



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



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

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

**«ΜΙΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA ΩΣ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΩΝ**  
**ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ**  
**ΜΑΣΤΟΥ»**

**ΔΟΥΓΑΝΙΩΤΗΣ Ν. ΓΕΩΡΓΙΟΣ**

**ΙΑΤΡΟΣ**

**ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Ασπασία Τσέζου, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Επιβλέπουσα  
Κωνσταντίνος Δήμας, Αναπληρωτής Καθηγητης Φαρμακολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Μέλος  
Παπαθανασίου Ιωάννα, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Μέλος

**ΛΑΡΙΣΑ, 2021**



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



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

**«MicroRNA REGULATION OF CANCER STEM CELLS IN BREAST CANCER»**

**GEORGE N. DOUGANIOTIS  
MEDICAL ONCOLOGY RESIDENT**

*Στους γονείς μου, Νίκο και Εύα  
Στη Μαρίζα*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αφορά τα μικρά μη κωδικά μόρια RNA (microRNAs) ως ρυθμιστές των καρκινικών βλαστικών κυττάρων στον καρκίνο του μαστού. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται αναφορά στον καρκίνο, μια σύγχρονη μάστιγα, μια νοσολογική οντότητα που επηρεάζει εκατομμύρια ανθρώπους ανά τον κόσμο και της οποίας οι σωματικές, ψυχολογικές και κοινωνικές επιπτώσεις έχουν αγγίξει σχεδόν όλους μας. Αν και ο όρος «καρκίνος» χρησιμοποιείται συχνά, στην πραγματικότητα δεν πρόκειται για ένα ενιαίο νόσημα, αλλά για πολλά διαφορετικά νοσήματα, με διαφορετική αιτιολογία, κλινική εικόνα και πρόγνωση. Εξ' αυτών, ο καρκίνος του μαστού είναι ένα από τα συχνότερα, ο συχνότερος καρκίνος στις γυναίκες, και ένα μείζον ιατρικό πρόβλημα με σοβαρή νοσηρότητα και θνητότητα παγκοσμίως. Τονίζεται ότι μπορεί να έχουν γίνει μεγάλες πρόοδοι στην αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού, αλλά η νόσος δεν έχει θεραπευθεί, και η διαχείριση των ασθενών με καρκίνο μαστού παραμένει μια πρόκληση. Επισημαίνονται οι νεότερες εξελίξεις στον χώρο της Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής που έχουν ανοίξει δρόμους προς αυτή την κατεύθυνση, με καινούριες γνώσεις που επιτρέπουν καλύτερη κατανόηση της παθογένεσης της νόσου και οδηγούν στην δημιουργία νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών μεθόδων. Στις εξελίξεις αυτές συμπεριλαμβάνεται ο ρόλος των καρκινικών βλαστικών κυττάρων και ο κλάδος της επιγενετικής. Γίνεται μια σύνοψη του θεωρητικού υποβάθρου των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, των μηχανισμών επιγενετικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, και μια εκτενής παρουσίαση της επιγενετικής ρύθμισης των καρκινικών βλαστικών κυττάρων του καρκίνου του μαστού μέσω του μηχανισμού των μικρών μη κωδικών μορίων RNA, καθώς και μια ανασκόπηση των ανάλογων βιβλιογραφικών δεδομένων. Τέλος, περιγράφονται οι εφαρμογές του κλάδου και οι μελλοντικές κατευθύνσεις και προοπτικές του.

### Λέξεις- Κλειδιά:

καρκίνος μαστού, καρκινικά βλαστικά κύτταρα, μικρά μη κωδικά μόρια RNA, επιγενετική

## **ABSTRACT**

The subject of this Master's thesis is microRNA regulation of cancer stem cells in breast cancer. Cancer is a modern-day plague, a disease that affects millions of people all over the globe. Even though the term "cancer" is widely used, in reality it is not a single disease, but rather an umbrella term which refers to many different diseases, each with its own different etiology, clinical presentation and prognosis. Of these, breast cancer is one of the most common, the most common cancer in women, and a major health concern with significant morbidity and mortality globally. Great breakthroughs have been made in the management of breast cancer, but the disease has not yet been cured, and the treatment of patients with breast cancer remains a challenge. Developments in the field of Molecular Biology and Genetics have opened new avenues in this direction, giving us a better understanding of the pathogenesis of the disease and leading to new diagnostic and treatment options. Some of these major developments concern the field of cancer stem cells and the field of epigenetics. In this Master's thesis, we provide a summary of the theoretical background of cancer stem cells and epigenetic regulation of gene expression, as well as an extensive presentation of the epigenetic microRNA regulation of breast cancer stem cells and a review of the relevant literature. We conclude with the applications of this field and possible future directions.

### **Key words:**

breast cancer, cancer stem cells, microRNA, epigenetics

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ</u></b> .....	σελ. 8-17
1.1. Επιδημιολογία .....	σελ. 8-9
1.2. Ανατομία του μαστού .....	σελ. 9-11
1.3. Ιστολογία του μαστού .....	σελ. 11-12
1.4. Ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού .....	σελ. 13-17
1.4.1. Ιστολογική ταξινόμηση	
1.4.2. Ανατομική ταξινόμηση	
1.4.3. Μοριακή ταξινόμηση	
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ</u></b> .....	σελ. 18-31
2.1. Εισαγωγή στον καρκίνο .....	σελ. 18-19
2.2. Θεωρίες καρκινογένεσης .....	σελ. 19-22
2.2.1. Κλωνικό (στοχαστικό) μοντέλο	
2.2.2. Ιεραρχικό μοντέλο (μοντέλο καρκινικών βλαστικών κυττάρων)	
2.2.3. Μοντέλο πλαστικότητας	
2.3. Προέλευση καρκινικών βλαστικών κυττάρων .....	σελ. 22-25
2.4. Σηματοδοτικά μονοπάτια .....	σελ. 25-31
2.4.1. Wnt/b-katenin	
2.4.2. JAK/STAT	
2.4.3. Notch	
2.4.4. Hedgehog	
2.4.5. PI3K/AKT	
2.4.6. BMI1	
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ</u></b> .....	σελ. 32-41
3.1. Το κεντρικό δόγμα της βιολογίας .....	σελ. 32
3.2. Επιγενετική .....	σελ. 33
3.3. Επιγενετικοί μηχανισμοί .....	σελ. 33-41
3.3.1. Μεθυλίωση του DNA	
3.3.2. Τροποποίηση των ιστονών	

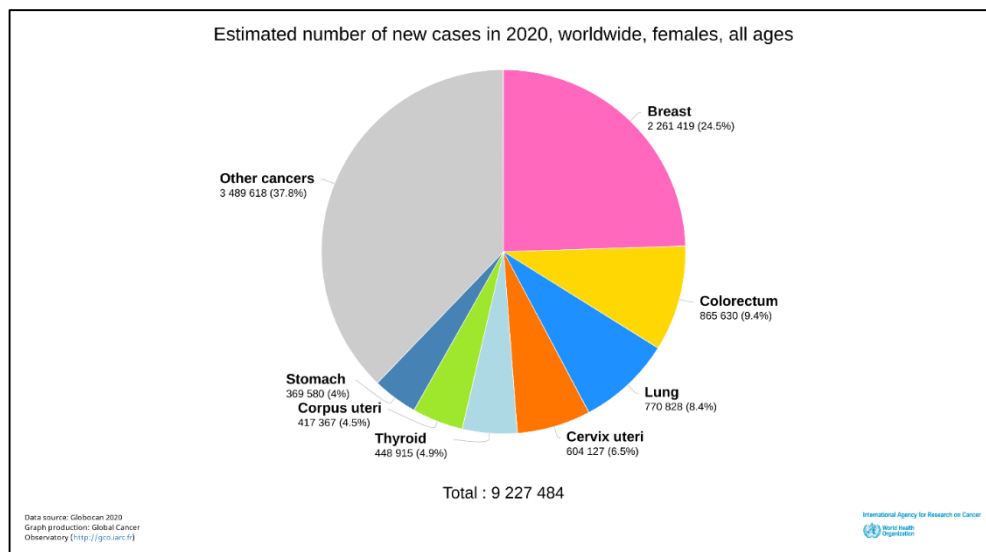
### 3.3.3. Μικρά μη κωδικά μόρια RNA

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. miRNAs ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ</b> .....	σελ. 42-76
<b>4.1. miRNAs με ογκοκατασταλτική δράση</b> .....	σελ. 43-51
<b>4.2. miRNAs με ογκογόνο δράση (oncomiRs)</b> .....	σελ. 52-58
<b>4.3. miRNAs με αμφίροπη δράση</b> .....	σελ. 58-60
<b>4.4. EMT-miR stemness και αντίσταση στη θεραπεία</b> .....	σελ. 60-67
<b>4.5. miRNAs ως θεραπευτικοί στόχοι</b> .....	σελ. 67-72
<b>4.6. miRNAs ως διαγνωστικοί στόχοι</b> .....	σελ. 72-76
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	σελ. 77-79
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	σελ. 80-96

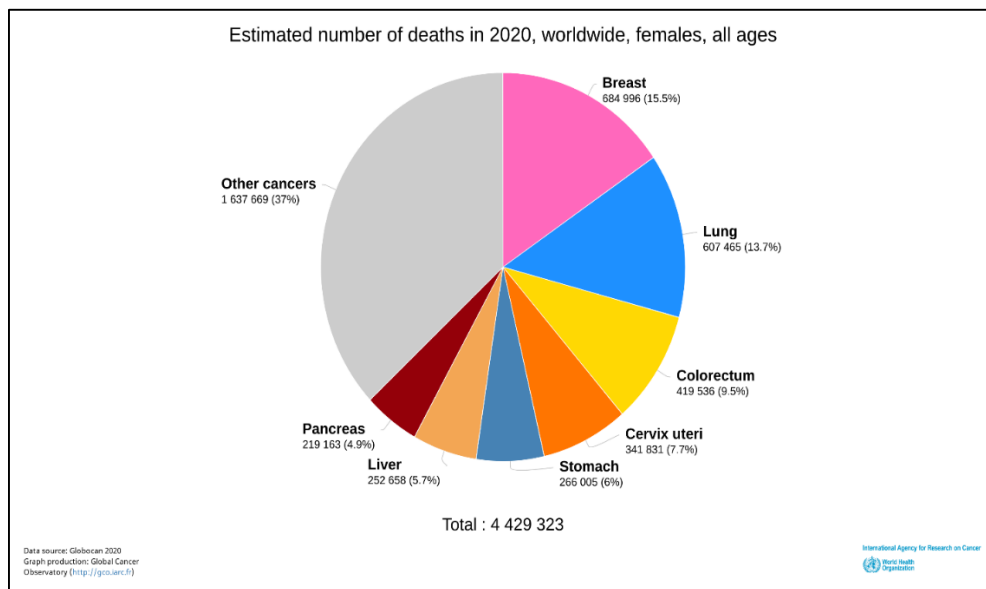
# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

## 1.1. Επιδημιολογία

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο συχνότερος καρκίνος στις γυναίκες (24.5% επίπτωση, Globocan 2020 – Εικόνα 1) και η πρώτη αιτία θανάτου σχετιζόμενη με καρκίνο στις γυναίκες (15.5% θνησιμότητα, Globocan 2020 – Εικόνα 2).



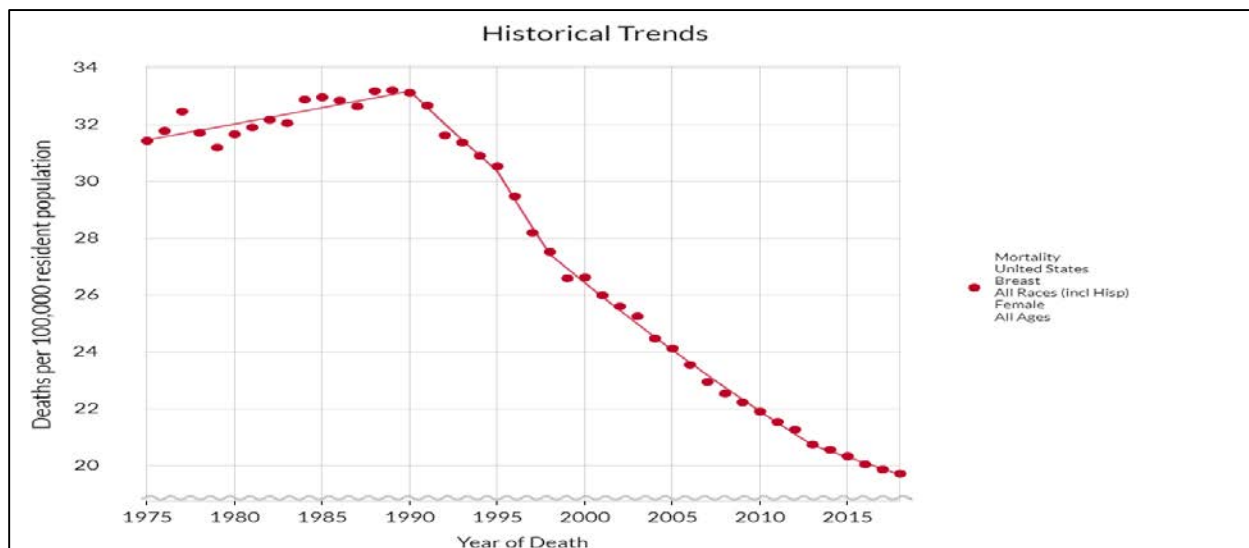
Εικόνα 1. Επίπτωση καρκίνου στις γυναίκες, 2020, Globocan IARC



Εικόνα 2. Θνησιμότητα από καρκίνο στις γυναίκες, 2020, Globocan IARC



Οι εξελίξεις στον χώρο της πρόληψης, της διάγνωσης και της θεραπευτικής έχουν μειώσει σημαντικά την θνησιμότητα που σχετίζεται με τον καρκίνο του μαστού ανά τα χρόνια (Εικόνα 3). Ωστόσο, εκατομμύρια γυναίκες συνεχίζουν να χάνουν τη ζωή τους από καρκίνο μαστού κάθε χρόνο, και παρά τις θεραπευτικές εξελίξεις, η εγκαθίδρυση της μεταστατικής φάσης της νόσου παραμένει στην συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων ανίατη.

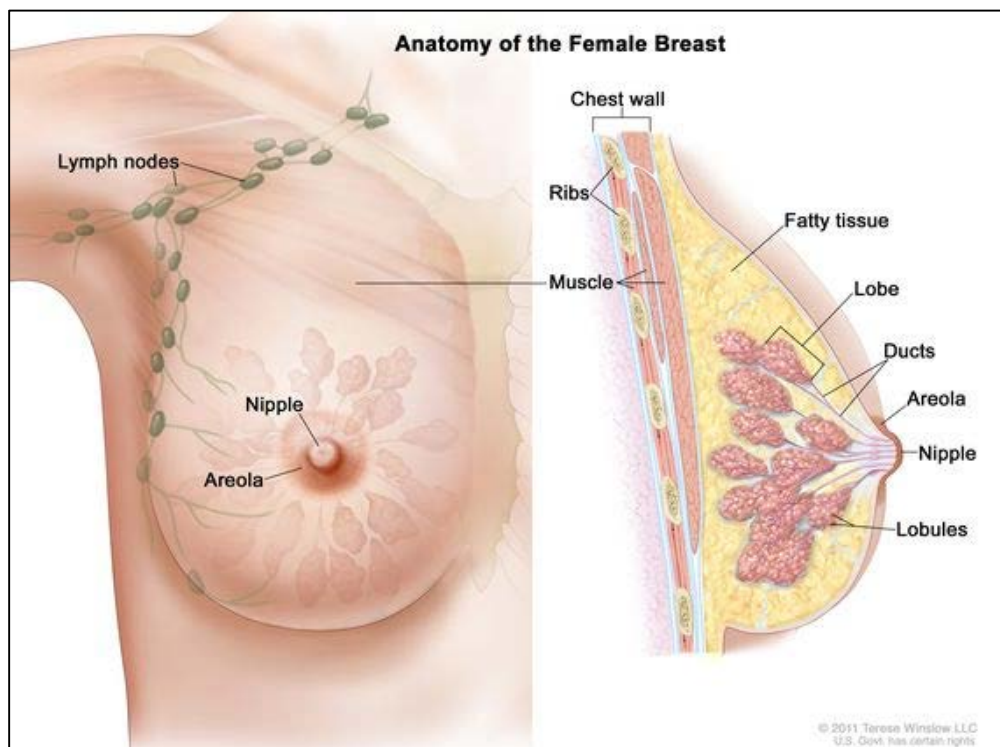


Εικόνα 3. Διαχρονική θνησιμότητα από καρκίνο μαστού, SEER Database

## 1.2. Ανατομία του μαστού

Ο μαστός βρίσκεται στο θωρακικό τοίχωμα, πάνω από τον μείζονα θωρακικό και τον πρόσθιο οδοντωτό μυ. Εκτείνεται από τη δεύτερη έως την έκτη πλευρά (εγκάρσιο επίπεδο) και από το στερνικό χείλος έως τη μέση μασχालιαία γραμμή (οβελιαίο επίπεδο), και μπορεί να φτάσει μέχρι την κορυφή της μασχालιαίας κοιλότητας (ουρά του Spence). Αποτελείται από δέρμα, λίπος, συνδετικό ιστό και τον μαστικό (ή μαζικό) αδένα. Πρόκειται για ένα όργανο που έχει διαφορετική ανάπτυξη, δομή και λειτουργία στα δύο φύλα. Λειτουργικός είναι ο γυναικείος μαστός, ο οποίος αποτελεί και επικουρικό γεννητικό όργανο<sup>1</sup>.

Ο μαστικός αδένας είναι η βασική λειτουργική μονάδα του μαστού και ο ρόλος του είναι η γαλουχία. Διακρίνουμε δύο κύριες δομές: 1) Τους λοβούς (lobes), που παράγουν το γάλα, και 2) Τους πόρους (ducts), που μεταφέρουν το γάλα προς τη θηλή. Ο κάθε λοβός παροχετεύεται από τον δικό του πόρο. Οι επιμέρους πόροι ακολούθως ενώνονται στους γαλακτοφόρους πόρους, οι οποίοι εκβάλλουν στη θηλή.



**Εικόνα 4.** Ανατομία του μαστού (PDQ Cancer Information Summaries, Breast Cancer Treatment (Adult), NCI)

Το λίπος περιβάλλει τον μαστό ως περιμαστικό λίπος, σε συνέχεια του υποδόριου λίπους. Κατά μήκος του λίπους του μαστού διατρέχει συνδετικός ιστός (οι σύνδεσμοι Cooper), ο οποίος εκτείνεται από το δέρμα έως την πρόσθια θωρακική περιτονία και αποτελεί το σύστημα στήριξης του μαστού. Οι σύνδεσμοι Cooper ανατομικά διαχωρίζουν τους λοβούς μεταξύ τους.

Εξωτερικά ο μαστός καλύπτεται από δέρμα, και η εξωτερική του μορφολογία περιλαμβάνει τη θηλή (nipple) και τη θηλαία άλω (areola). Η θηλή είναι το καστανέρυθρο έπαρμα του μαστού λίγο κάτω και έξω από το μέσο του μαστού, όπου καταλήγουν οι γαλακτοφόροι πόροι, και η θηλαία άλως είναι η υποστρόγγυλη και ελαφρά επηρμένη περιοχή γύρω από την θηλή<sup>1</sup>.

