και να λειτουργούν ως νέοι θεραπευτικοί στόχοι ή θεραπευτικά μόρια. Παρακάτω, συζητούνται μερικά miRNAs όπου μελέτες έχουν δείξει ότι ενέχουν κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού.

### **6.1. Ογκοκατασταλτικά *microRNAs***

#### **Οικογένεια miR-200**

Η εισβολή και η μετάσταση είναι τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα των επιθετικών όγκων. Για την διαδικασία αυτή σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η ενεργοποίηση στα καρκινικά κύτταρα της επιθηλιο – μεσεγχυματικής μετάπτωσης (EMT). Πολλά μόρια στο κύτταρο ρυθμίζουν την EMT είτε ενεργοποιώντας την είτε καταστέλλοντάς την. Η οικογένεια miR-200 έχει αποδειχθεί ένα κρίσιμο μόριο στη

διαδικασία αυτή, καθώς ασκεί κατασταλτική δράση σε πολλά μόρια – επαγωγείς της EMT όπως είναι το ZEB1, το ZEB2 και το TCF8. Τα μόρια αυτά καταστέλλουν την μεταγραφή της E – καντερίνης και συνεπώς επάγουν την EMT. Μελέτες έδειξαν ότι υπερεκφράση του miR- 200c σε κύτταρα MDA-MB-231 καρκίνου του μαστού, τα οποία παρουσίαζαν έλλειψη ενδογενούς έκφρασης miR-200c, οδήγησε σε μειωμένα επίπεδα TCF8, το οποίο αποκατέστησε τα επίπεδα της E – καντερίνης και τροποποίησε τη μορφολογία των κυττάρων. Συνολικά, οι παραπάνω μελέτες προτείνουν ότι τα miRNA της οικογένειας miR-200 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, ρυθμίζοντας την εξέλιξη του όγκου και τη μετάσταση καθώς η μείωση της ρύθμισης αυτών των miRNA είναι ουσιαστικά το πρώτο βήμα για την μετάσταση του όγκου (O’Day and Lal 2010)(Vergheese et al. 2008).

### **miR-17-5p**

Το miR-17-5p, επίσης γνωστό ως miR-91, βρίσκεται στη χρωμοσωμική περιοχή 13q31, μια περιοχή του γονιδιώματος που υφίσταται απώλεια ετεροζυγωτίας σε πολλούς καρκίνους, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού. Το ογκογονίδιο AIB1, το οποίο συχνά ενισχύεται στα μαστικά καρκινικά κύτταρα, είναι ένας άμεσος στόχος του miR-17-5p. Η πρωτεΐνη AIB1 ενισχύει τη μεταγραφική δραστηριότητα του ERα και E2F1 αλλά και άλλων γονιδίων οι πρωτεΐνες των οποίων δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Το miR-17-5p καταστέλλει τη μετάφραση του AIB1 mRNA, αναστέλλοντας έτσι τη λειτουργία των E2F1 και ERα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του μαστού (bcr2484, vergheese2008). Επιπλέον, η κυκλίνη D1 (CCND1) αναγνωρίζεται ως άμεσος στόχος του miR-17-5p, αναστολή της οποίας μπορεί να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού (O’Day and Lal 2010).

### **Οικογένεια let-7**

Η έκφραση του let-7 είναι μειωμένη ή απουσιάζει τελείως σε πολλούς ανθρώπινους καρκίνους. Πρόσφατα δεδομένα τόσο από αιματολογικές κακοήθειες όσο και από συμπαγείς όγκους υποδηλώνουν ότι και τα δύο είδη κακοηθειών περιλαμβάνουν μικρούς πληθυσμούς κυττάρων που είναι ικανοί να προκαλέσουν ογκογένεση. Αυτά τα κύτταρα (T-ICs) έχουν ιδιότητες βλαστοκυττάρων και

αποτελούν μόνο ένα μικρό κλάσμα των κυττάρων του όγκου. T-ICs παρατηρούνται και σε όγκους του μαστού (BT-ICs). Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τον εντοπισμό του προφίλ των microRNAs στα BT-ICs έδειξαν ότι η οικογένεια let-7 αποτελεί τα πιο σταθερά miRNAs που απορυθμίζονται στα κύτταρα αυτά. Υπερέκφραση των let-7 σε καρκινικά μαστικά είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων αυτών και της μετάστασης τους σε μοντέλα ποντικών καθώς οδήγησαν σε διαφοροποίηση των BT-ICs.

Τα παραπάνω microRNAs που περιγράφηκαν αποτελούν miRNAs που δρουν ως καταστολείς όγκων και σχετίζονται έντονα με τον καρκίνο του μαστού. Όμως, δεν αποτελούν τα μοναδικά microRNAs που δρουν με αυτόν τον τρόπο αλλά ούτε και οι ιδιότητες τους περιορίζονται σε αυτό το φάσμα. Άλλα microRNAs που δρουν ως ογκοκατασταλτικά και έχουν ενδείξεις ότι συμμετέχουν στην καρκινογένεση στο μαστό είναι τα miR-125a και miR-125b, miR-335, miR-126, miR-27b, miR-31, miR-34a, miR-206, miR-1 και πολλά άλλα ακόμη (Verghese et al. 2008)(O'Day and Lal 2010).

## **6.2. Ογκογόνα microRNAs**

### **miR-21**

Η σημασία αυτού του microRNA στη καρκινογένεση του μαστού έγινε γνώστη από μελέτες που στόχευαν στην εύρεση του προφίλ των microRNAs σε όγκους μαστού. Στις μελέτες αυτές βρέθηκε ότι το miR-21 ήταν το πιο εκτεταμένα εκφραζόμενο miRNA σε ιστούς όγκου σε σύγκριση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς. Ο ρόλος του miR-21 εξετάστηκε τόσο σε πλαίσιο κυτταρικών καλλιέργειων όσο και σε xenograft ποντίκια. Η μείωση του miR-21 στις κυτταρικές σειρές MCF-7 μείωσε την ανάπτυξη των κυττάρων και αύξησε την απόπτωση ενώ στους όγκους των ποντικών παρεμπόδιζε τον πολλαπλασιασμό και την περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το miR-21 είναι ένα ογκογόνο miRNA που παίζει σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση στο μαστό (O'Day and Lal 2010)(Verghese et al. 2008).

## **miR-10b**

Το miR-10b ήταν το πρώτο miRNA που βρέθηκε να επηρεάζει το μεταστατικό δυναμικό των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων. Σε αντίθεση με το miR-155, ένα miRNA το οποίο υπερεκφράζεται σε πολλούς όγκους του μαστού, το miR-10b εκφράζεται έντονα μόνο σε μεταστατικά καρκινικά κύτταρα και βρέθηκε ότι προάγει κυτταρική μετανάστευση και την εισβολή των καρκινικών κυττάρων *in vitro* αλλά και ότι ξεκινά την διήθηση του όγκου και τη μετάσταση *in vivo*. Το miR-10b αναστέλλει τη μετάφραση του μεταγραφικού παράγοντα HOXD10, που οδηγεί σε μια σειρά κλινικών αλλαγών, συμπεριλαμβανομένης της έκφρασης του προμεταστατικού γονιδίου RHOC, γονίδιο που προωθεί τη μετανάστευση καρκινικών κυττάρων και την εισβολή (Verghese et al. 2008)(Tang et al. 2012).

## **Οικογένεια miR-373/520c**

Τα microRNAs της οικογένειας miR-373/520c χαρακτηρίστηκαν ως προμεταστατικά μέσω μίας μελέτης στην οποία σε MCF-7 κύτταρα υπερεκφράστηκαν 450 miRNAs για να ελεγχθούν οι μεταστατικές τους ιδιότητες. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι τα miR-373 και miR-520c προάγουν τη μετανάστευση και την εισβολή καρκινικών κυττάρων *in vitro* και *in vivo*. Τα miRNAs αυτά επάγουν το μεταναστευτικό φαινότυπο αναστέλλοντας την έκφραση του καταστολέα της μετάστασης CD44. Είναι σημαντικό ότι η έκτοπη υπερέκφραση του CD44 από το οποίο έχει αφαιρεθεί η 3' UTR περιοχή, που φέρει τις θέσεις δέσμησης των παραπάνω miRNAs, μειώνει σημαντικά τη μετανάστευση των MCF-7 κυττάρων που εκφράζουν miR-373 ή miR520c, υποδηλώνοντας ότι απαιτείται μείωση της ρύθμισης του CD44 από τα miRNAs αυτά, για το μεταστατικό φαινότυπο των MCF-7 κυττάρων.

Το miR-21, το miR-10b και η οικογένεια των miR-373/520c αποτελούν τα πιο μελετημένα microRNAs που μπορούν να επάγουν την καρκινογένεση και σχετίζονται ισχυρά με την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Όμως, όπως και τα ογκοκατασταλτικά microRNAs έτσι και ογκογόνα δεν αποτελούν τα μοναδικά miRNAs που επάγουν την καρκινογένεση. Αντιθέτως, υπάρχουν αρκετά ακόμα microRNAs που συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή. Κάποια γνωστά, κάποια πιθανά και κάποια που ακόμα δεν έχουν ταυτοποιηθεί (O'Day and Lal 2010).

### 6.3. *microRNAs* στον TNBC

Τα περισσότερα από τα *microRNAs* που αναφέρθηκαν και συμμετέχουν στην καρκινογένεση του μαστού έχει δείχθει ότι συμμετέχουν, σε ένα βαθμό, και στην ανάπτυξη των TNBC όγκων. Διάφορες μελέτες, όμως, που έχουν πραγματοποιηθεί σε δείγματα TNBC έδειξαν ότι οι όγκοι της κατηγορίας αυτής παρουσιάζουν συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης *microRNAs*, διαφορετικό από τους άλλους υποτύπους καρκίνου του μαστού (Medimegh et al. 2014) (Thakur et al. 2016).

Μια μελέτη στην Ινδία, στην οποία ελέγχθηκαν δείγματα από τον ορό και τον όγκο ασθενών με TNBC, φανέρωσε την υπερέκφραση τριών ογκογόνων *miRNAs*, του *miR-21*, *miR-221* και *miR-210* και την μειωμένη έκφραση των *miR-195* και *miR-145* σε σύγκριση με τριπλά θετικούς όγκους. Επιπλέον, το *miR let-7a* υπερεκφράζεται σε γυναίκες με TNBC αν και πρόκειται για ένα *miRNA* που καταστέλλει την ογκογένεση. Αυξημένη συγκέντρωση του *miR-373* στον ορό μπορεί, επίσης, να αποτελέσει δείκτη για την ύπαρξη TNBC. Άλλη μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί σε δείγματα TNBC με μεταστάσεις στους λεμφαδένες συσχέτισαν 27 *miRNAs* με μεταστατικά φαινόμενα (Avery-Kiejda et al. 2014).

Άλλες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στον TNBC έδειξαν ότι τα αυξημένα επίπεδα των *miR-21*, *miR-27a/b*, *miR-210* και *miR-454* συσχετίζονται με μικρότερη συνολική επιβίωση των ασθενών με TNBC. Παρομοίως, η μειωμένη έκφραση του *miR-374a/b* και τα αυξημένα επίπεδα του *miR-454* συσχετίζονται με τη βραχύτερη επιβίωση ατόμων που έχουν απαλλαγεί από την νόσο (Piasecka et al. 2018).

Άλλες ομάδες *miRNA* αναγνωρίστηκαν ότι συσχετίζονται με την εκδήλωση χημειοαντίστασης. Για παράδειγμα, η έκφραση του *miR-181a* ήταν αυξημένη σε δείγματα όγκου TNBC από ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν σε νεο-ανοσοενισχυτική χημειοθεραπεία αλλά ήταν σημαντικά μειωμένα σε ασθενείς με χημειο-ευαισθησία. *In vitro* μελέτες από τους Ouyang et al. έδειξαν ότι στην κυτταρική σειρά MDA-MB-231 καθώς και σε δείγματα όγκου TNBC, η ρύθμιση προς τα πάνω των *miR-155-5p*, *miR-21-3p*, *miR-181a-5p*, *miR-181b-5p*, *miR-183-5p* και η μείωση της έκφρασης των *miR-10b-5p*, *miR-451a*, *miR-125b-5p*, *miR-31-5p*, *miR-195-5p* συσχετίστηκαν με χημειοαντίσταση στη δοξορουβικίνη (doxorubicin) (Jena 2017).

Από τις παραπάνω μελέτες γίνεται κατανοητό ότι πολλά microRNAs συμμετέχουν στην ογκογένεση των τριπλά αρνητικών όγκων και στην αύξηση του μεταστατικού τους δυναμικού. Πολλά από αυτά τα microRNAs είναι κοινά τόσο στους TNBC όγκους όσο και σε άλλους υποτύπους καρκίνου του μαστού. Ενώ άλλα αποτελούν γνώρισμα μόνο των TNBC. Μερικά από τα microRNAs που συμμετέχουν στις διαδικασίες αυτές έχουν αναγνωρισθεί και χαρακτηριστεί σε ένα μεγάλο βαθμό. Υπάρχουν όμως ακόμη πολλά microRNAs που φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στους TNBC όγκους όμως η ακριβής λειτουργία τους δεν είναι πλήρως κατανοητή. Δύο microRNAs της κατηγορίας αυτής είναι το miR-1 και το miR-206, η λειτουργία των οποίων αποτέλεσε το επίκεντρο της συγκεκριμένης εργασίας.

### **6.3.1. miR-1 & miR-206**

Έχει παρατηρηθεί ότι η έκφραση των microRNAs δεν είναι όμοια σε όλους τους ιστούς των οργανισμών. Υπάρχουν miRNAs τα οποία εκφράζονται ιστοειδικά και με τρόπο συγκεκριμένο για κάθε ιστό. Τέτοια microRNAs είναι και τα miR-1 και miR-206. Τα miRNAs αυτά εκφράζονται σχεδόν αποκλειστικά στους μύες των θηλαστικών και για τον λόγο αυτό συχνά αναφέρονται και ως myomiRs. Πέραν των δύο αυτών miRNAs μέχρι στιγμής έχουν βρεθεί άλλα πέντε miRNA που ανήκουν στην κατηγορία των myomiRs (**Πίνακας 1**). Αν και η έκφραση των miRNAs αυτών περιορίζεται στο σκελετικό και στον καρδιακό μυ πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα miRNAs αυτά εκφράζονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις και σε άλλους ιστούς (Horak et al. 2016).



**Πίνακας 1.** Οικογένεια myomiRs (Horak et al. 2016)

MyomiRNAs	Location on chromosome	Host gene	Tissue specificity
miR-1	20q13.33 (miR-1-1) 18q11.2 (miR-1-2)	<i>C20orf166</i> <i>MIB1</i>	muscle-specific
miR-133a	18q11.2 (miR-133a-1) 20q13.33 (miR-133a-2)	<i>MIB1</i> <i>C20orf166</i>	muscle-specific
miR-133b	6p12.2	intergenic	muscle-specific
miR-206	6p12.2	intergenic	skeletal muscle-specific
miR-208b	14q11.2	<i>MYH7</i>	muscle-specific
miR-486	8p11.21	<i>ANK1</i>	muscle-enriched
miR-499	20q11.22	<i>MYH7B</i>	muscle-specific

Ορισμένα myomiR είναι οργανωμένα σε συγκεκριμένες χρωμοσωμικές περιοχές και για αυτόν τον λόγο μεταγράφονται ταυτόχρονα. Συγκεκριμένα, τα miR-1-1/ miR-133a-2, miR-1-2/miR-133a-1 και miR-206/miR-133b στον άνθρωπο εντοπίζονται στις χρωμοσωμικές περιοχές 20q13.33, 18q11.2 και 6p12.2 αντίστοιχα. Το miR-206/miR-133b εντοπίζονται μεταξύ των γονιδίων της περιοχής, ενώ οι άλλες δύο ομάδες εντοπίζονται εντός των γονιδίων και συγκεκριμένα τα miR-1-1/ miR-133a-2 εντοπίζονται σε ένα ιντρόνιο του γονιδίου *C20orf166* (chromosome 20 open reading frame 166) ενώ το miR-1-2/miR-133a-1 εντοπίζεται σε ένα ιντρόνιο του γονιδίου *MIB1* (mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1). Παρόλο που αυτοί οι γενετικοί τόποι βρίσκονται σε διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος παράγουν πολύ παρόμοια ώριμα miRNAs. Συγκεκριμένα, η αλληλουχία του ώριμου miR-1-1 είναι πανομοιότυπη με την αλληλουχία του miR-1-2, ενώ η ώριμη μορφή του miR-1 διαφέρει από την ώριμη μορφή του miR-206 σε τέσσερα νουκλεοτίδια στην 3' – UTR περιοχή ενώ μοιράζονται στην ίδια αρχική αλληλουχία (Horak et al. 2016).

Τα myomiRs αποτελούν αναπόσπαστο τμήμα της ανάπτυξης των σκελετικών μυών αλλά και του καρδιακού μυ. Η δράση των microRNAs αυτών είναι καθοριστική για τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την αναγέννηση των σκελετικών μυών (Horak et al. 2016). Συγκεκριμένα, τα miR-1 και miR-206 προάγουν τη μυϊκή διαφοροποίηση σταματώντας το πολλαπλασιασμό των μυοβλαστών λόγω των αντιπολλαπλασιαστικών αποτελεσμάτων που φέρουν. Πειράματα που αναστέλλουν τη δραστηριότητα των miR-1 και miR-206 αποκάλυψαν τη σημασία αυτών των myomiRs για τη σωστή ανάπτυξη των μυών και ιδιαίτερα για τη σωστή διαφοροποίηση των μυοβλαστών (Goljanek-Whysall et al. 2012)(Horak et al. 2016).

Πέραν όμως του πρωταρχικού ρόλου που διαδραματίζουν τα δύο αυτά miRNAs στη μυογένεση φαίνεται να εμπλέκονται και σε πολλές άλλες διαδικασίες. Για παράδειγμα, προάγουν την απόπτωση καθώς στοχεύουν αντι-αποπτωτικά γονίδια, συμπεριλαμβανομένων των NOTCH3, PAX3 και IGFBP5 (Liu et al. 2012). Αντίθετα, κύτταρα στα οποία έχει αποσιωπηθεί η έκφραση των παραπάνω miRNAs κατέδειξαν τεράστια αντοχή στην απόπτωση με αναστολή συγκεκριμένων οδών κυτταρικού θανάτου και ενεργοποίηση αντι-αποπτωτικών παραγόντων. Εκτός από την απόπτωση, τα miR-1 και miR-206 έχουν, επίσης, βρεθεί ότι ρυθμίζουν την αγγειογένεση κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης με καταστολή του VEGFA. Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι τα δύο αυτά microRNAs εμπλέκονται στις διαδικασίες της ογκογένεσης και δρουν ως καταστολείς των όγκων καθώς προάγουν την απόπτωση και καταστέλλουν την αγγειογένεση αλλά και έναν σημαντικό αριθμό γονιδίων με ογκογόνο δράση (CCND2, CCND1, MET, VEGFA, NOTCH3).

Μια ανασκόπηση των Nohata et al. (Nohata et al. 2012) ανέφερε μεταβολές στην έκφραση των miRNAs αυτών σε πολλούς καρκίνους συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού. Η απορύθμιση αυτή συνεπάγεται με μείωση της έκφρασης των miRNAs στα δείγματα όγκων, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα microRNAs αυτά δρουν ως καταστολείς όγκων στους ιστούς, περιορίζοντας την αφθονία των παραγόντων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

### **6.3.2. miR-1 & miR-206 στο TNBC**

Ένας σημαντικός αριθμός μελετών μέχρι στιγμής έχει συσχετίζει τη λειτουργία των miR-1 και miR-206 με την ανάπτυξη αλλά και την επιθετικότητα του TNBC. Η έκφραση των δύο αυτών microRNAs βρίσκεται μειωμένη τόσο σε κυτταρικές σειρές TNBC (MDA-MB-231) όσο και σε δείγματα όγκων από ασθενείς με TNBC. Η μειωμένη έκφραση του miR-1 και miR-206 οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης πολλών γονιδίων-στόχων των miRNAs αυτών και συνεπώς, σε απορύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας των κυττάρων.

Πολλά γονίδια-στόχοι των miR-1/206 σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη μετανάστευση των κυττάρων και συχνά η έκφραση τους αυξάνεται στον TNBC. Η έλλειψη των microRNAs αυτών σχετίζεται με αυτόν τον φαινότυπο και αποδεικνύεται σε ένα μεγάλο αριθμό ερευνών. Παραδείγματος χάρη, σε μία μελέτη των Chou et al. (Chou et al. 2016), αποδείχθηκε ότι η έλλειψη του

miR-1 σε πολλές κυτταρικές σειρές TNBC (MDA-MB-4355, MDA-MB-231), αλλά και σε MCF-7 κυτταρικές σειρές, οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης ενός μακρού μη κωδικού RNA, του MALAT1 το οποίο επάγει τη μετάσταση και την εισβολή των καρκινικών κυττάρων του μαστού μέσω σύνδεσής του με το Cdc42 (πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των Rho πρωτεϊνών και συμβάλει στην πρόοδο του καρκίνου). Αντιθέτως, χορήγηση μιμητικών μορίων miR-1 αντέστρεψε αυτόν τον φαινότυπο και μείωσε την μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων. Άλλος στόχος του miR-1 που έχει μελετηθεί και αυξάνεται σε καρκίνους του μαστού είναι το K-Ras (Liu et al. 2015). Το miR-1 αποδείχθηκε ότι ελέγχει την έκφραση του K-Ras γονιδίου μέσω άμεσης σύνδεσης με το mRNA αυτού. Το K-Ras γονίδιο βρίσκεται αυξημένο σε πολλούς καρκίνους του μαστού και κυρίως σε υψηλού σταδίου καρκινώματα. Στη μελέτη αυτή χορήγηση μιμητικών miR-1 μορίων σε κύτταρα καρκίνου του μαστού ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό, την κινητικότητα και αύξησε την απόπτωση in vitro, αναστέλλοντας έτσι αύξηση του όγκου in vivo. Αποτελέσματα όμοια με αυτά που προκύπτουν από τη εξουδετέρωση του K-Ras (Liu et al. 2015).

Μία άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε βλαστικά κύτταρα καρκίνου του μαστού (CSCs) από διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και της κυτταρικής σειράς MDA-MB-231, έδειξε ότι το miR-1 καταστέλλει την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό και των CSCs κυττάρων. Συγκεκριμένα, μείωση της έκφρασης του miR-1 σχετίζεται με την υπερέκφραση στα κύτταρα αυτά των Fizzled 7, TSKN2 και c-Myc, μόρια που συμμετέχουν στο μονοπάτι Wnt - β κατενίνης. Μονοπάτι που συνδέεται ισχυρά με την μετανάστευση των κυττάρων. Αντίθετα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε υπερέκφραση του miR-1. Η υπερέκφραση αυτή μείωσε σημαντικά την έκφραση των Fizzled 7, TSKN2 και c-Myc και μείωσε τη σχετική αναλογία πυρηνικής προς κυτοσολικής β-κατενίνης στα CSCs κύτταρα. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το miR-1 αναστέλλει τη σηματοδότηση Wnt - β κατενίνης σε CSCs κύτταρα. Αναστολή η οποία μπορεί να εξασθενίσει τον πολλαπλασιασμό και τη διαδικασία επιθηλιακής - μεσεγχυματικής μετάπτωσης (EMT) των CSCs του μαστού. Πολλές ακόμα έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί και έχουν βρεθεί και τεκμηριωθεί γονίδια-στόχοι του miR-1, τα οποία επηρεάζονται σε TNBC όγκους, ενισχύοντας τη άποψη ότι το miR-1 διαδραματίζει ένα καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη των τριπλά αρνητικών όγκων (Liu et al. 2015).

Όμοια με το miR-1, έτσι και για το miR-206 υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ερευνών που τεκμηριώνουν την συμβολή του στην καρκινογένεση του μαστού. Αν

και η έκφραση του miR-206 είναι αμφιλεγόμενη μεταξύ των διάφορων υποτύπων καρκίνου του μαστού όλες οι έρευνες συμφωνούν στο γεγονός ότι η έκφρασή του είναι σημαντικά μειωμένη σε όλους τους υποτύπους καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό. Λεπτομερέστερα, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η έκφραση του miR-206 είναι πιο αυξημένη σε ER-α αρνητικούς καρκίνους του μαστού σε σύγκριση με τους ER-α θετικούς καρκίνους, υποδηλώνοντας ένα ρόλο του miRNA αυτού στη ρύθμιση του γονιδίου του υποδοχέα των οιστρογόνων ER-α (ESR1). Πράγματι, φαίνεται ότι το miR-206 φέρει δύο θέσεις δέσμευσης στο ESR1 γονίδιο αναστέλλοντάς το (Vimalraj et al. 2013)(Fu et al. 2015). Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν έρευνες που υποστηρίζουν ότι η έκφραση του miR-206 μειώνεται σημαντικά στους TNBC όγκους σε σύγκριση με τους θετικούς όγκους του μαστού (Liang et al. 2016)(Wang et al. 2014). Επίσης, υποστηρίζουν ότι στη μείωση αυτή συμβάλει και στην τόσο επιθετική μορφή αυτού του τύπου καρκίνου του μαστού.

Παρά τη διαφωνία του επιστημονικού κοινού για τα επίπεδα έκφρασης του miR-206, όλες οι έρευνες καταλήγουν στο ίδιο συμπέρασμα. Η έκφραση του miR-206 μειώνεται σε όλους τους υποτύπους καρκίνου του μαστού και η μείωση αυτή συμβάλει στην ανάπτυξη, εξέλιξη και μετάσταση του όγκου. Μερικά ευρήματα που υποστηρίζουν την παραπάνω άποψη αναφέρουν ότι η μείωση του miR-206 προωθεί την διήθηση και την αγγειογένεση των TNBC όγκων καθώς ο παράγοντας VEGF αποτελεί άμεσο στόχο του miRNA αυτού (Liang et al. 2016). Επιπλέον, χορήγηση μιμητικών μορίων miR-206 ανέστειλε την διήθηση (σε ποσοστό 88%) και την νεοαγγειογένεση (67% αναστολή της αγγειογένεσης) των TNBC κυττάρων in vitro αλλά και τη διήθηση (σε ποσοστό 62%) και την νεοαγγειογένεση (54% αναστολή) των MCF-7 κυττάρων (Liang et al. 2016). Επιπροσθέτως το miR-206 συμβάλει στη μετάσταση των TNBC όγκων μέσω στόχευσης μορίων που συμμετέχουν στις διαδικασίες προσκόλλησης και κινητικότητας των κυττάρων. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι το miR-206 στοχεύει τη πρωτεΐνη CORO1C (Wang et al. 2014) καθώς και την TWF1 (Samaeekia et al. 2017) οι οποίες δεσμεύονται στην ακτίνη και ελέγχουν την αναδιαμόρφωση των νημάτων της προωθώντας την κινητικότητα των κυττάρων. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι αυξημένες στους TNBC όγκους και έχει δειχθεί ότι η αύξηση αυτή σχετίζεται με την μείωση του miR-206. Επίσης, το miR-206 ελέγχει γονίδια που σχετίζονται με την επιθηλιο – μεσεγχυματική μετάπτωση (EMT). Συγκεκριμένα, το miR-206 έχει βρεθεί ότι στοχεύει το WDR1 μόριο ελέγχοντας έτσι

την έκφραση του. Το μόριο αυτό, μέσω του μονοπατιού RhoA – MRTFA οδηγεί στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την MET. Οι παραπάνω μελέτες, καθώς και άλλες έρευνες που έχουν γίνει για το miRNA αυτό, συνδέουν ισχυρά το miR-206 με την μετάσταση. Καθώς έρευνες επίσης έχουν δείξει ότι η έκφραση του miRNA αυτού, αλλά και του miR-1, που αναφέρθηκε προηγουμένως, μειώνεται περισσότερο σε προχωρημένου βαθμού καρκινώματα σε σύγκριση με τους πρωτεύοντες όγκους (Beltran et al. 2011).