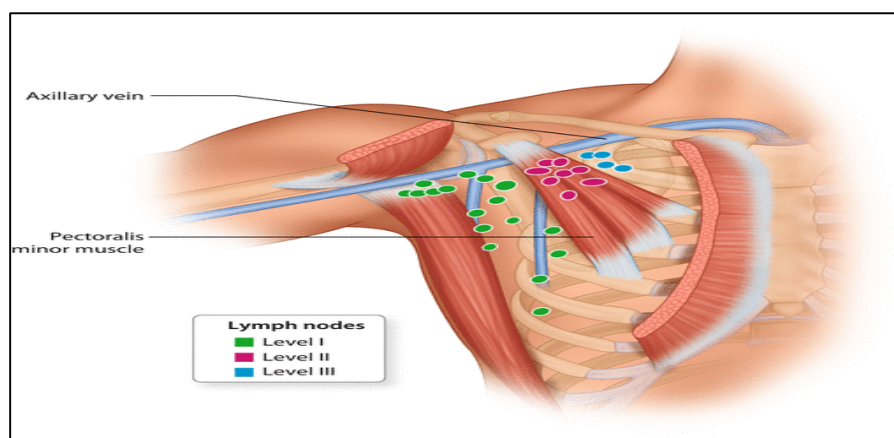
Η αιμάτωση του μαστού γίνεται από την έσω μαστική αρτηρία, την έξω μαστική αρτηρία, και κλάδους της ακρωμιοθωρακικής αρτηρίας. Η φλεβική παροχέτευση γίνεται από την έσω μαστική φλέβα, την μασχάλιαία φλέβα, και τις μεσοπλευρίες φλέβες. Η νεύρωση του μαστού γίνεται από πρόσθιους και πλάγιους κλάδους των μεσοπλευρίων νεύρων 4-6, από το μεσοπλευροβραχιόνιο, το θωρακοραχιαίο και το μακρύ θωρακικό νεύρο. Η λεμφική παροχέτευση γίνεται κυρίως από τους μασχάλιαίους και δευτερευόντως από τους έσω μαστικούς λεμφαδένες οι οποίοι παροχετεύουν στα παραστερνικά αγγεία. Η λεμφική παροχέτευση είναι μέγιστης σημασίας για

την διασπορά του καρκίνου του μαστού, γεγονός που οδήγησε στην χειρουργική κατηγοριοποίηση των μασχαλιαίων λεμφαδένων σε τρία επίπεδα ανάλογα με τη θέση τους σε σχέση με τον ελάσσονα θωρακικό μυ:

Επίπεδο I: Λεμφαδένες επί τα εκτός του ελάσσονος θωρακικού μυός

Επίπεδο II: Λεμφαδένες όπισθεν του ελάσσονος θωρακικού μυός

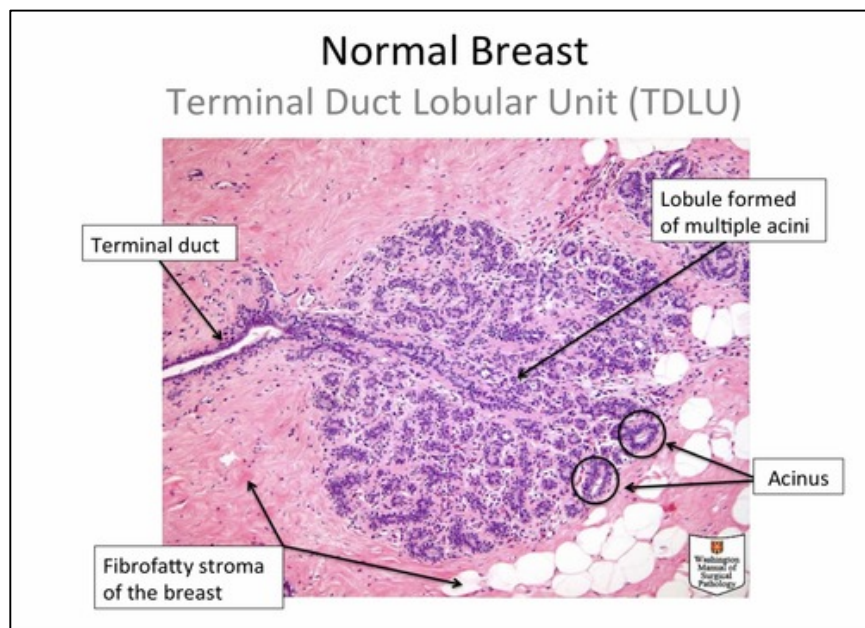
Επίπεδο III: Λεμφαδένες επί τα εντός του ελάσσονος θωρακικού μυός.<sup>2</sup>



Εικόνα 5. Επίπεδα μασχαλιαίων λεμφαδένων (www.oncohemakey.com)

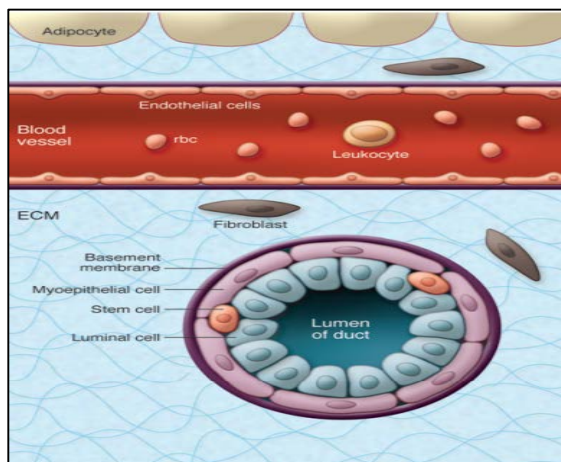
### **1.3. Ιστολογία του μαστού**

Σε επίπεδο μικροανατομίας, το σύστημα λοβών-πόρων εμφανίζει ιδιαίτερη πολυπλοκότητα. Ο κάθε λοβός αποτελείται από λόβια (lobules), τα οποία είναι διαμορφωμένα σε αδενοκυψέλες (acini). Οι γαλακτοφόροι πόροι διακλαδίζονται κατά σειρά σε κύριους, τμηματικούς, υποτμηματικούς και τελικούς πόρους. Ο τελικός πόρος καταλήγει στο λόβιο. Εδώ αναγνωρίζεται η «τελική πορολοβιαδική μονάδα» (terminal ductal lobular unit), η βασική δομική και λειτουργική μονάδα του μαστού, που αποτελείται από τον τελικό πόρο και το αντίστοιχο λόβιο. Η τελική πορολοβιαδική μονάδα είναι το σημείο όπου ξεκινά η καρκινογένεση στη συντριπτική πλειοψηφία των καρκίνων του μαστού<sup>3</sup>.



**Εικόνα 6.** Τελική πορολοβιδιακή μονάδα (Pathology – Breast Cancer Flashcards. [www.quizlet.com](http://www.quizlet.com))

Οι λοβοί και οι πόροι καλύπτονται από μια έσω στιβάδα επιθηλιακών κυττάρων (luminal) και μια έξω στιβάδα μυοεπιθηλιακών κυττάρων (basal), οι οποίες διαχωρίζονται μέσω της βασικής μεμβράνης από τον περιβάλλοντα ιστό (το στρώμα). Η διήθηση της βασικής μεμβράνης ορίζει τον διηθητικό καρκίνο και τον διαχωρίζει από το καρκίνωμα *in situ*<sup>4</sup>.



**Εικόνα 7.** Ιστολογική αρχιτεκτονική του μαστού (Bertos et al 2011)

## **1.4. Ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού**

### **1.4.1. Ιστολογική ταξινόμηση**

Η πρωταρχική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού είναι ιστολογική. Στην πλειοψηφία τους τα καρκινώματα του μαστού είναι επιθηλιακοί όγκοι (αδενοκαρκινώματα). Άλλοι, σπανιότεροι, ιστολογικοί τύποι είναι τα λεμφώματα και οι μεσεγγυματικοί όγκοι (σαρκώματα).

Η πρώτη διάκριση γίνεται ανάλογα με τη διήθηση της βασικής μεμβράνης σε 1) *in situ* καρκίνωμα, το οποίο είναι περιορισμένο εντός των πόρων ή των λοβίων χωρίς να διαπερνά τη βασική μεμβράνη, και 2) διηθητικό καρκίνωμα, το οποίο διηθεί τη βασική μεμβράνη και επεκτείνεται στο στρώμα<sup>4</sup>.

Η κύρια ιστολογική διάκριση βασίζεται στο είδος του κυττάρου από το οποίο εξορμάται ο όγκος. Η ταξινόμηση που χρησιμοποιείται παγκοσμίως είναι εκείνη του Παγκοσμίου Οργανισμού Υγείας (WHO Classification of Tumors of the Breast). Διακρίνονται δύο βασικοί τύποι: το πορογενές, που εξορμάται από τους πόρους, και το λοβιακό, που εξορμάται από τα λόβια. Συνεπώς, διακρίνουμε αντίστοιχα *in situ* πορογενές και διηθητικό πορογενές καρκίνωμα, και *in situ* λοβιακό και διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα, ανάλογα με την διήθηση ή όχι της βασικής μεμβράνης. Ο όρος «διηθητικό πορογενές» έχει αντικατασταθεί στις νεότερες ταξινομήσεις από τον όρο «διηθητικό καρκίνωμα μη ειδικού τύπου» (*invasive carcinoma of No Special Type – NST*). Επίσης, η οντότητα του *in situ* λοβιακού καρκινώματος έχει αποδειχθεί ότι πρόκειται για καλοήγη πάθηση, και δεν συμπεριλαμβάνεται πλέον στην ταξινόμηση των καρκινωμάτων του μαστού<sup>5</sup>.

Υπάρχουν και άλλες σπανιότερες κατηγορίες και υποκατηγορίες καρκίνων του μαστού (0.5-5%), η καθεμία με την δική της βιολογική συμπεριφορά και πρόγνωση.

### **1.4.2. Ανατομική ταξινόμηση**

Για την ανατομική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού χρησιμοποιείται το σύστημα TNM που χρησιμοποιείται σχεδόν για όλες τις συμπαγείς κακοήθειες – όπου

- T: περιγράφει το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου
- N: περιγράφει το βαθμό της διήθησης των επιχώριων λεμφαδένων
- M: περιγράφει την παρουσία μετάστασης

Η νεότερη ταξινόμηση κατά TNM είναι η 8<sup>η</sup> έκδοση του AJCC (American Joint Committee on Cancer) και συνοψίζεται παρακάτω:

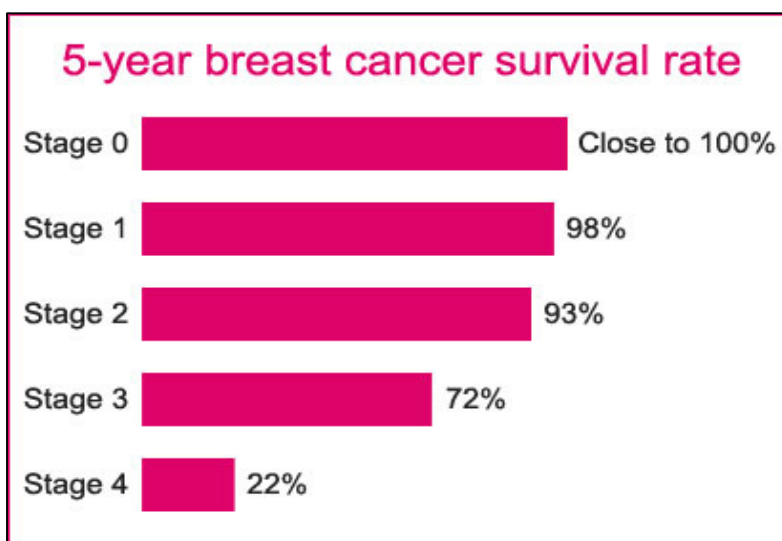
<b><u>T stage</u></b>	
T0	Χωρίς εικόνα πρωτοπαθούς όγκου
Tis	Πορογενές καρκίνωμα in situ (DCIS)
T1	Όγκος $\leq 2\text{cm}$ σε μέγιστη διάμετρο
T2	Όγκος $> 2\text{cm}$ αλλά $\leq 5\text{ cm}$ σε μέγιστη διάμετρο
T3	Όγκος $> 5\text{cm}$ σε μέγιστη διάμετρο
T4	Όγκος ανεξαρτήτως μεγέθους ο οποίος διηθεί το θωρακικό τοίχωμα ή/και το δέρμα
<b><u>N stage</u></b>	
N0	Χωρίς μετάσταση σε μασχαλιαίους λεμφαδένες
N1	Παρουσία μικρομετάστασης (N1mi) ή μετάστασης (N1) σε 1-3 μασχαλιαίους λεμφαδένες
N2	Μετάσταση σε 4-9 μασχαλιαίους λεμφαδένες
N3	Μετάσταση σε $>10$ μασχαλιαίους λεμφαδένες ή μετάσταση σε υποκλείδιους λεμφαδένες
<b><u>M stage</u></b>	
M0	Απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων
M1	Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων

**Πίνακας 1.** Ορισμοί για T,N,M σύμφωνα με AJCC 8<sup>th</sup> ed.

Στάδιο 0	Tis N0 M0
Στάδιο IA	T1 N0 M0
Στάδιο IB	T0, T1 N1mi M0
Στάδιο IIA	T0, T1 N1 M0 T2 N0 M0
Στάδιο IIB	T2 N1 M0 T3 N0 M0
Στάδιο IIIA	T0,T1,T2 N2 M0 T3 N1 M0 T3 N2 M0
Στάδιο IIIB	T4 N0, N1, N2 M0
Στάδιο IIIC	Any T N3 M0
Στάδιο IV	Any T Any N M1

**Πίνακας 2.** Ανατομικά στάδια AJCC

Η ανατομική ταξινόμηση είναι η σημαντικότερη προγνωστική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού, και περιλαμβάνει τα βασικότερα χαρακτηριστικά του όγκου που καθορίζουν την πιθανότητα υποτροπής και την επιβίωση των ασθενών. Στην Εικόνα 8 φαίνεται η μεγάλη ετερογένεια στην ολική επιβίωση ανάλογα με το στάδιο του καρκίνου στη διάγνωση.



**Εικόνα 8.** 5ετης επιβίωση ανάλογα με το στάδιο της νόσου ([www.asiancancer.com](http://www.asiancancer.com))

### 1.4.3. Μοριακή ταξινόμηση

Ο καρκίνος του μαστού είναι μια εξαιρετικά ετερογενής νόσος, με μια φαινοτυπική πολυπλοκότητα που δεν εξηγείται μόνο από το ανατομικό στάδιο. Ασθενείς με ίδια παθολογανατομικά χαρακτηριστικά έχουν διαφορετική πορεία. Οι προσπάθειες της έρευνας συνεπώς επικεντρώθηκαν στη συσχέτιση της διαφοράς αυτής στον φαινότυπο με αλλαγές σε μοριακό επίπεδο που σχετίζονται με την καρκινογένεση.

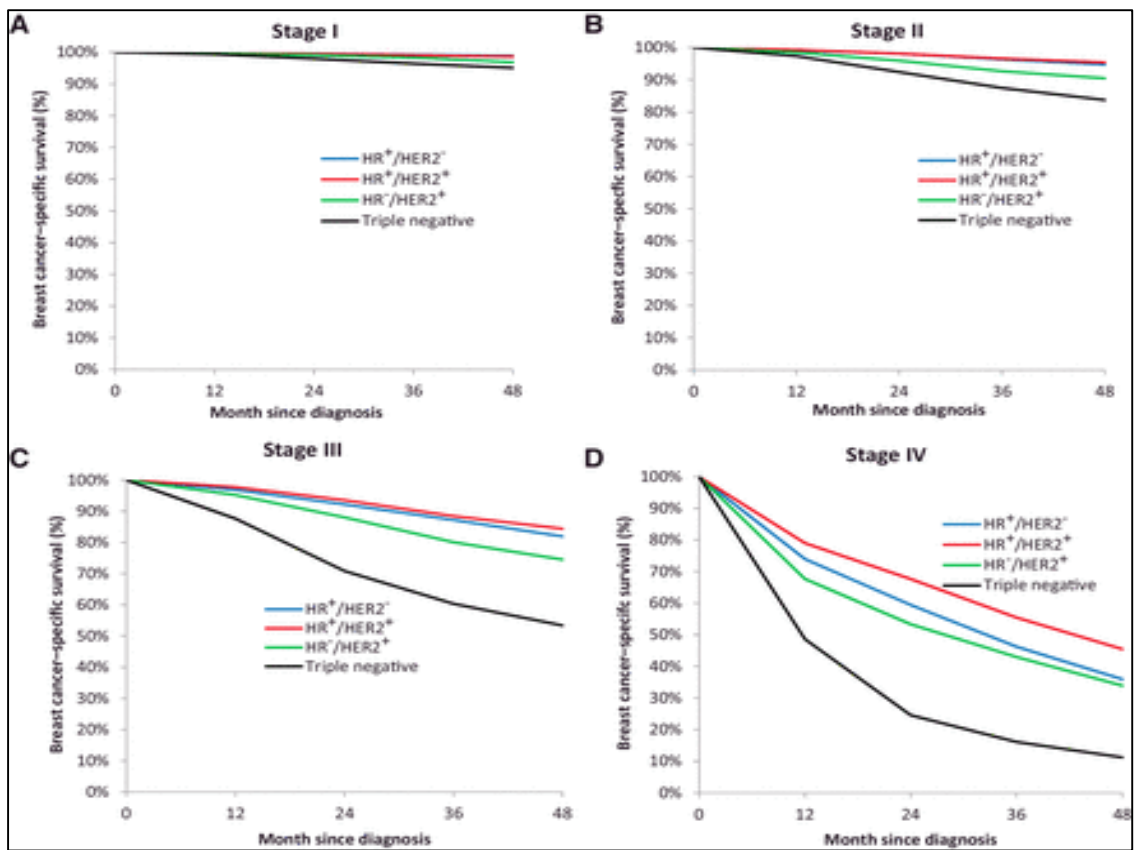
Τα κομβικά άρθρα των Perou και Sorlie<sup>6,7</sup> πρότειναν την ταξινόμηση των καρκίνων του μαστού σε 4 κατηγορίες με βάση το γονιδιακό προφίλ τους σε ανάλυση με μικροσυστοιχίες: 1) «Luminal A» και 2) «Luminal B», που εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς (οιστρογονικός υποδοχέας – Estrogen Receptor, ER, και προγεστερονικός υποδοχέας – Progesterone Receptor, PR) και έχουν γονιδιακό προφίλ παρόμοιο με εκείνο της έσω στιβάδας των επιθηλιακών κυττάρων (luminal), 3) «HER2-enriched», που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα HER2 χωρίς να εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς, 4) «Basal-like», που έχουν γονιδιακό προφίλ παρόμοιο με εκείνο της έξω στιβάδας των μυοεπιθηλιακών κυττάρων (basal).

Η ταυτοποίηση αυτών των ενδογενών υποτύπων του καρκίνου του μαστού αποτέλεσε τη βάση για την σύγχρονη ταξινόμηση, η οποία αξιολογεί με ανοσοϊστοχημεία τη θετικότητα του όγκου στους οιστρογονικούς και προγεστερονικούς υποδοχείς και την υπερέκφραση του HER2, και διακρίνει τους καρκίνους του μαστού σε

- ER-θετικούς, HER2-αρνητικούς
- HER2-θετικούς, ER-αρνητικούς
- «τριπλά θετικούς» [ER(+), PR(+), HER2(+)] και
- «τριπλά αρνητικούς» [ER(-), PR(-), HER2(-)].

Οι διαφορετικές αυτές κατηγορίες εμφανίζουν μεγάλες διαφορές τόσο στην πρόγνωση όσο και στην θεραπευτική αντιμετώπιση (Εικόνα 9). Η ταξινόμηση αυτή αποτελεί τη βάση για τη σύγχρονη συστηματική θεραπεία του καρκίνου του μαστού<sup>8,9</sup>.





Εικόνα 9. Επιβίωση που σχετίζεται με καρκίνο μαστού σε βάθος 4ετίας ανάλογα με το στάδιο και τον μοριακό υπότυπο του όγκου (Howlader et al 2018)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

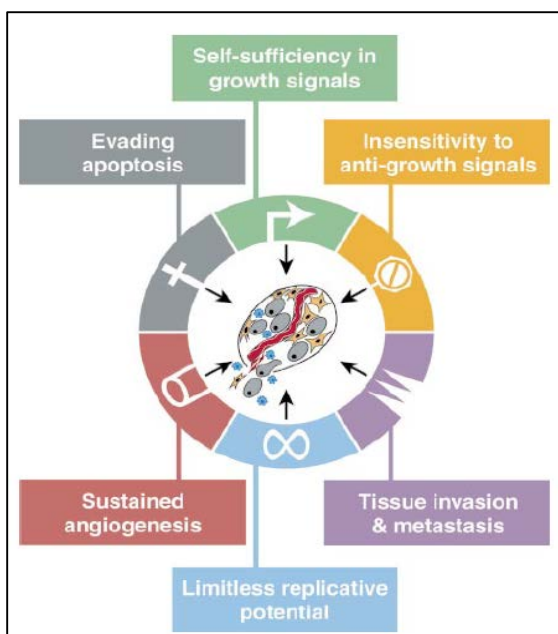
### 2.1. Εισαγωγή στον Καρκίνο

Ο καρκίνος είναι μια γενετική ασθένεια, που δημιουργείται ως αποτέλεσμα της συσσώρευσης πολλαπλών μοριακών αλλαγών στο γονιδίωμα των κυττάρων<sup>10</sup>. Οι αλλαγές αυτές αφορούν συγκεκριμένα γονίδια, τα οποία δρουν είτε ως πρωτο-ογκογονίδια/ογκογονίδια είτε ως ογκοκατασταλτικά γονίδια<sup>11</sup>.

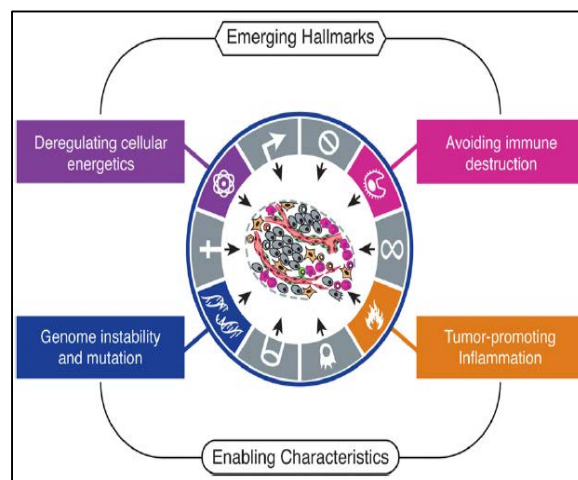
Τα πρωτο-ογκογονίδια είναι γονίδια τα οποία επάγουν καρκινογένεση εάν μεταλλαχθούν. Ο όρος ογκογονίδια αναφέρεται στη μεταλλαγμένη μορφή των πρωτο-ογκογονιδίων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ογκογονιδίων είναι το bcr/abl του χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία, το ErbB-2 (her2/neu) στον καρκίνο του μαστού κ.α. Οι μεταλλάξεις στα πρωτο-ογκογονίδια είναι «gain-of-function», προσδίδουν δηλαδή αυξημένη λειτουργικότητα στα γονίδια αυτά.

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, αντιθέτως, είναι γονίδια τα οποία καταστέλλουν την καρκινογένεση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ογκοκατασταλτικού γονιδίου είναι το TP53, το οποίο βρίσκεται μεταλλαγμένο στην πλειοψηφία των ανθρώπινων καρκίνων. Οι μεταλλάξεις στα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι «loss-of-function», οδηγούν δηλαδή σε απώλεια λειτουργικότητας των γονιδίων.

Στην αέναη αναζήτηση της θεραπείας του καρκίνου, η έρευνα έχει εμβαθύνει σε ασύλληπτες διαστάσεις από πολλές διαφορετικές κατευθύνσεις στην προσπάθεια κατανόησης της καρκινογένεσης και ανεύρεσης πιθανών θεραπευτικών στόχων. Σε μοριακό επίπεδο, η χρήση νέων τεχνικών μοριακής βιολογίας οδήγησε στην ολοκλήρωση της αλληλούχισης του ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project, 2004), η οποία ακολουθήθηκε από την αλληλούχιση του γονιδιώματος διαφόρων τύπων καρκίνου (Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes, 2020)<sup>12</sup>, έρευνα η οποία έχει ήδη περιγράψει εκατοντάδες γονίδια εμπλεκόμενα στην καρκινογένεση και συνεχίζεται. Οι βιολογικές διαδικασίες που εμπλέκονται στην καρκινογένεση συνοψίστηκαν στα 6 «Ορόσημα του καρκίνου» στο άρθρο-σταθμό<sup>13</sup> των Hanahan και Weinberg το 2000, και ακολούθως ανανεώθηκαν και διευρύνθηκαν το 2011<sup>14</sup>.



Εικόνα 10. Α. Ορόσημα του καρκίνου (Hanahan 2000)



Β. Νέα ορόσημα του καρκίνου (Hanahan 2011)

Σε πρώιμο εξελικτικό επίπεδο, εκτεταμένη έρευνα έχει γίνει επίσης και για την προέλευση και εξέλιξη των καρκινικών κυττάρων, διαδικασίες στις οποίες θα εμβαθύνουμε περισσότερο στην παρούσα εργασία.

## 2.2. Θεωρίες καρκινογένεσης

Η καρκινογένεση είναι η διαδικασία με την οποία ένα φυσιολογικό κύτταρο του οργανισμού μετατρέπεται σε καρκινικό.

Υπάρχουν τρεις βασικές θεωρίες για την εξελικτική πορεία της καρκινογένεσης.

### 2.2.1.Κλωνικό (στοχαστικό) μοντέλο

Το κλωνικό μοντέλο της καρκινογένεσης περιγράφη πρώτη φορά από τον Nowell το 1976 και προτείνει μια εξελικτική πορεία της καρκινογένεσης που παραλληλίζει τη δαρβινική φυσική επιλογή<sup>15</sup>. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, τα καρκινικά κύτταρα αρχικά είναι βιολογικά ισοδύναμα. Καθώς τα κύτταρα συσσωρεύουν γενετικές ή επιγενετικές αλλαγές στο γονιδίωμα τους, κάποιοι κυτταρικοί κλώνοι αποκτούν πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι των άλλων, κυριαρχούν εξελικτικά και είναι αυτοί που συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Καθώς συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται με ταχύτερους ρυθμούς, συσσωρεύουν επιπρόσθετες αλλαγές, που τους προσδίδουν περαιτέρω εξελικτικό προβάδισμα. Η καρκινογένεση δηλαδή είναι το αποτέλεσμα

συσσώρευσης μοριακών αλλαγών σε ένα κύτταρο, και οποιοδήποτε κύτταρο του οργανισμού μπορεί να μετατραπεί σε καρκινικό εάν συσσωρευτούν οι απαραίτητες αλλαγές. Ο τελικός όγκος αποτελείται από πληθυσμούς κυττάρων, όλα εκ των οποίων έχουν την δυνατότητα καρκινογένεσης<sup>15</sup>.

### 2.2.2. Ιεραρχικό μοντέλο (μοντέλο καρκινικών βλαστικών κυττάρων)

Ένα εναλλακτικό μοντέλο είναι το ιεραρχικό μοντέλο της καρκινογένεσης. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο από συγκεκριμένα κύτταρα, τα λεγόμενα καρκινικά βλαστικά κύτταρα, μια εξελικτική πορεία που παραλληλίζει την φυσιολογική εμβρυογένεση και οργανογένεση.

Η ανάπτυξη ενός ανθρώπινου οργανισμού είναι αποτέλεσμα διαδοχικών κυτταρικών διαιρέσεων, ξεκινώντας από το πρώτο κύτταρο που δημιουργείται με τη γονιμοποίηση, το ζυγωτό. Οι διαιρέσεις αυτές γίνονται σε κύτταρα τα οποία ονομάζονται βλαστοκύτταρα. Ο ορισμός του βλαστοκυττάρου περιλαμβάνει δύο βασικά χαρακτηριστικά: 1) Αυτοανανέωση (self-renewal) και 2) Δυνατότητα διαφοροποίησης σε πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους (potency). Ανάλογα με την δυνατότητα διαφοροποίησης, τα βλαστοκύτταρα διακρίνονται σε: 1) Totipotent (παντοδύναμο), 2) Pluripotent (ολοδύναμο) – τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα, τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε όλα τα κύτταρα και από τα τρία βλαστικά δέρματα, 3) Multipotent (πολυδύναμο), τα οποία μπορούν να παράγουν συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές, και 4) Unipotent (μονοδύναμο), τα οποία μπορούν να παράγουν μόνο έναν συγκεκριμένο τύπο κυττάρων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ενήλικου βλαστοκυττάρου είναι το αιμοποιητικό προγονικό κύτταρο, το οποίο αποτελεί ένα πολυδύναμο βλαστικό κύτταρο, και διαφοροποιείται σε μονοδύναμο κύτταρα τα οποία εν τέλει παράγουν τα κύτταρα του αίματος σε όλη την ενήλικη ζωή<sup>16</sup>.

Η θεωρία των καρκινικών βλαστικών κυττάρων προτείνει ότι κάθε όγκος περιέχει μια μικρή ομάδα καρκινικών βλαστικών κυττάρων, τα οποία θα διαφοροποιηθούν με ιεραρχικό τρόπο, όπως αντίστοιχα και τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα, και θα παράγουν καρκινικά κύτταρα. Η καρκινογένεση δηλαδή είναι μια ιεραρχική διαδικασία, και μόνο τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα μπορούν να δημιουργήσουν όγκους. Ο τελικός όγκος αποτελείται από δύο διαφορετικούς πληθυσμούς κυττάρων: Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα, που μπορούν να επάγουν καρκινογένεση, και τα διαφοροποιημένα καρκινικά μη βλαστικά, που δεν μπορούν<sup>17</sup>.

Η πρώτη απόδειξη για την ύπαρξη των καρκινικών βλαστικών κυττάρων ήρθε το 1997 με τους Bonnet και Dick<sup>18</sup>, οι οποίοι απομόνωσαν ενήλικα λευχαιμικά βλαστικά κύτταρα και έδειξαν ότι μόνο αυτά τα κύτταρα είναι ικανά να προκαλέσουν λευχαιμία σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια. Συνεπακόλουθες έρευνες ταυτοποίησαν την ύπαρξη καρκινικών βλαστικών κυττάρων και σε συμπαγείς κακοήθειες, όπως του καρκίνου του μαστού<sup>19</sup>, του καρκίνου του εγκεφάλου<sup>20</sup> και του καρκίνου του παχέος εντέρου<sup>21,22,23</sup>).

### 2.2.3. Μοντέλο πλαστικότητας (plasticity model)

Το μοντέλο αυτό είναι ένα ενοποιητικό μοντέλο, το οποίο προτείνει ότι η καρκινογένεση δεν είναι αποτέλεσμα μονόδρομης κυτταρικής εξέλιξης, αλλά ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν αμφίδρομα να μεταπηδούν φαινοτυπικά ανάμεσα σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα και διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα. Ένα διαφοροποιημένο καρκινικό κύτταρο μπορεί δηλαδή να επανακτήσει βλαστικές ιδιότητες και να επάγει εκ νέου καρκινογένεση, και ένα καρκινικό βλαστικό κύτταρο μπορεί να διαφοροποιηθεί σε μη βλαστικά καρκινικά κύτταρα<sup>24</sup>.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα η μελέτη των Gupta et al, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και απομονώθηκαν κύτταρα με 3 διαφορετικές ιδιότητες: «Basal-like», «Luminal-like» και «Stem-like». Παρά την φαινοτυπική απόκλιση των ομάδων, η επίδραση περιβαλλοντικών ερεθισμάτων επέτρεψε σε κάθε μία από τις 3 ομάδες να παράγει κύτταρα των άλλων δύο ομάδων<sup>25</sup>. Συνεπώς, φαίνεται ότι δεν υπάρχει αυστηρή διαφοροποίηση ανάμεσα σε βλαστικό και μη βλαστικό φαινότυπο, αλλά είναι δυνατή η αμφίδρομη μετατροπή ανάλογα με το μικροπεριβάλλον στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα.

Υπάρχουν ερευνητικά δεδομένα που υποστηρίζουν και τις τρεις αυτές θεωρίες. Ωστόσο, κάθε μοντέλο έχει τους περιορισμούς του και κανένα δεν έχει εξηγήσει αυτούσιο τη διαδικασία της καρκινογένεσης. Φαίνεται ότι η αλήθεια βρίσκεται κάπου στη μέση, ή ότι υπάρχουν εξελικτικές διαδικασίες οι οποίες δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί. Υπάρχουν επίσης δεδομένα που δείχνουν ότι διαφορετικά μοντέλα μπορεί να υπερισχύουν σε διαφορετικούς όγκους. Για παράδειγμα, η καρκινογένεση στο γλοιοβλάστωμα φαίνεται ότι ακολουθεί ένα αυστηρό ιεραρχικό μοντέλο, και η αναστολή των καρκινικών βλαστικών κυττάρων αναστέλλει ριζικά την ανάπτυξη του όγκου<sup>26</sup>. Εν αντιθέσει, σε πειραματικά μοντέλα καρκινογένεσης του καρκίνου του παχέος εντέρου, η αναστολή των καρκινικών βλαστικών κυττάρων και η αρχική υποστρόφη του όγκου ακολουθείται

από υποτροπή και επανεμφάνιση βλαστικών κυττάρων, γεγονός που υποδηλώνει ότι μη βλαστικά καρκινικά κύτταρα μετατράπηκαν σε βλαστικά – χαρακτηριστικό μοντέλο πλαστικότητας<sup>27</sup>.

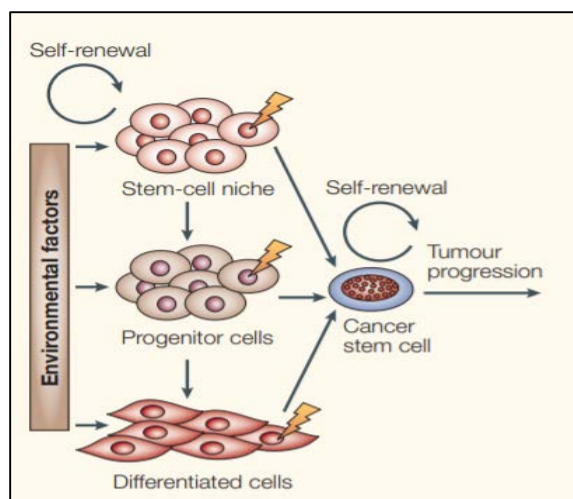
### **2.3. Προέλευση καρκινικών βλαστικών κυττάρων**

Το καρκινικό βλαστικό κύτταρο ορίζεται ως το καρκινικό κύτταρο που έχει την ικανότητα, εάν μεταμοσχευτεί, να δημιουργήσει καρκίνο<sup>28</sup>. Λειτουργικά, τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα εμφανίζουν ιδιότητες βλαστοκυττάρου: 1) αυτοανανέωση – δημιουργία καρκινικών κυττάρων με παρόμοιο φαινότυπο, και 2) δυνατότητα διαφοροποίησης – δημιουργία καρκινικών κυττάρων με διαφορετικό φαινότυπο και πιο περιορισμένο δυναμικό διαφοροποίησης<sup>28</sup>.

Απαραίτητο βήμα πριν την διερεύνηση της προέλευσης των βλαστικών κυττάρων είναι η ταυτοποίησή τους. Η έρευνα στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα ακολουθεί τις βασικές αρχές που διέπουν την έρευνα στα ενήλικα βλαστοκύτταρα. Όσον αφορά τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, η ικανότητα ενός κυττάρου να επαναδημιουργεί το γενεαλογικό δέντρο των κυττάρων του αίματος όταν μεταμοσχευτεί σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο για το βλαστικό δυναμικό του κυττάρου<sup>29</sup>. Αυτή η μέθοδος έχει οδηγήσει στην ταυτοποίηση ειδικών επιφανειακών αντιγόνων που επιτρέπουν την διαφοροποίηση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων από τα υπόλοιπα κύτταρα.

Αντίστοιχη μέθοδος εφαρμόζεται και όσον αφορά τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα: Οι κυτταρικοί πληθυσμοί του όγκου διαχωρίζονται με βάση τα διαφορετικά επιφανειακά αντιγόνα που εκφράζουν, μεμονωμένοι κυτταρικοί πληθυσμοί μεταμοσχεύονται σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια, και εξετάζεται η ικανότητά τους να δημιουργήσουν νέους καρκίνους<sup>30</sup>. Έχουν ταυτοποιηθεί έτσι δεκάδες επιφανειακά αντιγόνα που χαρακτηρίζουν καρκινικά βλαστικά κύτταρα<sup>31</sup>. Συγκεκριμένα στον καρκίνο του μαστού, ορισμένα από τα επιφανειακά αντιγόνα που έχουν ταυτοποιηθεί είναι τα: CD44<sup>19</sup>, CD29 και CD49f<sup>32</sup>, ALDH1 και CD133<sup>33</sup>, Sox2<sup>34</sup>.

Η ακριβής προέλευση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα μπορεί να προέρχονται είτε από φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα σε διάφορα στάδια διαφοροποίησης, είτε από διαφοροποιημένα κύτταρα τα οποία υφίστανται διαδικασίες αποδιαφοροποίησης (dedifferentiation).



**Εικόνα 11.** Προέλευση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (Bjerkvig et al 2005)

### Πρώιμες μορφές βλαστικών κυττάρων

Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα εμφανίζουν πολλές ομοιότητες με τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα. Τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα αυτοανανεώνονται υπό αυστηρή επιτήρηση και διαφοροποιούνται σε φυσιολογικά, ώριμα κύτταρα, ενώ τα καρκινικά αυτοανανεώνονται χωρίς τόσο αυστηρό έλεγχο και διαφοροποιούνται σε παθολογικά κύτταρα. Και οι δύο κατηγορίες ωστόσο χρησιμοποιούν τους ίδιους βιολογικούς μηχανισμούς, και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που χαρακτηρίζουν τη λειτουργία των βλαστικών κυττάρων είναι τα ίδια των οποίων η δυσλειτουργία επάγει καρκινογένεση (περισσότερα για τα σηματοδοτικά μονοπάτια στην Ενότητα 2.4.). Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα συνεπώς μπορούν να προκύψουν από την μεταλλαγή και κακοήθη εξαλλαγή των φυσιολογικών βλαστικών κυττάρων<sup>17</sup>.

Επί τούτου, το γεγονός ότι τα λευχαιμικά βλαστοκύτταρα εκφράζουν επιφανειακά αντιγόνα παρόμοια με τα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα υποστηρίζει την ιδέα ότι προέρχονται από αυτά<sup>28</sup>. Ωστόσο, υπάρχουν φαινοτυπικές διαφορές ανάμεσα στα λευχαιμικά και τα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα<sup>35,36</sup>, γεγονός που υποδηλώνει ότι ακόμα και εάν οι πρώτες μεταλλάξεις γίνονται στα αιμοποιητικά κύτταρα, τα τελικά συμβάντα που θα οδηγήσουν στην κακοήθη εξαλλαγή μπορεί να γίνονται σε μεταγενέστερες κυτταρικές σειρές<sup>28</sup>.

### Όνιμες μορφές βλαστικών κυττάρων

Υπάρχουν διάφορα στάδια διαφοροποίησης των βλαστοκυττάρων, από παντοδύναμα σε → ολοδύναμα → πολυδύναμα → μονοδύναμα. Στο τελευταίο στάδιο, τα μονοδύναμα βλαστοκύτταρα μπορούν να παράγουν μόνο έναν συγκεκριμένο τύπο κυττάρων, πχ νευρικά κύτταρα. Ωστόσο, υπάρχουν δεδομένα που αναδεικνύουν ότι οι αναπτυξιακοί περιορισμοί των βλαστοκυττάρων αυτού του σταδίου είναι δυνητικά αναστρέψιμοι, και μπορούν να τροποποιηθούν από παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος στο οποίο εδράζονται<sup>37</sup>. Νευρικά βλαστικά κύτταρα φάνηκε ότι μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα όλων των βλαστικών στιβάδων<sup>38</sup>. Επιπρόσθετα, κύτταρα του μυελού των οστών μπορούν να παραγάγουν κύτταρα του νευρικού συστήματος<sup>39</sup> καθώς και μυικά κύτταρα<sup>40</sup>. Το μικροπεριβάλλον ενός όγκου έχει αναδειχθεί ως ένας βασικός παράγοντας στην δημιουργία και πρόοδο του καρκίνου, και φαίνεται ότι υπάρχουν σηματοδοτήσεις από το μικροπεριβάλλον του όγκου που αίρουν τους αναπτυξιακούς περιορισμούς των ιστοειδικών βλαστοκυττάρων και επιτρέπουν την κακοήθη εξαλλαγή τους και μετατροπή σε καρκινικά βλαστοκύτταρα<sup>41</sup>.

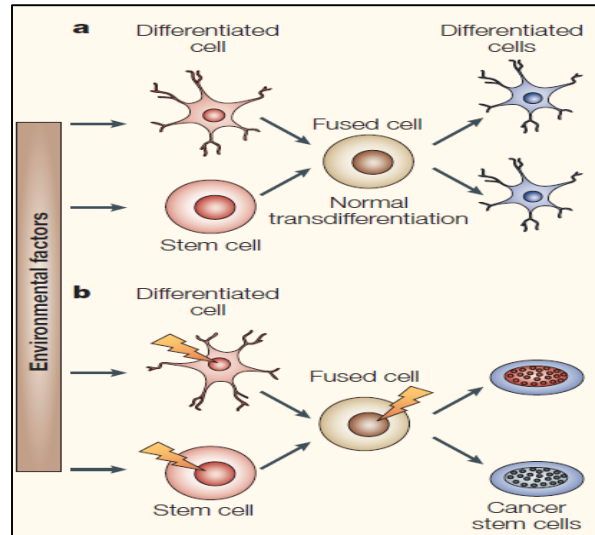
### Διαφοροποιημένα κύτταρα

Ένα διαφοροποιημένο κύτταρο μπορεί επίσης να αποτελέσει πηγή παραγωγής καρκινικών βλαστικών κυττάρων μέσω διαδικασιών αποδιαφοροποίησης. Για παράδειγμα, ο συνδυασμός της ενεργοποίησης του μονοπατιού του EGFR και της απώλειας της ογκοκατασταλτικής δράσης των INK4A και ARF πυροδοτεί έναν φαινότυπο γλοιωμάτων υψηλού βαθμού κακοήθειας in vivo, τόσο από νευρικά βλαστικά κύτταρα όσο και από διαφοροποιημένα αστροκύτταρα<sup>42</sup>. Φαίνεται συνεπώς ότι τα διαφοροποιημένα κύτταρα μπορούν να αποδιαφοροποιηθούν σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα, με παρόμοιο μηχανισμό όπως και τα προγονικά κύτταρα<sup>37</sup>.