Όσο αφορά στο πολλαπλασιασμό και στην επιβίωση των κυττάρων και σε αυτή τη διαδικασία το miR-206 κατέχει πρωτεύοντα ρόλο. Έχειδειχθεί ότι το miR-206 στοχεύει μόρια που συμμετέχουν σε διαδικασίες κυτταρικής αύξησης και επιβίωσης. Συγκεκριμένα, μία έρευνα των Amir et al. 2016 απέδειξε ότι το miR-206 στοχεύει το ογκογονίδιο Tbx3, το οποίο προωθεί την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων και βρίσκεται αυξημένο σε πολλούς καρκίνους του μαστού, συμπεριλαμβανομένου και του TNBC. Αυξημένα επίπεδα του ογκογονιδίου αυτού έχουν σχετισθεί με μικρότερη επιβίωση ασθενών με καρκίνο του μαστού. Προσθήκη του miR-206 έχει την ικανότητα να μειώσει την έκφραση του Tbx3 και να σταματήσει την ανάπτυξη του όγκου. Επίσης, ένα άλλο σημαντικό μόριο στόχος του miR-206 είναι η κυκλίνη D1 και D2 (Amir et al. 2016)(Zhou et al. 2013). Μόρια κλειδί για την επίτευξη του κυτταρικού κύκλου του κυττάρου τα οποία υπερεκφράζονται σε καρκινικές καταστάσεις.

Μέσω ανάλυσης βιοπληροφορικής ανιχνεύονται εκατοντάδες μόρια στόχοι των miR-1 και miR-206. Στόχοι οι οποίοι σχετίζονται με διάφορες κυτταρικές διαδικασίες που προωθούν την ογκογένεση. Μερικοί από αυτούς είναι και τα μόρια c-Met, Notch3 και Bcl-2. Μόρια που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απόπτωση των κυττάρων και με τα οποία και ασχοληθήκαμε στην συγκεκριμένη εργασία.

## **7. *c-Met* Σηματοδότηση**

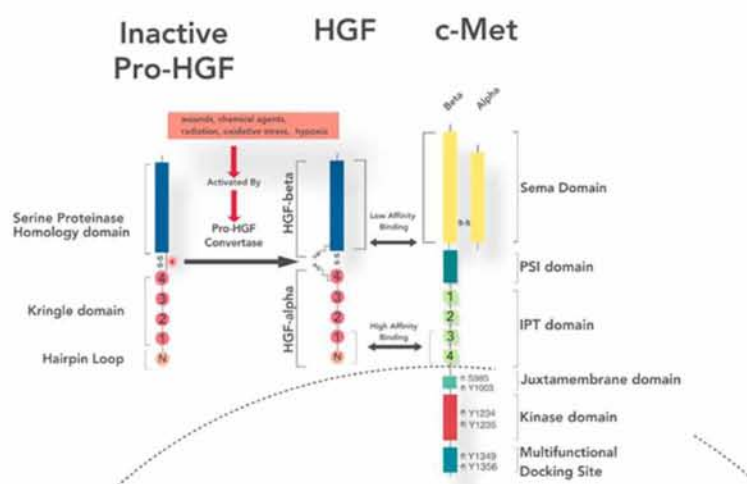
### **7.1. *To c-Met***

Ο υποδοχέας κινάσης τυροσίνης (RTK) c-Met, ανακαλύφθηκε πρώτη φορά ως το προϊόν μετασχηματισμού ενός γονιδίου που παράγεται από μία κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος (Cooper et al. 1984). Το 1991 ανακαλύφθηκε ότι το c-Met ήταν ο υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων (HGF) και το γονίδιο του

τοποθετείται στο χρωμόσωμα 7. Από την ανακάλυψη του και έπειτα μία ποικιλία ερευνών έχει συσχετίσει την δυσλειτουργία του υποδοχέα αυτού και της επακόλουθης σηματοδότησης, με μία ποικιλία κακοηθιών αλλά και προ-κακοηθών αλλοιώσεων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που εμφανίζονται στο μαστό, στο πνεύμονα, στο παχύ έντερο και τον τράχηλο (Ho-Yen et al. 2015). Η χρησιμότητα στόχευσης του c-Met σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου αξιολογείται τώρα σε κλινικές δοκιμές και χρήζει ιδιαίτερου ενδιαφέροντος.

## 7.2. Δομή και λειτουργία του c-Met

Το c-Met, αρχικά, παράγεται ως ένα πρόδρομο μόριο 170 kDa το οποίο στη συνέχεια υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση, δημιουργώντας μια εξωτερική,  $\alpha$  – υπομονάδα 50kDa και μία διαμεμβρανική,  $\beta$  – υπομονάδα 145kDa (**Εικόνα 6**). Η εξωτερική υπομονάδα συνδέεται με την διαμεμβρανική μέσω ενός δισουλφιδικού δεσμού. Η ενδοκυτταρική περιοχή του υποδοχέα αποτελείται από τις εξής τρεις περιοχές: την μεμβρανομεμβρανική, την καταλυτική περιοχή και την πολυλειτουργική θέση σύνδεσης στο καρβοξυτελικό άκρο (**Εικόνα 6**) (Arnold et al. 2017).



**Εικόνα 6.** Δομή c-Met υποδοχέα καθώς και του προσδέτη του HGF (Arnold et al. 2017)

Το μοναδικό γνωστό μόριο σύνδεσης του c-Met υποδοχέα είναι ο HGF. Όταν ο HGF προσδέεται στο c-Met προκαλείται αυτοφωσφορίλωση της καταλυτικής περιοχής του υποδοχέα και ενεργοποίησή του. Η φωσφορυλίωση αυτή επιτρέπει την πρόσδεση μορίων τα οποία θα ενεργοποιήσουν σηματοδοτικά μονοπάτια μέσα στο κύτταρο, ρυθμίζοντας έτσι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κινητικότητα, τη

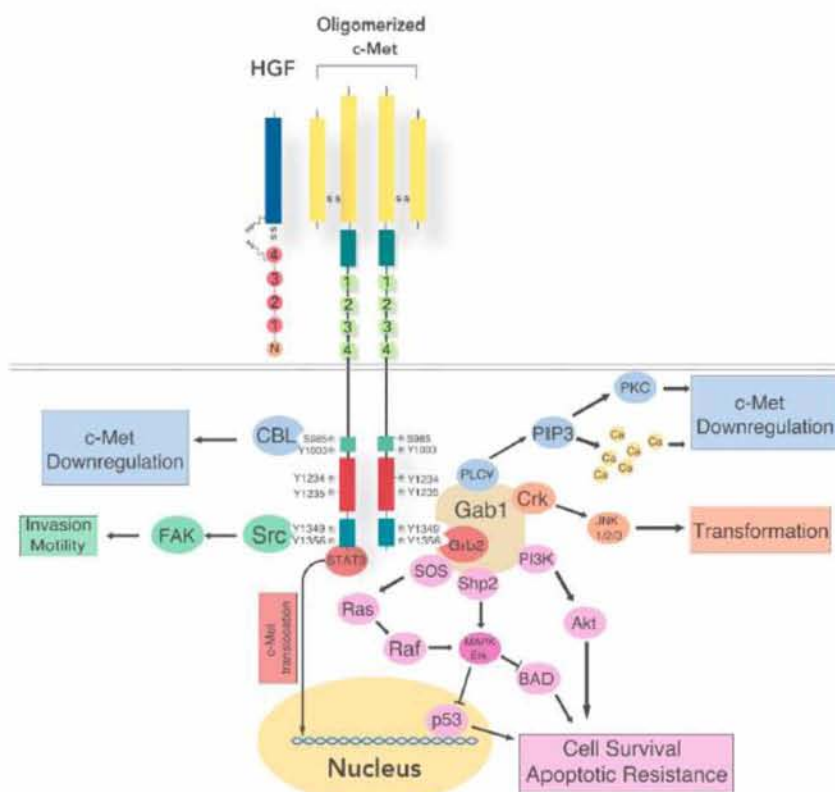
μετανάστευση, τη διήθηση αλλά και την καρκινογένεση των κυττάρων (Gherardi et al. 2012).

Στην ανάπτυξη του μαστού η σηματοδότηση c-Met έχει διαφορετικά αποτελέσματα σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Η έκθεση των επιθηλιακών κυττάρων του αγωγού και των μυοεπιθηλιακών κυττάρων στο HGF έχει αντίθετα αποτελέσματα. Ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων των αγωγών αυξάνεται σε πενταπλάσιο ή και εννεαπλάσιο βαθμό ύστερα από έκθεση τους στο HGF ενώ στα μυοεπιθηλιακά κύτταρα δεν παρατηρείται καμία επίδραση στο ρυθμό αύξησης τους. Η ανάλυση RT-PCR έδειξε ότι η έκφραση του c-Met ήταν υψηλότερη στα κύτταρα του αυλού από ότι στα μυοεπιθηλιακά κύτταρα, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει αυτές τις διαφορές. Γενικά, πολλές μελέτες έχουν τονίσει τη σπουδαιότητα της c-Met σηματοδότησης στην ανάπτυξη του μαστού, η υπερέκφραση του οποίου οδηγεί σε σημαντική αύξηση των διακλαδώσεων των αγωγών, καθώς και σημαντική αύξηση του μεγέθους των λοβών (Yant et al. 1998).

Μια ποικιλία κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού (BCLs) έχει χρησιμοποιηθεί για να μελετηθεί ο ρόλος του HGF και του c-Met σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του καρκίνου. Πέραν του αυξημένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού που προκαλεί ο HGF, μέσω της c-Met σηματοδότησης, γεγονός που ευνοεί την καρκινογένεση, η σηματοδότηση αυτή έχει δειχθεί ότι συμμετέχει και σε πολλές προ-μεταστατικές και προ-διηθητικές διεργασίες (Hiscox et al. 2000). Έχει δειχθεί ότι η έκθεση MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων στον HGF παράγοντα αυξάνει τη διήθηση και την μετάσταση μειώνοντας τα επίπεδα E-καντερίνης στην επιφάνεια των κυττάρων (Hung et al. 2011). Επίσης, η έκθεση αυτή οδηγεί και στον σχηματισμό λαμελιποδίων αλλά και στην έκκριση αρκετών πρωτεολυτικών ενζύμων που αποικοδομούν την εξωκυττάρα ουσία και αυξάνουν την κινητικότητα των κυττάρων (60,66 1). Τέλος, η σηματοδότηση c-Met φαίνεται να έχει αντι-αποπτωτική δράση (X. Wang et al. 2002).

Η c-Met σηματοδότηση ξεκινάει όταν ο υποδοχέας c-Met έρθει σε επαφή με τον προσδέτη του HGF. Η σύνδεση αυτή προκαλεί αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα, σε συγκεκριμένα κατάλοιπα τυροσίνης, και ενεργοποίησή του. Οι φωσφορυλιωμένες περιοχές του υποδοχέα αρχίζουν να αλληλεπιδρούν με διάφορες ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων της Grd2 (growth factor receptor-bound protein 2), SHC (src homology/collagen), Gab1 (Grb2-associated adaptor protein) και CT10 (chicken tumor virus No. 10) (**Εικόνα 7**). Η φωσφορυλίωση και

ενεργοποίηση αυτών των πρωτεϊνών είναι υπεύθυνη για τις μοναδικές βιολογικές επιδράσεις της HGF/c-Met σηματοδότησης. Το PI3K/Akt μονοπάτι (alpha serine/threonine-protein kinase), το μονοπάτι των MAPK κινασών (mitogen-activated protein kinase) και η STAT (signal transducer and activators of transcription) σηματοδότηση αποτελούν τις καθοδικές οδούς σηματοδότησης που επηρεάζονται από την c-Met σηματοδότηση (**Εικόνα 7**) (Arnold et al. 2017).



**Εικόνα 7.** Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την c-Met/HGF σηματοδότηση (Arnold et al. 2017)

Η ενεργοποίηση των MAPK κινασών οδηγεί στην ενεργοποίηση διαδοχικά διαφορετικών κινασών με τελικό στόχο τις Erk1 και Erk2 κινάσες, τις JNK1, JNK2 και JNK3 κινάσες καθώς και το P38. Οι πρωτεΐνες αυτές θα ενεργοποιήσουν ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, προάγοντας έτσι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά και διεργασίες σημαντικές για την μετανάστευση των κυττάρων. Από την άλλη πλευρά, η απενεργοποίηση της BAD πρωτεΐνης και η αποικοδόμηση της προ-αποπτωτικής P53, μέσω της ενεργοποίησης του PI3K/Akt μονοπατιού, αυξάνει την κυτταρική επιβίωση και την αποπτωτική αντίσταση των κυττάρων (Birchmeier et al. 2003). Τέλος, η ενεργοποίηση της STAT3 μετατοπίζει τον υποδοχέα c-Met στον



πυρήνα όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας, ρυθμίζοντας γονίδια που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Arnold et al. 2017).

### 7.3. Το Σηματοδοτικό Μονοπάτι PI3K/Akt

Πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια έχουν εμπλακεί στην ανοδική ή καθοδική ρύθμιση της απόπτωσης και της αυτοφαγίας. Η σηματοδότηση PI3K/Akt είναι μια πολύ γνωστή οδός που εμπλέκεται στη ρύθμιση και των δύο αυτών διαδικασιών και μπορεί να συμβάλει στην ταυτόχρονη ή διαδοχική επαγωγή τους. Η διέγερση του άξονα PI3K/Akt καταστέλλει τόσο την αυτοφαγία όσο και την απόπτωση. Επομένως, αναστολή της σηματοδότησης αυτής προωθεί και τις δύο αυτές διαδικασίες (Zhao et al. 2015). Ένα ετεροδιμερές μόριο που ανήκει στις λιπιδικές κινάσες, η φοσφοϊνοσιτιδικής -3 κινάσης (PI3K), είναι το κύριο συστατικό αυτής της οδού. Με βάση τη δομή, τον μηχανισμό ρύθμισης και την εξειδίκευση του λιπιδικού υποστρώματος, οι PI3K μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις κατηγορίες, αλλά η κατηγορία I είναι εκείνη που απορυθμίζεται περισσότερο στον καρκίνο (Mayer and Arteaga 2016).

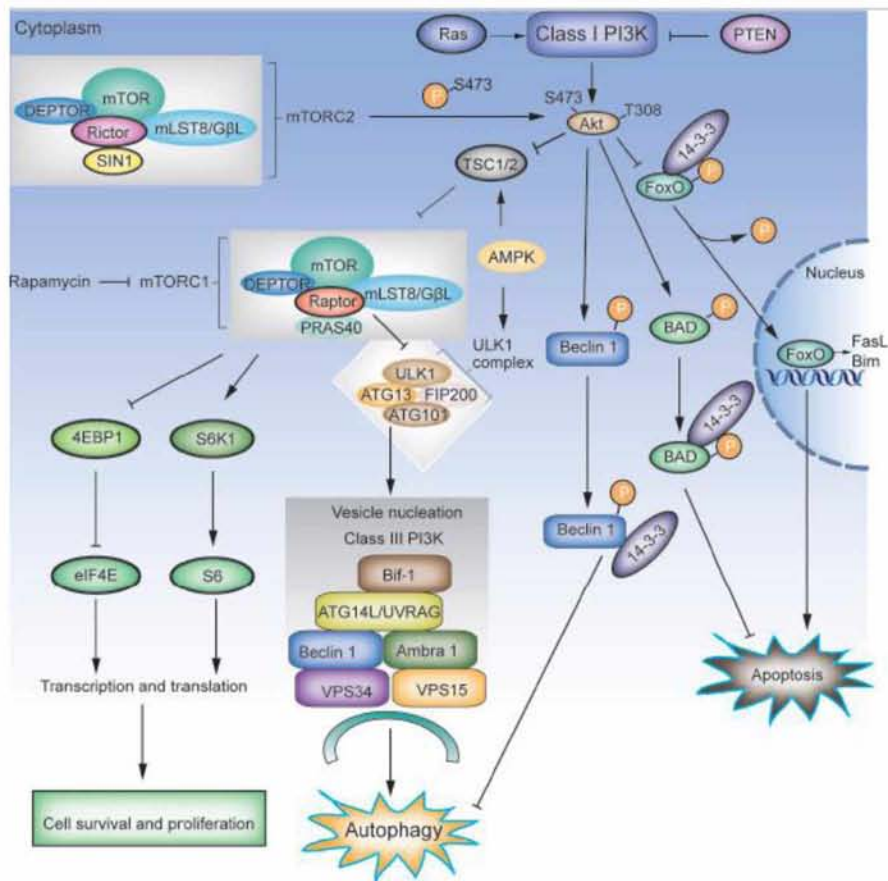
Η σηματοδότηση PI3K/Akt, πέραν της ενεργοποίησης του c-Met, ξεκινάει με την σύνδεση οποιουδήποτε αυξητικού παράγοντα σε μία ποικιλία υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (TKRs) (Massihnia et al. 2016). Στην ενεργοποιημένη μορφή του, το PI3K φωσφορυλιώνει την 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP2) σε 3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP3) η οποία θα ενεργοποιήσει την PDK1. Άμεσος στόχος της PDK1 είναι η Akt κινάση. Η Akt, με την σειρά της, μπορεί να ενεργοποιηθεί, αλλά και να καταστείλει μια ποικιλία καθοδικών πρωτεϊνών ρυθμίζοντας τόσο την απόπτωση όσο και την αυτοφαγία στο κύτταρο.

Αρχικά, η Akt μπορεί να φωσφορυλιώσει τους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας FoxO, διεγείροντας έτσι την αλληλεπίδρασή τους με τον παράγοντα 14-3-3 (**Εικόνα 8**). Η αλληλεπίδραση αυτή αναστέλλει τις προ-αποπτωτικές λειτουργίες των FoxO (Zhao et al. 2015). Την σημαντικότερη όμως επίδραση στις διαδικασίες της απόπτωσης, η Akt κινάση, την ασκεί μέσω της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών.

Υπάρχουν τρεις υποοικογένειες Bcl-2 παραγόντων, δύο εκ των οποίων έχουν προ-αποπτωτικές και αντι-αποπτωτικές δράσεις, αντίστοιχα. Στην οικογένεια των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών ανήκουν οι Bad, Bak, Bid και Bax παράγοντες, ενώ στις οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες αποτελούνται από την Bcl-2, Bcl-xL και Mcl-1. Η

οικογένεια των Bcl-2 πρωτεϊνών εντοπίζεται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη όπου, μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας, μπορεί να μεταβάλει τη διαπερατότητα της μεμβράνης των μιτοχονδρίων και να προκαλέσει απόπτωση (μιτοχονδριακή απόπτωση) (Gross et al. 1999)(Guo et al. 2015). Συγκεκριμένα, τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας τείνουν να σταθεροποιούν την μιτοχονδριακή μεμβράνη ενώ τα προ-αποπτωτικά την αποσταθεροποιούν. Η αναλογία προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών είναι ο μηχανισμός κλειδί της μιτοχονδριακής απόπτωσης. Όταν η αναλογία αυτή στρέφεται υπέρ των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών η διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης αυξάνεται έχοντας σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στο κυττόςόλιο. Στις πρωτεΐνες αυτές συμπεριλαμβάνεται το κυτόχρωμα c, που προάγει τον σχηματισμό του αποπτωσώματος, η κασπάση 9 και η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι η ενεργοποίηση της κασπάσης 9 και η απόπτωση του κυττάρου. Επιπλέον του κυτοχρώματος, η Smac, μια άλλη διαμεμβρανική πρωτεΐνη που απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια, προάγει την απόπτωση δεσμεύοντας και ανταγωνίζοντας τις πρωτεΐνες αναστολής της απόπτωσης (IAP).

Η PI3K/Akt σηματοδότηση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση των πρωτεϊνών Bcl-2. Η Bad πρωτεΐνη αποτελεί άμεσο στόχο της Akt κινάσης, ενεργοποίηση της οποίας θα οδηγήσει στην φωσφορυλίωση της Bad. Μόλις η πρωτεΐνη Bad φωσφορυλιωθεί αυξάνεται η ικανότητα αλληλεπίδρασης της με τον παράγοντα 14-3-3, ο οποίος καταστέλλει την Bad και συνεπώς, τις προ-αποπτωτικές τις λειτουργίες στο κύτταρο. Από την άλλη πλευρά, η ενεργοποίηση της Akt θα οδηγήσει στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα CREB. Ο CREB είναι ο πρωταρχικός ενεργοποιητής της μεταγραφής του αντι-αποπτωτικού γονιδίου Bcl-2, καθώς συνδέεται σε ειδική περιοχή του προμώτορα του γονιδίου και επάγει την μεταγραφή του (Guo et al. 2015). Το Bcl-2 μπορεί να ελέγξει την διαπερατότητα των μιτοχονδρίων μέσω της ικανότητάς του να αναστέλλει το σχηματισμό ομο- ή ετερο-ολιγομερών των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας, τα οποία θα οδηγούσαν στη συναρμολόγηση ενός διαπερατού πόρου στην επιφάνεια των μιτοχονδρίων (Fulda 2014).



**Εικόνα 8.** Καθοδικά μονοπάτια της PI3K/Akt σηματοδότησης (Zhao et al. 2015)

Η ρύθμιση της αυτοφαγίας από το Akt πραγματοποιείται μέσω του συμπλέγματος mTOR, το οποίο υπάρχει σε δύο διακριτά, λειτουργικά σύμπλοκα, το mTORC1 και mTORC2. Συγκεκριμένα, η Akt κινάση φωσφοριλιώνει την TSC2 και καταστέλλει το σύμπλοκο TSC1 / TSC2, αναιρώντας έτσι την κατασταλτική δράση που ασκεί στο mTORC1 (**Εικόνα 8**). Το mTORC1 ενεργοποιείται ως απάντηση στην επάρκεια θρεπτικών ή αυξητικών παραγόντων και οδηγεί σε καταστολή της αυτοφαγίας, αύξηση της μεταγραφής και γενικότερα της βιοσύνθεσης του κυττάρου. Από την άλλη πλευρά, το σύμπλοκο mTOR2 εμπλέκεται στην οργάνωση του κυτταροσκελετού και, ταυτόχρονα, ρυθμίζει την φωσφορυλίωση της Akt κινάσης (Zhao et al. 2015).

Το PTEN (phosphatase and tensin homolog), ένα γνωστό ογκοκατασταλτικό, ρυθμίζει την αυτοφαγία και την απόπτωση μέσω του PI3K/Akt μονοπατιού. Το PTEN αποφωσφορυλιώνει το PIP3 μετατρέποντας το πάλι σε PIP2, εμποδίζοντας έτσι την ενεργοποίηση της Akt και επιτρέποντας την έναρξη της αυτοφαγίας (Zhao et al. 2015)(Massihnia et al. 2016). Πολλές μελέτες αναφέρουν υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων στο PTEN και PI3K σε ασθενείς με TNBC σε σχέση με

άλλους ιστολογικούς υποτύπους καρκίνου του μαστού (Koboldt et al. 2012). Πέραν του PTEN πολλοί άλλοι παράγοντες ελέγχουν τους μηχανισμούς απόπτωσης και αυτοφαγίας του κυττάρου μέσω της PI3K/Akt σηματοδότησης. Ένας από αυτούς είναι και οι παράγοντες της οικογένειας Notch.

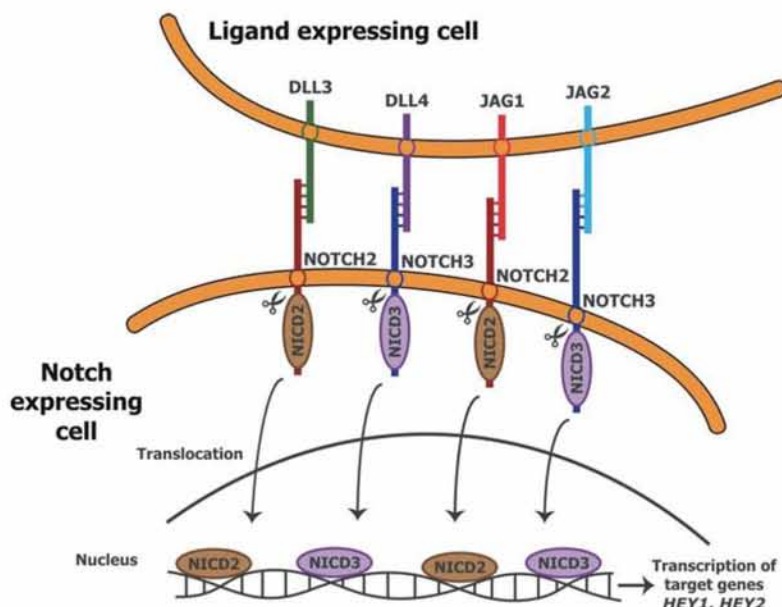
#### **7.4. Η Notch Σηματοδότηση**

Η Notch σηματοδότηση είναι αναπτυξιακά ένα πολύ συντηρημένο μονοπάτι με ρόλους στην κυτταρική διαφοροποίηση, πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων. Θεωρείται ότι εμπλέκεται σε αρκετές κακοήθειες και συμπεριφέρεται είτε ως ογκογονίδιο ή ογκοκατασταλτικό γονίδιο, ανάλογα με το είδος του κυττάρου στο οποίο εκφράζεται.

Η οικογένεια Notch είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που λειτουργούν τόσο ως διαμεμβρανικοί υποδοχείς όσο και ως μεταγραφικοί παράγοντες. Υπάρχουν 4 διακριτές ισομορφές του υποδοχέα Notch στα θηλαστικά, το Notch1, 2, 3 και 4. Οι ισομορφές αυτές είναι πανομοιότυπες μεταξύ τους και αποτελούνται από δύο τμήματα, ένα εξωκυττάριο, πλούσιο σε επαναλαμβανόμενες περιοχές με δομή ανάλογη του EGF, και ένα ενδοκυττάριο τμήμα, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους δημιουργώντας ένα ετεροδομερές (Yao and Qian 2010a).

Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί πέντε διαφορετικοί προσδέτες των υποδεχών Notch οι οποίοι ανήκουν σε δύο οικογένειες, την οικογένεια Jagged (Jagged1, Jagged2) και Delta-like (Dll1, Dll3 και Dll4) πρωτεϊνών. Και αυτές οι πρωτεΐνες είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς που εκφράζονται στην επιφάνεια γειτονικών κυττάρων (Boras et al. 2014). Η αλληλεπίδραση του Notch με τον προσδέτη του οδηγεί σε πρωτεολυτική διάσπαση του από την γ-σεγκρετάση και απελευθέρωση του ενδοκυττάρου τμήματος του υποδοχέα (NICD) στο κυτταρόπλασμα (**Εικόνα 9**). Το NICD μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας (Scheppke et al. 2012). Συγκεκριμένα, το NICD όταν εισέλθει στον πυρήνα προσδένεται στον RBP-Jκ μεταγραφικό παράγοντα και τον ενεργοποιεί, επιτρέποντας έτσι την έναρξη της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων. Τα κυριότερα γονίδια-στόχοι του Notch είναι οι οικογένειες των μεταγραφικών παραγόντων Hes και Hey. Εκτός από τον κλασικό ρόλο των NICD να ενεργοποιούν γονίδια-στόχους, η ενεργοποίηση του υποδοχέα Notch επηρεάζει και άλλα

σηματοδοτικά μονοπάτια όπως το PI3K/Akt, ERK/MAPK, Src και Ras (Yao and Qian 2010b)(W. Wang et al. 2002).



**Εικόνα 9.** Σχηματική απεικόνιση του Notch σηματοδοτικού μονοπατιού (Fragkiadaki et al. 2015)

Ανωμαλίες στη σηματοδότηση Notch έχουν συνδεθεί με διάφορες μορφές καρκίνου, όπως η λευχαιμία των T-κυττάρων, ο καρκίνος του μαστού και ο καρκίνος του πνεύμονα. Μία από τις λειτουργίες του Notch που συνδέεται με την καρκινογένεση είναι η αναστολή της απόπτωσης (Dang 2012). Η διαδικασία αυτή φαίνεται να επιτυγχάνεται μέσω του PI3K/Akt σηματοδοτικού μονοπατιού, και κυρίως στον καρκίνο του μαστού (Olivier Meurette et al. 2009).

Το Notch μονοπάτι ελέγχει την απόπτωση μέσω της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών. Έχει δειχθεί ότι το Notch επάγει την έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών ενώ καταστέλλει την έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας. Προς το παρόν δεν υπάρχουν δεδομένα που να υποστηρίζουν μία άμεση σύνδεση μεταξύ του Notch και των Bcl-2 πρωτεϊνών. Αντιθέτως, τα δεδομένα υποστηρίζουν ότι το Notch ελέγχει την έκφραση των πρωτεϊνών αυτών μέσω άλλων μονοπατιών, όπως είναι το PI3K/Akt μονοπάτι (Dang 2012).

Ο ακριβής μηχανισμός ρύθμισης του PI3K/Akt από την Notch σηματοδότηση δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός. Ένας αριθμός ερευνών υποστηρίζει ότι η Notch δεν επηρεάζει άμεσα τα μόρια PI3K ή Akt. Αντιθέτως, στοχεύει στο PTEN. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη στόχος του Notch, HES1, καταστέλλει την μεταγραφή του PTEN οδηγώντας έτσι σε αύξηση της PI3K και Akt κινάσης (Dang 2012)(Palomero

et al. 2007). Άλλες έρευνες υποστηρίζουν ότι η σηματοδότηση Notch επηρεάζουν την PI3K/Akt μέσω ενός μηχανισμού ανεξαρτήτου από τον RBP-Jκ. Συγκεκριμένα, το Notch προκαλεί μεταγραφή του υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) σε κύτταρα γλοιώματος και συνεπώς, ενεργοποίηση της PI3K σηματοδότησης (O. Meurette et al. 2009). Εντούτοις, σε MCF10A κύτταρα, η έκφραση της NICD δεν οδήγησε σε αλλαγές των επιπέδων του υποδοχέα EGF ή HER-2. Επίσης, σε T – κύτταρα έχει δειχθεί ότι το Notch αλληλεπιδρά άμεσα με το PI3K και το ενεργοποιεί. Όμως, δεν είναι απολύτως κατανοητό αν κάτι τέτοιο ισχύει και σε κύτταρα του μαστού.

Αν και δεν είναι εξακριβωμένος πλήρως ο μηχανισμός σύνδεσης των δύο αυτών μονοπατιών στα κύτταρα του μαστού, είναι ευρέως αποδεκτό ότι η Notch σηματοδότηση αυξάνει την PI3K/Akt ενεργότητα σε MCF-10A κυτταρικές σειρές (Olivier Meurette 2009). Στην διαδικασία αυτή σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει η Notch3 πρωτεΐνη, καθώς, πολλές έρευνες έχουν συσχετίσει την ενεργότητα της με το PI3K/Akt μονοπάτι σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του πνεύμονα (Guest et al. 2016), του παγκρεατικού καρκίνου (Yao and Qian 2010a) και του καρκίνου του μαστού. Όμως, όλες οι έρευνες καταλήγουν σε ένα κοινό συμπέρασμα. Η έκφραση του Notch3 ενεργοποιεί την PI3K/Akt σηματοδότηση με ένα μηχανισμό ανεξάρτητο από το RBP-Jκ μεταγραφικό παράγοντα.

## ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της έκφρασης microRNAs σε καρκινικές κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον φαινότυπό τους (παρουσία ή απουσία ERα, HER2/neu και OR υποδοχέων) καθώς και η συμβολή των υπό μελέτη microRNAs στον καρκίνο του μαστού μέσω της ρύθμισης γονιδίων που ενέχονται σε διάφορες βιολογικές λειτουργίες του κυττάρου. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν:

- Καλλιέργειες της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς MCF-12F και των καρκινικών κυτταρικών σειρών MCF-7 και MB-231. Η κυτταρική σειρά MCF-7 παρομοιάζεται με τους ERα- και PR- θετικούς όγκους (ERα<sup>+</sup>, PR<sup>+</sup>, HER2<sup>-</sup>) ενώ η κυτταρική σειρά MB-231 προσομοιάζει με τους τριπλά αρνητικούς όγκους του μαστού (ERα<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, HER2<sup>-</sup>).
- Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης των microRNAs, miR-1 και miR-206, στις καρκινικές σειρές MCF-7 και MB-231, καθώς και στη φυσιολογική κυτταρική σειρά MCF-12F.
- Βιοπληροφορική ανάλυση για την ανάδειξη των γονιδίων-στόχων των microRNAs, miR-1 και miR-206, καθώς και των σηματοδοτικών μονοπατιών και των βιολογικών διεργασιών στα οποία ενέχονται.
- Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων-στόχων c-Met, Bcl-2 και Notch3 στις καρκινικές σειρές MCF-7 και MB-231 καθώς και στη φυσιολογική κυτταρική σειρά MCF-12F
- Ο ρόλος του miR-206 στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων c-Met, Bcl-2 και Notch3 μετά από χορήγηση του miR-206 στην καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7.
- Ο ρόλος του miR-206 στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων c-Met, Bcl-2 και Notch3 μετά από χορήγηση του miR-206 στην καρκινική κυτταρική σειρά MB-231.

## ***B. Ειδικό μέρος***



## **ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **1. Κυτταρικές Σειρές**

Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινες επιθηλιακές κυτταρικές σειρές MCF-12F, καθώς και ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού MB-231 και MCF-7. Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές παρουσιάζουν διαφορές όσον αφορά στην γονιδιακή έκφραση του α-υποδοχέα των οιστρογόνων (ERα), του υποδοχέα της προγεστερόνης (PgR), καθώς επίσης και του υποδοχέα του ανθρώπινου επιθηλιακού αυξητικού παράγοντα (HER2). Συγκεκριμένα, στις MB-231 κυτταρικές σειρές δεν παρατηρείται έκφραση των παραπάνω υποδοχέων, χαρακτηριστικό του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού, ενώ στις MCF-7 παρατηρείται έκφραση μόνο του υποδοχέα των οιστρογόνων α (ERα) και της προγεστερόνης (Subik et al. 2010).

### **2. Κυτταροκαλλιέργειες**

Τα κύτταρα στην καλλιέργεια διατηρούνται και πολλαπλασιάζονται σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και θρεπτικού υλικού. Για την καλλιέργεια των τριών κυτταρικών σειρών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (Gidco, Paisley, Scotland, UK). Το θρεπτικό υλικό πριν τη χρήση του εμπλουτίζεται με ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco) σε αναλογία 5% και L- Γλουταμίνη (L-Glutamine), σε αναλογία 1%, τα οποία παρέχουν τους απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς επίσης και με αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (penicillin-streptomycin, P/S), σε αναλογία 1% του όγκου του θρεπτικού.

Η ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε σε φλάσκες 25ml μέσα σε επωαστικό κλίβανο, ο οποίος παρέχει σταθερή θερμοκρασία 37°C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα με 5% CO<sub>2</sub>. Όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων γίνονται σε στείρες συνθήκες με την χρήση απαγωγού νηματικής ροής (hood).

Κατά την ανάπτυξή τους τα κύτταρα προσκολλούνται στην επιφάνεια δημιουργώντας μία μονή στιβάδα (Attached Monolayer Cell Culture). Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε με μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης. Όταν η περιεκτικότητα των

κυττάρων στην φλάσκα φθάσει το 80-90% πραγματοποιείται θρυψινοποίηση και ανακαλλιέργεια των κυττάρων. Η ανακαλλιέργεια των καρκινικών κυτταρικών σειρών γινόταν κάθε 3 με 4 ημέρες, ενώ των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων περίπου κάθε 15 ημέρες καλλιέργειας. Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας γίνεται με σκοπό να απομακρυνθούν τα τοξικά απόβλητα των κυττάρων, να ανανεωθεί το θρεπτικό και να διατηρούνται τα κύτταρα στο απαραίτητο ποσοστό για την ομαλή ανάπτυξή τους.

Για την διαδικασία της ανακαλλιέργειας ακολουθείται η εξής διαδικασία:

1. Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού της φλάσκας
2. Πλύση των κυττάρων με 5ml ρυθμιστικού διαλύματος Phosphate Buffer Saline χωρίς  $\text{CaCl}_2$  και  $\text{MgCl}_2$  (PBS, Lonza)
3. Προσθήκη στη φλάσκα 1,5ml Θρυψίνης προθερμασμένης στους  $37^\circ\text{C}$ . Στο στάδιο αυτό το πώμα της φλάσκας σφραγίζεται και η φλάσκα τοποθετείται στον κλίβανο για περίπου 5 λεπτά. Ο συνολικός χρόνος παραμονής των κυττάρων στη θρυψίνη δεν πρέπει να ξεπερνά τα 10 λεπτά
4. Παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο και επιβεβαίωση της αποκόλλησής τους από την επιφάνεια της φλάσκας
5. Προσθήκη 5ml πλήρους θρεπτικού RPMI. Η προσθήκη πλήρους θρεπτικού γίνεται με σκοπό να αναστείλει τη δράση της θρυψίνης. Μεταφορά των κυττάρων σε σωληνάρια των 15ml και φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές, για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT)
6. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml PBS
7. Επαναδιάλυση των κυττάρων και φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για 7 λεπτά σε RT
8. Απομάκρυνση του υπερκειμένου
9. Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 2ml πλήρες θρεπτικό
10. Προσθήκη 1ml εναιωρήματος σε κάθε φλάσκα και 4ml πλήρους θρεπτικού (τελικός όγκος καλλιέργειας 5ml)
11. Η φλάσκα τοποθετείται στον κλίβανο με ελαφρώς ανοικτό το πώμα και τις επόμενες μέρες ελέγχεται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων.

Εάν τα κύτταρα δεν έχουν αναπτυχτεί επαρκώς ώστε να καλύπτουν το 80 με 90% της επιφάνειας της φλάσκας, όμως το θρεπτικό υλικό είχε μεταβολιστεί, τότε αντί για ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται ανανέωση θρεπτικού κατά την οποία απομακρύνεται το παλιό μεταβολισμένο θρεπτικό και προστίθεται νέο.

### **3. Χειρισμοί Κυττάρων**

#### **3.1. Πάγωμα Κυττάρων**

Όταν από τις καλλιέργειες ληφθεί ο επιθυμητός αριθμός κυττάρων για την διεξαγωγή των περαιτέρω πειραμάτων της μελέτης τα κύτταρα αποθηκεύονται για μελλοντική χρήση. Η ψύξη των κυττάρων πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει το 80-90% της επιφάνειας της φλάσκας και γίνεται βαθμιαία, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός κρυστάλλων πάγου στο εσωτερικό τους και να ελαχιστοποιηθεί η απώλεια νερού, τα οποία θα ήταν θανατηφόρα για τα κύτταρα. Προκειμένου να επιτευχθεί η σωστή ψύξη των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε ο κρυοπροστατευτικός παράγοντας DMSO (Dimethylsulfoxide 99.8%, ο οποίος δημιουργεί ένα βραδύτερο ρυθμό ψύξης.

Το DMSO χορηγείται μαζί με όρο (90% ορός + 10% DMSO) κατασκευάζοντας το freezing medium.

Η διαδικασία του παγώματος είναι παρόμοια με αυτή της ανακαλλιέργειας. Τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια της φλάσκας με τη χρήση της θρυψίνης, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Η δράση της θρυψίνης αναστέλλεται με την προσθήκη πλήρους θρεπτικού και ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων. Μετά την φυγοκέντρηση, αποχύνεται το υπερκείμενο και διατηρείται το ίζημα (κύτταρα) το οποίο ξεπλένεται με PBS χωρίς  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$ . Ακολουθεί φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του PBS μέχρι και την τελευταία σταγόνα. Στο ίζημα προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα freezing medium. Ακολουθεί καλή ανάδευση των κυττάρων και μεταφορά του εναιωρήματος σε cryovial. Τα cryovials αρχικά τοποθετούνται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για 3 ώρες, έπειτα στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 4-5 ημέρες και τέλος στους  $-150^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.2. Ξεπάγωμα Κυττάρων**

Σε αντίθεση με την διαδικασία ψύξης των κυττάρων, η οποία είναι διαδοχική, η διαδικασία απόψυξης τους γίνεται με γρήγορο ρυθμό. Για το ξεπάγωμα των κυττάρων ακολουθείται η εξής διαδικασία:

1. Μεταφορά των cryovials από την κατάψυξη κατευθείαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας  $37^{\circ}\text{C}$

2. Άμεση μεταφορά του περιεχομένου σε σωληνάρια των 15ml τα οποία περιέχουν 5ml πλήρες θρεπτικό υλικό.
3. Φυγοκέντρηση των σωληναρίων για 5 λεπτά στις 2000 στροφές σε RT
4. Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναδιάλυση ιζήματος με 5 ml πλήρες θρεπτικό υλικό
5. Τοποθέτηση του εναιωρήματος σε φλάσκα και τέλος, στον επωαστικό κλίβανο.

#### **4. Απομόνωση Ολικού Κυτταρικού RNA από Κυτταροκαλλιέργειες**

Προκειμένου να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη microRNAs (miR-1 και miR-206), καθώς και των γονιδίων-στόχων τους (c-Met, Notch3, Bcl2), απομονώθηκε ολικό RNA από τις καλλιέργειες των κυτταρικών σειρών με την εξής διαδικασία:

1. Όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει το 80-90% της επιφάνειας της φλάσκας απομακρύνεται το θρεπτικό και προστίθεται 1 ml Trizol
2. Ξέπλυμα της επιφάνειας της φλάσκας με το Trizol
3. Μεταφορά του περιεχομένου της φλάσκας σε σωληνάρια των 2 ml
4. Έντονο vortex με στόχο τη λύση των κυττάρων. Προσθήκη 0,2 ml χλωροφορμίου και έντονο vortex
5. Επώαση των δειγμάτων για 3 λεπτά σε RT
6. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C)
7. Μετά τη φυγοκέντρηση σε κάθε σωληνάριο υπάρχουν τρεις φάσεις: η υποκείμενη φάση (Trizol, χλωροφόρμιο, υπολείμματα κυτταρικών μεμβρανών, πρωτεΐνες), η μεσόφαση (DNA) και η ανώτερη υδατική φάση στην οποία έχει απομονωθεί το RNA
8. Μεταφορά της ανώτερης υδατικής φάσης, που περιέχει το RNA σε νέο σωληνάριο των 2 ml
9. Προσθήκη 500μl κρύας ισοπροπανόλης για να γίνει η κατακρήμνιση του RNA Επώαση των δειγμάτων για 10 λεπτά σε πάγο
10. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία των 4°C)
11. Αφαίρεση υπερκειμένου και προσθήκη στο ίζημα 500 μl κρύας αιθανόλης 70%
12. Φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία των 4°C)

13. Αφαίρεση του υπερκλειμένου και επώαση των δειγμάτων στον κλίβανο με σκοπό να απομακρυνθεί όλη η αιθανόλη
14. Επαναδιάλυση των δειγμάτων με 30 μl ddH<sub>2</sub>O
15. Επώαση των δειγμάτων στο υδατόλουτρο για 10 λεπτά στους 55–60 °C.
16. Αποθήκευση του RNA στους -80° C.

### 5. Σύνθεση Συμπληρωματικού DNA (cDNA Synthesis)

Τα δείγματα RNA που απομονώθηκαν μετατράπηκαν *in vitro* σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription, RT). Για τη διαδικασία αυτή, ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν είτε ολιγονουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (random primers) είτε ολιγονουκλεοτίδια γνωστής αλληλουχίας (stem loop RT primer), έτσι ώστε να ενισχυθεί η περιοχή που περιέχει το microRNA που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση είναι η αντίστροφη μεταγραφάση MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase, 200U/μl).

**Πίνακας 2.** Αλληλουχίες των stem loop για κάθε microRNA και για το μικρό πυρηνικό U6

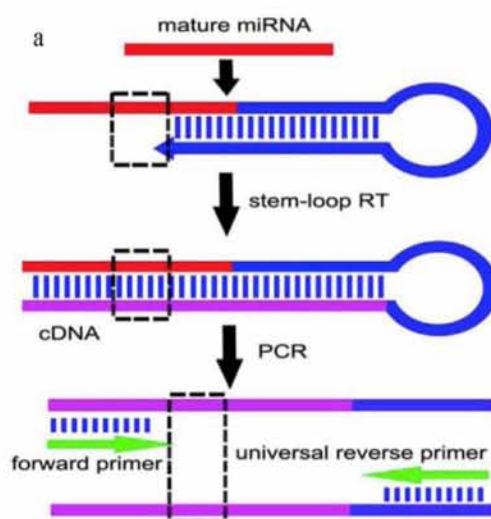
Γονίδιο	Stem loop
miR-1	5'-GCC-CGC-TGG-AAT-GTA-AAG-AAG-TATG-3'
miR-206	5'-GTC-AGA-AGG-AAT-GAT-GCA-CAG-CCA-ACA-ACA-3'
mpU6	5'-CAC-GGA-AGC-CCT-CAC-ACC-GTG-TCG-TTC-3'

Η μετατροπή 1μg RNA σε cDNA πραγματοποιείται σε δύο φάσεις και περιέχει τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- Στην 1<sup>η</sup> φάση ανά δείγμα προστίθενται τα εξής αντιδραστήρια:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (μl)
dH <sub>2</sub> O	11,5
DNTPs	1,0
Stem loop primer/ Random primers	1,0
RNA	1,5
<b>Σύνολο</b>	<b>15</b>

Στην περίπτωση των microRNAs σε κάθε αντίδραση θα παραχθεί η συγκεκριμένη αλληλουχία cDNA που περιέχει το microRNA για το οποίο είναι ειδικός ο Stem loop primer που έχει χρησιμοποιηθεί (**Εικόνα 10**). Συνεπώς, ανάλογα με τα microRNA που επιθυμούμε να μελετήσουμε παρασκευάζουμε και τα αντίστοιχα cDNA.



**Εικόνα 10.** Η αρχή της stem-loop RT-PCR. Ο stem loop primer σχεδιάζεται για να αυξήσει το μήκος των ώριμων miRNAs. Ο forward primer της PCR σχεδιάζεται από τα miRNAs στόχους ενώ, ο universal reverse primer σχεδιάζεται με βάση την αλληλουχία του stem loop. Τα τετράγωνα με την διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύουν τις βάσεις που δεν περιλαμβάνονται στους primers (Gao et al. 2012)

Για την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων πραγματοποιείται ενίσχυση αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων τα οποία εκφράζονται πάντα στα υπό ανάλυση κύτταρα (μετάγραφα “αναφοράς”). Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιείται το mRNA του γονιδίου GAPDH (Glyxeraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, καθώς και του U6 small nuclear RNA (RNU6B) για την περίπτωση των microRNAs.

Το παραπάνω διάλυμα θερμαίνεται για 5 λεπτά στους 65° C με σκοπό την αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών του RNA.

Ψύξη του διαλύματος στους 4° C για 5 λεπτά για τη σταθεροποίηση των αποδιαταγμένων δευτεροταγών δομών του RNA

- Στην 2<sup>η</sup> φάση για κάθε δείγμα παρασκευάζεται το εξής mix:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)
5x buffer	4
DTT	2
M-MLV	1
Σύνολο	7

1. 7 μl από το παραπάνω μίχ προστίθενται σε κάθε δείγμα της φάσης 1
2. Καλή ανάδευση και τοποθέτηση των δειγμάτων στον κυκλοποιητή όπου εφαρμόζονται οι ακόλουθες συνθήκες:
  - 37° C , 2 λεπτά
  - 25° C , 10 λεπτά
  - 37° C , 50 λεπτά
  - 70° C , 15 λεπτά
  - Τελική θερμοκρασία: 4° C
3. Τα cDNA, αφού παραχθούν, μπορούν να φυλαχθούν στους -20° C για μεγάλο χρονικό διάστημα.

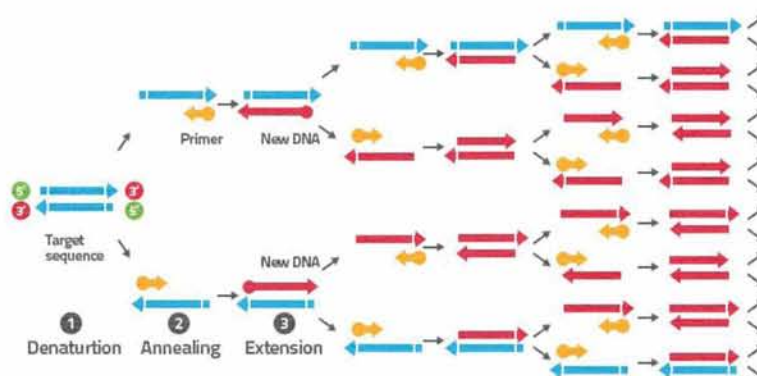
## 6. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (*Polymerase Chain Reaction, PCR*)

Στόχος της παρασκευής cDNA, στη συγκεκριμένη μελέτη, είναι η ποσοτικοποίηση της ώριμης μη κωδικής αλληλουχίας RNA, των υπό μελέτη microRNAs καθώς και του μικρού πυρηνικού RNA U6 (RNU6B), αλλά και των ώριμων mRNA των γονιδίων-στόχων, που εκφράζονται στο αρχικό δείγμα ελέγχου. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR). Πριν όμως το σημείο αυτό, τα δείγματα πρέπει να ελεγχθούν για να διαπιστωθεί η σωστή παρασκευή cDNA αλλά και οι άριστες συνθήκες στις οποίες οι primers προσδένονται σωστά στη περιοχή στόχο με αποτέλεσμα την αποφυγή παρασκευής μη ειδικού προϊόντος κατά τη διαδικασία της real-time PCR. Οι έλεγχοι αυτοί πραγματοποιούνται μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού των υπό μελέτη περιοχών.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία για τη παρασκευή πολλών αντιγράφων μίας συγκεκριμένης περιοχής DNA. Βασίζεται στην *in vitro*

ενζυμική αναπαραγωγή του DNA χωρίς τη χρήση ζωντανών οργανισμών. Το απαραίτητο ένζυμο για τη διαδικασία αυτή είναι η Taq DNA πολυμεράση η οποία πολλαπλασιάζει τμήματα DNA που οριοθετούνται μεταξύ δύο εκκινητών – ολιγονουκλεοτιδίων (primers). Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή είναι συμπληρωματική προς τη μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA – εκμαγείου. Η αντίδραση περιλαμβάνει 20 – 40 επαναλαμβανόμενους κύκλους που ο κάθε ένας αποτελείται από τα εξής στάδια:

1. Αποδιάταξη του εκμαγείου – DNA (denaturation)  
Συνθήκες συνθήκες: 94°C – 96°C, 20" – 60"
2. Σύνδεση εκκινητών με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλυσίδες (primer annealing).  
Συνθήκες συνθήκες: 37°C – 65°C, 20" – 60"  
Οι ακριβής θερμοκρασία στο στάδιο αυτό καθορίζεται από την αλληλουχία των εκκινητών και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή ειδικού προϊόντος
3. Επιμήκυνση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5'→ 3' (extension).  
Συνθήκες συνθήκες: 72°C, 0.5 – 2 min



**Εικόνα 11.** Στάδια αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού (PCR)  
[https://theory.labster.com/PCR\\_Polymerase\\_Chain\\_Reaction\\_AG/](https://theory.labster.com/PCR_Polymerase_Chain_Reaction_AG/)



Για την διαδικασία της PCR, για κάθε δείγμα, παρασκευάζεται το εξής διάλυμα:

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητες (μl)</b>
<b>Hotstart</b>	12,5
<b>Primer Forward</b>	1
<b>Primer Reverse</b>	1
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	7,5
<b>cDNA</b>	3
<b>Σύνολο</b>	25

Ο χρόνος παραμονής στο κάθε στάδιο της αντίδρασης εξαρτάται κυρίως από το μήκος (σε bp) του υπό μελέτη τμήματος DNA. Το προϊόν επιμήκυνσης του κάθε εκκινητή σε ένα κύκλο αντίδρασης αποτελεί εκμαγείο για τον άλλο εκκινητή στον επόμενο κύκλο. Μετά από *n* κύκλους το προϊόν της PCR περιέχει 2<sup>*n*</sup> δίκλιωνα μόρια DNA πανομοιότυπα με την αλληλουχία στόχο.

### **7. Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα Αγαρόζης 3%**

Ο έλεγχος των προϊόντων της PCR , δηλαδή η παρουσία ή όχι ειδικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3% με μάρτυρα πρότυπων μοριακών βαρών 100bp. Η διάκριση της ζώνωσης των δειγμάτων πάνω στο πήκτωμα της αγαρόζης έγινε με την χρήση μικρής ποσότητας βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των 2 αλυσίδων του DNA καθιστώντας το ορατό όταν εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

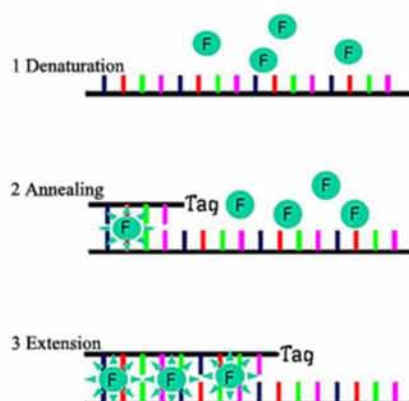
### **8. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR)**

#### **8.1. Αρχή της Μεθόδου**

Η ποσοτική PCR (Quantitative PCR, QPCR) είναι μια γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος, η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων. Υπάρχουν δύο είδη ποσοτικής PCR: η τελικού σημείου (endpoint) και η πραγματικού χρόνου (Real-Time) PCR. Στη Real-Time PCR, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της

αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού μίας φθορίζουσας ουσίας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ως φθορίζουσα ουσία χρησιμοποιήθηκε η SYBR green I. Η SYBR green I δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα. Ωστόσο, η ενσωμάτωσή της στο DNA, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος και συνεπώς, αυξάνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του.

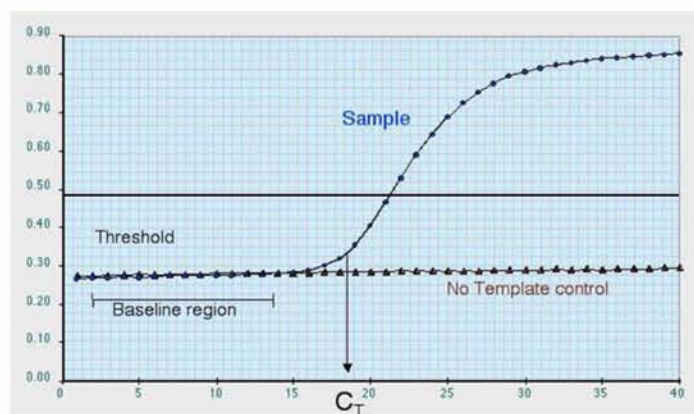
Επιπλέον η SYBR green I επιτρέπει και ποιοτική ανάλυση, με βάση τη μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος, δεδομένου ότι κάθε προϊόν ανάλογα με το μέγεθος του έχει μια χαρακτηριστική θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ). Το κύριο μειονέκτημα της χρωστικής SYBR green I είναι ότι συνδέεται και στα μη ειδικά προϊόντα, οπότε πρέπει να γίνεται σαφής διαφοροποίηση μεταξύ των ειδικών και μη ειδικών προϊόντων, όταν πραγματοποιούμε ανάλυση της καμπύλης τήξης.