### Κυτταρική σύντηξη

Νεότερες θεωρίες που έχουν προταθεί σχετικά με την προέλευση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων στοχεύουν στον ρόλο της κυτταρικής σύντηξης (cell fusion) στα αρχικά γεγονότα της καρκινογένεσης. Η κυτταρική σύντηξη αποτελεί βασικό μηχανισμό της ανάπτυξης των οργανισμών<sup>43</sup>, και είναι απαραίτητη για την αναγέννηση των ιστών και τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων<sup>43,44</sup>). Ωστόσο, η ακατάλληλη κυτταρική σύντηξη μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία καρκίνου.





**Εικόνα 12.** Κυτταρική σύντηξη (Bjerkvig et al 2005)

Η ιδέα ότι η κυτταρική σύντηξη διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην καρκινογένεση εισήχθη αρχικά πριν από 100 περίπου χρόνια με την πρόταση ότι ο καρκίνος είναι το αποτέλεσμα του υβριδισμού μεταξύ λευκοκυττάρων και σωματικών κυττάρων, και ακολούθως επεκτάθηκε στη θεωρία ότι η κυτταρική σύντηξη είναι υπεύθυνη για την φαινοτυπική και γονοτυπική ποικιλομορφία των όγκων<sup>45,46</sup>). Η σύντηξη μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων δημιουργεί υβρίδια με νέες ιδιότητες, και μπορεί να αποτελεί έναν ξεχωριστό μηχανισμό παθογένεσης των καρκινικών βλαστικών κυττάρων<sup>37</sup>.

#### **2.4. Σηματοδοτικά μονοπάτια**

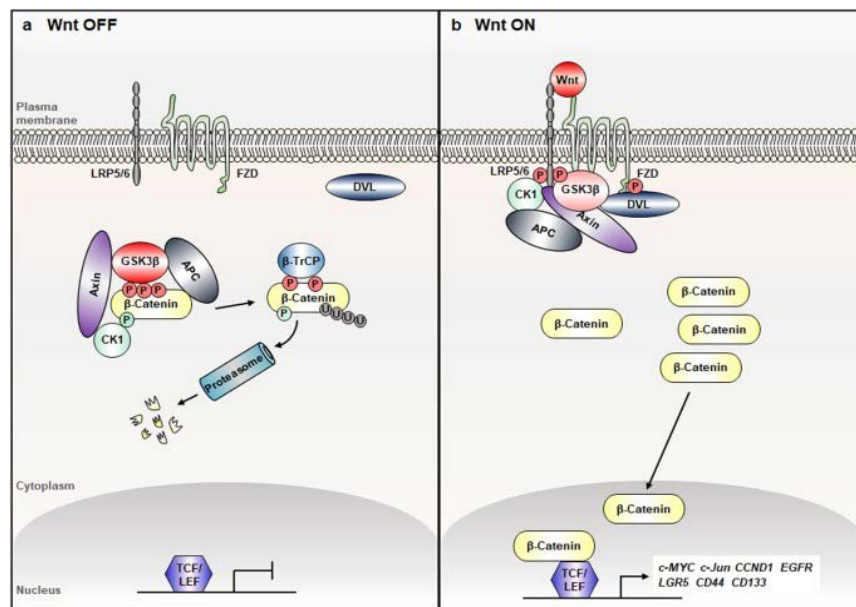
Ο όρος «κυτταρική σηματοδότηση» αναφέρεται στους μοριακούς μηχανισμούς με τους οποίους το κύτταρο λαμβάνει, επεξεργάζεται και μεταδίδει τις πληροφορίες που μεταφέρονται από τα ερεθίσματα που δρουν σε αυτό. Υπάρχει ένα λεπτομερές σύστημα επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων που είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο των βασικών κυτταρικών λειτουργιών. Στο πλαίσιο αυτό, τα περισσότερα εξελικτικά βιολογικά φαινόμενα, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης των χαρακτηριστικών των βλαστικών κυττάρων (αυτοανανέωση, ικανότητα διαφοροποίησης) ρυθμίζονται από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια.

Η δυσλειτουργία των ίδιων σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με τη ρύθμιση των βλαστικών κυττάρων συμμετέχει επίσης στην επαγωγή της καρκινογένεσης. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται περιλαμβάνουν την επαγωγή φαινοτύπου βλαστικού κυττάρου στα καρκινικά

κύτταρα, τη ρύθμιση της αυτοανανέωσης, την αντίσταση στη φαρμακευτική αγωγή, και την επαγωγή της διήθησης και μετάστασης<sup>17</sup>.

### 2.4.1. Wnt/b-katenin

Το μονοπάτι αυτό ενεργοποιείται από τις Wnt γλυκοπρωτεΐνες, που δεσμεύουν τους υποδοχείς LRP5/6 και FZD. Όταν απουσιάζει η δέσμευση των Wnt, τα κύτταρα χρησιμοποιούν το σύμπλοκο APC και Axin για να προωθήσουν την διαμεσολαβούμενη από την GSK-3 φωσφορυλίωση της β-κατενίνης, η οποία οδηγεί την β-κατενίνη προς αποδόμηση από το πρωτεάσωμα. Μόλις οι Wnt δεσμευτούν στους υποδοχείς LRP5/6 ή FZD, ανταγωνίζονται την δράση του συμπλόκου APC/Axin, οπότε η β-κατενίνη σταθεροποιείται, δεν αποδομείται, και επάγει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων στον πυρήνα (πχ c-myc, CCND1) που σχετίζονται με την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό<sup>47</sup>.



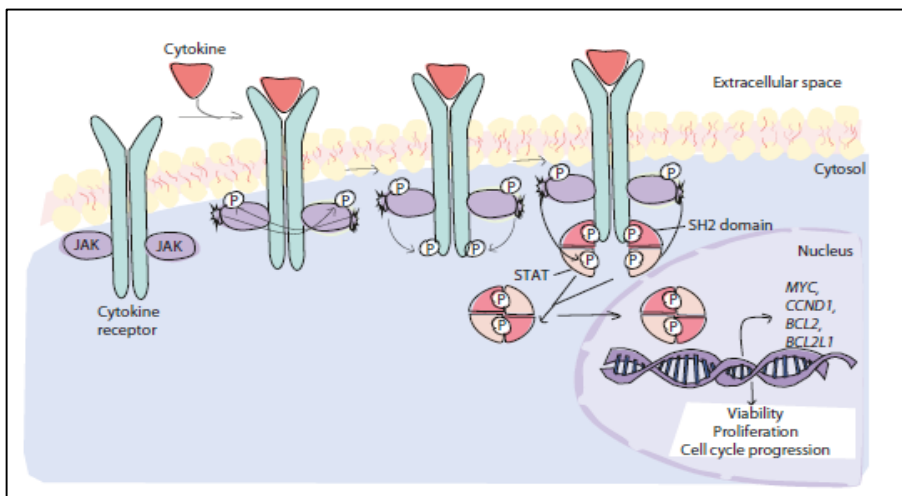
**Εικόνα 13.** Σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/b-katenin (Jeong et al 2018)

Το μονοπάτι της Wnt είναι από τους βασικότερους ρυθμιστικούς μηχανισμούς της ανάπτυξης σε όλο το ζωικό βασίλειο και είναι απαραίτητο για την λειτουργία των βλαστικών κυττάρων στα περισσότερα ενήλικα θηλαστικά<sup>48</sup>. Η δυσλειτουργία του εμπλέκεται στην παθογένεση των περισσότερων καρκίνων αλλά και πολλών άλλων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων νευροεκφυλιστικών και φλεγμονωδών νοσημάτων. Αποτελεί το βασικό σηματοδοτικό μονοπάτι

στην παθογένεση του κολοορθικού καρκίνου, όπου το 94% των περιπτώσεων φέρει μεταλλάξεις σε τουλάχιστον ένα γονίδιο του μονοπατιού (The Cancer Genome Atlas Network 2012)<sup>49</sup>. Συγκεκριμένα στο καρκίνο του μαστού έχει δείχθει ότι η Wnt σηματοδότηση συμμετέχει στις διαδικασίες του πολλαπλασιασμού και της μετάστασης, της ρύθμισης του ανοσιακού μικροπεριβάλλοντος, της διατήρησης της βλαστικότητας, της αντίστασης στην θεραπεία, καθώς και του καθορισμού του φαινοτύπου<sup>50</sup>. Το μονοπάτι της Wnt συμμετέχει επίσης στην ρύθμιση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων του καρκίνου του μαστού, όπου αποτελεί τον στόχο διαφόρων miRNAs – η πλειοψηφία των οποίων ασκεί ογκοκατασταλτική δράση<sup>51</sup> (περισσότερα στο Κεφάλαιο 4).

#### 2.4.2. JAK/STAT

Το μονοπάτι αυτό ενεργοποιείται από κυτταροκίνες (ιντερφερόνες, ιντερλευκίνες, κλπ). Η δέσμευση των κυτταροκινών στους υποδοχείς τους ενεργοποιεί τις JAK κινάσες. Οι JAK κινάσες (JAK1, JAK2, JAK3, TYK) ενεργοποιούνται φωσφορυλιώνοντας η μία την άλλη, μια διαδικασία που οδηγεί στην φωσφορυλίωση του υποδοχέα, επιτρέποντας την δέσμευση των μεταγραφικών παραγόντων STAT μέσω των SH2 domain τους. Μόλις οι STAT δεσμευτούν, φωσφορυλιώνονται από τις JAK κινάσες, ομο- ή ετεροδιμερίζονται και μετακινούνται στον πυρήνα, όπου επάγουν την μεταγραφή γονιδίων στόχων (πχ c-myc, CCND1)<sup>52</sup>.

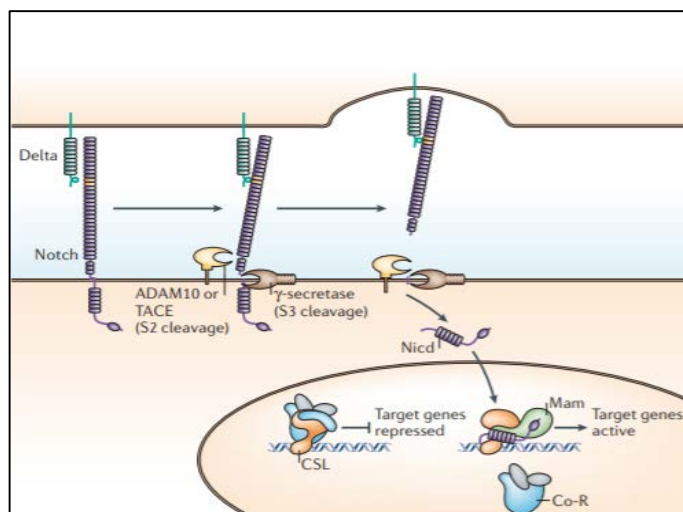


**Εικόνα 14.** Σηματοδοτικό μονοπάτι JAK/STAT (Molecular and Cell Biology of Cancer, Fior&Zilhao)

. Το μονοπάτι JAK/STAT ρυθμίζει μια πληθώρα φυσιολογικών κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων της οργανογένεσης, της ρύθμισης της κυτταρικής διαφοροποίησης και της απόπτωσης. Η παθολογική ενεργοποίησή του εμπλέκεται στην παθογένεση πολλών καρκίνων, και εμφανίζεται σε περισσότερο από το 40% των καρκίνων του μαστού, όπου συμμετέχει στις διαδικασίες του πολλαπλασιασμού, της αγγειογένεσης, της EMT, καθώς και στην ρύθμιση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων<sup>53</sup>.

### 2.4.3 Notch

Το μονοπάτι αυτό ενεργοποιείται από τη σύνδεση των Notch συνδετών (Delta-like, Jagged) των σηματοδοτικών κυττάρων στους Notch υποδοχείς (Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4) των κυττάρων υποδοχέων. Η σύνδεση αυτή ενεργοποιεί δύο πρωτεολυτικές αντιδράσεις, διαμεσολαβούμενες αντίστοιχα από τις μεταλλοπρωτεάσες της οικογένειας ADAM και TACE (S2 cleavage) και την γ-σεκρετάση (S3 cleavage), με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της ενδοκυττάριας περιοχής των Notch υποδοχέων. Η απελευθερωμένη ενδοκυττάρια περιοχή μετακινείται στον πυρήνα, συνδέεται με και ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα CSL και επάγει την μεταγραφή γονιδίων στόχων<sup>54</sup>



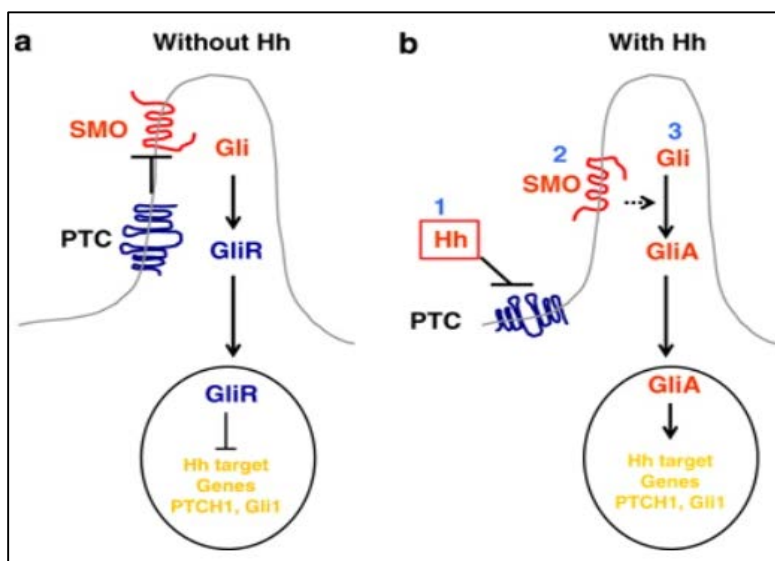
**Εικόνα 15.** Σηματοδοτικό μονοπάτι Notch (Bray et al 2006)

Το μονοπάτι Notch είναι ένα αρχέγονο μοριακό μονοπάτι που σχετίζεται με την εμβρυογένεση, την οργανογένεση, τη διαφοροποίηση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αυτοανανέωση. Η δυσλειτουργία του εμπλέκεται σε διάφορους μηχανισμούς καρκινογένεσης, όπως η

διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων, η αγγειογένεση και η κυτταρική μετανάστευση<sup>55</sup>. Έχει δείχθει ότι η υπερέκφραση των Notch συνδετών ή/και υποδοχέων και ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού συμμετέχει στην παθογένεση του καρκίνου του μαστού<sup>56</sup> καθώς και στην ρύθμιση της αυτοανανεωτικής ικανότητας των καρκινικών βλαστικών κυττάρων του καρκίνου του μαστού<sup>51</sup>.

#### 2.4.4. Hedgehog

Το μονοπάτι αυτό ενεργοποιείται από τα σηματοδοτικά μόρια της οικογένειας Hedgehog (Hh), που περιλαμβάνουν τα Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) και Desert Hedgehog (Dhh). Τα μόρια Hh δεσμεύονται στην διαμεμβρανική πρωτεΐνη Patched και την αποδομούν, μια διαδικασία που ενεργοποιεί μια άλλη διαμεμβρανική πρωτεΐνη, την SMO. Η SMO ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες Gli, οι οποίοι δρουν στον πυρήνα επάγοντας την μεταγραφή γονιδίων στόχων<sup>57</sup>.



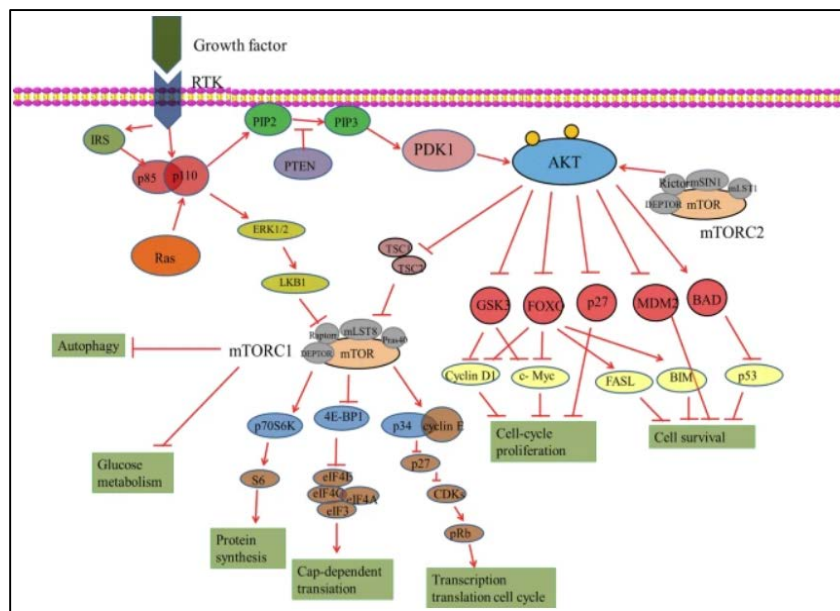
Εικόνα 16. Σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog (Yang et al 2010)

Το μονοπάτι Hedgehog είναι βασικό μονοπάτι στην εμβρυική ανάπτυξη και κυτταρική διαφοροποίηση. Η διαταραχή του κατά την εμβρυογένεση σχετίζεται με σοβαρές σκελετικές δυσμορφίες και αναπτυξιακές ανωμαλίες όπως η ολοπρωσεγκεφαλία. Η έκτοπη ενεργοποίησή του έχει συσχετιστεί με την σηματοδότηση στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα και την παθογένεση διαφόρων τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού<sup>58</sup>. Χαρακτηριστικό παράδειγμα το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος, όπου η

φαρμακευτική αναστολή του μονοπατιού Hedgehog έχει οδηγήσει στη δημιουργία φαρμάκων που έχουν μπει στην κλινική πράξη (Vismodegib<sup>59</sup>, Sonidegib<sup>60</sup>).

#### 2.4.5. PI3K/AKT

Οι PI3K είναι μια οικογένεια κινασών (Phosphatidyl Inositol 3-Kinases) με κομβικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση. Το κεντρικό μονοπάτι είναι το μονοπάτι της PI3K/AKT, το οποίο ενεργοποιείται από την δέσμευση εξωκυττάρων αυξητικών παραγόντων σε υποδοχείς τυροσινικής κινάσης. Η δέσμευση αυτή οδηγεί στην αυτοφωσφορύλιωση και ενεργοποίηση του υποδοχέα και την ενεργοποίηση της PI3K, η οποία φωσφορυλιώνει το μεμβρανικό λιπίδιο PIP2 σε PIP3 και ενεργοποιεί την AKT. Η AKT είναι μια κινάση σερίνης-θρεονίνης με μια εξαιρετικά ευρεία ποικιλία δράσεων, που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση του mTOR και συνεπακόλουθη αναστολή της αυτοφαγίας, καθώς και την καταστολή του p27 και επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Το μονοπάτι είναι ιδιαίτερα πολύπλοκο, περιλαμβάνει πολλαπλούς ενεργοποιητές, καταστολείς και διαμεσολαβητές, καθώς και δομές που δεν έχουν μελετηθεί ακόμα πλήρως<sup>61</sup>.



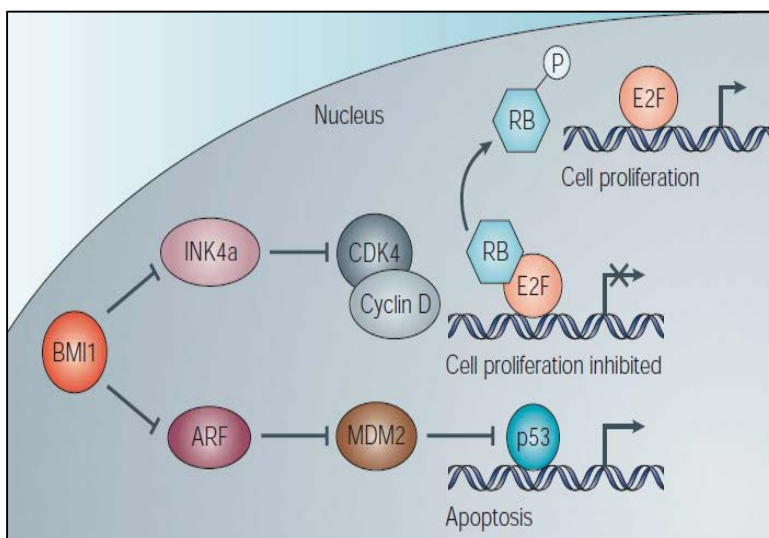
Εικόνα 17. Σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K (Xu et al 2020)

Το μονοπάτι αυτό είναι απαραίτητο στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Είναι λογικό συνεπώς να εμπλέκεται στη λειτουργία των βλαστικών κυττάρων και τον υπέρμετρο κυτταρικό πολλαπλασιασμό που σχετίζεται με την καρκινογένεση, και

αποτελεί ένα από τα πιο μελετημένα σηματοδοτικά κυκλώματα στον ανθρώπινο καρκίνο. Η φαρμακευτική του αναστολή χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική πράξη<sup>62</sup> καθώς και στον καρκίνο του μαστού<sup>63</sup>, για τον οποίο το πρώτο φαρμακευτικό σκεύασμα που βασίζεται στην αναστολή του μονοπατιού PI3K (alpelisib – brand name Piqray) εγκρίθηκε από τους Διεθνείς Οργανισμούς Φαρμάκων (FDA, EMA) το 2019<sup>64</sup>.

#### 2.4.6. BMI1

Το μονοπάτι αυτό ενεργοποιείται από την πρωτεΐνη BMI1. Η BMI1 αναστέλλει την μεταγραφή και ενεργοποίηση της INK4a και της ARF, δύο αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών. Η καταστολή της INK4a οδηγεί στην φωσφορύλιωση και απενεργοποίηση του Rb, και συνεπακόλουθη απελευθέρωση μεταγραφικών παραγόντων (κυρίως του E2F) που σχετίζονται με την συνέχιση του κυτταρικού κύκλου. Η καταστολή της ARF επιτρέπει την διαμεσολαβούμενη από το MDM2 καταστολή του p53, με αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης<sup>28</sup>.



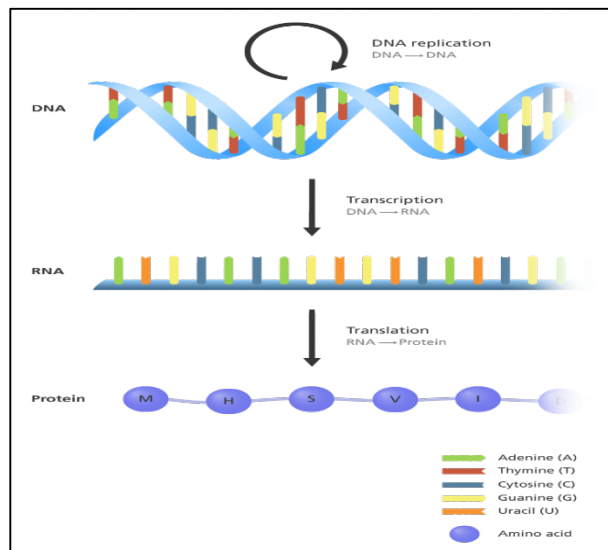
**Εικόνα 18.** Σηματοδοτικό μονοπάτι BMI1 (Pardal et al 2003)

Το μονοπάτι της BMI1 είναι απαραίτητο για την αυτοανανεωτική λειτουργία των βλαστοκυττάρων. Αποτελεί όμως και μονοπάτι που εμπλέκεται στην καρκινογένεση πολλών αιματολογικών και συμπαγών κακοηθειών<sup>65</sup> συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού, όπου έχει συσχετισθεί με αναστολή της αναδιπλασιαστικής γήρανσης<sup>66</sup> και αυξημένη αυτοανανεωτική ικανότητα των καρκινικών βλαστικών κυττάρων<sup>67</sup>.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

### 3.1. Το κεντρικό δόγμα της βιολογίας

Η ροή της γενετικής πληροφορίας στα κύτταρα καθορίζεται από το κεντρικό δόγμα της βιολογίας (Εικόνα 19). Σύμφωνα με αυτό, η γενετική πληροφορία βρίσκεται στον πυρήνα ενός κυττάρου, και είναι κωδικοποιημένη στις βάσεις του DNA. Μέσω της διαδικασίας της **αντιγραφής**, το DNA αυτοδιπλασιάζεται προκειμένου να διατηρήσει και να μεταβιβάσει τη γενετική πληροφορία από κύτταρο σε κύτταρο. Μέσω της διαδικασίας της **μεταγραφής**, το DNA μετατρέπεται σε RNA. Τέλος, μέσω της διαδικασίας της **μετάφρασης**, το RNA μετατρέπεται σε πρωτεΐνη. Με την ανακάλυψη των ρετροϊών, το δόγμα διευρύνθηκε για να συμπεριλάβει τον αυτοδιπλασιασμό του RNA και την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, μέσω της οποίας το RNA μπορεί να μετατραπεί σε DNA. Οι διαδικασίες της μεταγραφής και της μετάφρασης καθορίζουν την **γονιδιακή έκφραση**, δηλαδή τον τρόπο με τον οποίο η αλληλουχία του DNA παρέχει τις πληροφορίες για τη σύνθεση των πρωτεϊνών<sup>68</sup>.



Εικόνα 19. Το κεντρικό δόγμα της Βιολογίας (Image credit: Genome Research Limited)



### **3.2. Επιγενετική**

Ο όρος επιγενετική χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον εξελικτικό βιολόγο C.H.Waddington για να περιγράψει τις διαδικασίες πάνω και πέρα (“above and beyond”) της γενετικής που ορίζουν τη διαφοροποίηση – διαδικασίες που εξηγούν φαινόμενα όπως το διαφορετικό χρώμα τριχώματος στα γενετικά πανομοιότυπα ποντίκια Agouti ή το διαφορετικό χρώμα ματιών σε γενετικά πανομοιότυπα ομοζυγωτικά δίδυμα. Η επιγενετική ορίζεται ως η μελέτη των κληρονομικών αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης που συμβαίνουν χωρίς αλλαγές στην αλληλουχία των βάσεων του DNA. Κατά συνέπεια, η γονιδιακή έκφραση καθορίζεται όχι μόνο από τον γενετικό κώδικα, αλλά και από επιγενετικές αλλαγές οι οποίες μπορεί να πραγματοποιηθούν κατά τη διάρκεια της ζωής ενός οργανισμού. Δημιουργείται έτσι το **επιγένωμα**, ένας δεύτερος γενετικός κώδικας τοποθετημένος πάνω από τις αλληλουχίες βάσεων DNA του γονιδιώματος, που περιλαμβάνει ολόκληρο το σύνολο των επιγενετικών πορειών ενός οργανισμού. Παρόλο που κάθε οργανισμός έχει ένα γονιδίωμα, το ίδιο άτομο έχει διαφορετικά επιγενώματα, τα οποία μπορεί να διαφέρουν σε κάθε κυτταρικό τύπο και να διαφοροποιούνται κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου<sup>69</sup>.

### **3.3. Επιγενετικοί μηχανισμοί**

Οι βασικότεροι επιγενετικοί μηχανισμοί είναι

1. Η μεθυλίωση του DNA
2. Οι τροποποιήσεις των ιστονών
3. Τα μη κωδικά μόρια RNA (ncRNAs) και κυρίως τα μικρά μη κωδικά μόρια RNA (microRNAs)

#### **3.3.1 Μεθυλίωση του DNA**

Η μεθυλίωση του DNA περιγράφει την διαδικασία προσθήκης μιας μεθυλομάδας (CH<sub>3</sub>) σε μια κυτοσίνη που προηγείται γουανίνης (CpG αλληλουχία). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μέσω ενζύμων που ονομάζονται μεθυλοτρανσφεράσες. Στον άνθρωπο υπάρχουν 3 μεθυλοτρανσφεράσες, οι DNMT1, DNMT3a και DNMT3b.

#### **Ρόλος της μεθυλίωσης**

Η μεθυλίωση του DNA συμβάλλει στη γονιδιακή έκφραση όταν αφορά CpG αλληλουχίες που βρίσκονται στην περιοχή των υποκινητών των γονιδίων. Περιοχές πλούσιες σε CpG αλληλουχίες ονομάζονται CpG νησίδες (CpG islands) και συνηθέστερα εντοπίζονται στην περιοχή των

υποκινητών των γονιδίων. Οι CpG νησίδες βρίσκονται στο 60% των γονιδίων και οι περισσότερες είναι μη μεθυλιωμένες. Η μεθυλίωση μιας νησίδας CpG εμποδίζει την ενεργοποίηση του υποκινητή στον οποίο εντοπίζεται και οδηγεί στην αποσιώπηση του γονιδίου. Συνεπώς, η παρουσία μεθυλίωσης σχετίζεται με αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης<sup>70</sup>.

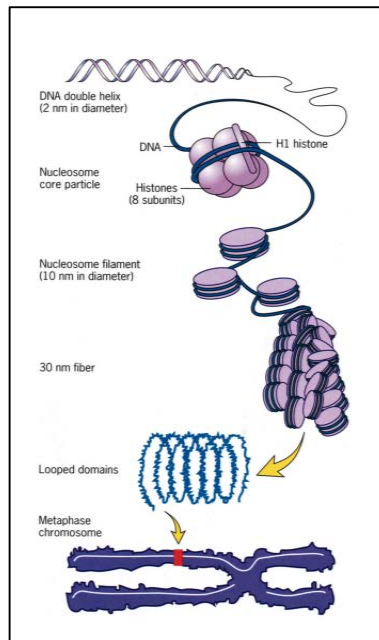
### Κλινικές εφαρμογές

Ο μηχανισμός της μεθυλίωσης του DNA έχει συσχετιστεί με την παθογένεση πολλών ασθενειών. Συγκεκριμένα στον χώρο της ογκολογίας, οι επιγενετικές βλάβες που σχετίζονται με την μεθυλίωση έχουν ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον – καθώς τόσο η μεθυλίωση ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου όσο και η απομεθυλίωση ενός πρωτο-ογκογονιδίου είναι γεγονότα που μπορούν να επάγουν καρκινογένεση, γι' αυτό και η μεθυλίωση του γονιδιώματος έχει χαρακτηριστεί ως ένα ορόσημο του καρκίνου<sup>71</sup>. Η μελέτη των προτύπων μεθυλίωσης συνεπώς είναι ελπιδοφόρα όσον αφορά την εύρεση βιοδεικτών σχετιζόμενων με καρκίνο<sup>72</sup>. Καθώς οι επιγενετικοί μηχανισμοί είναι δυνητικά αντιστρέψιμοι, η στόχευση των επιγενετικών βλαβών αποτελεί επίσης δελεαστικό θεραπευτικό στόχο. Υπάρχουν πολλές ουσίες σε προχωρημένα στάδια κλινικών μελετών που στοχεύουν φαρμακευτικά την μεθυλίωση, και δύο εξ'αυτών έχουν εγκριθεί από τους διεθνείς φορείς και έχουν εισαχθεί στην καθημερινή κλινική πρακτική – πρόκειται για τους DNMT αναστολείς decitabine (brand name Dacogen) για τη θεραπεία της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και azacitidine (brand name Vidaza) για τη θεραπεία της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και του μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου<sup>73</sup>. Αν και οι ουσίες αυτές δεν έχουν ακόμα δείξει κλινικό όφελος σε ασθενείς με καρκίνο μαστού, η υπερμεθυλίωση του DNA έχει ενοχοποιηθεί ως μηχανισμός καρκινογένεσης κυρίως στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, και η αναστολή της μεθυλίωσης έχει συσχετισθεί με αντικαρκινική δράση σε πειραματικές κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού<sup>74,75</sup>. Επιπρόσθετα, οι DNMT αναστολείς παρουσιάζουν ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες, και υπάρχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον γύρω από την δυνητική χρησιμότητά τους σε συνδυασμό με ανοσοθεραπεία στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού<sup>74</sup>. Η εφαρμογή τους δοκιμάζεται επί του παρόντος σε κλινικές μελέτες φάσης 2, σε συνδυασμό με καρβοπλατίνη για ασθενείς με μεταστατικό τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (clinical trial NCT03295552), και σε συνδυασμό με pembrolizumab ως προεγχειρητική θεραπεία για ασθενείς με πρώιμο τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (clinical trial NCT02957968).

### 3.3.2. Τροποποίηση των ιστονών

#### Δομή του χρωμοσώματος (Εικόνα 19)

Η επόμενη οργανωμένη δομή μετά το γονίδιο είναι το χρωμόσωμα. Ουσιαστικά το DNA συσπειρώνεται και πακετάρεται σε χρωμοσώματα, ώστε να μπορέσει παρά το μήκος του των 2m να χωρέσει στον πυρήνα μήκους 5μm. Η συσπείρωση αυτή πραγματοποιείται με τη βοήθεια πρωτεϊνών, οι οποίες διαφοροποιούνται σε δύο ομάδες: 1) Τις ιστόνες (H1, H2A, H2B, H3, H4) και 2) Τις μη ιστονικές πρωτεΐνες. Το σύμπλοκο που σχηματίζει το DNA με τις πρωτεΐνες ονομάζεται χρωματίνη.



Εικόνα 19. Δομή του χρωμοσώματος (Pierce B: Genetics, 2004)

Η δομή της χρωματίνης είναι καίριας σημασίας για την έκφραση των γονιδίων. Η συμπαγής δομή της χρωματίνης (ετεροχρωματίνη) οδηγεί σε καταστολή της μεταγραφής, ενώ για την ενεργοποίηση της μεταγραφής απαραίτητη είναι η αποδιατεταγμένη δομή της χρωματίνης (ευχρωματίνη). Οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την αλλαγή της δομής της χρωματίνης είναι τα σύμπλοκα αναδιοργάνωσης των νουκλεοσωμάτων (του πρώτου επιπέδου οργάνωσης της χρωματίνης), και ο επιγενετικός μηχανισμός της τροποποίησης των ιστονών<sup>76</sup>.

### Ρόλος της τροποποίησης των ιστονών

Όταν δημιουργείται το νουκλεόσωμα, οι αμινοτελικές ουρές των ιστονών προεξέχουν από τον πυρήνα του. Οι ουρές αυτές υπόκεινται σε χημικές ομοιοπολικές τροποποιήσεις που ελέγχουν την δομή της χρωματίνης και κατά συνέπεια την γονιδιακή έκφραση. Οι πιο γνωστές τροποποιήσεις είναι η ακετυλίωση, η μεθυλίωση και η φωσφορυλίωση. Υπάρχουν επίσης και η ουβουικιτινιλίωση, η σουμοϋλίωση, η κιτρουλινίωση και άλλες λιγότερο μελετημένες<sup>77</sup>.

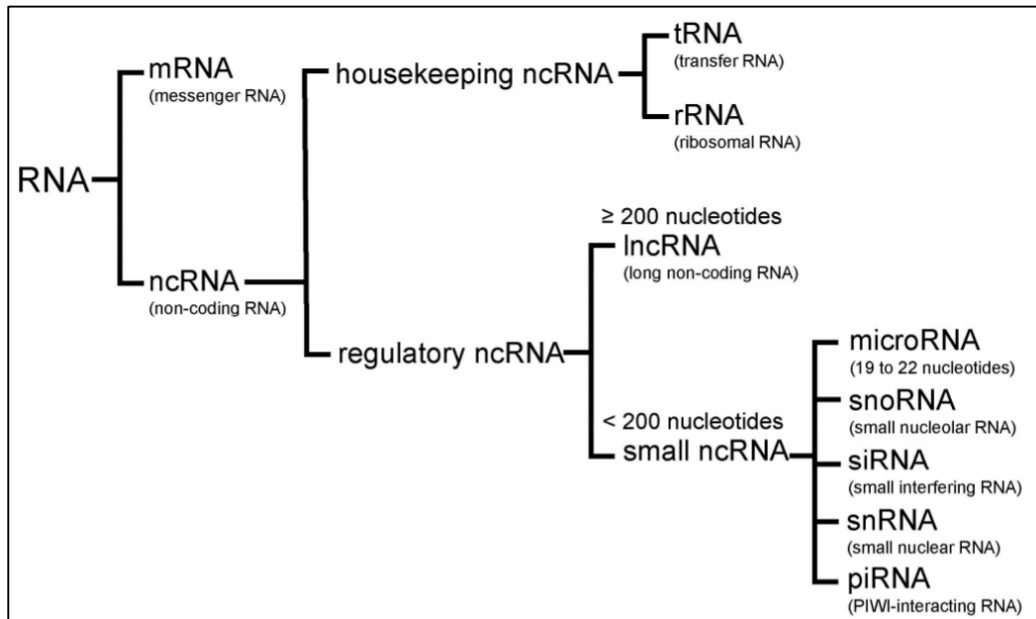
Η ακετυλίωση των ιστονών σχετίζεται με την ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης μέσω αποδιάταξης της χρωματίνης σε ευχρωματίνη, ενώ αντίστοιχα η απο-ακετυλίωσή τους σχετίζεται με την αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης. Η διαδικασία της ακετυλίωσης πραγματοποιείται από τις ακετυλάσες των ιστονών, και η διαδικασία της από-ακετυλίωσης από τις αποακετυλάσες των ιστονών. Η μεθυλίωση των ιστονών σχετίζεται με την αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης μέσω συμπύκνωσης της χρωματίνης σε ετεροχρωματίνη. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται από τις μεθυλοτρανσφεράσες των ιστονών<sup>77</sup>.

### Κλινικές εφαρμογές

Η τροποποίηση των ιστονών έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη καρκίνου. Τόσο η ακετυλίωση<sup>78</sup> όσο και η μεθυλίωση<sup>79</sup> των ιστονών έχουν αποδειχθεί ότι εμπλέκονται στην διαδικασία της καρκινογένεσης, αν και οι ακριβείς μηχανισμοί ακόμα δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Η φαρμακευτική αναστολή των αποακετυλασών των ιστονών έχει ήδη δώσει σκευάσματα που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη ως ογκολογικά φάρμακα, όπως το panobinostat (brand name Farydak) για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος και τα vorinostat (brand name Zolinza), romidepsin (brand name Istodax) και belinostat (brand name Beleodaq) για τη θεραπεία των περιφερικών T-λεμφομάτων<sup>80</sup>. Όσον αφορά τον καρκίνο του μαστού, αναστολείς των αποακετυλασών των ιστονών βρίσκονται σε προχωρημένες φάσεις κλινικών μελετών, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα από κλινικές μελέτες φάσης 2 και 3<sup>81,82</sup>.

### 3.3.3. Μικρά μη κωδικά μόρια RNA

Η οικογένεια των RNA είναι εκτενής. Μια αδρή κατηγοριοποίηση (Εικόνα 20) διακρίνει τα RNA σε δύο μεγάλες κατηγορίες: 1) Το αγγελιαφόρο RNA (messenger RNA – mRNA), το οποίο περιέχει την γενετική πληροφορία η οποία θα μεταφραστεί σε πρωτεΐνη, και 2) Το μη κωδικοποιό RNA (non-coding RNA – ncRNA), το οποίο δεν θα κωδικοποιηθεί σε πρωτεΐνη. Το μη κωδικοποιό RNA, εκτός από τα γνωστά από το κεντρικό δόγμα της βιολογίας μεταφορικό RNA (transfer RNA – tRNA) και ριβοσωμικό RNA (ribosomal RNA – rRNA), περιλαμβάνει και μια μεγάλη ομάδα ρυθμιστικών μορίων RNA τα οποία έχουν αναδειχθεί ως κομβικά σχεδόν σε κάθε κυτταρική λειτουργία – και των οποίων η μελέτη έχει οδηγήσει σε μια έκρηξη δεδομένων τις τελευταίες δεκαετίες<sup>83</sup>.

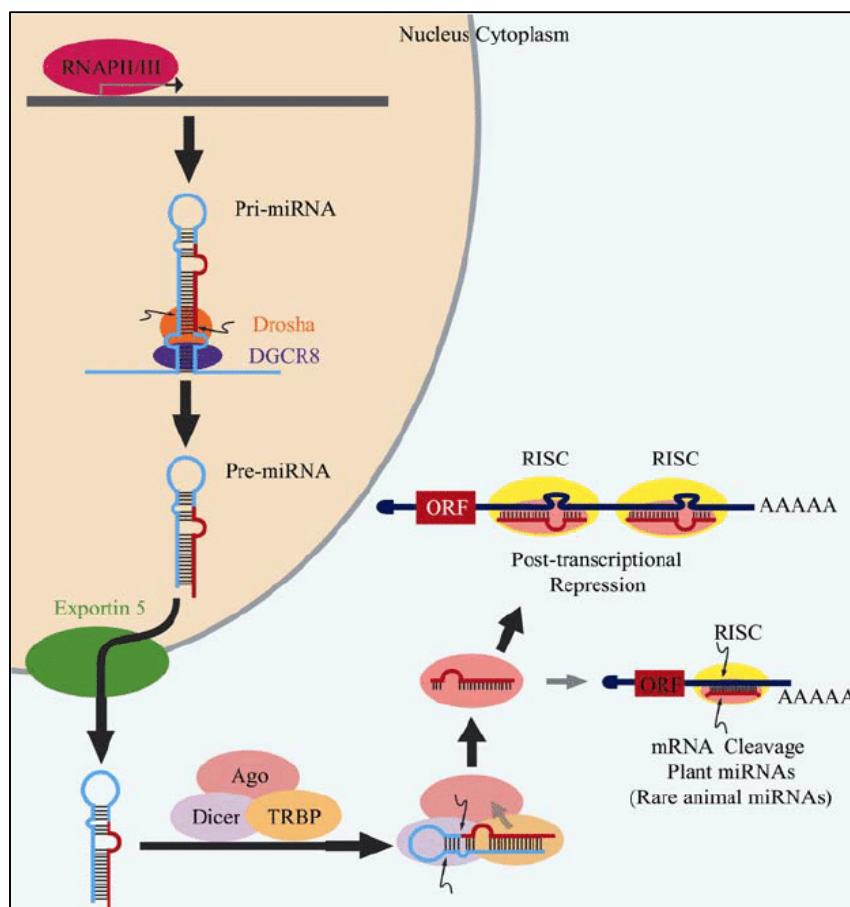


Εικόνα 20. Είδη RNA (Inamura et al 2017)

Τα μικρά μη κωδικά μόρια RNA (micro-RNAs – miRNAs) είναι μικρά μονόκλινα μόρια RNA μήκους 19-22 νουκλεοτιδίων. Λειτουργούν ως επιγενετικοί μηχανισμοί της γονιδιακής έκφρασης ζευγαρώνοντας ειδικά με μόρια mRNA με βάση τον κανόνα συμπληρωματικότητας των βάσεων και επηρεάζοντας την έκφρασή τους. Ο μηχανισμός δράσης των ρυθμιστικών ncRNAs ονομάζεται παρεμβολή RNA (RNA interference). Η παρεμβολή RNA μελετήθηκε για πρώτη φορά στο *C.Elegans*<sup>84</sup> – έκτοτε, τα miRNAs φάνηκε ότι ρυθμίζουν τουλάχιστον 30% των ανθρώπινων γονιδίων<sup>85</sup> και συμμετέχουν σε όλες σχεδόν τις κυτταρικές λειτουργίες. Η μελέτη της παρεμβολής του RNA<sup>86</sup> οδήγησε τους Fire και Mello σε βραβείο Nobel Φυσιολογίας/Ιατρικής το 2006.