**Εικόνα 12.** Δράση της χρωστικής SYBR green I στην RT-PCR.

<http://www.sinobiological.com/real-time-pcr-service-gene-expression-analysis-by-qpcr-cro-service.html>

Ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot) που επιτρέπει την παρακολούθηση όλη της διαδικασίας της αντίδρασης. Η καμπύλη ενίσχυσης της Real Time PCR διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού.



**Εικόνα 13.** Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης, όπου διακρίνονται η εκθετική, η γραμμική και η φάση κορεσμού <http://cbc.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture12.html>

Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή  $C_T$  (threshold cycle), η οποία είναι ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή  $C_T$  είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή αυτή τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (Bustin et al., 2005; Kubista et al., 2006).

## 8.2. Ποσοτικός Προσδιορισμός

Στη παρούσα μελέτη για την ποσοτικοποίηση των μεταφράφων χρησιμοποιείται η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης. Στη περίπτωση αυτή πραγματοποιείται σύγκριση των  $C_T$  τιμών των δειγμάτων προς ανάλυση με τις αντίστοιχες τιμές ενός δείγματος-αναφοράς. Οι τιμές  $C_T$  τόσο των δειγμάτων προς εξέταση όσο και του δείγματος-αναφοράς, κανονικοποιούνται ως προς τις αντίστοιχες τιμές του ενδογενούς γονιδίου-ελέγχου. Η κανονικοποίηση ως προς το ενδογενές γονίδιο απαιτείται για τη διόρθωση των πιθανών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων, οι οποίες οφείλονται σε διαφορετική συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (cDNA) ή σε διαφορές στην αποδοτικότητα της αντίδρασης ενίσχυσης.

Η μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης ορίζεται από την εξίσωση  $2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-[\Delta\Delta CT]}$ , όπου  $\Delta\Delta CT = \Delta\Delta CT_{\text{δείγματος}} - \Delta\Delta CT_{\text{αναφοράς}}$ . Η  $\Delta\Delta CT_{\text{δείγματος}}$  είναι η κανονικοποιημένη τιμή  $C_T$  για κάθε δείγμα, ως προς την αντίστοιχη τιμή του

ενδογενούς γονιδίου έκφρασης, ενώ η τιμή  $\Delta CT_{\text{αναφοράς}}$  είναι αντίστοιχα, η κανονικοποιημένη τιμή CT για το δείγμα αναφοράς. Εξ' ορισμού, για το δείγμα αναφοράς ισχύει ότι  $2^{-\Delta\Delta CT} = 2^0 = 1$ , οπότε η διαφορά στην έκφραση του γονιδίου στόχου στο δείγμα αναφοράς σε σχέση με τον εαυτό του ισούται με 1. Οι αντίστοιχες εξισώσεις για τα υπόλοιπα δείγματα δείχνουν πόσες φορές είναι αυξημένη ή μειωμένη η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-στόχου στα δείγματα αυτά, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (Livak and Schmittgen, 2001).

### 8.3. Περιγραφή Μεθοδολογίας

Πριν την αντίδραση, το cDNA κάθε δείγματος που αφορούσε τα microRNAs και το μικρό πυρηνικό U6 αραιώθηκε με dH<sub>2</sub>O σε αναλογία 1:100. Τα cDNA των γονιδίων-στόχων (Notch3, c-Met, Bcl2) αραιώθηκαν με την προσθήκη 30  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O. Από τα αραιωμένα αυτά δείγματα χρησιμοποιήθηκε όγκος που αντιστοιχεί σε 1  $\mu$ g RNA.

Για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των miR-1 και miR-206, καθώς επίσης και των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων Notch3, c-Met και Bcl-2 χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα Power SYBR Green (Applied Biosystems Foster, CA), στη συσκευή ABI 7300 (Applied Biosystems Foster, CA), ενώ οι ειδικοί για κάθε αντίδραση εκκινητές καθώς και οι εκάστοτε συνθήκες αναφέρονται στον **Πίνακα 3**.

**Πίνακας 3.** Αλληλουχίες εκκινητών, μέγεθος προϊόντων PCR και ιδανικές συνθήκες δράσης τους

Γονίδιο	Εκκινητές	Tm	Αριθμός κύκλων
<b>miR-1</b>	F: 5'-GCC-CGC-TGG-AAT-GTA-AAG-AAG-TATG-3' R: 5'-GTG-CAG-GGT-CCG-AGGT-3'	60 °C	40
<b>miR-206</b>	F: 5'-CGT-CAG-AAG-GAA-TGA-TGC-ACAG-3' R: 5'-ACC-TGC-GAT-GGT-AGT-TTC-ATGT-3'	66 °C	40
<b>mpU6</b>	F: 5'-GCT-TCG-GCA-GCA-CAT-ATA-CTA-AAAT-3' R: 5'-CTC-ACA-CCG-TGT-CGT-TCC-3'	60 °C	40
<b>Notch3</b>	F: 5'-ACC-GAT-GTC-AAC-GAG-TGT-CT -3' R: 5'- GTT-GAC-ACA-GGG-GCT-ACT-CT-3'	60 °C	40
<b>c-Met</b>	F: 5'-CCC-ACC-CTT-TGT-TCA-GTG-TG-3' R: 5'-AGT-CAA-GGT-GCA-GCT-CTC-AT-3'	60 °C	40
<b>Bcl-2</b>	F: 5'-CTG-CAC-CTG-ACG-CCC-TTC-ACC-3' R: 5'-CAC-ATG-ACC-CCA-CCG-AAC-TCA-AAG-A-3'	60 °C	40

Το διάλυμα της αντίδρασης για κάθε δείγμα, αποτελείται από:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)
<b>SYBR Green</b>	5
<b>Εκκινητής Forward (5p/mol)</b>	0,3
<b>Εκκινητής Reverse (5p/mol)</b>	0,3
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	2,4
<b>cDNA (αραιωμένο)</b>	2
<b>Σύνολο</b>	10

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδική μικροπλάκα 96 κελίων.

Επιλέχθηκαν τέσσερις φάσεις για την ολοκλήρωση της διαδικασίας.

1. Ενεργοποίηση της Taq πολυμεράσης και αρχική αποδιάταξη  
95°C, 10 min (1ος κύκλος).
2. Κύκλοι PCR στους οποίους πραγματοποιείται η ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου:  
1<sup>ο</sup> στάδιο (αποδιάταξη) → 95°C, 15 sec  
2<sup>ο</sup> στάδιο (υβριδοποίηση εκκινητών) → θερμοκρασία αντίστοιχη του σημείου τήξεως (melting temperature, T<sub>m</sub>) του κάθε εκκινητή, 30 sec  
3<sup>ο</sup> στάδιο (επιμήκυνση) → 60° C, 1min  
Η φάση αυτή διήρκησε 45 κύκλους.
3. Καμπύλη τήξης:  
1<sup>ο</sup> στάδιο → 95°C, 10 sec  
2<sup>ο</sup> στάδιο → 55°C, 2 min  
3<sup>ο</sup> στάδιο → 95°C, sec  
Η φάση αυτή διήρκησε 1 κύκλο.
4. Ψύξη: 40° C, 30 sec.  
Η φάση αυτή διήρκησε 1 κύκλο.

## 9. Βιοπληροφορική Ανάλυση

Τα microRNAs αποτελούν μία πρόσφατη ανακάλυψη τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων. Η δράση τους έγκειται στη μετα-μεταγραφική τροποποίηση των γονιδίων-στόχων τους μετά τη

σύνδεση τους σε συμπληρωματικές ή ημι-συμπληρωματικές αλληλουχίες στα mRNA. Κάθε microRNA στοχεύει σε πολλά διαφορετικά mRNA και με τη σειρά του κάθε mRNA μπορεί να περιέχει πολλές θέσεις σύνδεσης διαφορετικών microRNAs, επιτρέποντας στα microRNAs να δημιουργούν ένα πολύπλοκο σύστημα γονιδιακής ρύθμισης. Η μελέτη αυτού του δικτύου είναι δυνατή μέσω της ανεύρεσης των γονιδίων στόχων για κάθε microRNA μέσω της χρήσης ειδικών υπολογιστικών προγραμμάτων.

Για την διερεύνηση των γονιδίων-στόχων των microRNAs που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων miRWalk. Η βάση αυτή δίνει τη δυνατότητα σύγκρισης δεδομένων από διάφορες άλλες βάσεις. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι αλγόριθμοι πρόβλεψης miRWalk, PITA, RNA22, miRanda και Targetscan. Προκειμένου να επιτευχθεί η ανεύρεση των γονιδίων-στόχων των υπό μελέτη microRNAs, χρησιμοποιήθηκε το accession του επιθυμητού microRNA, το οποίο ανευρίσκεται από το miRBase.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε υπολογιστική πρόβλεψη όλων των πιθανών στόχων των miR-1 και miR-206. Ένα γονίδιο θεωρήθηκε ως πιθανός στόχος των miRs εάν εμφανίζεται σε τουλάχιστον 4 από τους 5 αλγορίθμους πρόβλεψης που χρησιμοποιήθηκαν.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η βιολογική σημασία των γονιδίων-στόχων των microRNAs και επομένως, να διευκρινιστεί η ακριβής συμμετοχή τους στην καρκινογένεση, αλλά και στην εξέλιξη του όγκου του καρκίνου του μαστού, πραγματοποιήθηκε ο εντοπισμός των σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν τα συγκεκριμένα γονίδια-στόχοι. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων DAVID.

Τέλος, για τη συνολική εικόνα συμμετοχής των microRNAs στις βιολογικές διαδικασίες του κυττάρου, οι επαληθευμένοι στόχοι των miRs υπεβλήθησαν σε ανάλυση GO (Gene Ontology), μέσω του προγράμματος PANTHER, η οποία εφαρμόστηκε για την οργάνωση των γονιδίων-στόχων σε ιεραρχικές κατηγορίες με βάση τη βιολογική τους λειτουργία.

## **10. Επιμόλυνση των καρκινικών κυτταρικών σειρών MB-231 και MCF7 με το miR-206 (mimic miR-206)**

### **10.1. Αρχή της Μεθόδου**

Τα microRNAs είναι μικρά, μονόκλωνα, μη κωδικά μόρια RNA, μεγέθους 20-24 νουκλεοτιδίων. Ο ρόλος τους στο κύτταρο είναι η ρύθμιση της πρωτεϊνικής έκφρασης σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, μέσω πρόσδεσης τους σε συγκεκριμένες αλληλουχίες στόχους των mRNAs. Κάθε microRNA είναι συμπληρωματικό με περισσότερα του ενός mRNAs. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η συμπληρωματικότητα αυτή παρατηρείται στην 3'-UTR περιοχή των mRNAs στόχων. Όμως, σε σπάνιες περιπτώσεις microRNAs παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα και στην 5'-UTR περιοχή ή σε κωδικοποιούσες περιοχές. Όταν εμφανίζουν πλήρη συμπληρωματικότητα με το mRNA στόχο προκαλούν αποδόμησή του, ενώ όταν εμφανίζουν μερική συμπληρωματικότητα με αυτό, το καταστέλλουν. Η χρήση των microRNAs αποτελεί μία σύγχρονη προσέγγιση για την στοχευμένη αναστολή έκφρασης γονιδίων που ευθύνονται για την ανάπτυξη και εξέλιξη πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου.

### **10.2. Περιγραφή Μεθοδολογίας**

Πριν τη διαμόλυνση των κυττάρων με το miR-206 (syn-has-miR-206 mimic), κύτταρα από τις MB-231 και MCF-7 καρκινικές κυτταρικές σειρές καλλιεργούνται με τη μέθοδο που έχει περιγραφεί παραπάνω. Ακολούθως, τοποθετούνται σε πλάκες 6 θέσεων στα οποία προστίθενται 2 ml θρεπτικού υλικού RPMI 1640 χωρίς την παρουσία FBS και αντιβιοτικών. Τα κύτταρα επωάζονται υπό στείρες συνθήκες σε κλίβανο για 24 ώρες. Μετά την λήξη των 24 ωρών γίνεται η επίδραση με το επιθυμητό micron. Τα κύτταρα 3 θέσεων χρησιμοποιήθηκαν ως δείγμα ελέγχου (δεν έγινε επιμόλυνση με το mimic miR-206), ενώ στα κύτταρα των άλλων 3 θέσεων έγινε επιμόλυνση με 100 pmol miR-206 mimic για χρονικό διάστημα 48 ωρών. Για κάθε δείγμα γίνονται 3 δοκιμές προκειμένου να διαπιστωθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου.

Αναλυτικότερα, η διαδικασία διαμόλυνσης των κυττάρων είναι η εξής:

1. Προσθήκη 5 μl λιποφεκταμίνης σε 495μl Optimem (low serum medium).  
Καλή ανάδευση

2. Προσθήκη 5  $\mu$ l microRNA σε 495 $\mu$ l Optimem. Καλή ανάδευση
3. Επώαση των διαλυμάτων για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT)
4. Ανάμειξη των 2 παραπάνω διαλυμάτων και καλή ανάδευση
5. Επώαση του μίγματος για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT)
6. Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από τις θέσεις της πλάκας και ξέπλυμα με PBS
7. Μεταφορά 1 ml σε κάθε πηγαδάκι του μίγματος λιποφεκταμίνη / microRNA
8. Προσθήκη 1ml Optimem
9. Στα untransfected wells προσθήκη μόνο 2ml Optimem
10. Τοποθέτηση των wells στον κλίβανο για 4-6 h
11. Απομάκρυνση από τα wells του Optimem και προσθήκη 2ml PRMI ενισχυμένο με FBS και L – γλουταμίνη, χωρίς όμως αντιβιοτικά
12. Τοποθέτηση στον κλίβανο για 48 h
13. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA με τη διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως.

### **11. Στατιστική ανάλυση**

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα GraphPad έκδοση 4 (GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Η στατιστική ανάλυση και η σύγκριση των δεδομένων των τριών κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πολυπαραγοντικού μοντέλου ANOVA test, με επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές με το τυπικό σφάλμα (μέση  $\pm$  SEM). Σε όλες τις περιπτώσεις ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή  $p < 0.05$ .



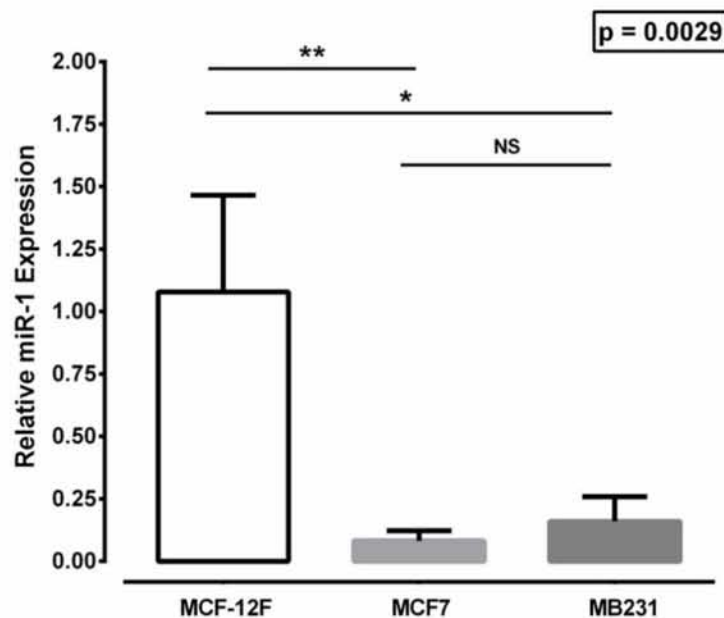
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1. Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των *microRNAs* *miR-1* και *miR-206* σε καλλιέργειες των καρκινικών σειρών *MB-231* και *MCF7* και της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς *MCF-12F*

Από τις κυτταρικές σειρές, που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, απομονώθηκε RNA και προσδιορίστηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των *miR-1* και *miR-206*.

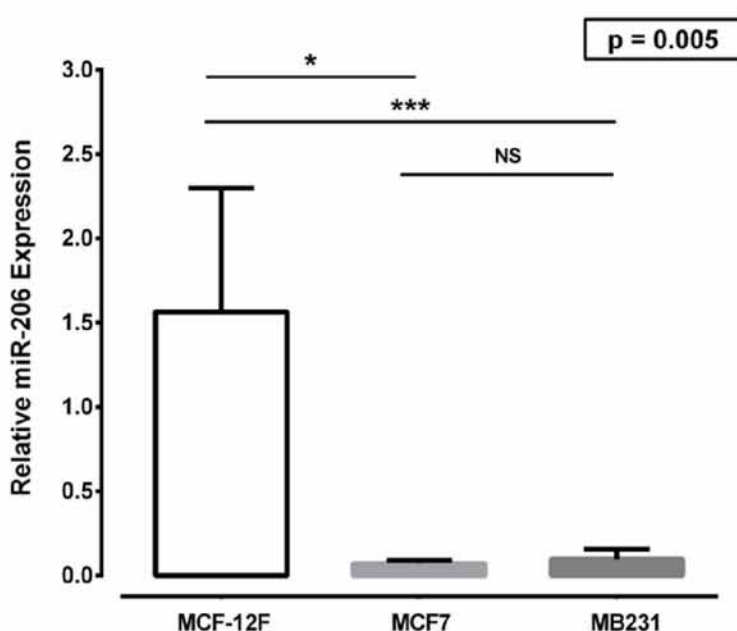
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τη μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου έδειξαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά στα επίπεδα έκφρασης του *miR-1* μεταξύ των υπό μελέτη κυτταρικών σειρών ( $p=0.0029$ ) (**Εικόνα 14**).

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης του *miR-1* ήταν σημαντικά μειωμένα τόσο στην καρκινική σειρά *MCF7* όσο και στην *MB-231* συγκριτικά με τη φυσιολογική κυτταρική σειρά *MCF-12F* ( $p=0.0022$ ,  $p=0.0255$ , αντιστοίχως) (**Εικόνα 14**). Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης του *miR-1* δεν παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των *MB-231* και *MCF7* καρκινικών σειρών.



**Εικόνα 14.** Επίπεδα έκφρασης του *microRNA-1* στις κυτταρικές σειρές *MCF-12F*, *MCF-7* και *MB-231*. Τα επίπεδα του *microRNA* είναι ομαλοποιημένα ως προς το *microRNA* αναφοράς *hpU6*.  $*(p<0.05)$ ,  $** (p<0.01)$ ,  $NS=non\ significant$

Παρόμοια είναι και τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τη ποσοτική μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου όσον αφορά στα επίπεδα έκφρασης του miR-206, καθώς παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην έκφραση του miR-206 μεταξύ των υπό μελέτη κυτταρικών σειρών ( $p=0.005$ ). Συγκεκριμένα, βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα τα επίπεδα έκφρασης του miR-206 τόσο στην καρκινική σειρά MCF7 όσο και στην MB-231 συγκριτικά με τη φυσιολογική κυτταρική σειρά MCF-12F ( $p=0.0234$ ,  $p=0.0003$ , αντιστοίχως) (Εικόνα 15). Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης του miR-206 δεν παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των MB-231 και MCF7 καρκινικών σειρών.



**Εικόνα 15.** Επίπεδα έκφρασης του microRNA-206 στις κυτταρικές σειρές MCF-12F, MCF-7 και MB-231. Τα επίπεδα του microRNA είναι ομαλοποιημένα ως προς το microRNA αναφοράς miR-U6.  $*(p < 0.05)$ ,  $***(p < 0.001)$ , NS=non significant

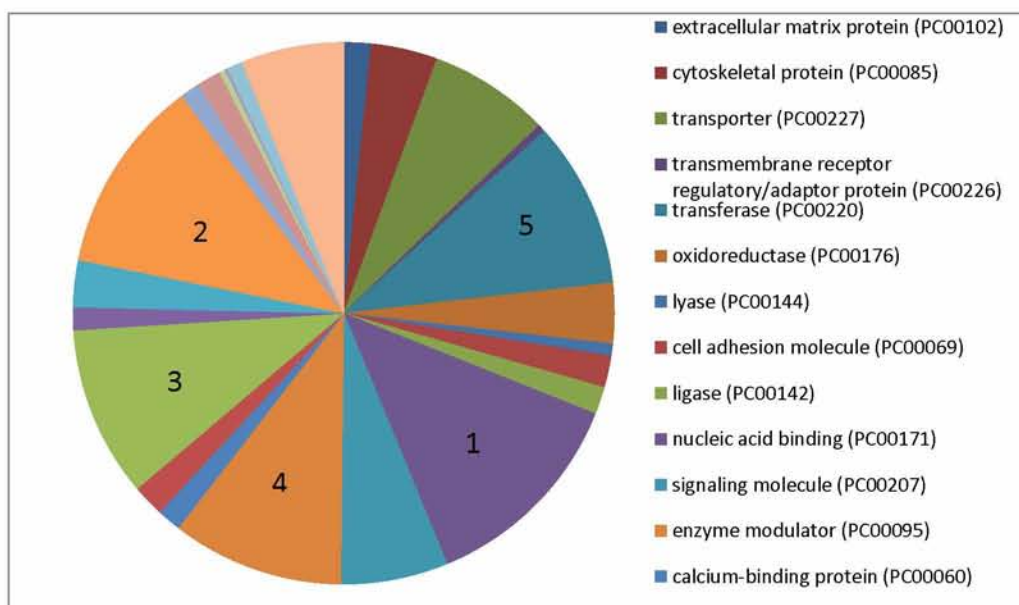
## 2. Βιοπληροφορική ανάλυση των μοριακών, κυτταρικών και βιολογικών λειτουργιών των υπό μελέτη microRNAs, καθώς και των σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία εμπλέκονται

Προκειμένου να διερευνήσουμε τη βιολογική σημασία των υπό μελέτη microRNAs, miR-1 και miR-206, τόσο στην ανάπτυξη όσο και στην εξέλιξη του όγκου στο καρκίνο του μαστού, προσδιορίστηκαν τα γονίδια-στόχοι τους με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων βιοπληροφορικής. Συγκεκριμένα, για την ανεύρεση των γονιδίων-στόχων, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων miRWalk 2.0.

Ακολούθως, διερευνήθηκαν οι βιολογικές διεργασίες στις οποίες ενέχονται τα γονίδια που αναδείχθηκαν από το miRWalk, με τη χρήση του προγράμματος PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) Classification System Version 13.1. Επιπλέον, βιοπληροφορική ανάλυση με τη χρήση του προγράμματος DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) Bioinformatics Resources v6.8 αλλά και το PANTHER, ανέδειξε τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία ενέχονται τα παραπάνω γονίδια.

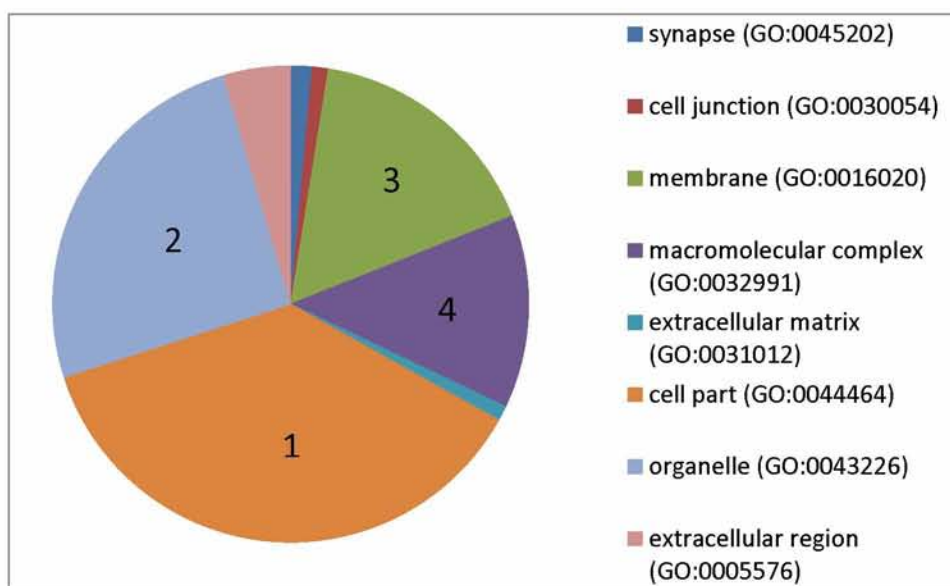
## 2.1 miR-1

Αρχικά, ταυτοποιήθηκε το είδος των γονιδιακών προϊόντων των γονιδίων-στόχων του miR-1. Όπως απεικονίζεται και στην **Εικόνα 16** τα προϊόντα των γονιδίων αυτών ανήκουν σε διάφορες πρωτεϊνικές κατηγορίες με τις σημαντικότερες να αποτελούν κατηγορίες πρωτεϊνών που ενώνονται με νουκλεϊκά οξέα σε ποσοστό 13% (1), μεταγραφικούς παράγοντες σε ποσοστό 12% (2) αλλά και ένζυμα υδρόλυσης (3), ρυθμιστές ενζύμων (4) και τρανσφεράσες (5) σε ποσοστό 10% για τη κάθε κατηγορία.



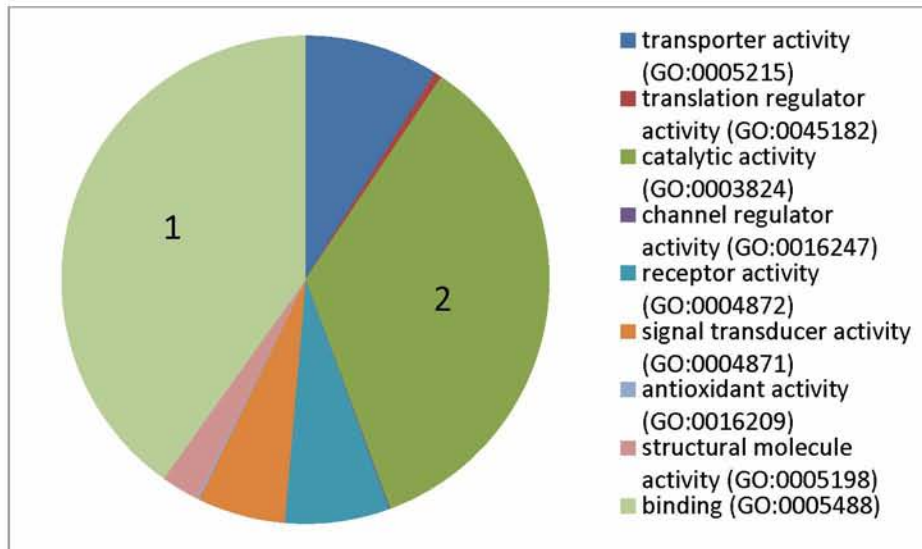
**Εικόνα 16.** Κατηγοριοποίηση των γονιδίων-στόχων του miR-1 με κριτήριο το πρωτεϊνικό είδος του γονιδιακού τους προϊόντος.