### Βιογένεση miRNA(Εικόνα 21)

Τα γονίδια των miRNAs βρίσκονται μέσα στο γονιδίωμα του ανθρώπου. Η κατανομή τους δεν είναι τυχαία – συχνά πολλοί γενετικοί τόποι miRNAs βρίσκονται κοντά ο ένας στον άλλο και αποτελούν μια ενιαία μεταγραφική οντότητα<sup>87</sup>. Η μεταγραφή τους γίνεται κυρίως από την RNA πολυμεράση II και σε μικρότερο βαθμό από την RNA πολυμεράση III. Το αρχικό μόριο που δημιουργείται ονομάζεται πρωτογενές miRNA (pri-miRNA) και έχει δομή φουρκέτας (stem loop structure). Σε αυτό δρα αρχικά το ένζυμο Drosha μαζί με τον συμπαραγοντά της DGCR8. Η Drosha είναι μια πρωτεΐνη με δράση νουκλεάσης RNase III, η οποία τέμνει το pri-miRNA και δημιουργεί το πρόδρομο mi-RNA (pre-miRNA). Το pre-miRNA ακολούθως εξέρχεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα με την βοήθεια της εξπορτίνης 5. Στο κυτταρόπλασμα, το pre-miRNA τέμνεται από την Dicer, μια πρωτεΐνη με δράση νουκλεάσης RNase III, η οποία απομακρύνει το 3'-άκρο του βρόγχου του pre-miRNA και παράγει το δίκλωνο γραμμικό miRNA. Το δίκλωνο αυτό miRNA αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο RISC και μετατρέπεται σε μονόκλωνο miRNA, που είναι η τελική ενεργή μορφή<sup>88</sup>.



**Εικόνα 21.** Βιογένεση του miRNA (Cong et al 2009)

### Μηχανισμός δράσης miRNAs

Τα miRNAs δρουν στα μόρια mRNA-στόχους ως ένας μετα-μεταγραφικός τρόπος γονιδιακής ρύθμισης. Θεωρούνται κατά κανόνα αρνητικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης, καθώς η δράση τους οδηγεί στην αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης μέσω δύο κύριων μηχανισμών:

1) Αποδόμηση του mRNA (mRNA degradation).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η διαδικασία της μεταγραφής οδηγεί στην δημιουργία του πρόδρομου mRNA (pre-mRNA) – το οποίο περιέχει την γενετική πληροφορία για την πρωτεΐνη που πρόκειται να συντεθεί αλλά δεν επαρκεί από μόνο του για την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης. Για την ωρίμανση του πρόδρομου mRNA σε ώριμο mRNA απαιτούνται κάποιες απαραίτητες μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις: α) Ο σχηματισμός της καλύπτρας του mRNA, με την προσθήκη γουανινών στο 5'-άκρο οι οποίες ακολούθως μεθυλιώνονται, β) Η πολυαδενυλίωση, με την προσθήκη καταλοίπων αδενίνης στο 3'-αμετάφραστο άκρο, και γ) Το μάτισμα, με την

αφαίρεση των εσονίων και την συρραφή των εξονίων μεταξύ τους. Το miRNA δρα σε αυτό το στάδιο της μετα-μεταγραφικής τροποποίησης αφαιρώντας είτε την καλύπτρα στο 5'-άκρο είτε τα κατάλοιπα αδενίνης στο 3'-άκρο, και οδηγώντας έτσι το pre-mRNA σε αποδόμηση. Η αποδόμηση του mRNA είναι αποτέλεσμα πλήρους συμπληρωματικότητας μεταξύ της αλληλουχίας του miRNA και του mRNA-στόχου<sup>88</sup>.

## 2) Καταστολή της μετάφρασης του mRNA (translational repression)

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η διαδικασία της μετάφρασης περιλαμβάνει την σύνδεση του ώριμου mRNA στο ριβόσωμα, όπου σχηματίζεται το σύμπλοκο έναρξης ανάμεσα στην 5'-θέση καλύπτρας του mRNA, τη μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος και τους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης. Ακολούθως, η μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος ενώνεται με το σύμπλοκο έναρξης και ξεκινάει την σύνθεση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, η οποία επιμηκύνεται με τη δράση παραγόντων επιμήκυνσης, και τερματίζεται με την δράση του παράγοντα απελευθέρωσης όταν το ριβόσωμα φτάσει στο κωδικόνιο λήξης. Το miRNA δρα σ' αυτό το στάδιο με ποικίλους μηχανισμούς: α) Δεν επιτρέπει στον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4E να συνδεθεί στην 5'-καλύπτρα ώστε να σχηματιστεί το σύμπλοκο έναρξης, οπότε η μετάφραση δεν ξεκινά, β) Δεν επιτρέπει στη μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος να συνδεθεί στο σύμπλοκο έναρξης, οπότε η μετάφραση σταματά, γ) Αλληλεπιδρά με τους παράγοντες επιμήκυνσης της μετάφρασης, οπότε η πρωτεϊνοσύνθεση τερματίζεται πρόωρα. Η καταστολή της μετάφρασης του mRNA είναι αποτέλεσμα μερικής συμπληρωματικότητας μεταξύ της αλληλουχίας του miRNA και του mRNA-στόχου. Ένα miRNA μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση περισσότερου του ενός γονιδίων, και η έκφραση ενός γονιδίου μπορεί να ρυθμίζεται από περισσότερα του ενός miRNA<sup>88</sup>.

## Κλινικές εφαρμογές

Δεν έχουν περάσει πολλά χρόνια από την ανακάλυψη του πρώτου miRNA, αλλά αυτό το διάστημα ήταν αρκετό για να αναδειχθεί τον ρόλο των miRNAs ως αναπόσπαστο λειτουργικό τμήμα του κυττάρου τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις<sup>89</sup>. Συγκεκριμένα στον χώρο της ογκολογίας, τα miRNAs έχουν αναδειχθεί ως βασικοί συντελεστές στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Η δυσλειτουργία των miRNAs δρα ως ορόσημο του καρκίνου με ποικίλους μηχανισμούς, που συμπεριλαμβάνουν την επαγωγή του ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της αγγειογένεσης, την αντίσταση στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, και την ενεργοποίηση της διήθησης και μετάστασης<sup>90</sup>. Το γεγονός ότι τα miRNAs

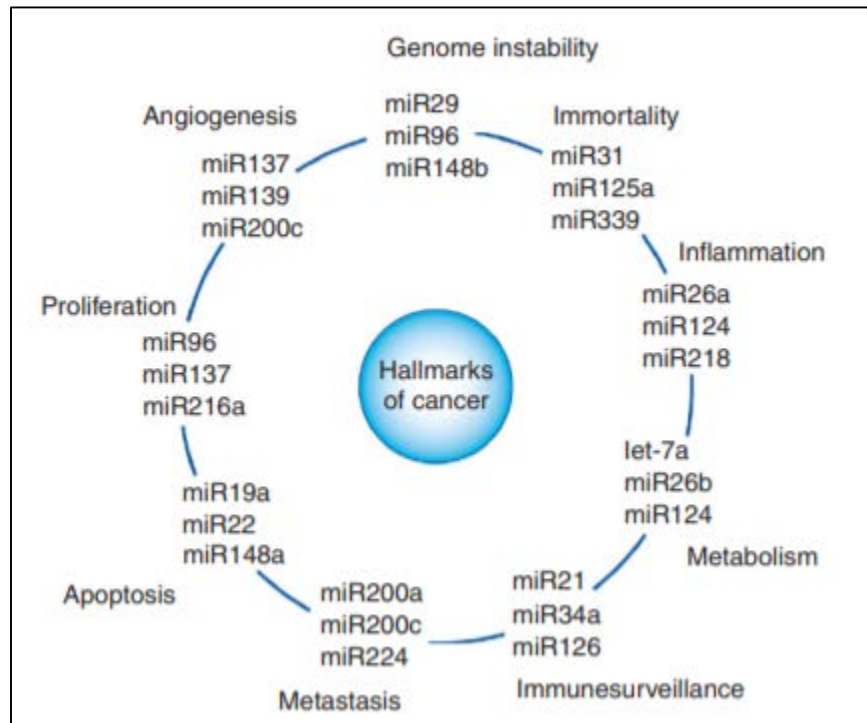


εμφανίζουν διαφορετική έκφραση ανάμεσα σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα, καθώς και ανάμεσα σε διαφορετικούς καρκινικούς τύπους, καθώς και η δυνατότητα ανίχνευσής τους στη κυκλοφορία, τους προσδίδει μια δυναμική χρήση ως βιοδείκτες διαφόρων τύπων καρκίνου<sup>91</sup>. Επίσης, καθώς τα miRNAs μπορούν να δράσουν και ως ογκοκατασταλτικά ανάλογα με τον στόχο τους, υπάρχει η δυνατότητα χρήσης τους ως αντικαρκινικές ουσίες<sup>92</sup>.

Αν και φάρμακα που βασίζονται σε miRNAs δεν έχουν ακόμα εγκριθεί για κλινική χρήση εντός ή εκτός ογκολογίας, ο κλάδος παραμένει πολλά υποσχόμενος, με πολλές ουσίες σε πειραματικό στάδιο σε κλινικές μελέτες<sup>92</sup>. Τα καλύτερα δεδομένα που υπάρχουν αυτή την στιγμή, έως και την συγγραφή της παρούσας εργασίας, αφορούν την ουσία ABX464 που βασίζεται στην επαγωγή του αντι-φλεγμονώδους miR-124 στην θεραπευτική της ελκώδους κολίτιδας<sup>93</sup>, και την ουσία Miravirsen που βασίζεται στην καταστολή του miR-122 στην θεραπευτική της χρόνιας ηπατίτιδας C<sup>94</sup>. Σημειώνεται επίσης ότι η φαρμακευτική χρήση της παρεμβολής του RNA, αν και στοχεύει διαφορετικό μηχανισμό, έχει οδηγήσει σε φάρμακο που έχει εγκριθεί για κλινική χρήση – πρόκειται για το patirisan (brand name Onpattro), το οποίο βασίζεται στον μηχανισμό των siRNA και έχει δείξει κλινική αποτελεσματικότητα σε ασθενείς με κληρονομική αμυλοείδωση που προκαλείται από τρανσθυρετίνη<sup>95</sup>.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – miRNAs ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Τα miRNAs διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην καρκινογένεση. Συμμετέχουν σε κάθε μία από τις διαδικασίες που έχουν αναγνωριστεί ως ορόσημα του καρκίνου (Εικόνα 22). Το κάθε miRNA αναγνωρίζει και στοχεύει το δικό του μόριο-στόχο, αλλά μπορεί να εμπλέκεται σε παραπάνω από ένα μοριακό μονοπάτι – επιπλέον, τα μονοπάτια αυτά αλληλοεπιδρούν, προσδίδοντας επιπρόσθετη πολυπλοκότητα στο σύστημα αυτό.



Εικόνα 22. Συσχέτιση μεταξύ miRNAs και των οροσήμων του καρκίνου (Pichler et al 2015)<sup>96</sup>

Μία από τις διαδικασίες η οποία έχει αποκτήσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον είναι η επίδραση των miRNAs στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Ήδη από την πρωταρχική ανακάλυψη των let-7 και lin-4 miRNAs στο *C.elegans* είχε αναδειχθεί ότι τα miRNAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση των διαφόρων μοριακών μηχανισμών που σχετίζονται με την εμβρυική ανάπτυξη και τη λειτουργία των βλαστοκυττάρων στα θηλαστικά<sup>97</sup>. Ακολούθησαν μελέτες οι οποίες ανέδειξαν την απαραίτητη θέση των miRNAs στην διατήρηση του πληθυσμού των βλαστοκυττάρων στην εμβρυογένεση, όπως των Bernstein et al, οι οποίοι παρενέβησαν στο γονίδιο της Dicer1, μιας νουκλεάσης που σχετίζεται με τη δράση των miRNAs, σε πειραματόζωα (ποντίκια) και παρατήρησαν ότι το αποτέλεσμα ήταν ο πρόωμος θάνατος των ποντικών του

πειράματος νωρίς στην εμβρυική ζωή τους. Στο πείραμα αυτό δημιουργήθηκαν χιμερικά ποντίκια που έφεραν το ανενεργό μεταλλαγμένο αλληλίο της Dicer1 τα οποία διασταυρώθηκαν – κανένας από τους απογόνους δεν ήταν ομόζυγος στο μεταλλαγμένο αλληλίο, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα ποντίκια που στερούνται Dicer1 δεν μπορούν να επιβιώσουν. Ακολούθως, έγιναν χρονικά υπολογισμένες διασταυρώσεις με σκοπό να εξακριβωθεί το ακριβές αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο είναι απαραίτητη η Dicer 1, όπου φάνηκε ότι η ανάπτυξη των μεταλλαγμένων ποντικίων σταματά νωρίς στην εμβρυογένεση κατά τη διαδικασία της γαστριδίωσης<sup>98</sup>.

Τα καρκινικά και τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα έχουν πολλές ομοιότητες, και τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα χρησιμοποιούν κοινούς μηχανισμούς με τα φυσιολογικά, με αποτέλεσμα όμως την υπέρμετρη (αντί για ελεγχόμενη) παραγωγή καρκινικών (αντί για φυσιολογικών) κυττάρων (Κεφάλαιο 2). Συνεπώς ήταν λογική η υπόθεση ότι τα miRNAs συμμετέχουν και στη λειτουργία των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, και υπάρχει πλέον πληθώρα ερευνητικών δεδομένων που αναδεικνύουν την πολύπλευρη δράση των miRNAs στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα πολλών ειδών καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού<sup>99</sup>.

Η επίδραση αυτή μπορεί να συνοψιστεί σε τρεις πυλώνες:

- α) miRNAs με ογκοκατασταλτική δράση
- β) miRNAs με ογκογόνο δράση
- γ) miRNAs εμπλεκόμενα σε EMT-miR stemness και αντίσταση στη θεραπεία

#### **4.1. miRNAs με ογκοκατασταλτική δράση**

Τα miRNAs μπορούν να δράσουν ως ογκοκατασταλτικά αναστέλλοντας την λειτουργικότητα των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Η δράση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη ικανότητα αυτοανανεώσης ή/και διαφοροποίησης των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Η αναστολή της λειτουργίας των καρκινικών βλαστικών κυττάρων επάγεται από διάφορους μηχανισμούς, όπως η επιλεκτική καταστολή των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην καρκινογένεση (Ενότητα 2.4), η καταστολή μεταγραφικών παραγόντων ή άλλων μορίων διακριτών για ξεχωριστά miRNA.

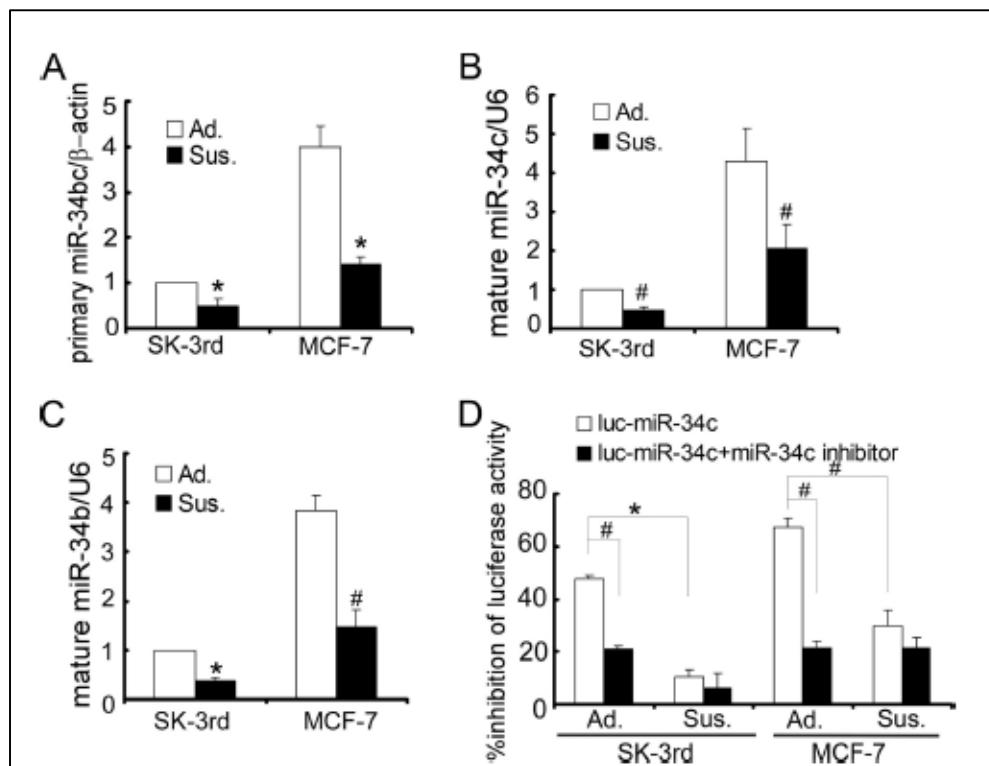
Υπάρχει μεγάλος αριθμός miRNAs τα οποία έχουν συσχετιστεί με ογκοκατασταλτικό ρόλο και τα οποία φαίνονται στον Πίνακα 3.

miRNA	ΑΝΑΦΟΡΕΣ
miR-let7	[ <sup>100</sup> ] , [ <sup>101</sup> ]
miR-7	[ <sup>102</sup> ] , [ <sup>103</sup> ]
miR-16	[ <sup>104</sup> ]
miR -21	[ <sup>105</sup> ]
miR-30	[ <sup>106</sup> ] , [ <sup>107</sup> ] , [ <sup>108</sup> ]
miR-34	[ <sup>109</sup> ] , [ <sup>110</sup> ] , [ <sup>111</sup> ] , [ <sup>112</sup> ] , [ <sup>113</sup> ]
miR-93	[ <sup>114</sup> ] , [ <sup>115</sup> ] , [ <sup>116</sup> ]
miR-99a	[ <sup>117</sup> ]
miR-128	[ <sup>118</sup> ]
miR-130-3p	[ <sup>119</sup> ]
miR-137	[ <sup>120</sup> ] , [ <sup>121</sup> ]
miR-140	[ <sup>122</sup> ]
miR-142-3p	[ <sup>123</sup> ]
miR-200	[ <sup>124</sup> ] , [ <sup>125</sup> ]
miR-205	[ <sup>126</sup> ] , [ <sup>127</sup> ]
miR-375	[ <sup>128</sup> ]
miR-519d	[ <sup>129</sup> ]
miR-590-5p	[ <sup>130</sup> ]
miR-600	[ <sup>131</sup> ]
miR-628	[ <sup>132</sup> ]
miR-1287-5p	[ <sup>133</sup> ]
miR-4319	[ <sup>134</sup> ]

**Πίνακας 3.** Ογκοκατασταλτικά miRNAs

Από τα πιο κατά μελετημένα miRNA είναι η οικογένεια των **miR-34**. Οι Yu et al (2011) μελέτησαν την έκφραση του miR-34c στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα καρκίνου του μαστού.<sup>109</sup>. Αρχικά, έδειξαν ότι ή έκφραση καθώς και η λειτουργικότητά του είναι μειωμένες στα καρκινικά

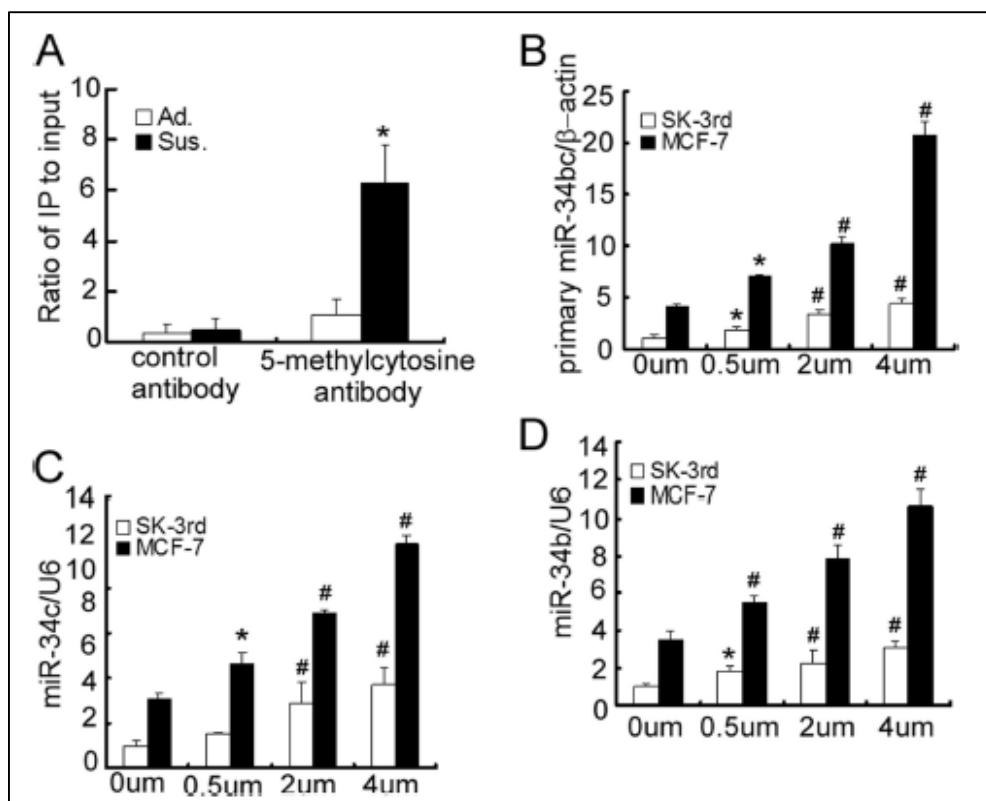
βλαστικά κύτταρα συγκριτικά με τα διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα του μαστού (Εικόνα 23).