Αφού έγινε προσδιορισμός του είδους των γονιδιακών προϊόντων των γονιδίων στόχων για το miR-1, στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος των ανωτέρω γονιδίων σε κυτταρικές λειτουργίες. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων υποδεικνύουν ότι η πλειοψηφία των γονιδίων-στόχων, δηλαδή το 37% αυτών, αποτελούν κυτταρικά τμήματα, κυρίως ενδοκυττάρια αλλά και τμήματα της πλασματικής μεμβράνης (**Εικόνα 17, 1**). Έπειτα, ακολουθούν γονίδια-στόχοι που δρουν στα οργανίδια του κυττάρου. Το ποσοστό αυτής της κατηγορίας αντιστοιχεί στο 25% των γονιδίων στόχων, εκ των οποίων οι πλειοψηφία τους να δρα στον πυρήνα του κυττάρου (**Εικόνα 17, 2**). Στην τρίτη θέση βρίσκονται γονίδια-στόχοι που αποτελούν κυτταρικά συστατικά των μεμβρανών των κυττάρων, σε ποσοστό 16%, με κυριότερη την πλασματική μεμβράνη (**Εικόνα 17, 3**). Τέλος, ένα ακόμη σημαντικό ποσοστό των γονιδίων αυτών, δηλαδή το 13%, αποτελεί τμήματα μακρομοριακών συμπλόκων, κυρίως πρωτεϊνικών (**Εικόνα 17, 4**).



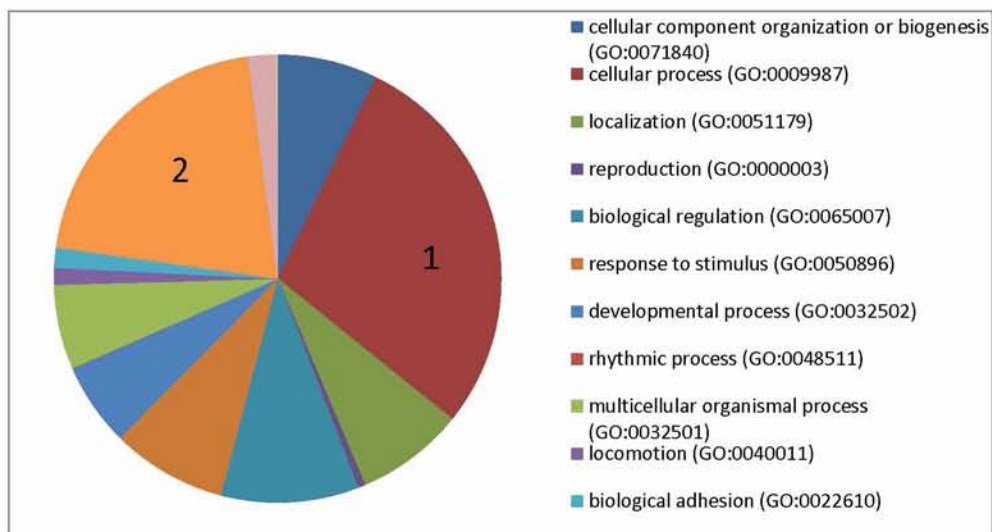
**Εικόνα 17.** Γραφική απεικόνιση των κυτταρικών ρόλων του miR-1.

Έπειτα, ταυτοποιήθηκε η μοριακή λειτουργία των γονιδίων-στόχων του miR-1. Μέσω της ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε βρέθηκε ότι το 40% των γονιδίων αυτών δρουν ως μόρια πρόσδεσης (**Εικόνα 18, 1**), με την πλειοψηφία τους να αποτελούν μόρια πρόσδεσης πρωτεϊνών αλλά και νουκλεϊκών οξέων. Επίσης, μία ακόμη μεγάλη κατηγορία, που αποτελεί το 35% των γονιδίων-στόχων, διαθέτει καταλυτική δράση (**Εικόνα 18, 2**).



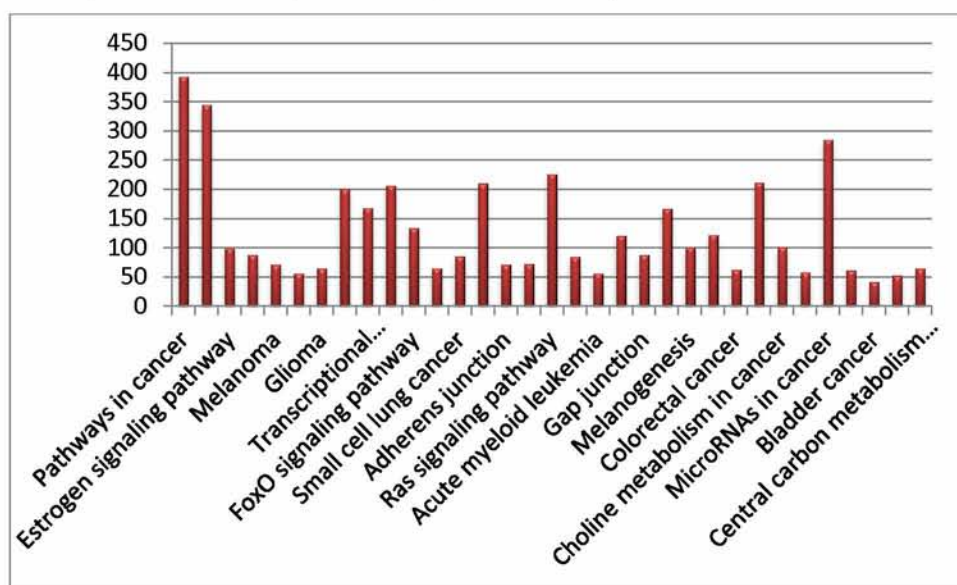
**Εικόνα 18.** Γραφική απεικόνιση των μοριακών λειτουργιών του miR-1.

Οι βιολογικές διαδικασίες στις οποίες ασκεί τη δράση του το miR-1, οι οποίες ανιχνεύθηκαν μέσω της βιοπληροφορικής ανάλυσης με τη βοήθεια του προγράμματος PANTHER, φάνηκε να ποικίλουν. Σημαντική είναι η συνεισφορά του miR-1 σε βιολογικές διαδικασίες που σχετίζονται με τη λειτουργικότητα του κυττάρου, καθώς το 29% των γονιδίων-στόχων του παράγει πρωτεϊνικά προϊόντα που ανήκουν στην κατηγορία αυτή (**Εικόνα 19, 1**). Επίσης, ένα άλλο μεγάλο ποσοστό γονιδίων-στόχων, το 21%, αποτελούν μόρια που συμμετέχουν σε μεταβολικές διαδικασίες που επιτελούνται στο κύτταρο (**Εικόνα 19, 2**). Ακολουθούν κατηγορίες γονιδίων που σχετίζονται με την βιολογική ρύθμιση του κυττάρου, την τοποθέτηση του, αλλά και την απόκριση του κυττάρου στα διάφορα ερεθίσματα (**Εικόνα 19**).



**Εικόνα 19.** Γραφική απεικόνιση των βιολογικών διαδικασιών στις οποίες συμμετέχει το miR-1

Εφόσον διερευνήθηκε ο κυτταρικός ρόλος, οι μοριακές λειτουργίες και οι βιολογικές διαδικασίες στις οποίες ενέχεται το miR-1, αμέσως μετά πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία ρυθμίζει το miR-1 και μέσω των οποίων έχει αποκτήσει τα παραπάνω χαρακτηριστικά. Βρέθηκε ότι το microRNA-1 ασκεί τη δράση του σε 65 μονοπάτια μέσα στο κύτταρο. Η πλειοψηφία των μονοπατιών αυτών σχετίζονται με την καρκινογένεση και διαδικασίες που ευνοούν την μετάσταση και την προώθηση του καρκίνου, υπογραμμίζοντας το σπουδαίο ρόλο του miR-1 στις διαδικασίες αυτές. Τα σπουδαιότερα από αυτά τα μονοπάτια φαίνονται στην **Εικόνα 20**.



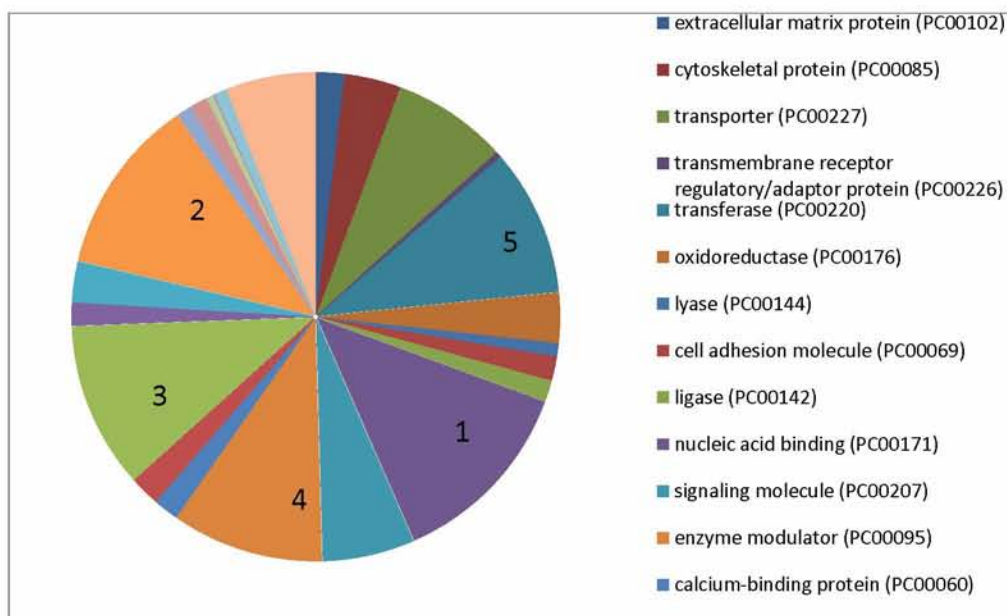
**Εικόνα 20.** Γραφική απεικόνιση των σημαντικότερων μονοπατιών στα οποία εμπλέκεται το miR-1 και σχετίζονται με της διαδικασίες καρκινογένεσης

## 2.2 miR-206

Στη συνέχεια, η ίδια βιοπληροφορική ανάλυση πραγματοποιήθηκε και για το miR-206. Τα αποτελέσματα από το miR-206 ήταν πανομοιότυπα με τα αποτελέσματα του miR-1, που αναλύθηκε παραπάνω. Οι κατηγορίες που εντάσσονται τα περισσότερα γονίδια-στόχοι είναι όμοιες με αυτές του miR-1. Οι μόνες διαφορές που παρουσίασαν τα δύο αυτά miRs ήταν στα ποσοστά συμμετοχής των γονιδίων στόχων στις επιμέρους κατηγορίες που αναλύθηκαν. Με τη μοναδική διαφορά να παρατηρείται στα ποσοστά συμμετοχής των γονιδίων, κυρίως, στις κατηγορίες με την μικρότερη συμμετοχή (ποσοστό συμμετοχής < 10%).

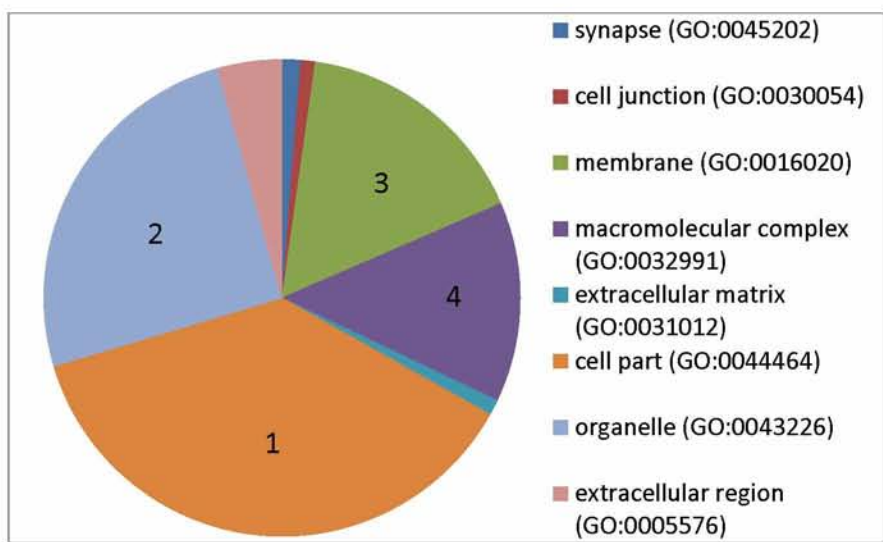
Συγκεκριμένα, τα πρωτεϊνικά προϊόντα των γονιδίων-στόχων του miR-206 στην πλειοψηφία τους καταλαμβάνουν τις ίδιες ομάδες με τα προϊόντα των γονιδίων-

στόχων του miR-1 όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 21**, δηλαδή σε ποσοστό 13% αποτελούν πρωτεΐνες που ενώνονται με νουκλεϊκά οξέα (**Εικόνα 21, 1**), το 12% αυτών αποτελεί μεταγραφικούς παράγοντες (**Εικόνα 21, 2**), το 11% ένζυμα υδρόλυσης (**Εικόνα 21, 3**), το 10% ρυθμιστές ενζύμων (**Εικόνα 21, 4**) και άλλο ένα 10% τρανσφεράσες (**Εικόνα 21, 5**).



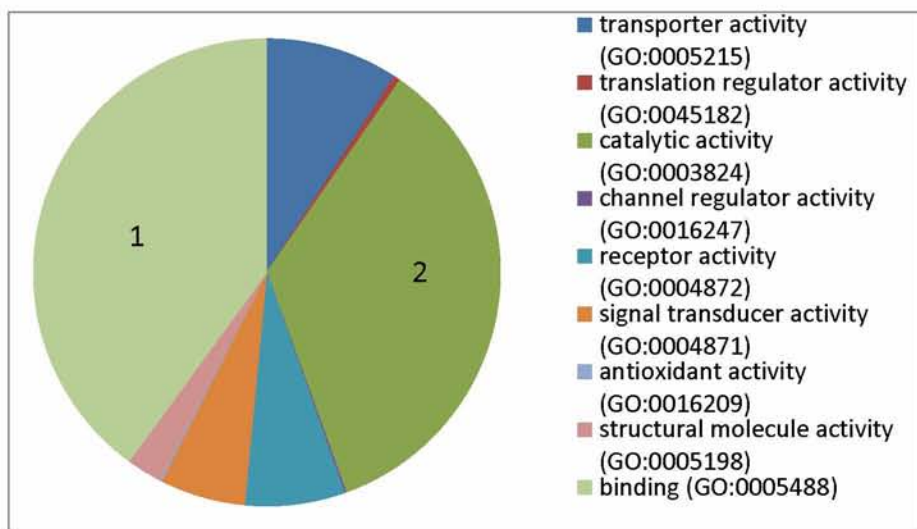
**Εικόνα 21.** Κατηγοριοποίηση των γονιδίων-στόχων του miR-206 με κριτήριο το πρωτεϊνικό είδος του γονιδιακού τους προϊόντος

Πανομοιότυπη εικόνα πήραμε και στην ανάλυση του ρόλου που διαδραματίζουν τα πρωτεϊνικά προϊόντα αυτά μέσα στο κύτταρο (**Εικόνα 22**). όπως το miR-1 έτσι και το miR-206 φαίνεται να ασκεί σημαντική επίδραση σε γονίδια, τα προϊόντα των οποίων αποτελούν τμήματα του κυττάρου, 37% (1), των οργανιδίων, 25% (2), συστατικά των μεμβρανών, 16% (3) αλλά και τμήματα μακρομοριακών συμπλόκων, 14% (4).



**Εικόνα 22.** Γραφική απεικόνιση των κυτταρικών ρόλων του miR-206

Το ίδιο παρατηρήθηκε και στις τις μοριακές λειτουργίες που ενέχεται το miR-206 (**Εικόνα 23**) καθώς ασκεί επίδραση σε γονίδια, τα προϊόντα των οποίων δρουν κυρίως είτε ως μόρια πρόσδεσης, σε ποσοστό 40% του συνόλου των γονιδίων-στόχων (1), είτε έχουν καταλυτική δράση, σε ποσοστό 35% (2).

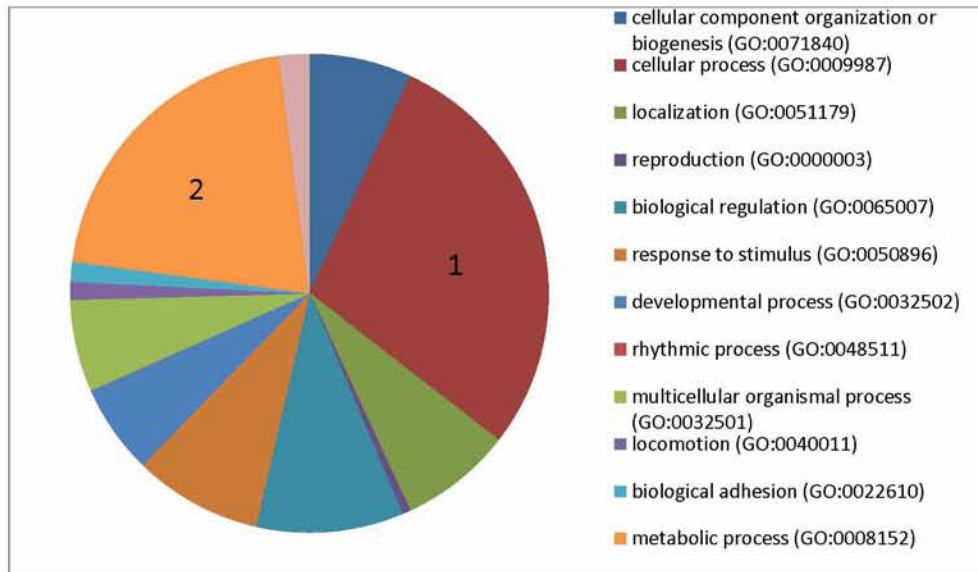


**Εικόνα 23.** Γραφική απεικόνιση των μοριακών λειτουργιών του miR-206

Τέλος, την ίδια εικόνα με το miR-1 παρατηρήσαμε και για τις βιολογικές διαδικασίες (**Εικόνα 24**) στις οποίες το miR-206 συμμετέχει και ελέγχει στο κύτταρο. Συγκεκριμένα, το miR-206 ασκεί επίδραση σε γονίδια τα προϊόντα των οποίων σχετίζονται κυρίως με τη λειτουργικότητα του κυττάρου. Στην κατηγορία αυτή ανήκει το 29% των γονιδίων-στόχων του (**Εικόνα 24, 1**). Επίσης, όπως και το miR-1, μεγάλη επίδραση φαίνεται να έχει και στις μεταβολικές διαδικασίες που επιτελούνται

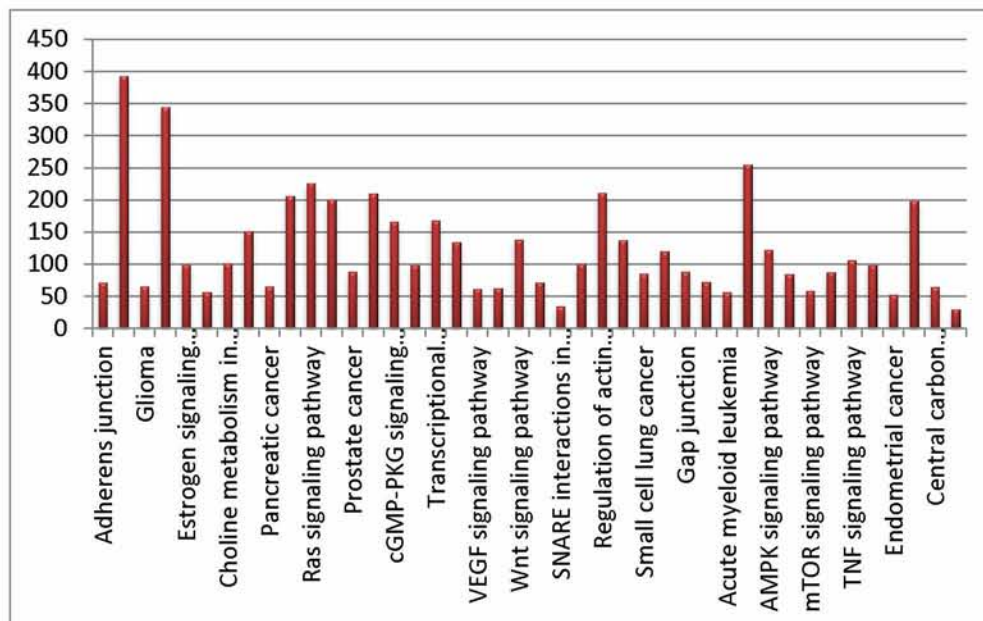


στο κύτταρο, καθώς το 21% των γονιδίων στόχων ανήκουν στην κατηγορία αυτή (Εικόνα 24).



Εικόνα 24. Γραφική απεικόνιση των βιολογικών διαδικασιών στις οποίες συμμετέχει το miR-206

Χαρακτηρισμός των μοριακών μονοπατιών πραγματοποιήθηκε και για το miR-206. Το microRNA αυτό συμμετέχει σε 84 σηματοδοτικά μονοπάτια που, όπως και το miR-1, τα περισσότερα από αυτά ελέγχουν την καρκινογένεση σε διάφορους ιστούς του οργανισμού. Τα μονοπάτια αυτά του καρκίνου απεικονίζονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 25). Όπως διαπιστώνουμε και πάλι, τα περισσότερα από τα μονοπάτια της καρκινογένεσης είναι κοινά για τα δύο αυτά microRNAs.

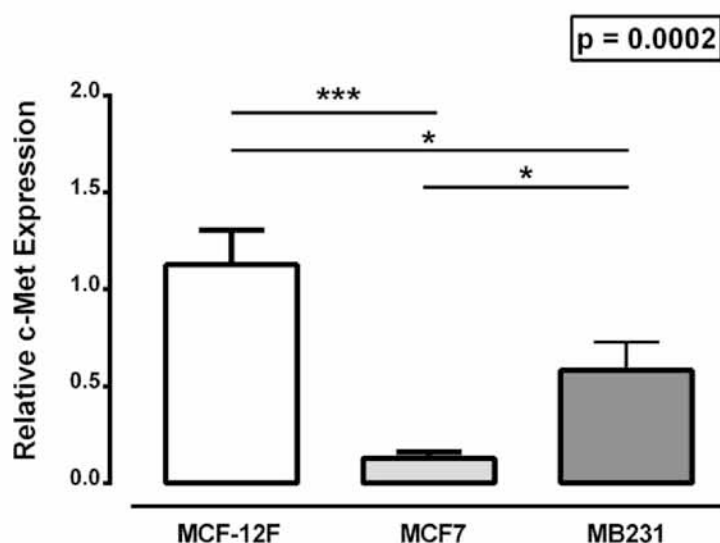


Εικόνα 25. Απεικόνιση σε μορφή ράβδων των μονοπατιών στα οποία εμπλέκεται το miR-206

### 3. Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *c-Met*, *Notch3* και *Bcl-2* σε καλλιέργειες των καρκινικών σειρών *MB-231* και *MCF7* και της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς *MCF-12F*

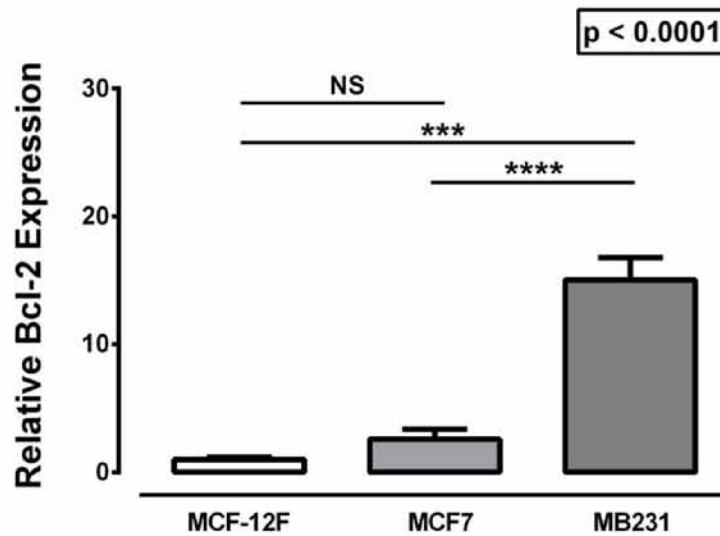
Από τις κυτταρικές σειρές *MB-231*, *MCF-7* και *MCF-12F* που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διπλωματική εργασία απομονώθηκε mRNA τόσο για την μελέτη έκφρασης των miR-1 και miR-206 όσο και για τη μελέτη έκφρασης τριών γονιδίων-στόχων αυτών των microRNAs, του *c-Met*, *Notch3* και *Bcl-2*. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τη μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου έδειξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των τριών αυτών γονιδίων μεταξύ των υπό μελέτη κυτταρικών σειρών.

Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης του *c-Met* γονιδίου ήταν σημαντικά μειωμένα στις καρκινικές κυτταρικές σειρές *MB-231* και *MCF-7* σε σύγκριση με τη φυσιολογική κυτταρική σειρά *MCF-12F* ( $p=0.002$ ,  $p=0.026$ , αντιστοίχως) (Εικόνα 26). Επιπλέον, η ανάλυση υπέδειξε στατιστικά σημαντικά μειωμένη έκφραση του *c-Met* στην κυτταρική σειρά *MCF-7* συγκριτικά με τη *MB-231* ( $p=0.0237$ ).



**Εικόνα 26.** Επίπεδα έκφρασης του *c-Met* στις κυτταρικές σειρές *MCF-12F*, *MCF-7* και *MB-231*. Τα επίπεδα του *c-Met* είναι ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς *GAPDH*.  $*(p<0.05)$ ,  $** (p<0.01)$ ,  $*** (p<0.001)$

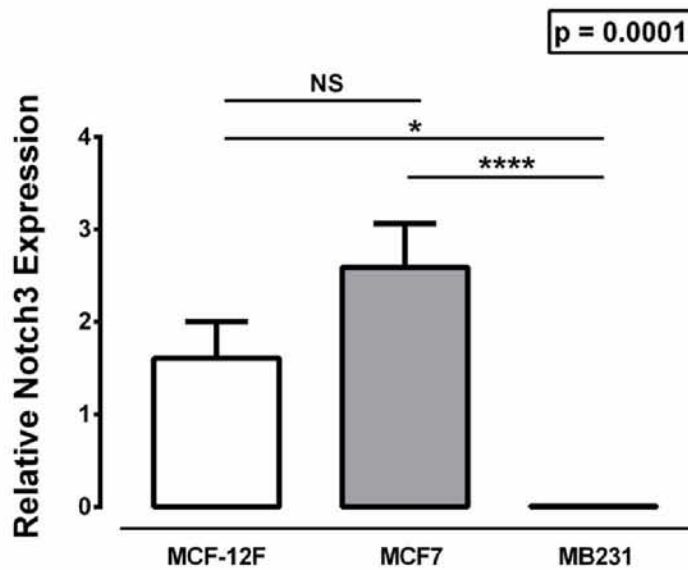
Όσο αφορά στην έκφραση του *Bcl-2* γονιδίου, τα επίπεδα έκφρασής του με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου φαίνονται στην **Εικόνα 27**.



**Εικόνα 27.** Επίπεδα έκφρασης του Bcl-2 στις κυτταρικές σειρές MCF-12F, MCF-7 και MB-231. Τα επίπεδα του Bcl-2 είναι ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. \*\*\*( $p < 0.001$ ), \*\*\*\*( $p < 0.0001$ ), NS= non significant

Η έκφραση του Bcl-2 γονιδίου βρέθηκε σημαντικά αυξημένη στην MB-231 καρκινική κυτταρική σειρά τόσο σε σύγκριση με την φυσιολογική κυτταρική σειρά MCF-12F ( $p = 0.0004$ ) όσο και με τη MCF-7 καρκινική κυτταρική σειρά ( $p < 0.0001$ ) (**Εικόνα 27**). Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά στα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του Bcl-2 στα MCF-7 κύτταρα συγκριτικά με τη φυσιολογική MCF-12F κυτταρική σειρά ( $p = 0.8722$ ) (**Εικόνα 27**).

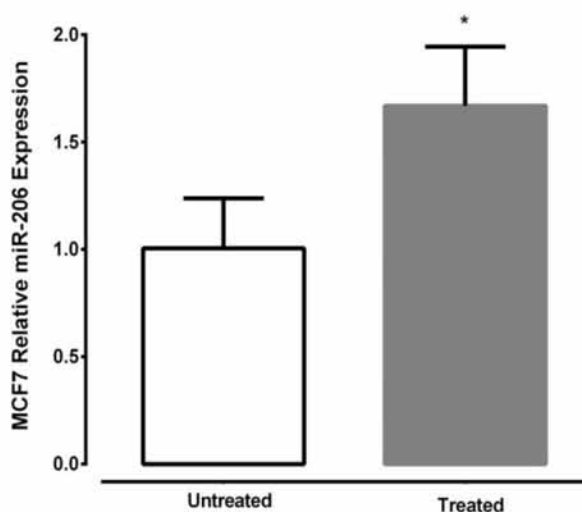
Τέλος, από τη διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης του Notch3 στις κυτταρικές σειρές MB-231, MCF-7 και MCF-12F βρέθηκε ότι η έκφραση του γονιδίου αυτού μειώνεται σημαντικά στα MB-231 κύτταρα τόσο σε σχέση με τα κύτταρα στην φυσιολογική κυτταρική σειρά MCF-12F όσο και σε σχέση με τα MCF-7 κύτταρα ( $p = 0.0283$ ,  $p < 0.001$ , αντιστοίχως). Αντίθετα, η έκφραση του Notch3 γονιδίου φαίνεται να αυξάνεται στα MCF-7 κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά MCF-12F. Παρόλα αυτά, η αύξηση αυτή δε ήταν στατιστικά σημαντική ( $p = 0.2143$ ) (**Εικόνα 28**).



**Εικόνα 28.** Επίπεδα έκφρασης του Notch3 στις κυτταρικές σειρές MCF-12F, MCF-7 και MB-231. Τα επίπεδα του Notch3 είναι ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. \*( $p < 0.05$ ), \*\*\*\*( $p < 0.0001$ ), NS= non significant

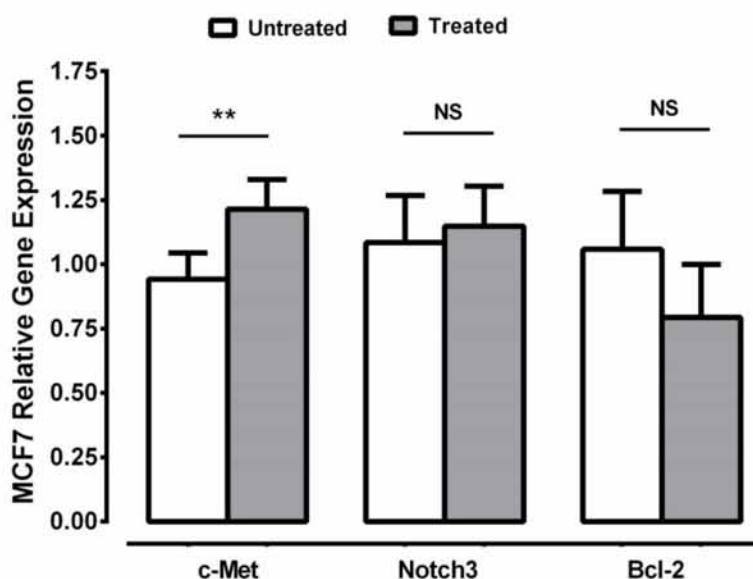
#### 4. Ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων *c-Met*, *Bcl-2* και *Notch3* από το *miR-206* σε καρκινικές κυτταρικές σειρές MCF-7

Για τη μελέτη του τρόπου ρύθμισης των γονιδίων *c-Met*, *Notch3* και *Bcl-2* από το *miR-206* χορηγήσαμε στην καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7 100 pmol μιμητικό *miR-206* (*miR-mimic*) για χρονικά διάστημα 48 h. Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης του *miR-206* ( $p < 0.005$ ) στα δείγματα που έγινε επίδραση σε σύγκριση με εκείνα που δε πραγματοποιήθηκε η επίδραση υποδηλώνοντας ότι η επίδραση με το μιμητικό *miRNA* ήταν επιτυχής (**Εικόνα 29**).



**Εικόνα 29.** Μεταγραφική έκφραση του *miR-206* σε καρκινικές κυτταρικές σειρές MCF-7 μετά από επίδραση με 100 pmol *miR-206* mimic για 48 h. Τα επίπεδα έκφρασης του *miR-206* είναι ομαλοποιημένα ως προς το μικρό πυρηνικό RNA U6. \*( $p < 0.05$ )

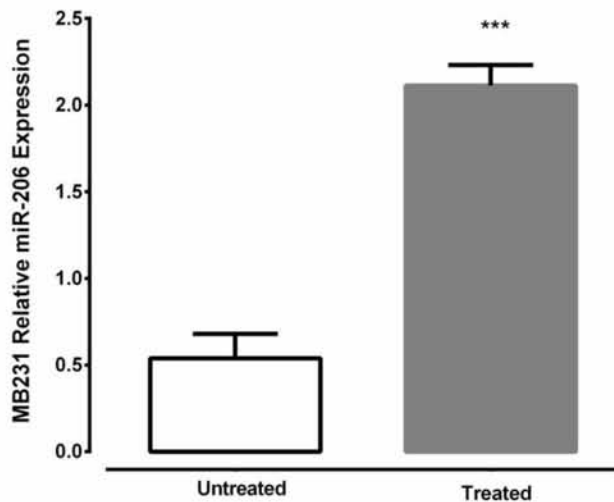
Στη συνέχεια μελετήθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων c-Met, Notch3 και Bcl-2. Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του c-Met γονιδίου στα MCF-7 κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε το miR-206 ( $p=0.0074$ ) (**Εικόνα 30**). Αντιθέτως η χορήγηση του miR-206 δεν επηρέασε τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων Notch3 και Bcl-2 (**Εικόνα 30**).



**Εικόνα 30.** Μεταγραφική έκφραση των γονιδίων c-Met, Notch3 και Bcl-2 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές MCF-7 μετά από επίδραση με 100 pmol miR-206 mimic για 48 h. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων c-Met, Notch3 και Bcl-2 είναι ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH (\*\*( $p < 0.01$ ), NS= non significant)

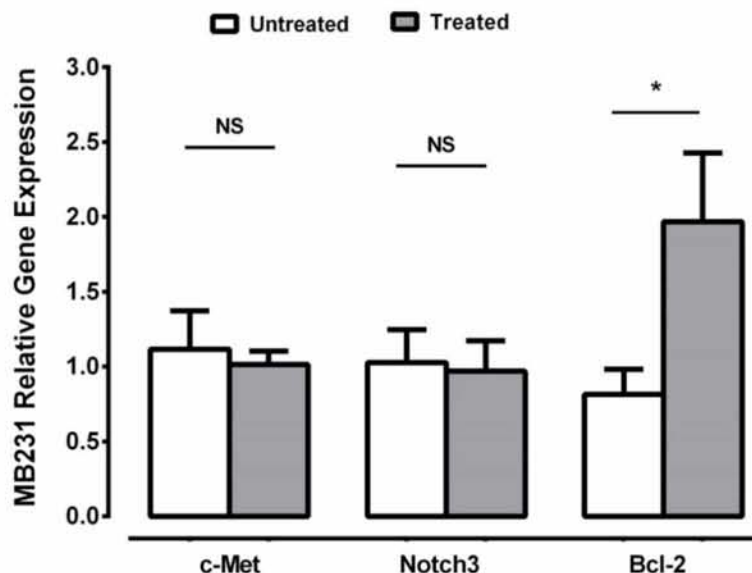
##### **5. Ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων c-Met, Bcl-2 και Notch3 από το miR-206 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές MB-231**

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του miR-206 στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων c-Met, Notch3 και Bcl-2 και στις MB-231 καρκινικές κυτταρικές σειρές, χορηγήσαμε 100 pmol miR-206 mimic για χρονικό διάστημα 48h στα MB-231 κύτταρα. Η επίδραση με το μιμητικό miRNA ήταν επιτυχής καθώς η έκφραση του miR-206, που υπολογίστηκε με την μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου, αυξήθηκε σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα (**Εικόνα 31**).



**Εικόνα 31.** Μεταγραφική έκφραση του miR-206 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές MB-231 μετά από επίδραση με 100 pmol miR-206 mimic για 48 h. Τα επίπεδα έκφρασης του miR-206 είναι ομαλοποιημένα ως προς το μικρό πυρηνικό RNA U6. \*\*\*( $p < 0.001$ )

Η διαμόλυνση των καρκινικών κυτταρικών σειρών MB-231 φαίνεται να επηρέασε με διαφορετικό βαθμό την έκφραση των τριών γονιδίων-στόχων. Συγκεκριμένα, το miR-206 φαίνεται να μην ασκεί κάποια επίδραση στην έκφραση των γονιδίων c-Met και Notch3, εφόσον τα επίπεδα έκφρασης των mRNA τους δεν παρουσίασαν σημαντική μείωση (NS) (**Εικόνα 32**). Αντίθετα, η μεταγραφική έκφραση του γονιδίου Bcl-2 φαίνεται να αυξάνεται σημαντικά μετά την επίδραση με το miR-206 σε σύγκριση με τα δείγματα στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε επίδραση ( $p=0.0369$ ) (**Εικόνα 32**).



**Εικόνα 32.** Μεταγραφική έκφραση των γονιδίων c-Met, Notch3 και Bcl-2 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές MB-231 μετά από επίδραση με 100 pmol miR-206 mimic για 48 h. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων c-Met, Notch3 και Bcl-2 είναι ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH \*( $p < 0.05$ ), NS= non significant

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο συχνά διαγνωσμένος καρκίνος μεταξύ των γυναικών. Περίπου 1 στις 8 γυναίκες παγκοσμίως διατρέχει κίνδυνο να αναπτύξει καρκίνο αυτού του τύπου κατά τη διάρκεια της ζωής της (Ghoncheh et al. 2016)(Sun et al. 2017). Ο καρκίνος του μαστού αναπτύσσεται μέσω μιας διαδικασίας πολλαπλών σταδίων, όμως μέχρι και σήμερα δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ο ακριβής παθογενετικός μηχανισμός της νόσου (Hon et al. 2016). Για το λόγο αυτό, παρά τη συνεχόμενη ανάπτυξη των τεχνικών πρόγνωσης και αντιμετώπισης, το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών που θα αναπτύξει επιθετικό καρκίνο του μαστού τελικά θα οδηγηθεί στο θάνατο από τη νόσο αυτή.

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναδείξει ένα σημαντικό αριθμό προδιαθεσικών παραγόντων που έχουν συσχετιστεί με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα, το γυναικείο φύλο αποτελεί τον κατ' εξοχήν σημαντικότερο αιτιολογικό παράγοντα, μίας και οι γυναίκες έχουν πιθανότητα 100 φορές μεγαλύτερη να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού σε σχέση με τους άντρες. Επιπλέον η ηλικία, η κληρονομικότητα, οι αναπαραγωγικοί παράγοντες όπως η πρόωγη εμμηνόρροια, η καθυστερημένη εμμηνόπαυση, η προχωρημένη ηλικία πρώτης εγκυμοσύνης, καθώς και ο μικρός αριθμός γεννήσεων επηρεάζουν σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού (Sun et al. 2017).

Οι καρκίνοι του μαστού μπορούν να ταξινομηθούν με βάση την έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων (ERα), προγεστερόνης (PR) και του μεμβανικού υποδοχέα HER2. Στοχεύουσες τεχνικές είναι διαθέσιμες για ERα/PR-θετικούς και HER2-θετικούς όγκους. Όμως, οι τριπλά αρνητικοί καρκίνοι του μαστού (TNBC) εξ ορισμού δεν εκφράζουν αυτούς τους υποδοχείς και συνεπώς δε διαθέτουν στοχεύουσες θεραπείες. Οι TNBC αποτελούν την πιο επιθετική μορφή καρκίνου της κατηγορίας αυτής. Αντιπροσωπεύουν το 10-20% του συνόλου των καρκίνων του μαστού και ο κίνδυνος μετάστασης εντός των 5 ετών από τη διάγνωση είναι αυξημένος, ενώ η επιβίωση μετά την υποτροπή είναι σημαντικά μικρότερη από ότι γυναίκες με άλλους τύπους καρκίνου του μαστού (Yam et al. 2017).

Μέχρι στιγμής οι μόνες διαθέσιμες θεραπευτικές προσεγγίσεις για τους TNBCs είναι η κλασσική χημειοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία και η χειρουργική επέμβαση. Δυστυχώς, η ανάπτυξη στοχευουσών θεραπειών για τους TNBC όγκους δεν έχει οδηγήσει ακόμη σε ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Συνεπώς, είναι σημαντικό να

κατανοήσουμε τη παθογένεια των TNBCs ώστε να μπορέσουμε να σχεδιάσουμε θεραπείες που στοχεύουν ειδικά σε μηχανισμούς ανάπτυξης των όγκων αυτών δημιουργώντας ελπίδα για την αντιμετώπιση αυτού του τόσο επιθετικού υποτύπου καρκίνου του μαστού (Andreopoulou et al. 2015).

Τα τελευταία χρόνια η επιστημονική κοινότητα έχει επικεντρωθεί στη μελέτη επιγενετικών μηχανισμών υπεύθυνων για τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που ενέχονται σε πολλούς μηχανισμούς καρκινογένεσης. Σημαντικά μόρια των διαδικασιών αυτών είναι τα microRNAs (miRNAs). Τα microRNAs είναι μικρά, μη κωδικά μόρια RNA, μήκους περίπου 24 νουκλεοτιδίων τα οποία ρυθμίζουν την μεταγραφή γονιδίων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, τα microRNAs αναστέλλουν την έκφραση γονιδίων με δύο τρόπους, είτε καταστέλλοντας τη διαδικασία της μετάφρασης όταν η συμπληρωματικότητα μεταξύ του microRNA και του mRNA- στόχου δεν είναι πλήρης, είτε αποικοδομώντας τα mRNA τα οποία στοχεύουν, όταν εμφανίζουν πλήρη συμπληρωματικότητα με αυτά (Lee and Vasudevan 2013)(Iwakawa and Tomari 2015). Τα miRNAs μπορούν να δράσουν είτε ως ογκογόνα είτε ως καταστολείς όγκων, παίζοντας αρνητικούς ή θετικούς ρόλους στην ανάπτυξη του καρκίνου (O'Day and Lal 2010). Ογκοκατασταλτικά microRNAs αποτελούν σημαντικά εργαλεία για την αποσιώπηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ογκογένεση ή τη μετάσταση και χρησιμοποιούνται πλέον ευρέως ως εργαλεία για την ανάδειξη νέων θεραπειών πολλών τύπων καρκίνου.

Πέραν της χρήσης των microRNAs ως θεραπευτικά μόρια, τα microRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης και ως βιοδείκτες διάγνωσης, πρόγνωσης, αλλά και ανταπόκρισης του ασθενούς σε μία θεραπεία. Οι ιδιότητες των microRNAs που τα καθιστούν μόρια ιδανικά ως βιοδείκτες είναι η εύκολη απομόνωση τους, με ελαφρώς επεμβατικές τεχνικές, από διάφορα υγρά του σώματος στα οποία κιάλας εμφανίζουν αξιοσημείωτη σταθερότητα, ο εύκολος προσδιορισμός του τίτλου τους με απλές τεχνικές μεθόδους και η τροποποίηση των επιπέδων τους σε παθολογικές καταστάσεις.

Τα τελευταία χρόνια έχει πραγματοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός ερευνών που σκοπεύουν στη διερεύνηση τόσο του ρόλου των κυκλοφορούντων όσο και των ιστοειδικών microRNAs σε μία ευρεία λίστα παθολογικών καταστάσεων (Farazi et al. 2011). Έρευνες που έχουν σαν αντικείμενο μελέτης τα επίπεδα έκφρασης διάφορων miRNAs και τη συσχέτιση αυτών με την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού όλο και αυξάνονται, με τα αποτελέσματά τους να είναι πολλά υποσχόμενα, καθώς



φανερώνουν διαφοροποιημένη έκφραση των microRNAs τόσο μεταξύ των καρκινικών και φυσιολογικών ιστών όσο και μεταξύ διαφόρων σταδίων ανάπτυξης του όγκου (Tang et al. 2012).

Πολλά miRNAs είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι συμμετέχουν στην καρκινογένεση του μαστού. Μερικά από αυτά είναι τα ογκοκατασταλτικά miR-200, miR-17-5p, miR-125a/b αλλά και τα ογκογόνα miR-21, miR-10b και miR-373/520c, ο μηχανισμός δράσης των οποίων έχει αποσαφηνιστεί σε μεγάλο βαθμό (O'Day and Lal 2010)(Verghese et al. 2008). Μια ποικιλία πολλών ακόμη miRNAs έχει δειχθεί ότι επηρεάζουν τις διαδικασίες αυτές, όμως ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους παραμένει άγνωστος. Δύο από αυτά τα miRNAs είναι το miR-1 και miR-206, τα οποία και αναλύθηκαν στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης και οι επιδράσεις των microRNAs αυτών στις καρκινικές κυτταρικές σειρές MB-231, MCF-7 και συσχετίστηκαν με τη φυσιολογική κυτταρική σειρά MCF-12F. Η MB-231 παρομοιάζεται με τον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και παρουσιάζει αυξημένη ικανότητα μετάστασης, ενώ η MCF-7 είναι λιγότερο μεταστατική και παρομοιάζεται με τους ERα θετικούς όγκους. Τα miR-1 και miR-206 είναι δύο microRNAs που εκφράζονται σχεδόν αποκλειστικά στους σκελετικούς μύες και στο μυ της καρδιάς, όπου και ελέγχουν την σωστή ανάπτυξη και διαφοροποίηση των οργάνων αυτών. Διαταραχές στην έκφραση αυτών των microRNAs έχουν συσχετιστεί με διάφορες καρδιαγγειακές παθήσεις, αλλά και παθολογικές καταστάσεις των σκελετικών μυών (Valsecchi et al. 2015)(Ma et al. 2015)(Novák et al. 2014)(Cheng et al. 2018). Όμως, οι συγκεντρώσεις τους πολλές φορές έχει δειχθεί ότι επηρεάζονται και σε άλλους ιστούς σε καταστάσεις κακοήθειας.

Γενικά, έχει βρεθεί ότι τα microRNAs ρυθμίζουν τη μετανάστευση, τη διήθηση και τη μετάσταση του όγκου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα, μελέτες έχουν αναφέρει διαταραχές των επιπέδων έκφρασης του miR-1 σε διάφορους τύπους καρκίνου. Πρόσφατα, έχει δειχθεί ότι το miR-1 ασκεί αντι-αγγειακά αποτελέσματα στο μικροφαρυγγικό καρκίνωμα (Lu et al. 2014). Επιπροσθέτως, μελέτες έχουν δείξει ένα λειτουργικό ρόλο του miR-1 στον κυτταρικό μετασχηματισμό, την καρκινογένεση, την απόπτωση και την ευαισθησία στα φάρμακα (Han et al. 2014). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση του miR-1 μειώνεται σε αρκετούς τύπους καρκίνου, όπως ο καρκίνος του προστάτη (Ambs et al. 2008)(Hudson et al. 2012), του πνεύμονα (Mataki et al. 2015), της

ουροδόχου κύστεως (Yoshino et al. 2012), στην καρκινογένεση του ήπατος (Datta et al. 2008) και του θυρεοειδή (Leone et al. 2011). Παρόλα αυτά, ο ρόλος του miR-1 στον καρκίνο του μαστού δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί. Δεδομένου ότι το miR-1 είναι ένας καταστολέας όγκων σε άλλους τύπους καρκίνων και ένας πολύτιμος δείκτης για την πρόγνωση του καρκίνου, αξιολογήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του miR-1 στις καρκινικές κυτταρικές σειρές MB-231 και MCF-7 με την μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου. Παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του miR-1 είναι σημαντικά μειωμένη στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού συγκριτικά με τη φυσιολογική κυτταρική σειρά. Βάση των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας αλλά και προηγούμενων μελετών, το miR-1 θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως ένας βιοδείκτης κατάλληλος για την κλινική διάγνωση και πρόγνωση των όγκων του μαστού, αλλά και η αποκατάσταση του miR-1 στα καρκινικά κύτταρα θα μπορούσε να αποτελέσει μια πιθανή θεραπευτική στρατηγική για τον καρκίνο του μαστού.

Συμφωνά με τη διεθνή βιβλιογραφία, ο αριθμός των ερευνών που έχει πραγματοποιηθεί και συσχετίζει το miR-1 με τον καρκίνο του μαστού είναι περιορισμένος. Αφορά περίπου σε 5 άρθρα διεθνώς τα οποία έχουν πραγματοποιηθεί την τελευταία τριετία. Τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών, όμως, συμπίπτουν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, καθώς σε όλες τις παραπάνω έρευνες το miR-1 φαίνεται να έχει ογκοκατασταλτική δράση για την ανάπτυξη διαφόρων όγκων στο μαστό, συμπεριλαμβανομένων των TNBC όγκων και η έκφραση του ανευρίσκεται σημαντικά μειωμένη τόσο σε καρκινικές κυτταρικές σειρές όσο και σε δείγματα όγκων από ασθενείς σε σύγκριση με φυσιολογικές κυτταρικές σειρές και ιστούς.

Όπως για το miR-1 έτσι και για το miR-206 έρευνες έχουν δείξει ότι ασκεί μια ογκοκατασταλτική δράση σε διάφορους τύπους καρκίνου. Και για αυτό το microRNA οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, αν και περισσότερες, είναι πολύ πρόσφατες και αφορούν περίπου την τελευταία πενταετία. Τα στοιχεία δείχνουν ότι και το miR-206 διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στο πολλαπλασιασμό, απόπτωση, διήθηση και μετάσταση πολλών καρκινικών κυττάρων όπως του οστεοσαρκώματος (Pan et al. 2018)(Zhang et al. 2014), του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (Xue et al. 2016), του γαστρικού καρκίνου (Shi et al. 2015) και του μελανώματος (Tian et al. 2015). Πρόσφατες μελέτες, επίσης, έδειξαν τη συνεισφορά του στο καρκίνο του μαστού δρώντας ως καταστολέας όγκων (Ge et al. 2015)(Sasaki et al. 2014). Ωστόσο,

οι ρόλοι του miR-206 στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του TNBC δεν είναι καλά κατανοητοί μέχρι στιγμής. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τόσο οι μη-TNBC κυτταρικές σειρές όσο και οι κυτταρικές σειρές που προσομοιάζουν με τον TNBC εκφράζουν σημαντικά μειωμένα επίπεδα του miR-206 σε σύγκριση με τις φυσιολογικές κυτταρικές σειρές. Η ιδιαίτερα χαμηλή έκφραση του miR-206 σε κύτταρα TNBC παρέχει όχι μόνο σημαντικά στοιχεία για τους μηχανισμούς κατανόησης της ανάπτυξης και εξέλιξης του TNBC, αλλά προσφέρει επίσης την ευκαιρία να εντοπιστούν νέοι θεραπευτικοί στόχοι για τη θεραπεία των TNBC όγκων.

Τα αποτελέσματά μας αυτά ταυτίζονται με όσες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής στη διεθνή βιβλιογραφία και συνδέουν το miR-206 με τον καρκίνο του μαστού και συγκεκριμένα με τον TNBC. Σε αυτές τις μελέτες το miR-206 παρουσιάζεται μειωμένο σε όλες τις κατηγορίες καρκίνου του μαστού (Samaeekia et al. 2017)(Fu et al. 2015)(Amir et al. 2016). Επιπρόσθετα, μερικές από αυτές τις μελέτες έχουν δείξει ακόμα πιο μειωμένα επίπεδα του miR-206 μεταξύ TNBC κυττάρων και κυττάρων άλλων τύπων καρκίνου του μαστού (Liang et al. 2016)(Wang et al. 2014). Δείχνοντας με αυτόν τον τρόπο ότι η εύρεση μειωμένων επιπέδων του miR-206 είναι ένας κακός προγνωστικός δείκτης εφόσον περισσότερη μείωση παρουσιάζει σε πιο επιθετικές μορφές καρκίνου.

Προσπαθώντας να διερευνήσουμε την παθογένεια των διάφορων υποτύπων καρκίνου του μαστού, συμπεριλαμβανομένου του TNBC, και τη συνεισφορά των miR-1 και miR-206 στις διαδικασίες της καρκινογένεσης, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδίων-στόχων των παραπάνω microRNAs. Σε πρώτη ανάλυση βρέθηκε ότι τα γονίδια-στόχοι που αναλύθηκαν συμμετέχουν σε βιολογικές διαδικασίες του κυττάρου που σχετίζονται, κυρίως, με την λειτουργικότητά του όπως, η κυτταρική επικοινωνία, ο κυτταρικός κύκλος και η κυτταρική ανάπτυξη, αλλά σχετίζονται επίσης και με πολλές μεταβολικές διαδικασίες. Διαδικασίες του κυττάρου οι οποίες εάν απορυθμιστούν μπορούν να οδηγήσουν σε διάφορες ασθένειες συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Σε δεύτερη φάση αναλύθηκαν τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία ενέχονται τα miR-1 και miR-206. Η ανάλυση αυτή φανέρωσε μια εκτεταμένη λίστα μονοπατιών, τα περισσότερα από αυτά τα οποία αφορούν σηματοδοτικές διαδικασίες που σχετίζονται με την παθογένεια των καρκινικών κυττάρων. Αναλυτικότερα, τέτοια μονοπάτια είναι τα PI3K/Akt, Ras, η Rap1 σηματοδότηση αλλά και μονοπάτια σηματοδότησης που σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκίνου σε διάφορα όργανα, όπως ο καρκίνος του

προστάτη, το μελάνωμα, το γλοίωμα, ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, ο καρκίνος του παχέος εντέρου και αρκετά ακόμη.

Η βιοπληροφορική ανάλυση αποτέλεσε σημαντικό εργαλείο στην επιλογή των γονιδίων-στόχων που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη. Μέσω αυτής παρατηρήθηκε ότι τα γονιδιακά προϊόντα των c-Met, Bcl-2 και Notch3 αποτελούν προβλεπόμενους στόχους των miR-1 και miR-206 με μεγάλη συνεισφορά στα σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν τα microRNAs αυτά. Για το λόγο αυτό, και δεδομένου ότι τα τρία αυτά ογκογονίδια απορρυθμίζονται σε πολλούς τύπους καρκίνου προχωρήσαμε σε πειραματικό έλεγχο των επιδράσεων τους στην παθογένεια του καρκίνου του μαστού και συγκεκριμένα του TNBC.