**Εικόνα 23.** Η έκφραση του miR-34c είναι μειωμένη στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα του μαστού (Yu et al 2011)

Στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα του μαστού (Sus) συγκριτικά με τα διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα του μαστού (Ad), ανευρίσκεται μειωμένη έκφραση τόσο του πρωτογενούς (A) όσο και του ώριμου (B,C) miR-34, καθώς και μειωμένη λειτουργικότητά του (D)

Ακολούθως, διερεύνησαν τον αιτιολογικό μηχανισμό και έδειξαν ότι η μειωμένη έκφραση είναι αποτέλεσμα επιγενετικής αποσιώπησής του μέσω υπερμεθυλίωσης. Αυτό φάνηκε με την σύγκριση της κατάστασης μεθυλίωσης του υποκινητή του miR-34 στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα και στα διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα – οι γειτονικές CpG νησίδες του miR-34c βρέθηκαν υπερμεθυλιωμένες στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα αλλά όχι στα διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα (Εικόνα 24A). Το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε με την χορήγηση του DAC, ενός επαγωγέα απομεθυλίωσης, σε προοδευτικά αυξημένες συγκεντρώσεις, γεγονός που είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του miR-34c σε ρυθμό ανάλογο με την αύξηση της συγκέντρωσης του DAC (Εικόνα 24 B-D).

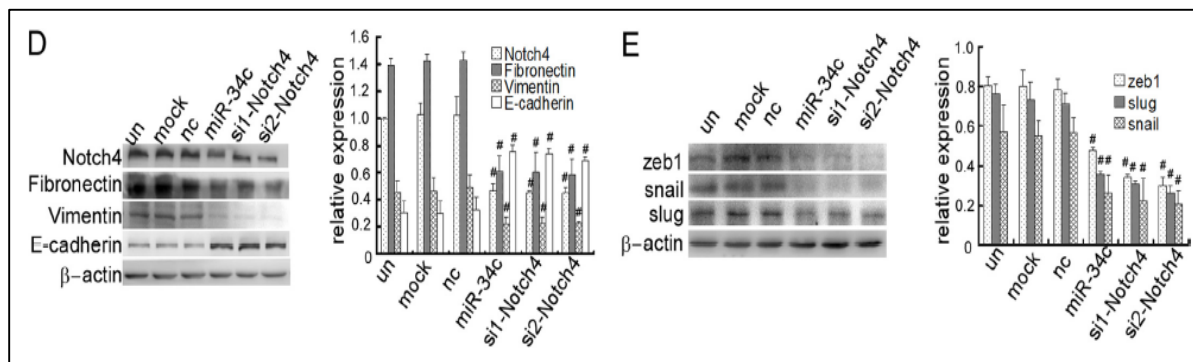


**Εικόνα 24.** Η μείωση του miR-34c στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα του μαστού σχετίζεται με την υπερμεθυλίωση της γειτονικής CpG νησίδας (Yu et al 2011)

(A) Υπερμεθυλίωση της CpG νησίδας στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (Sus) συγκριτικά με τα διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα (Ad).

(B-D) Δοσοεξαρτώμενη αύξηση της έκφρασης του miR-34c με την χορήγηση DAC

Μελετήθηκαν επίσης δείκτες επιθηλιακού και μεσεγχυματικού φαινοτύπου, όπου φάνηκε ότι η μειωμένη έκφραση του miR-34 οδηγεί σε επαγωγή της EMT (Επιθηλιακή προς Μεσεγχυματική Μετάβαση) και αυξημένη ικανότητα αυτοανανέωσης των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Αντιστρόφως, η επαναφορά της έκφρασης του miR-34c οδηγεί στην καταστολή της EMT και της ικανότητας των καρκινικών βλαστικών κυττάρων για αυτοανανέωση και μετανάστευση. Η χρήση μιμητών miR-34c και Notch4 siRNA (ενός γονιδίου-στόχου του miR-34) είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση του επιθηλιακού δείκτη E-cadherin και μειωμένη έκφραση των μεσεγχυματικών δεικτών fibronectin και vimentin, καθώς και την μειωμένη έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων snail, slug, και zeb1 που συμμετέχουν στην διαδικασία της EMT (Εικόνα 25)<sup>109</sup>.

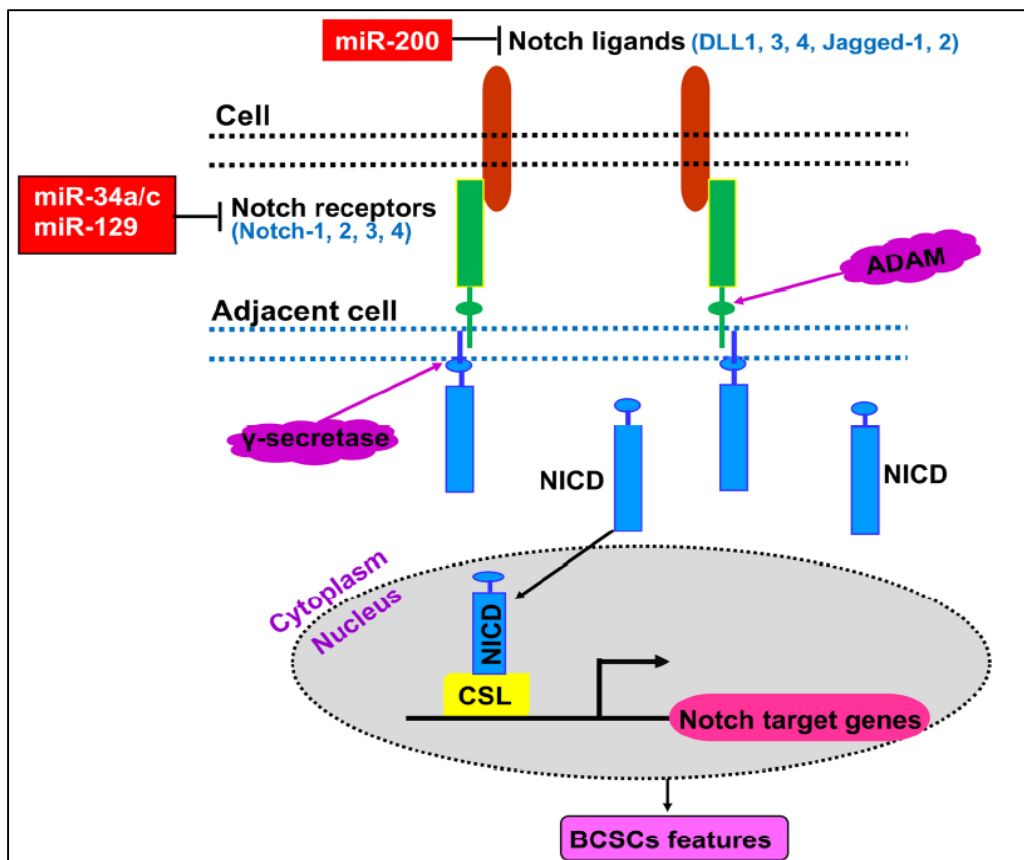


**Εικόνα 25.** Η επαγωγή του miR-34c σχετίζεται με αναστολή της EMT (Yu et al 2011)

(D) Αυξημένη έκφραση της E-cadherin και μειωμένη έκφραση των fibronectin, vimentin

(E) Μειωμένη έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων zeb1, snail, slug

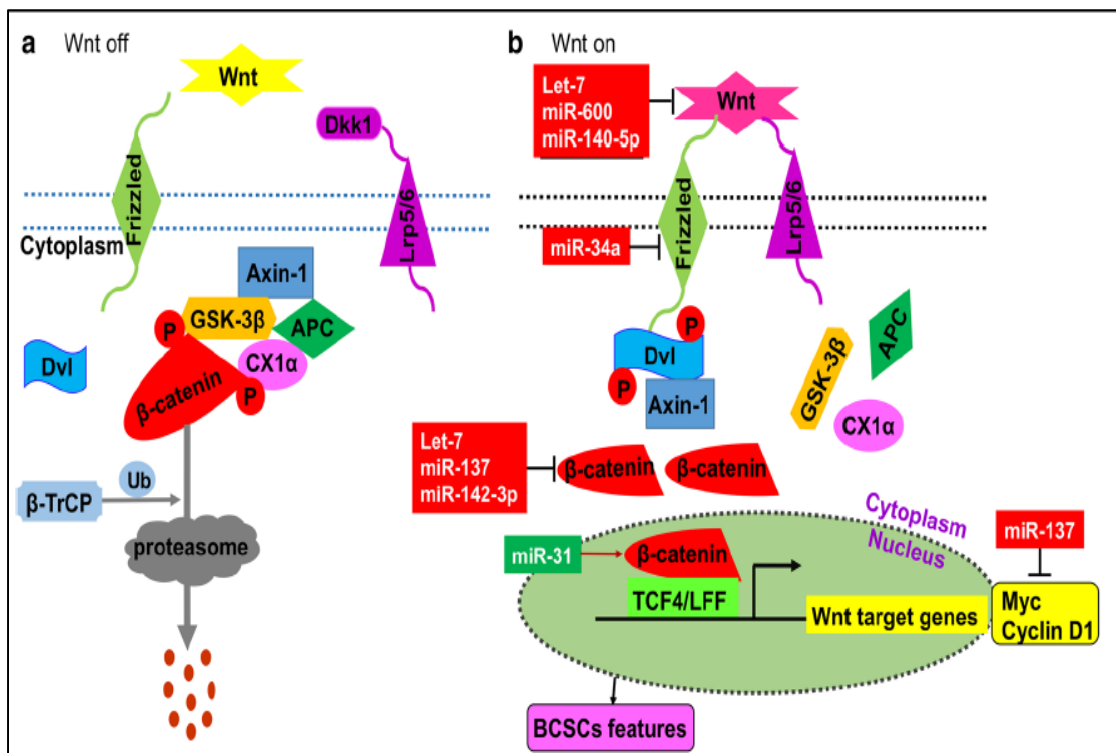
Οι Khang et al (2015) και Park et al (2014) έδειξαν ότι η έκφραση του miR-34a καταστέλλει τις ιδιότητες των καρκινικών βλαστικών κυττάρων αναστέλλοντας το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch1<sup>110,111</sup> (Εικόνα 23). Οι Bonetti et al (2018) ακολούθως ανέδειξαν έναν περαιτέρω μηχανισμό της κατασταλτικής δράσης του miR-34a, ως αναστολέα του σηματοδοτικού μονοπατιού της Wnt/b-katenin<sup>113</sup> (Εικόνα 23).



**Εικόνα 26.** Παρεμβολή των miRNAs στο μονοπάτι Notch (Niu et al 2021)

Στην Εικόνα 26 φαίνεται η παρεμβολή του miR-34 στο μονοπάτι Notch. Το miR-34 δρα με στόχο τον υποδοχέα Notch1, τον οποίο αναστέλλει, καταστέλλοντας το σηματοδοτικό μονοπάτι. Παρόμοιο μηχανισμό δράσης έχει και το miR-129, ενώ το miR-200 δρα στο ίδιο μονοπάτι σε διαφορετικό στόχο, ανταγωνιζόμενο τους Notch συνδέτες και κυρίως τον Jagged-1. Και αυτά τα δύο miRNAs έχουν ογκοκατασταλτική δράση.





Εικόνα 27. Παρεμβολή των miRNAs στο μονοπάτι Wnt/b-katenin (Niu et al 2021)

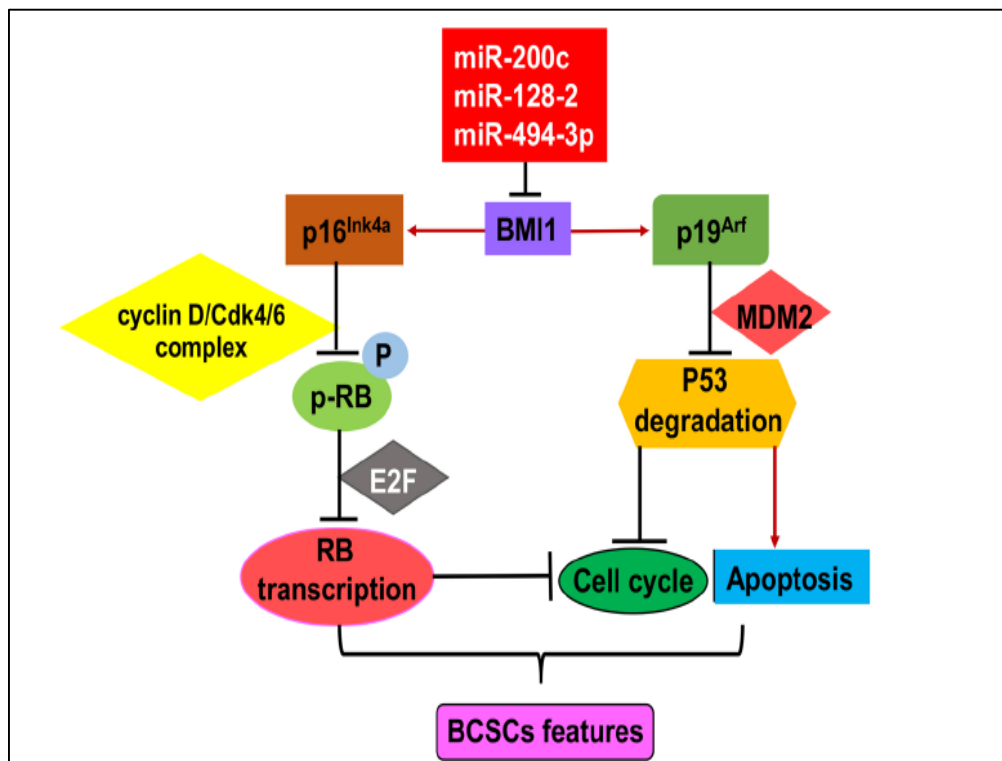
Στην Εικόνα 27 φαίνεται η παρεμβολή του miR-34 στο μονοπάτι Wnt/b-katenin. Το miR-34 δρα καταστέλλοντας τους υποδοχείς FZD (Frizzled), βασικούς ρυθμιστές του μονοπατιού, και κατά συνέπεια δεν επιτρέπει την σύνδεση του Wnt και την επαγωγή της σηματοδότησης. Στο ίδιο μονοπάτι δρουν και άλλα ογκοκατασταλτικά miRNAs, πολλά με περισσότερους από έναν στόχους: Το miR-142-3p, το οποίο στοχεύει την b-katenin, το miR-let-7, το οποίο στοχεύει την b-katenin καθώς και την Wnt γλυκοπρωτεΐνη, και το miR-137 το οποίο στοχεύει την b-katenin και επίσης τους downstream μεταγραφικούς παράγοντες όπως το c-Myc. Απεικονίζεται επίσης και το miR-31, το οποίο δρα ως ογκογόνο και θα αναφερθεί παρακάτω<sup>51</sup>.

Το miR-34 έχει μελετηθεί και ως δυνητικός θεραπευτικός στόχος (Ενότητα 4.5.)

Η οικογένεια του **miR-let7** έχει αναγνωριστεί ως βασικός ογκοκατασταλτικός μηχανισμός σε πολλούς καρκίνους. Συγκεκριμένα στον καρκίνο του μαστού, οι Yu et al (2007) έδειξαν ότι το miR-let7 δρα σε πολλαπλούς στόχους (HRAS, HMGA2) για να καταστείλει τις ιδιότητες των καρκινικών βλαστικών κυττάρων<sup>100</sup>. Η έκφρασή του είναι σημαντικά μειωμένη στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα, γεγονός που τους επιτρέπει να διατηρούν τις βλαστικές τους ιδιότητες, και η επαγωγή της έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη πολλαπλασιαστική ικανότητα και μειωμένο

μεταστατικό δυναμικό των βλαστικών κυττάρων. Παρόμοια δεδομένα παρουσιάστηκαν από τους Johnson et al (2005)<sup>135</sup> και Lee et al (2007)<sup>136</sup>. Οι Sun et al (2016) μελέτησαν τη δράση του miR-let7 στον ER-θετικό καρκίνο του μαστού, όπου φάνηκε ότι μπλοκάρει το σηματοδοτικό μονοπάτι της Wnt/b-katenin το οποίο έχει ενεργοποιηθεί από τους οιστρογονικούς υποδοχείς, οδηγώντας στην αναστολή της αυτοανανεωτικής ικανότητας των καρκινικών βλαστικών κυττάρων<sup>101</sup>. Η δράση του αυτή μπορεί να στοχευθεί θεραπευτικά, μια διαδικασία που θα εξετάσουμε περισσότερο στην Ενότητα 4.5.

Η οικογένεια των **miR-200** δρα επίσης κατασταλτικά στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα του μαστού στοχεύοντας πολλαπλούς στόχους. Δρα αναστέλλοντας το μονοπάτι Notch, στοχεύοντας τους Notch συνδέτες Jagged-1 (Εικόνα 26) καθώς και τους συν-ενεργοποιητές MamI2 και MamI3<sup>124</sup>. Όπως έδειξαν οι Shimono et al (2009) δρα επίσης στο μονοπάτι BMI1, αναστέλλοντας την ανάπτυξη των καρκινικών βλαστικών κυττάρων και την συνεπακόλουθη ογκογένεση, και επάγοντας κυτταρική διαφοροποίηση<sup>125</sup>. Επιπρόσθετα, έχει δραστηριότητα στην επαγωγή της EMT-miR βλαστικότητας και στην αντίσταση στη θεραπεία (Ενότητα 4.4.)



**Εικόνα 28.** Παρεμβολή των miRNAs στο μονοπάτι BMI1 (Niu et al 2021)

Στην Εικόνα 28 φαίνεται η παρεμβολή του miR-200c στο μονοπάτι BMI1. Το miR-200c δρα καταστέλλοντας την πρωτεΐνη BMI1, επαναφέροντας την λειτουργικότητα των INK4a και ARF

(οι οποίες δρουν σαν αναστολείς κυκλινοεξαρτώμενων κινασών) και σταματώντας τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στο ίδιο μονοπάτι με τον ίδιο στόχο δρουν και τα ογκοκατασταλτικά miRNAs miR-128-2 και miR-494-3p.