Τα τελευταία χρόνια, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για την κατανόηση της οδού σηματοδότησης HGF/c-Met στην ανάπτυξη και την πρόοδο του καρκίνου. Ο υποδοχέας c-Met προωθεί την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων, μία σύνθετη διαδικασία που απαιτεί την ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της επιβίωσης, της διήθησης των κυττάρων και την αγγειογένεσης (Gastaldi et al. 2010)(Bahrami et al. 2017). Το c-Met υπερεκφράζεται σε μια ποικιλία καρκινωμάτων όπως ο καρκίνος του πνεύμονα, του παγκρέατος, ο γαστρικός καρκίνος και πολλών άλλων ακόμη. Τα δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία υποστηρίζουν έναν κρίσιμο ρόλο της σηματοδότησης αυτής και στους όγκους του μαστού. Η υπερέκφραση του c-Met έχει αναφερθεί στο 14-53,6% των ασθενών με καρκίνο του μαστού (Zagouri et al. 2013)(Gonzalez-Angulo et al. 2013)(Inanc et al. 2014). Όμως, ο ρόλος c-Met στην επιβίωση των ατόμων με καρκίνο του μαστού είναι ακόμη ασαφής. Αν και η πλειοψηφία των ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια και συσχετίζουν τη c-Met σηματοδότηση με την καρκινογένεση του μαστού υποστηρίζουν ότι η έκφραση του c-Met αυξάνεται στα καρκινικά κύτταρα του μαστού (Ho-Yen et al. 2015)(Minuti and Landi 2015)(Zhao et al. 2017), τα αποτελέσματά μας έρχονται αντιμέτωπα με αυτά τα ευρήματα. Στην παρούσα διπλωματική εργασία παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του c-Met, τόσο στις καρκινικές κυτταρικές σειρές MCF-7 όσο και στις MB-231 σε σύγκριση με την φυσιολογική κυτταρική σειρά MCF-12F που χρησιμοποιήθηκε. Οι διαφορές αυτές, ενδεχομένως, να οφείλονται σε διαφορές στον τρόπο καλλιέργειας αλλά και στο δείγμα που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε μελέτη. Οι περισσότερες έρευνες που ελέγχουν την έκφραση του c-Met στα καρκινικά κύτταρα του μαστού χρησιμοποιούν δείγματα όγκων από ασθενείς και όχι κυτταρικές σειρές (Raghav et al. 2012)(Chae et al. 2016).

Επιπλέον, σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των μελετών αναφορικά με την κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται ως φυσιολογική. Πιο συγκεκριμένα, η πλειοψηφία των ερευνητικών ομάδων χρησιμοποιεί ως φυσιολογική κυτταρική σειρά την MCF-10A και MCF-12A σε αντίθεση με την MCF-12F (Akl et al. 2014) που αξιολογείται στα συγκεκριμένα πειράματα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι μέχρι και σήμερα υπάρχουν σημαντικές διαφωνίες μεταξύ των μελετών σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων ERα, PR και HER2 στις παραπάνω σειρές χαρακτηρίζοντας τις σειρές είτε θετικές είτε αρνητικές στους αντίστοιχους υποδοχείς. Επιπλέον σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και το καλλιεργητικό μέσο καθώς φαίνεται ότι το μέσο καλλιέργειας που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των φυσιολογικών κυτταρικών σειρών διαφέρει από εκείνο των καρκινικών (Yaacob et al. 2014). Με τα φυσιολογικά να αναπτύσσονται στο DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) και τα καρκινικά, κυρίως, στο RPMI-1640. Οι παραπάνω διαφορές στις συνθήκες καλλιέργειας καθώς και η χρήση της MCF-12F κυτταρικής σειράς ως φυσιολογικής θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν σε έναν βαθμό τη διαφορά της έκφρασης του c-Met που παρατηρήθηκε μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών κυτταρικών σειρών.

Παρά το γεγονός όμως αυτό, τα επίπεδα έκφρασης του c-Met μεταξύ των καρκινικών κυτταρικών σειρών παρουσίασαν σημαντική διαφορά, με τα MB-231 κύτταρα να εκφράζουν στατιστικά σημαντικά επίπεδα έκφρασης του μορίου αυτού, σε σύγκριση με τα MCF-7. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν αποτελέσματα άλλων ερευνών με βάση τις οποίες η υπερέκφραση του c-Met αποτελεί έναν κακό προγνωστικό δείκτη εξέλιξης της νόσου και σχετίζεται με πιο επιθετικές μορφές καρκίνου, όπως είναι και οι TNBC όγκοι (Eterno et al. 2014). Το γεγονός αυτό ενισχύει την άποψη ότι το c-Met θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένα ελπιδοφόρο μόριο για στοχεύουσα θεραπεία των TNBC καθώς οι καρκίνοι αυτοί στερούνται υποδοχέων και συνεπώς άμεσων μοριακών στόχων.

Επόμενο γονίδιο-στόχος που μελετήθηκε ήταν το Bcl-2. Πρόκειται για μία αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών. Η αύξηση της Bcl-2 πρωτεΐνης σε ένα μεγάλο αριθμό καρκινικών τύπων, όπως το γλοίωμα, το νευροβλάστωμα, το μελάνωμα, ο καρκίνος του παχέος εντέρου, των πνευμόνων και του μαστού αυξάνει την επιβίωση, την μεταναστευτικότητα και διηθητικότητα των κυττάρων αυτών (Um 2016). Στη παρούσα μελέτη, η έκφραση της Bcl-2 πρωτεΐνης παρατηρήθηκε να αυξάνεται στα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Εύρημα το οποίο έχει αποδειχθεί σε ένα μεγάλο αριθμό ερευνών στη διεθνή βιβλιογραφία (Guo et al.

2016)(Inao et al. 2018). Αν και η αύξηση αυτή στην κυτταρική σειρά MCF-7 δε θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική, στην MB-231 η έκφραση του Bcl-2 υπεραυξήθηκε σε ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό, υποδηλώνοντας την ικανότητα των κυττάρων αυτών να αντιστέκονται στην προκαλούμενη από τα μιτοχόνδρια απόπτωση και επιβεβαιώνοντας την επιθετική συμπεριφορά αυτού του υποτύπου καρκίνου του μαστού. Μία μελέτη των Del Bufalo et al. (Del Bufalo et al. 1997) αποδεικνύει ότι η υπερέκφραση του Bcl-2 στην κυτταρική σειρά MCF-7 αύξησε τον αριθμό των σπλαγγικών μεταστάσεων όταν τα κύτταρα αυτά χορηγήθηκαν σε nude ποντίκια. Επιπροσθέτως, ασθενείς με TNBC που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του Bcl-2, έχουν φτωχότερη πενταετή επιβίωση μετά τη θεραπεία, κυρίως, αν αυτή στηρίζεται στην κλασσική χημειοθεραπεία με ανθρακυκλίνες (Bouchalova et al. 2015). Όμως, και νέες ανοσο-ενισχυτικές θεραπείες φάνηκε να μην είναι ελπιδοφόρες για τις κατηγορία των ασθενών με TNBC που υπερεκφράζει το πρωτο-γονίδιο Bcl-2 (Abdel-Fatah et al. 2013). Συνεπώς, το Bcl-2 θα μπορούσε να θεωρηθεί ένας καλός μοριακός στόχος για την θεραπεία των TNBC όγκων και να αυξήσει περαιτέρω την ευαισθησία των κυττάρων αυτών στη χημειοθεραπεία.

Τέλος, το γονίδιο Notch3 επιλέχτηκε ως ένας άλλος πιθανός στόχος των miR-1 και miR-206 που μελετήθηκαν στη παρούσα μελέτη. Η επιλογή του γονιδίου αυτού για περαιτέρω διερεύνηση έγινε διότι, σε ένα μεγάλο αριθμό μελετών έχει δειχθεί ότι η Notch3 πρωτεΐνη ασκεί μία ογκογόνο δράση και ευνοεί την καρκινογένεση και τη μετάσταση σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου (Ozawa et al. 2014), των ωοθηκών (Gupta et al. 2013), του πνεύμονα (Ye et al. 2013) και του μαστού (Zhang et al. 2010)(Leontovich et al. 2018) (Diluvio et al. 2018). Επίσης αρκετές έρευνες έχουν παρατηρήσει υπερέκφραση του Notch3 στα καρκινικά κύτταρα, με ιδιαίτερα σημαντική αύξησή του σε πιο επιθετικές μορφές καρκίνου (Xue et al. 2017)(Diluvio et al. 2018). Στηριζόμενοι σε αυτά τα ευρήματα, μελετήσαμε την έκφραση του Notch3 γονιδίου στις κυτταρικές σειρές MCF-7 και MB-231. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν, με τη χρήση της μεθόδου της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου, ήρθαν σε αντίθεση με τη παραπάνω βιβλιογραφία. Στη παρούσα μελέτη, η έκφραση του Notch3 παρέμεινε σταθερή στα κύτταρα της κυτταρικής σειράς MCF-7, με τη παρατήρηση μίας μόνο μικρής τάσης αύξησης της, η οποία όμως δε μπορεί να θεωρηθεί στατιστικά σημαντική. Αντίθετα, στα MB-231 κύτταρα η έκφραση του Notch3 βρέθηκε σημαντικά μειωμένη, σε επίπεδο τέτοιο που θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η έκφραση του γονιδίου αυτού αποσιωπάται τελείως

στο συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο. Τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύονται από ένα αριθμό πρόσφατων ερευνών στις οποίες γίνεται λόγος για τις ογκοκατασταλτικές ιδιότητες της Notch3 πρωτεΐνης (Chen et al. 2016)(Dou et al. 2017)(Zhang et al. 2016)(Lin et al. 2018). Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Chen et al, η Notch3 μπορεί να διακόψει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού στη φάση G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, διακόπτοντας έτσι την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και κατ' επέκταση την αύξηση του όγκου. Αυτή η γνώση μπορεί να βοηθήσει στην ανάπτυξη νέων θεραπειών αντιμετώπισης του καρκίνου που στοχεύουν στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι το Notch3 αναστέλλει την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση των καρκινικών κυττάρων του μαστού και τη μετάσταση (Zhang et al. 2016)(Dou et al. 2017)(Lin et al. 2018). Επιπλέον, τα ευρήματα των μελετών αυτών συνάδουν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, καθώς και αυτές έδειξαν μείωση της έκφρασης του Notch3 στα MB-231 κύτταρα σε σύγκριση με τις MCF-7 και τις φυσιολογικές, MCF-12F κυτταρικές σειρές, θεωρώντας το Notch3 ένα ελπιδοφόρο θεραπευτικό μόριο για την αντιμετώπιση αυτού του τόσο επιθετικού καρκίνου του μαστού. Περαιτέρω μελέτες πρέπει να πραγματοποιηθούν για τον χαρακτηρισμό της οδού σηματοδότησης του Notch3 στα επιθηλιακά κύτταρα καρκίνου του μαστού και στην κατανόηση των καθοδικών μορίων στόχων της Notch3 στα κύτταρα αυτά.

Στη συνέχεια ελέγξαμε το ρόλο του miR-206 στην ανάπτυξη των καρκινικών κυτταρικών σειρών MCF-7 και MB-231. Επιλέξαμε το microRNA αυτό λόγω των ογκοκατασταλτικών ιδιοτήτων που φέρει και της σημαντικής μείωσης που παρουσιάζει στα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Μελέτες σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού, έχουν δείξει ότι το microRNA αυτό αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, τη διήθηση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων στοχεύοντας και καταστέλλοντας σημαντικά ογκογονίδια, η έκφραση των οποίων έχει δείχθει ότι απορυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό σε καρκινικές καταστάσεις (Wang et al. 2011)(Li et al. 2013)(Ren et al. 2014). Στη παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η ογκοκατασταλτική δράση του miR-206 στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του μαστού, και συγκεκριμένα των TNBC, μέσω της επίδρασης που ασκεί στα γονίδια c-Met, Bcl-2 και Notch3, τα οποία έχει δείχθει ότι αποτελούν άμεσους στόχους του μέσω δοκιμασίας λουσιφεράσης (Sun et al. 2015)(Song et al. 2009). Παρόλο που στη διεθνή βιβλιογραφία υποστηρίζεται το ογκογόνο δυναμικό των τριών αυτών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου του Notch3,

αλλά και η ογκοκατασταλτική δράση του miR-206 στα γονίδια αυτά, σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως ο γαστρικός καρκίνος (Zheng et al. 2015) (WANG et al. 2015), το καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου (Sun, Li, et al. 2015) (Koshizuka et al. 2017), των νεφρών, των ωοθηκών (Choi et al. 2017) αλλά και στο γλοίωμα (Hao et al. 2016) τα αποτελέσματα μας ήρθαν αντιμέτωπα με τη γνώση αυτή. Στις επιδράσεις με μιμητικά miR-206 που πραγματοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη, τόσο σε MCF-7 όσο και σε MB-231 καρκινικές κυτταρικές σειρές δε παρατηρήθηκε καμία μεταβολή της έκφρασης των παραπάνω γονιδίων η οποία θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι οφείλεται στην ογκοκατασταλτική δράση του miR-206. Αντιθέτως, η έκφραση των γονιδίων είτε παρέμεινε σταθερή είτε αυξήθηκε ύστερα από την επίδραση του miR-206. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι, ενδεχομένως, τα γονίδια-στόχοι του miR-206, c-Met, Bcl-2 και Notch3, στα καρκινικά κύτταρα του μαστού ελέγχονται και από άλλους μηχανισμούς του κυττάρου που ασκούν μεγαλύτερη επίδραση στην έκφραση των γονιδίων αυτών και εξουδετερώνουν την κατασταλτική ρύθμιση του miR-206. Τέτοιοι μηχανισμοί μπορεί να είναι είτε άλλοι επιγενετικοί παράγοντες είτε μεταλλάξεις σε μόρια – κλειδιά που ελέγχουν τη ρύθμιση της μεταγραφής και οι οποίες έχουν συμβεί κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης.

Στο σημείο αυτό, σκόπιμο είναι να αναφερθούν οι πιθανοί μελλοντικοί στόχοι της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας. Λόγω της απόκλισης μερικών αποτελεσμάτων από τη διεθνή βιβλιογραφία, μία πιθανή λύση είναι η επανάληψη των συγκεκριμένων μετρήσεων μετατρέποντας μερικές από τις συνθήκες του πειράματος κατά τέτοιο τρόπο που να ταυτίζονται πλήρως με τις συνθήκες των δημοσιευμένων ερευνών. Επιπροσθέτως, προτείνεται η διεξαγωγή των πειραμάτων σε ιστό μαστού προκειμένου να λάβουμε μία πιο πλήρη εικόνα της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων καθώς και του πιθανού ρόλου των υπό μελέτη miRNAs στον καρκίνο του μαστού. Τέλος, λόγω του περίπλοκου μηχανισμού δράσης των microRNAs στον τρόπο ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, χρήσιμη θα ήταν και η ανίχνευση των πρωτεϊνικών επιπέδων των γονιδίων c-Met, Bcl-2 και Notch3. Καθώς, σε πρώτη ανάλυση μπορεί να γίνεται αντιληπτό ότι η έκφραση των γονιδίων αυτών δεν επηρεάζεται από το miR-206 σε επίπεδο mRNA, όμως σε επίπεδο πρωτεΐνης να παρατηρηθούν σημαντικές διαφορές.

Συμπερασματικά, στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε η συνεισφορά και ο μηχανισμός δράσης δύο microRNAs στην καρκινογένεση του μαστού. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για τη συμμετοχή των microRNAs στην



ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η έκφραση των miR-1 και miR-206, μειώνεται δραματικά στις καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού σε σύγκριση με τις φυσιολογικές σειρές με τις οποίες ελέγχθηκαν. Λόγω αυτής της διαφοροποιημένης έκφρασης που παρουσιάζουν, το miR-1 και miR-206 θα μπορούσαν να θεωρηθούν πιθανοί βιοδείκτες διάγνωσης, πρόγνωσης και ανταπόκρισης στη θεραπεία για ασθενείς που πάσχουν από αυτόν τον τύπο καρκίνου. Επιπλέον, μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης, βρέθηκε ότι τα miRNAs αυτά ελέγχουν μία πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών, η πλειονότητα των οποίων απορυθμίζεται σε καρκινικές καταστάσεις. Συνεπώς, μέσω της αποκατάστασης των επιπέδων των miR-1 και miR-206 στα καρκινικά κύτταρα του μαστού ίσως ανασταλούν βασικά μονοπάτια καρκινογένεσης, γεγονός που αναδεικνύει τα microRNAs αυτά ως δυνητικά ελπιδοφόρα θεραπευτικά μόρια για το καρκίνο του μαστού. Τέλος, έγινε προσπάθεια ανεύρεσης των κατασταλτικών ιδιοτήτων του miR-206 στα καρκινικά κύτταρα διαφόρων τύπων καρκίνου του μαστού μέσω μελέτης των επιδράσεων του σε 3 γονίδια-στόχους που επιλέχθηκαν μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης. Τα γονίδια αυτά ήταν το c-Met, Bcl-2 και Notch3. Αναγνωρισμένοι στόχοι του miR-206 σε διάφορους άλλους τύπους καρκίνου. Αν και τα αλογονίδια c-Met και Bcl-2 παρουσίασαν πιο αυξημένη έκφραση στα κύτταρα του επιθετικού TNBC σε σχέση με τα κύτταρα των ERα θετικών όγκων, το miR-206 δεν κατάφερε να ελέγξει τον τρόπο ρύθμισης τους ύστερα από την χορήγησή του στα κύτταρα αυτά. Το ίδιο συνέβη και για το Notch3. Όμως, για το συγκεκριμένο γονίδιο διχάζεται η επιστημονική κοινότητα καθώς φαίνεται ότι το Notch3 έχει διττούς ρόλους. Υπάρχουν περιπτώσεις όγκων όπου η έκφραση του αυξάνεται και δρα προωθώντας την εξέλιξη του όγκου. Όμως, υπάρχει και ένας μεγάλος αριθμός πρόσφατων ερευνών, στις οποίες παρατηρείται σημαντική μείωση της Notch3 πρωτεΐνης και έχει δειχθεί ότι η αποκατάσταση της έχει ογκοκατασταλτικές ιδιότητες. Στη παρούσα μελέτη η έκφραση του Notch3 βρέθηκε μειωμένη σε μεγάλο βαθμό. Περεταίρω μελέτες κρίνονται απαραίτητες για τη διερεύνηση αυτών των αποτελεσμάτων και την κατανόηση των μηχανισμών δράσεων των miR-1 και miR-206 ειδικά στο τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdel-Fatah, T. M. A. et al. 2013. “Bcl2 Is an Independent Prognostic Marker of Triple Negative Breast Cancer (TNBC) and Predicts Response to Anthracycline Combination (ATC) Chemotherapy (CT) in Adjuvant and Neoadjuvant Settings.” *Annals of Oncology* 24(11):2801–7.
- Ahn, Sung Gwe, Seung Jun Kim, Cheungyeul Kim, and Joon Jeong. 2016. “Molecular Classification of Triple-Negative Breast Cancer.” *Journal of Breast Cancer* 19(3):223–30.
- Akl, Mohamed R. et al. 2014. “Olive Phenolics as C-Met Inhibitors: (-)-Oleocanthal Attenuates Cell Proliferation, Invasiveness, and Tumor Growth in Breast Cancer Models.” *PloS One* 9(5):e97622.
- Ambros, Victor et al. 2003. “A Uniform System for MicroRNA Annotation.” *RNA (New York, N.Y.)* 9(3):277–79.
- Ambs, S. et al. 2008. “Genomic Profiling of MicroRNA and Messenger RNA Reveals Deregulated MicroRNA Expression in Prostate Cancer.” *Cancer Research* 68(15):6162–70.
- Amé, Jean-Christophe, Catherine Spenlehauer, and Gilbert de Murcia. 2004. “The PARP Superfamily.” *BioEssays* 26(8):882–93.
- Amir, Sumaira et al. 2016. “Regulation of the T-Box Transcription Factor Tbx3 by the Tumour Suppressor MicroRNA-206 in Breast Cancer.” *British Journal of Cancer* 114(10):1125–34.
- Anders, Carey K., Vandana Abramson, Tira Tan, and Rebecca Dent. 2016. “The Evolution of Triple-Negative Breast Cancer: From Biology to Novel Therapeutics.” *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 36:34–42.
- Andreopoulou, Eleni, Sarah J. Schweber, Joseph A. Sparano, and Hayley M. McDaid. 2015. “Therapies for Triple Negative Breast Cancer.” *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 16(7):983–98.
- Arnold, Levi, Jonathan Enders, and Sufi Mary Thomas. 2017. “Activated HGF-c-Met Axis in Head and Neck Cancer.” *Cancers* 9(12):169.
- Avery-Kiejda, Kelly A., Stephen G. Braye, Andrea Mathe, John F. Forbes, and Rodney J. Scott. 2014. “Decreased Expression of Key Tumour Suppressor MicroRNAs Is Associated with Lymph Node Metastases in Triple Negative Breast Cancer.” *BMC Cancer* 14(1):51.
- Bahrami, Afsane et al. 2017. “C-Met as a Potential Target for the Treatment of Gastrointestinal Cancer: Current Status and Future Perspectives.” *Journal of Cellular Physiology* 232(10):2657–73.
- Beltran, Adriana S. et al. 2011. “Suppression of Breast Tumor Growth and Metastasis by an Engineered Transcription Factor” edited by A. J. Cooney. *PLoS ONE* 6(9):e24595.

- Bhaskaran, M. and M. Mohan. 2014. "MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease." *Veterinary Pathology* 51(4):759–74.
- Bianchini, Giampaolo, Justin M. Balko, Ingrid A. Mayer, Melinda E. Sanders, and Luca Gianni. 2016. "Triple-Negative Breast Cancer: Challenges and Opportunities of a Heterogeneous Disease." *Nature Reviews Clinical Oncology* 13(11):674–90.
- Birchmeier, Carmen, Walter Birchmeier, Ermanno Gherardi, and George F. Vande Woude. 2003. "Met, Metastasis, Motility and More." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4(12):915–25.
- Bonotto, Marta et al. 2014. "Measures of Outcome in Metastatic Breast Cancer: Insights from a Real-World Scenario." *The Oncologist* 19(6):608–15.
- Boras, Emhamed et al. 2014. "Monomeric C-Reactive Protein and Notch-3 Cooperatively Increase Angiogenesis through PI3K Signalling Pathway." *Cytokine* 69(2):165–79.
- Bouchalova, Katerina et al. 2015. "BCL2 Is an Independent Predictor of Outcome in Basal-like Triple-Negative Breast Cancers Treated with Adjuvant Anthracycline-Based Chemotherapy." *Tumor Biology* 36(6):4243–52.
- Del Bufalo, D., A. Biroccio, C. Leonetti, and G. Zupi. 1997. "Bcl-2 Overexpression Enhances the Metastatic Potential of a Human Breast Cancer Line." *The FASEB Journal* 11(12):947–53.
- Bushati, Natascha and Stephen M. Cohen. 2007. "MicroRNA Functions." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23(1):175–205.
- Calin, G. A. et al. 2004. "Human MicroRNA Genes Are Frequently Located at Fragile Sites and Genomic Regions Involved in Cancers." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(9):2999–3004.
- Carey, Lisa A. et al. 2007. "The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13(8):2329–34.
- Chae, Young Kwang et al. 2016. "The Association between EGFR and CMET Expression and Phosphorylation and Its Prognostic Implication in Patients with Breast Cancer." *PloS One* 11(4):e0152585.
- Chen, Chun-Fa et al. 2016. "Notch3 Overexpression Causes Arrest of Cell Cycle Progression by Inducing Cdh1 Expression in Human Breast Cancer Cells." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 15(3):432–40.
- Chendrimada, Thimmaiah P. et al. 2005. "TRBP Recruits the Dicer Complex to Ago2 for MicroRNA Processing and Gene Silencing." *Nature* 436(7051):740–44.
- Cheng, Yongxia et al. 2018. "Liver X Receptor  $\alpha$  Is Targeted by MicroRNA-1 to Inhibit Cardiomyocyte Apoptosis through a ROS-Mediated Mitochondrial Pathway." *Biochemistry and Cell Biology* 96(1):11–18.

- Chico, Timothy JA, Marta Milo, and David C. Crossman. 2009. "The Genetics of Cardiovascular Disease: New Insights from Emerging Approaches." *The Journal of Pathology* 220(2):n/a-n/a.
- Choi, Bo-Hyun, Da Young Ryu, In-Geun Ryoo, and Mi-Kyoung Kwak. 2017. "NFE2L2/NRF2 Silencing-Inducible MiR-206 Targets c-MET/EGFR and Suppresses BCRP/ABCG2 in Cancer Cells." *Oncotarget* 8(63):107188–205.
- Chou, Jinjiang et al. 2016. "MALAT1 Induced Migration and Invasion of Human Breast Cancer Cells by Competitively Binding MiR-1 with Cdc42." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 472(1):262–69.
- Cooper, C. S. et al. n.d. "Molecular Cloning of a New Transforming Gene from a Chemically Transformed Human Cell Line." *Nature* 311(5981):29–33.
- Czech, Benjamin et al. 2009. "Hierarchical Rules for Argonaute Loading in *Drosophila*." *Molecular Cell* 36(3):445–56.
- Dang, Thao P. 2012. "Notch, Apoptosis and Cancer." Pp. 199–209 in *Advances in experimental medicine and biology*. Vol. 727.
- Datta, J. et al. 2008. "Methylation Mediated Silencing of MicroRNA-1 Gene and Its Role in Hepatocellular Carcinogenesis." *Cancer Research* 68(13):5049–58.
- Denli, Ahmet M., Bastiaan B. J. Tops, Ronald H. A. Plasterk, René F. Ketting, and Gregory J. Hannon. 2004. "Processing of Primary MicroRNAs by the Microprocessor Complex." *Nature* 432(7014):231–35.
- Dent, R. et al. 2007. "Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence." *Clinical Cancer Research* 13(15):4429–34.
- Diluvio, Giulia et al. 2018. "NOTCH3 Inactivation Increases Triple Negative Breast Cancer Sensitivity to Gefitinib by Promoting EGFR Tyrosine Dephosphorylation and Its Intracellular Arrest." *Oncogenesis* 7(5):42.
- Dou, Xiao-Wei et al. 2017. "Notch3 Maintains Luminal Phenotype and Suppresses Tumorigenesis and Metastasis of Breast Cancer via Trans-Activating Estrogen Receptor- $\alpha$ ." *Theranostics* 7(16):4041–56.
- Eterno, Vincenzo et al. 2014. "Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (ASCs) May Favour Breast Cancer Recurrence via HGF/c-Met Signaling." *Oncotarget* 5(3):613–33.
- Etheridge, Alton, Inyoul Lee, Leroy Hood, David Galas, and Kai Wang. 2011. "Extracellular MicroRNA: A New Source of Biomarkers." *Mutation Research* 717(1–2):85–90.
- Farazi, Thalia A., Jessica I. Spitzer, Pavel Morozov, and Thomas Tuschl. 2011. "MiRNAs in Human Cancer." *The Journal of Pathology* 223(2):102–15.
- Farmer, Hannah et al. 2005. "Targeting the DNA Repair Defect in BRCA Mutant Cells as a Therapeutic Strategy." *Nature* 434(7035):917–21.
- Fragkiadaki, Persefoni et al. 2015. "Downregulation of Notch Signaling Pathway in

- Late Preterm and Term Placentas from Pregnancies Complicated by Preeclampsia” edited by M.-H. Lee. *PLOS ONE* 10(5):e0126163.
- Fu, Y. et al. 2015. “Hsa-MiR-206 Represses the Proliferation and Invasion of Breast Cancer Cells by Targeting Cx43.” *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 19(11):2091–2104.
- Fulda, Simone. 2014. “Synthetic Lethality by Co-Targeting Mitochondrial Apoptosis and PI3K/Akt/MTOR Signaling.” *Mitochondrion* 19:85–87.
- Gao, Lu, Hongliang Zuo, Keling Liu, Haiyi Li, and Guohua Zhong. 2012. “A New Strategy for Identification of Highly Conserved MicroRNAs in Non-Model Insect, *Spodoptera Litura*.” *International Journal of Molecular Sciences* 13(1):612–27.
- Gastaldi, Stefania, Paolo M. Comoglio, and Livio Trusolino. 2010. “The Met Oncogene and Basal-like Breast Cancer: Another Culprit to Watch out For?” *Breast Cancer Research* 12(4):208.
- Ge, Xin et al. 2015. “Overexpression of MiR-206 Suppresses Glycolysis, Proliferation and Migration in Breast Cancer Cells via PFKFB3 Targeting.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 463(4):1115–21.
- Geyer, Felipe C. et al. 2017. “The Spectrum of Triple-Negative Breast Disease.” *The American Journal of Pathology* 187(10):2139–51.
- Gherardi, Ermanno, Walter Birchmeier, Carmen Birchmeier, and George Vande Woude. 2012. “Targeting MET in Cancer: Rationale and Progress.” *Nature Reviews. Cancer* 12(2):89–103.
- Ghoncheh, Mahshid, Zahra Pournamdar, and Hamid Salehiniya. 2016. “Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World.” *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP* 17(S3):43–46.
- Goljanek-Whysall, K. et al. 2012. “Regulation of Multiple Target Genes by MiR-1 and MiR-206 Is Pivotal for C2C12 Myoblast Differentiation.” *Journal of Cell Science* 125(15):3590–3600.
- Gonzalez-Angulo, Ana M. et al. 2013. “Frequency of Mesenchymal-Epithelial Transition Factor Gene (*MET*) and the Catalytic Subunit of Phosphoinositide-3-Kinase (*PIK3CA*) Copy Number Elevation and Correlation with Outcome in Patients with Early Stage Breast Cancer.” *Cancer* 119(1):7–15.
- Gross, A., J. M. McDonnell, and S. J. Korsmeyer. 1999. “BCL-2 Family Members and the Mitochondria in Apoptosis.” *Genes & Development* 13(15):1899–1911.
- Guest, Rachel V et al. 2016. “Notch3 Drives Development and Progression of Cholangiocarcinoma.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(43):12250–55.
- Guney Eskiler, Gamze, Gulsah Cecener, Unal Egeli, and Berrin Tunca. 2018. “Triple Negative Breast Cancer: New Therapeutic Approaches and *BRCA* Status.” *APMIS* 126(5):371–79.

- Guo, Hongrui et al. 2015. "Modulation of the PI3K/Akt Pathway and Bcl-2 Family Proteins Involved in Chicken's Tubular Apoptosis Induced by Nickel Chloride (NiCl<sub>2</sub>)." *International Journal of Molecular Sciences* 16(9):22989–11.
- Guo, Yi et al. 2016. "Effects of Methylglyoxal and Glyoxalase I Inhibition on Breast Cancer Cells Proliferation, Invasion, and Apoptosis through Modulation of MAPKs, MMP9, and Bcl-2." *Cancer Biology & Therapy* 17(2):169–80.
- Gupta, Nidhi, Zihua Xu, Ahmed El-Sehemy, Helen Steed, and YangXin Fu. 2013. "Notch3 Induces Epithelial–mesenchymal Transition and Attenuates Carboplatin-Induced Apoptosis in Ovarian Cancer Cells." *Gynecologic Oncology* 130(1):200–206.
- Han, Chao, Zujiang Yu, Zhenfeng Duan, and Quancheng Kan. 2014. "Role of MicroRNA-1 in Human Cancer and Its Therapeutic Potentials." *BioMed Research International* 2014:428371.
- Hanson, Erin K., Helge Lubenow, and Jack Ballantyne. 2009. "Identification of Forensically Relevant Body Fluids Using a Panel of Differentially Expressed MicroRNAs." *Analytical Biochemistry* 387(2):303–14.
- Hao, Wenjiong et al. 2016. "MicroRNA-206 Inhibited the Progression of Glioblastoma Through BCL-2." *Journal of Molecular Neuroscience : MN* 60(4):531–38.
- Hiscox, S. et al. 2000. "Inhibition of HGF/SF-Induced Breast Cancer Cell Motility and Invasion by the HGF/SF Variant, NK4." *Breast Cancer Research and Treatment* 59(3):245–54.
- Ho-Yen, Colan M., J. Louise Jones, and Stephanie Kermorgant. 2015a. "The Clinical and Functional Significance of C-Met in Breast Cancer: A Review." *Breast Cancer Research : BCR* 17(1):52.
- Ho-Yen, Colan M., J. Louise Jones, and Stephanie Kermorgant. 2015b. "The Clinical and Functional Significance of C-Met in Breast Cancer: A Review." *Breast Cancer Research* 17(1):52.
- Hon, Jane Date C. et al. 2016. "Breast Cancer Molecular Subtypes: From TNBC to QNBC." *American Journal of Cancer Research* 6(9):1864–72.
- Horak, Martin, Jan Novak, and Julie Bienertova-Vasku. 2016. "Muscle-Specific MicroRNAs in Skeletal Muscle Development." *Developmental Biology* 410(1):1–13.
- Horton, Janet K., Reshma Jaggi, Wendy A. Woodward, and Alice Ho. 2018. "Breast Cancer Biology: Clinical Implications for Breast Radiation Therapy." *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 100(1):23–37.
- Hudson, Robert S. et al. 2012. "MicroRNA-1 Is a Candidate Tumor Suppressor and Prognostic Marker in Human Prostate Cancer." *Nucleic Acids Research* 40(8):3689–3703.
- Hugh, Judith et al. 2009. "Breast Cancer Subtypes and Response to Docetaxel in Node-Positive Breast Cancer: Use of an Immunohistochemical Definition in the

- BCIRG 001 Trial.” *Journal of Clinical Oncology* 27(8):1168–76.
- Hung, Chao-Ming et al. 2011. “Osthole Suppresses Hepatocyte Growth Factor (HGF)-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition via Repression of the c-Met/Akt/MTOR Pathway in Human Breast Cancer Cells.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(17):9683–90.
- Inanc, Mevlude et al. 2014. “Cytokeratin 5/6, c-Met Expressions, and PTEN Loss Prognostic Indicators in Triple-Negative Breast Cancer.” *Medical Oncology* 31(1):801.
- Inao, Touko et al. 2018. “Bcl-2 Inhibition Sensitizes Triple-Negative Human Breast Cancer Cells to Doxorubicin.” *Oncotarget* 9(39):25545–56.
- Iwakawa, Hiro-oki and Yukihide Tomari. 2015. “The Functions of MicroRNAs: MRNA Decay and Translational Repression.” *Trends in Cell Biology* 25(11):651–65.
- Jena, Manoj Kumar. 2017. “MicroRNAs in the Development and Neoplasia of the Mammary Gland.” *F1000Research* 6:1018.
- Koboldt, Daniel C. et al. 2012. “Comprehensive Molecular Portraits of Human Breast Tumours.” *Nature* 490(7418):61–70.
- Koshizuka, Keiichi et al. 2017. “Dual-Receptor (EGFR and c-MET) Inhibition by Tumor-Suppressive MiR-1 and MiR-206 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.” *Journal of Human Genetics* 62(1):113–21.
- Kozomara, Ana and Sam Griffiths-Jones. 2014. “MiRBase: Annotating High Confidence MicroRNAs Using Deep Sequencing Data.” *Nucleic Acids Research* 42(Database issue):D68-73.
- Kumar, Madhu S. et al. 2009. “Dicer1 Functions as a Haploinsufficient Tumor Suppressor.” *Genes & Development* 23(23):2700–2704.
- Landthaler, Markus, Abdullah Yalcin, and Thomas Tuschl. 2004. “The Human DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8 and Its D. Melanogaster Homolog Are Required for MiRNA Biogenesis.” *Current Biology : CB* 14(23):2162–67.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, and V. Ambros. 1993. “The C. Elegans Heterochronic Gene Lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to Lin-14.” *Cell* 75(5):843–54.
- Lee, Sooncheol and Shobha Vasudevan. 2013. “Post-Transcriptional Stimulation of Gene Expression by MicroRNAs.” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 768:97–126.
- Lehmann, Brian D. et al. 2011. “Identification of Human Triple-Negative Breast Cancer Subtypes and Preclinical Models for Selection of Targeted Therapies.” *The Journal of Clinical Investigation* 121(7):2750–67.
- Leone, Vincenza et al. 2011. “MiR-1 Is a Tumor Suppressor in Thyroid Carcinogenesis Targeting CCND2, CXCR4, and SDF-1 $\alpha$ .” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96(9):E1388–98.

- Leontovich, Alexey A. et al. 2018. "NOTCH3 Expression Is Linked to Breast Cancer Seeding and Distant Metastasis." *Breast Cancer Research* 20(1):105.
- Li, Yuyang, Fanzhen Hong, and Zhigang Yu. 2013. "Decreased Expression of MicroRNA-206 in Breast Cancer and Its Association with Disease Characteristics and Patient Survival." *Journal of International Medical Research* 41(3):596–602.
- Liang, Zhongxing, Xuehai Bian, and Hyunsuk Shim. 2016. "Downregulation of MicroRNA-206 Promotes Invasion and Angiogenesis of Triple Negative Breast Cancer." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 477(3):461–66.
- Liedtke, Cornelia et al. 2008. "Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 26(8):1275–81.
- Lin, Hao-Yu et al. 2018. "Notch3 Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer via a Novel Mechanism, Upregulation of GATA-3 Expression." *Oncogenesis* 7(8):59.
- Liu, Ning et al. 2012. "MicroRNA-206 Promotes Skeletal Muscle Regeneration and Delays Progression of Duchenne Muscular Dystrophy in Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 122(6):2054–65.
- Liu, Ruilei et al. 2015. "Hsa-MiR-1 Suppresses Breast Cancer Development by down-Regulating K-Ras and Long Non-Coding RNA MALAT1." *International Journal of Biological Macromolecules* 81:491–97.
- Livasy, Chad A. et al. 2006. "Phenotypic Evaluation of the Basal-like Subtype of Invasive Breast Carcinoma." *Modern Pathology* 19(2):264–71.
- Lu, Juan et al. 2014. "EZH2 Promotes Angiogenesis through Inhibition of MiR-1/Endothelin-1 Axis in Nasopharyngeal Carcinoma." *Oncotarget* 5(22):11319–32.
- Lu, Jun et al. 2005. "MicroRNA Expression Profiles Classify Human Cancers." *Nature* 435(7043):834–38.
- Ma, Guoda et al. 2015. "MiR-206, a Key Modulator of Skeletal Muscle Development and Disease." *International Journal of Biological Sciences* 11(3):345–52.
- Massihnia, Daniela et al. 2016. "Triple Negative Breast Cancer: Shedding Light onto the Role of Pi3k/Akt/Mtor Pathway." *Oncotarget* 7(37):60712–22.
- Mataki, Hiroko et al. 2015. "Downregulation of the MicroRNA-1/133a Cluster Enhances Cancer Cell Migration and Invasion in Lung-Squamous Cell Carcinoma via Regulation of Coronin1C." *Journal of Human Genetics* 60(2):53–61.
- Mayer, Ingrid A. and Carlos L. Arteaga. 2016. "The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment." *Annual Review of Medicine* 67(1):11–28.
- Medimegh, Imen et al. 2014. "MicroRNAs Expression in Triple Negative vs Non



- Triple Negative Breast Cancer in Tunisia: Interaction with Clinical Outcome.” edited by P. Rameshwar. *PloS One* 9(11):e111877.
- Meurette, O. et al. 2009. “Notch Activation Induces Akt Signaling via an Autocrine Loop to Prevent Apoptosis in Breast Epithelial Cells.” *Cancer Research* 69(12):5015–22.
- Meurette, Olivier et al. 2009. “Notch Activation Induces Akt Signaling via an Autocrine Loop to Prevent Apoptosis in Breast Epithelial Cells.” *Cancer Research* 69(12):5015–22.
- von Minckwitz, Gunter et al. 2014. “Neoadjuvant Carboplatin in Patients with Triple-Negative and HER2-Positive Early Breast Cancer (GeparSixto; GBG 66): A Randomised Phase 2 Trial.” *The Lancet Oncology* 15(7):747–56.
- Minuti, Gabriele and Lorenza Landi. 2015. “MET Deregulation in Breast Cancer.” *Annals of Translational Medicine* 3(13):181.
- Mitchell, Patrick S. et al. 2008. “Circulating MicroRNAs as Stable Blood-Based Markers for Cancer Detection.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(30):10513–18.
- Nielsen, T. O. et al. 2004. “Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma.” *Clinical Cancer Research* 10(16):5367–74.
- Nohata, Nijiro, Toyoyuki Hanazawa, Hideki Enokida, and Naohiko Seki. 2012. “MicroRNA-1/133a and MicroRNA-206/133b Clusters: Dysregulation and Functional Roles in Human Cancers.” *Oncotarget* 3(1):9–21.
- Novák, Jan, Peter Kružliak, Julie Bienertová-Vašků, Ondřej Slabý, and Miroslav Novák. 2014. “MicroRNA-206: A Promising Theranostic Marker.” *Theranostics* 4(2):119–33.
- O’Day, Elizabeth and Ashish Lal. 2010. “MicroRNAs and Their Target Gene Networks in Breast Cancer.” *Breast Cancer Research* 12(2):201.
- Okamura, Katsutomo, Na Liu, and Eric C. Lai. 2009. “Distinct Mechanisms for MicroRNA Strand Selection by Drosophila Argonautes.” *Molecular Cell* 36(3):431–44.
- Ozawa, Tsuyoshi et al. 2014. “Nuclear Notch3 Expression Is Associated with Tumor Recurrence in Patients with Stage II and III Colorectal Cancer.” *Annals of Surgical Oncology* 21(8):2650–58.
- Palomero, Teresa et al. 2007. “Mutational Loss of PTEN Induces Resistance to NOTCH1 Inhibition in T-Cell Leukemia.” *Nature Medicine* 13(10):1203–10.
- Pan, Bao-Long et al. 2018. “Effects of MicroRNA-206 on Osteosarcoma Cell Proliferation, Apoptosis, Migration and Invasion by Targeting ANXA2 Through the AKT Signaling Pathway.” *Cellular Physiology and Biochemistry* 45(4):1410–22.
- PANDYA, SONALI and RICHARD G. MOORE. 2011. “Breast Development and

- Anatomy." *Clinical Obstetrics and Gynecology* 54(1):91–95.
- Pasquinelli, A. E. et al. 2000. "Conservation of the Sequence and Temporal Expression of Let-7 Heterochronic Regulatory RNA." *Nature* 408(6808):86–89.
- Perou, Charles M. et al. 2000. "Molecular Portraits of Human Breast Tumours." *Nature* 406(6797):747–52.
- Piasecka, Dominika, Marcin Braun, Radzislaw Kordek, Rafal Sadej, and Hanna Romanska. 2018. "MicroRNAs in Regulation of Triple-Negative Breast Cancer Progression." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 144(8):1401–11.
- Raghav, Kanwal P. et al. 2012. "CMET and Phospho-CMET Protein Levels in Breast Cancers and Survival Outcomes." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18(8):2269–77.
- Reinhart, B. J. et al. 2000. "The 21-Nucleotide Let-7 RNA Regulates Developmental Timing in *Caenorhabditis Elegans*." *Nature* 403(6772):901–6.
- Ren, Jun et al. 2014. "MicroRNA-206 Suppresses Gastric Cancer Cell Growth and Metastasis." *Cell & Bioscience* 4(1):26.
- Saini, H. K., S. Griffiths-Jones, and A. J. Enright. 2007. "Genomic Analysis of Human MicroRNA Transcripts." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(45):17719–24.
- Samaeekia, Ravand et al. 2017. "MiR-206 Inhibits Stemness and Metastasis of Breast Cancer by Targeting MKL1/IL11 Pathway." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 23(4):1091–1103.
- Sasaki, Akiko et al. 2014. "Decreased MiR-206 Expression in BRCA1 Wild-Type Triple-Negative Breast Cancer Cells after Concomitant Treatment with Gemcitabine and a Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Inhibitor." *Anticancer Research* 34(9):4893–97.
- Schepke, Lea et al. 2012. "Notch Promotes Vascular Maturation by Inducing Integrin-Mediated Smooth Muscle Cell Adhesion to the Endothelial Basement Membrane." *Blood* 119(9):2149–58.
- Sevignani, Cinzia, George A. Calin, Linda D. Siracusa, and Carlo M. Croce. 2006. "Mammalian MicroRNAs: A Small World for Fine-Tuning Gene Expression." *Mammalian Genome* 17(3):189–202.
- Sharma, P. 2016. "Biology and Management of Patients With Triple-Negative Breast Cancer." *The Oncologist* 21(9):1050–62.
- Shi, Huichang et al. 2015. "Prognostic Significance of Combined MicroRNA-206 and CyclinD2 in Gastric Cancer Patients after Curative Surgery: A Retrospective Cohort Study." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 71:210–15.
- Siegel, Rebecca L., Kimberly D. Miller, and Ahmedin Jemal. 2017. "Cancer Statistics, 2017." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 67(1):7–30.

- Slack, F. J. et al. 2000. “The Lin-41 RBCC Gene Acts in the C. Elegans Heterochronic Pathway between the Let-7 Regulatory RNA and the LIN-29 Transcription Factor.” *Molecular Cell* 5(4):659–69.
- Song, Guisheng, Yuxia Zhang, and Li Wang. 2009. “MicroRNA-206 Targets Notch3, Activates Apoptosis, and Inhibits Tumor Cell Migration and Focus Formation.” *The Journal of Biological Chemistry* 284(46):31921–27.
- Stitt-Cavanagh, Erin, Laura MacLeod, and Chris Kennedy. 2009. “The Podocyte in Diabetic Kidney Disease.” *TheScientificWorldJournal* 9:1127–39.
- Subik, Kristina et al. 2010. “The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines.” *Breast Cancer : Basic and Clinical Research* 4:35–41.
- Sun, Chengcao, Shujun Li, et al. 2015. “Down-Regulation of c-Met and Bcl2 by MicroRNA-206, Activates Apoptosis, and Inhibits Tumor Cell Proliferation, Migration and Colony Formation.” *Oncotarget* 6(28):25533–74.
- Sun, Chengcao, Zhidong Liu, et al. 2015. “Down-Regulation of c-Met and Bcl2 by MicroRNA-206, Activates Apoptosis, and Inhibits Tumor Cell Proliferation, Migration and Colony Formation.” *Oncotarget* 6(28):25533–74.
- Sun, Yi-Sheng et al. 2017. “Risk Factors and Preventions of Breast Cancer.” *International Journal of Biological Sciences* 13(11):1387–97.
- Taft, Ryan J., Ken C. Pang, Timothy R. Mercer, Marcel Dinger, and John S. Mattick. 2010. “Non-Coding RNAs: Regulators of Disease.” *The Journal of Pathology* 220(2):126–39.
- Tang, Joy, Aamir Ahmad, and Fazlul H. Sarkar. 2012. “The Role of MicroRNAs in Breast Cancer Migration, Invasion and Metastasis.” *International Journal of Molecular Sciences* 13(12):13414–37.
- Thakur, Seema, Rajesh K. Grover, Sanjay Gupta, Ajay K. Yadav, and Bhudev C. Das. 2016. “Identification of Specific MiRNA Signature in Paired Sera and Tissue Samples of Indian Women with Triple Negative Breast Cancer.” edited by A. Ahmad. *PLoS One* 11(7):e0158946.
- Tian, Rong, Tao Liu, Li Qiao, Mei Gao, and Jing Li. 2015. “Decreased Serum MicroRNA-206 Level Predicts Unfavorable Prognosis in Patients with Melanoma.” *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8(3):3097–3103.
- Twelves, Chris et al. 2010. “Phase III Trials of Eribulin Mesylate (E7389) in Extensively Pretreated Patients With Locally Recurrent or Metastatic Breast Cancer.” *Clinical Breast Cancer* 10(2):160–63.
- Um, Hong-Duck. 2016. “Bcl-2 Family Proteins as Regulators of Cancer Cell Invasion and Metastasis: A Review Focusing on Mitochondrial Respiration and Reactive Oxygen Species.” *Oncotarget* 7(5):5193–5203.
- Valadi, Hadi et al. 2007. “Exosome-Mediated Transfer of MRNAs and MicroRNAs Is

- a Novel Mechanism of Genetic Exchange between Cells.” *Nature Cell Biology* 9(6):654–59.
- Valsecchi, Valeria, Marina Boido, Elena De Amicis, Antonio Piras, and Alessandro Vercelli. 2015. “Expression of Muscle-Specific MiRNA 206 in the Progression of Disease in a Murine SMA Model” edited by G. Pignataro. *PLOS ONE* 10(6):e0128560.
- Vasudevan, Shobha, Yingchun Tong, and Joan A. Steitz. 2007. “Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can up-Regulate Translation.” *Science (New York, N.Y.)* 318(5858):1931–34.
- Vella, Monica C. and Frank J. Slack. 2005. “C. Elegans MicroRNAs.” *WormBook* 1–9.
- Vergheze, E. T., A. M. Hanby, V. Speirs, and T. A. Hughes. 2008. “Small Is Beautiful: MicroRNAs and Breast Cancer-Where Are We Now?” *The Journal of Pathology* 215(3):214–21.
- Vickers, Kasey C., Brian T. Palmisano, Bassem M. Shoucri, Robert D. Shamburek, and Alan T. Remaley. 2011. “MicroRNAs Are Transported in Plasma and Delivered to Recipient Cells by High-Density Lipoproteins.” *Nature Cell Biology* 13(4):423–33.
- Vimalraj, S., P. J. Miranda, B. Ramyakrishna, and N. Selvamurugan. 2013. “Regulation of Breast Cancer and Bone Metastasis by MicroRNAs.” *Disease Markers* 35(5):369–87.
- Wang, Jun et al. 2014. “MiR-206 Inhibits Cell Migration through Direct Targeting of the Actin-Binding Protein Coronin 1C in Triple-Negative Breast Cancer.” *Molecular Oncology* 8(8):1690–1702.
- Wang, Wenli, Chengyu Z. Prince, Yongshan Mou, and Matthew J. Pollman. 2002. “Notch3 Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells Induces C-FLIP Expression via ERK/MAPK Activation. Resistance to Fas Ligand-Induced Apoptosis.” *The Journal of Biological Chemistry* 277(24):21723–29.
- WANG, XIAO-WEI et al. 2015. “MicroRNA-206 Attenuates Tumor Proliferation and Migration Involving the Downregulation of NOTCH3 in Colorectal Cancer.” *Oncology Reports* 33(3):1402–10.
- Wang, Xiaochen, Chunhua Ling, Yanyan Bai, and Jun Zhao. 2011. “MicroRNA-206 Is Associated With Invasion and Metastasis of Lung Cancer.” *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 294(1):88–92.
- Wang, Xue et al. 2002. “A Mechanism of Cell Survival: Sequestration of Fas by the HGF Receptor Met.” *Molecular Cell* 9(2):411–21.
- Weber, Jessica A. et al. 2010. “The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids.” *Clinical Chemistry* 56(11):1733–41.
- Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun. 1993. “Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene Lin-14 by Lin-4 Mediates Temporal Pattern Formation in C.

- Elegans.” *Cell* 75(5):855–62.
- Xue, Dong et al. 2016. “MicroRNA-206 Attenuates the Growth and Angiogenesis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Blocking the 14-3-3&#x3B6;/STAT3/HIF-1&#x3B1;/VEGF Signaling.” *Oncotarget* 7(48):79805–13.
- Xue, Siliang et al. 2017. “Expression of Jagged1/Notch3 Signaling Pathway and Their Relationship with the Tumor Angiogenesis in TNBC.” *Archives of Medical Research* 48(2):169–79.
- Yaacob, Nik Soriani, Nik Nursyazni Nik Mohamed Kamal, and Mohd Nor Norazmi. 2014. “Synergistic Anticancer Effects of a Bioactive Subfraction of *Strobilanthes crispus* and Tamoxifen on MCF-7 and MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cell Lines.” *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14(1):252.
- Yam, Clinton, Sendurai A. Mani, and Stacy L. Moulder. 2017. “Targeting the Molecular Subtypes of Triple Negative Breast Cancer: Understanding the Diversity to Progress the Field.” *The Oncologist* 22(9):1086–93.
- Yant, J., L. Buluwela, B. Niranjana, B. Gusterson, and T. Kamalati. 1998. “In Vivo Effects of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor on Mouse Mammary Gland Development.” *Experimental Cell Research* 241(2):476–81.
- Yao, Jun and Cuijuan Qian. 2010a. “Inhibition of Notch3 Enhances Sensitivity to Gemcitabine in Pancreatic Cancer through an Inactivation of PI3K/Akt-Dependent Pathway.” *Medical Oncology (Northwood, London, England)* 27(3):1017–22.
- Yao, Jun and Cuijuan Qian. 2010b. “Inhibition of Notch3 Enhances Sensitivity to Gemcitabine in Pancreatic Cancer through an Inactivation of PI3K/Akt-Dependent Pathway.” *Medical Oncology* 27(3):1017–22.
- Ye, Yuan-zi et al. 2013. “Notch3 Overexpression Associates with Poor Prognosis in Human Non-Small-Cell Lung Cancer.” *Medical Oncology* 30(2):595.
- Yi, Rui, Yi Qin, Ian G. Macara, and Bryan R. Cullen. 2003. “Exportin-5 Mediates the Nuclear Export of Pre-MicroRNAs and Short Hairpin RNAs.” *Genes & Development* 17(24):3011–16.
- Yoshino, Hirofumi et al. 2012. “Tumor Suppressive MicroRNA-1 Mediated Novel Apoptosis Pathways through Direct Inhibition of Splicing Factor Serine/Arginine-Rich 9 (SRSF9/SRp30c) in Bladder Cancer.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417(1):588–93.
- Zagouri, F. et al. 2013. “High MET Expression Is an Adverse Prognostic Factor in Patients with Triple-Negative Breast Cancer.” *British Journal of Cancer* 108(5):1100–1105.
- Zhang, Chun, Cong Yao, Haopeng Li, Guoyu Wang, and Xijing He. 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, X. et al. 2016. “Notch3 Inhibits Epithelial–mesenchymal Transition by Activating Kibra-Mediated Hippo/YAP Signaling in Breast Cancer Epithelial Cells.” *Oncogenesis* 5(11):e269–e269.
- Zhang, Zhiyuan et al. 2010. “Notch3 in Human Breast Cancer Cell Lines Regulates Osteoblast-Cancer Cell Interactions and Osteolytic Bone Metastasis.” *The American Journal of Pathology* 177(3):1459–69.
- Zhao, Gao-Xiang, Hao Pan, Dong-Yun Ouyang, and Xian-Hui He. 2015. “The Critical Molecular Interconnections in Regulating Apoptosis and Autophagy.” *Annals of Medicine* 47(4):305–15.
- Zhao, Xixi et al. 2017. “Clinicopathological and Prognostic Significance of C-Met Overexpression in Breast Cancer.” *Oncotarget* 8(34):56758–67.
- Zheng, Zhiqiang et al. 2015. “MicroRNA-206: Effective Inhibition of Gastric Cancer Progression through the c-Met Pathway” edited by H. Suzuki. *PLOS ONE* 10(7):e0128751.
- Zhou, Jing et al. 2013. “MiR-206 Is down-Regulated in Breast Cancer and Inhibits Cell Proliferation through the up-Regulation of CyclinD2.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 433(2):207–12.

### **Κεφάλαια από Βιβλία**

- Cooper AP: On the anatomy of the breast. *Jefferson*; 1840
- Adnan Aydiner, Abdullah Igci and Atilla Soran: Breast Disease, Diagnosis and Pathology. *Springer*; 2016

### **Ιστοσελίδες**

- <http://www.smyrlis-laparoscopic.gr/com/32-Xeiryrgikh-mastoy>
- [https://theory.labster.com/PCR\\_Polymerase\\_Chain\\_Reaction\\_AG/](https://theory.labster.com/PCR_Polymerase_Chain_Reaction_AG/)
- <http://www.sinobiological.com/real-time-pcr-service-gene-expression-analysis-by-qpcr-cro-service.html>
- <http://cbc.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture12.html>
- [www.ebiotrade.com/images/mirna-1.gif](http://www.ebiotrade.com/images/mirna-1.gif)