Το **miR-140** αναγνωρίστηκε από τους Wolfson et al (2014) ως βασικός ρυθμιστής των καρκινικών βλαστικών κυττάρων του μαστού<sup>122</sup>. Δρώντας κατασταλτικά στα μονοπάτια Wnt, SOX2 και SOX9, καταστέλλει τη σηματοδότηση στα βλαστικά κύτταρα και την καρκινογένεση, και η αποσιώπησή του οδηγεί σε πρόοδο της νόσου. Οι Li et al (2014) περιέγραψαν την απώλεια του miR-140 ως ένα ορόσημο του in situ καρκίνου (DCIS), δεδομένου του ότι οι σημαντικότεροι βλαστικοί παράγοντες στα βλαστικά κύτταρα του DCIS, το SOX9 και το ADLH1, είναι οι άμεσοι στόχοι του miR-140<sup>137</sup>. Οι Wu et al ακολούθως περιέγραψαν και κατασταλτική δράση του miR-140 στο μονοπάτι της Wnt/b-katenin<sup>138</sup>.

#### **4.2. miRNAs με ογκογόνο δράση (oncomiRs)**

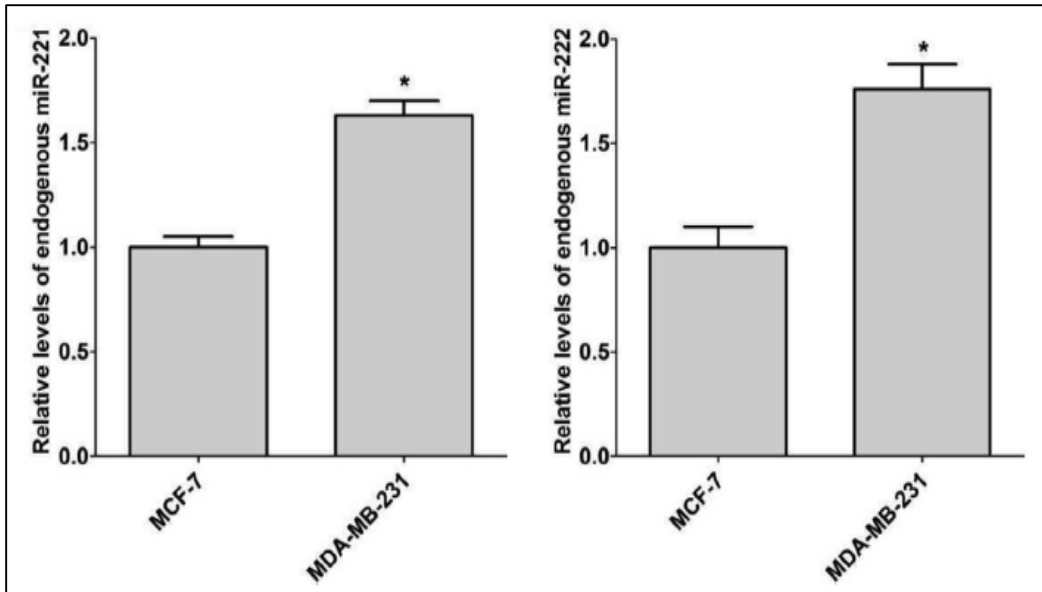
Τα miRNAs μπορούν επίσης να επάγουν την ογκογένεση, μέσω ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών, επαγωγής των βλαστικών χαρακτηριστικών (αυτοανανέωση, διαφοροποίηση) και διέγερσης των καρκινικών βλαστικών κυττάρων.

Ομοίως με τα ογκοκατασταλτικά miRNAs, υπάρχει πληθώρα miRNAs που έχουν χαρακτηριστεί ως onco-miRs. [Πίνακας 4].

<b>miRNA</b>	<b>ΑΝΑΦΟΡΕΣ</b>
miR-9	[ <sup>139</sup> ]
miR-10b	[ <sup>140</sup> ]
miR-22	[ <sup>141</sup> ]
miR-29a	[ <sup>142</sup> ]
miR-31	[ <sup>143</sup> ]
miR-93	[ <sup>144</sup> ]
miR-155	[ <sup>145</sup> ], [ <sup>146</sup> ]
miR-181	[ <sup>147</sup> ], [ <sup>148</sup> ]
miR-203	[ <sup>149</sup> ]
miR-205	[ <sup>150</sup> ]
miR-210	[ <sup>151</sup> ]
miR-221/222	[ <sup>152</sup> ], [ <sup>153</sup> ]

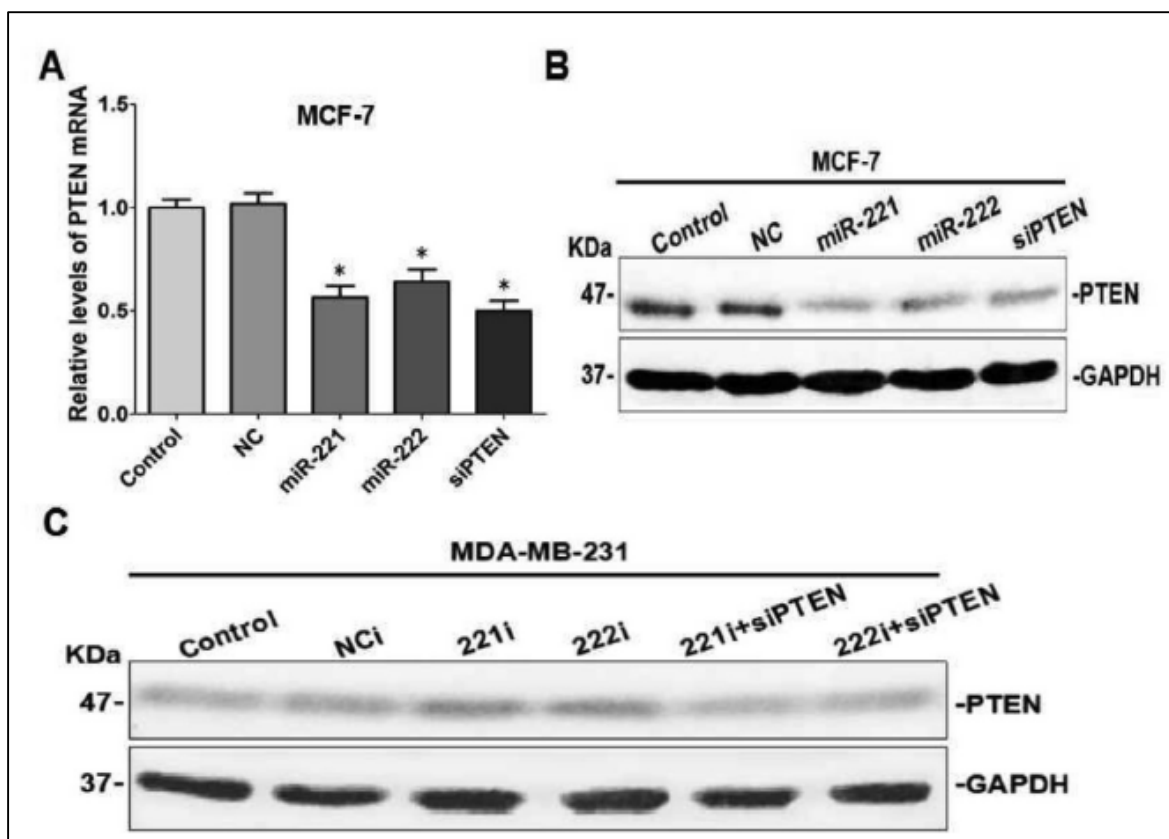
**Πίνακας 4.** miRNAs με ογκογόνο δράση

Το **miR-221** μελετήθηκε από τους Li et al (2017), οι οποίοι έδειξαν ότι έχει ογκογόνο δυναμικό και, όπως και το miR-222, αναστέλλει το ογκοκατασταλτικό γονίδιο PTEN και ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT/NF-kb/COX-2<sup>152</sup>. Για την μελέτη τους χρησιμοποίησαν δύο κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού, την MCF-7 και την MDA-MB-231, η δεύτερη εκ των οποίων χαρακτηρίζεται από επιθετικότερο φαινότυπο και αυξημένη παρουσία δεικτών EMT και καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Στην κυτταρική σειρά MDA-MB-231 ανευρέθη αυξημένη έκφραση τόσο του miR-221 όσο και του miR-222 σε σχέση με την MCF-7, υποδηλώνοντας ότι τα miRNA αυτά πιθανώς συμμετέχουν στην επιθετικότητα και βλαστικότητα των καρκινικών βλαστικών κυττάρων του μαστού (Εικόνα 29).



**Εικόνα 29.** Η έκφραση των miR-221/222 είναι αυξημένη στα κύτταρα MDA-MB-231 σε σχέση με τα MCF-7 (Li et al 2017)

Ακολούθως οι δύο αυτές κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκαν η μεν MCF-7 για knock-in πειράματα και η δε MDA-MB-231 για knock-down πειράματα. Αρχικά μελετήθηκε η συσχέτιση των miR-221/222 με το PTEN, όπου φάνηκε ότι η έκφρασή τους καταστέλλει την έκφραση του PTEN – καθώς η χρήση μιμητών των miR-221/222 κατέστειλε την έκφραση του PTEN στα κύτταρα MCF-7, και αντιστρόφως η χρήση αναστολέων των miR-221/222 επανέφερε την έκφραση του PTEN στα κύτταρα MDA-MB-31 (Εικόνα 30).

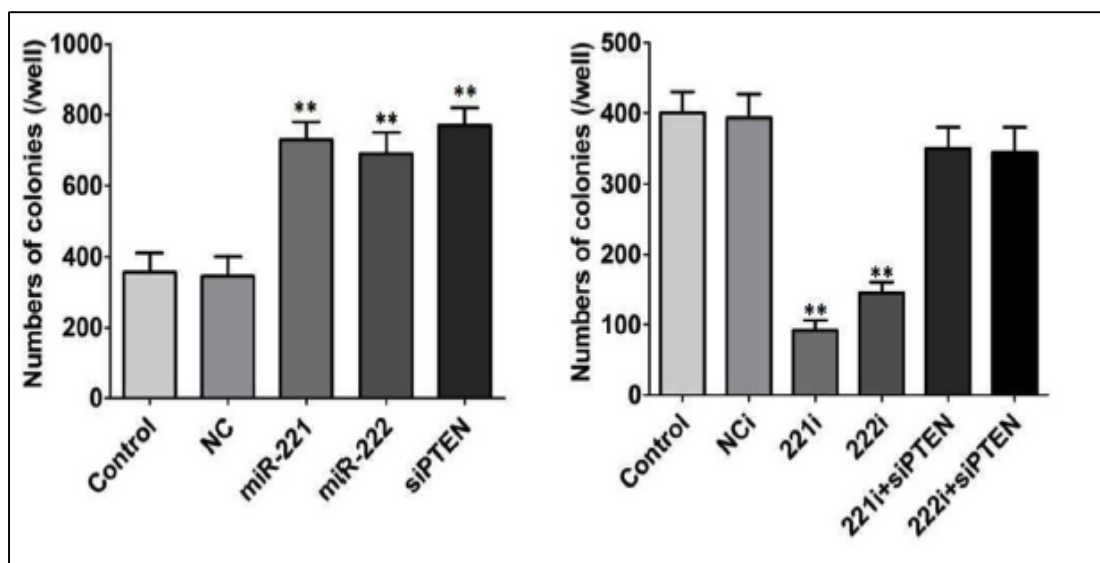


**Εικόνα 30.** Τα miR-221/222 καταστέλλουν την έκφραση του PTEN (Li et al 2017)

(A,B) Έκφραση του PTEN στα κύτταρα MCF-7 μετά την χρήση μιμητών miR-221/222 σε σχέση με την αρνητική (Control, NC) και τη θετική (siPTEN) ομάδα ελέγχου

(C) Έκφραση του PTEN στα κύτταρα MDA-MB-231 μετά την χρήση αναστολέων miR-221/222

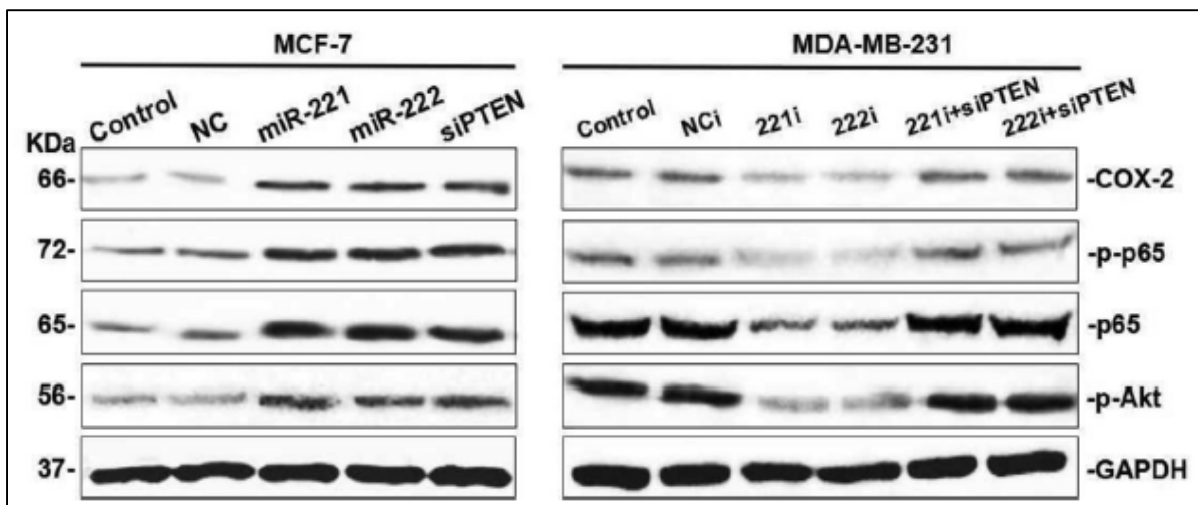
Η καταστολή του PTEN φάνηκε να επάγει αυξημένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 31), καθώς και αυξημένες αυτοανανεωτικές και διηθητικές ιδιότητες.



**Εικόνα 31.** Τα miR-221/222 επάγουν αυξημένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων μέσω της καταστολής του PTEN (Li et al 2017)

(Αριστερά) Αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός στα κύτταρα MCF-7 μετά την χρήση miR-221/222 (Δεξιά) Μειωμένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός στα κύτταρα MDA-MB-231 μετά την καταστολή miR-221/222

Επιπρόσθετα, προκειμένου να μελετηθεί ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τα miR-221/222 δρουν μέσω του PTEN για να επάγουν καρκινογένεση, μελετήθηκαν τα επίπεδα των p-AKT, p65, p-p65 και COX-2, τα οποία βρέθηκαν αυξημένα παρουσία των miR-221/222, και μειωμένα απουσία αυτών (Εικόνα 32), αναδεικνύοντας τον ρόλο των miR-221/222 στο σηματοδοτικό μονοπάτι AKT/NF-κB/COX-2<sup>152</sup>.



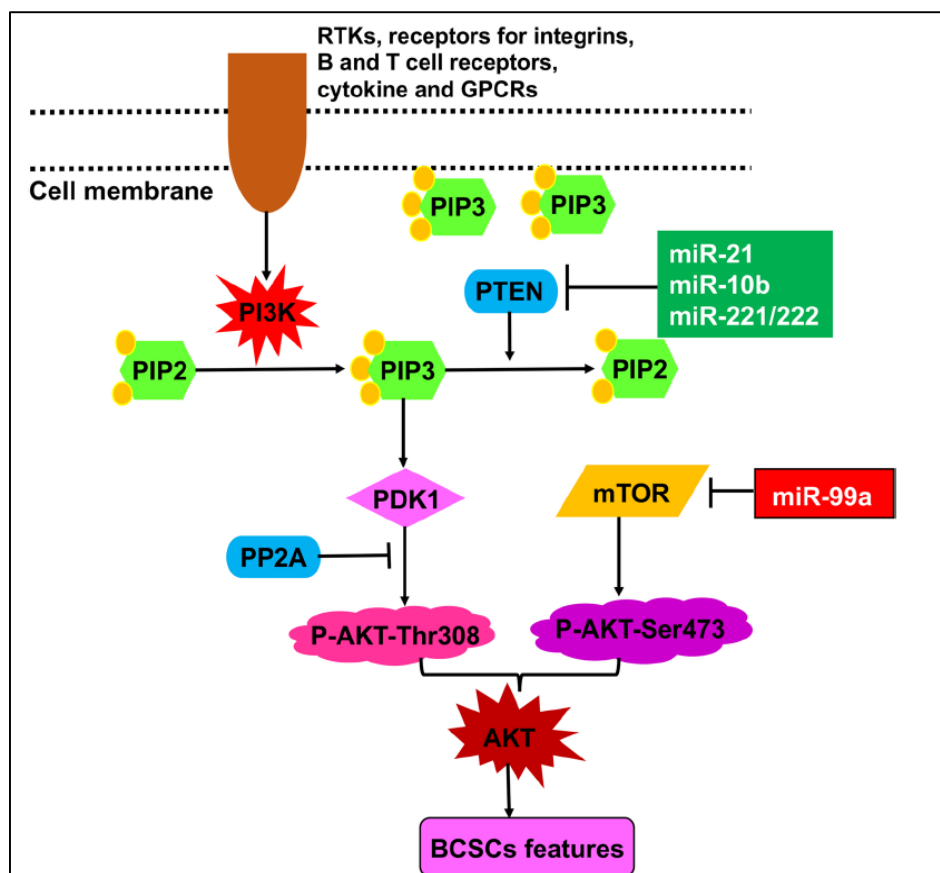
**Εικόνα 32.** Τα miR-221/222 επάγουν την φωσφορυλίωση της Akt και ενεργοποίηση των NF-κB και COX-2 (Li et al 2017)

(AP) Gain-of-function πείραμα στα κύτταρα MCF-7

(ΔΕ) Loss-of-function πείραμα στα κύτταρα MDA-MB-231

Οι Cheng et al (2018) ακολούθως έδειξαν ότι η έκφρασή του miR-221 (όπως και του miR-9) σχετίζεται με επαγωγή μεσεγχυματικού βλαστικού δυναμικού στα καρκινικά κύτταρα του καρκίνου του μαστού, ενώ αντίστοιχα η καταστολή τους σχετίζεται με μειωμένο αριθμό βλαστικών κυττάρων και μειωμένη ικανότητα αυτοανανέωσης, διήθησης και μετανάστευσης<sup>153</sup>.





Εικόνα 33. Παρεμβολή των miRNAs στο μονοπάτι PI3K/AKT (Niu et al 2021)

Στην Εικόνα 33 φαίνεται η παρεμβολή των miR-221 και miR-222 στο μονοπάτι της PI3K. Τα miRs αυτά δρουν αναστέλλοντας το PTEN, το οποίο είναι ένας από τους βασικούς ανασταλτικούς μηχανισμούς της σηματοδότησης μέσω του μονοπατιού PI3K/AKT. Με τον ίδιο μηχανισμό δρουν και τα miR-21 και miR-10b, τα οποία επίσης θεωρούνται oncomiRs. Απεικονίζεται και το miR-99a, το οποίο δρα στο ίδιο μονοπάτι αλλά ως ογκοκατασταλτικό, καταστέλλοντας την έκφραση του mTOR<sup>51</sup>.

Το **miR-155** έχει ογκογόνο δράση, στοχεύοντας και αδρανοποιώντας το ογκοκατασταλτικό γονίδιο SOCS1<sup>145</sup>. Η υπερέκφραση του miR-155 επάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων και την ογκογένεση, διαμέσου της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού JAK/STAT. Οι ίδιοι ερευνητές έδειξαν ότι η δράση των φλεγμονωδών κυτταροκινών IFN $\gamma$  και IL-6 στα καρκινικά κύτταρα του μαστού διεγείρει την έκφραση του miR-155, υποδεικνύοντας μια πιθανή συσχέτιση μεταξύ φλεγμονής και καρκίνου. Παρόμοια ευρήματα παρουσιάστηκαν από τους Zuo et al (2018), οι οποίοι έδειξαν ότι το miR-155 είναι αυξημένο στα

καρκινικά κύτταρα του μαστού και ότι η υπερέκφρασή του σχετίζεται με αύξηση των βλαστικών χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων<sup>146</sup>. Μελέτησαν επίσης και τις θεραπευτικές προεκτάσεις αυτών των ευρημάτων, τις οποίες θα εξετάσουμε στην Ενότητα 4.5.

Το **miR-31** αναγνωρίστηκε ως ένας βασικός ρυθμιστής της καρκινογένεσης του καρκίνου του μαστού από τους Cong et al (2017), οι οποίοι έδειξαν ότι η έκφρασή του σχετίζεται με πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και αύξηση των βλαστικών χαρακτηριστικών τους<sup>143</sup>. Η δράση αυτή επάγεται μέσω πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών, των TGFb, pRl/Stat5, και ιδιαίτερα της Wnt/b-katenin, το οποίο ενεργοποιεί μέσω καταστολής των ανταγωνιστών του (Εικόνα 25).

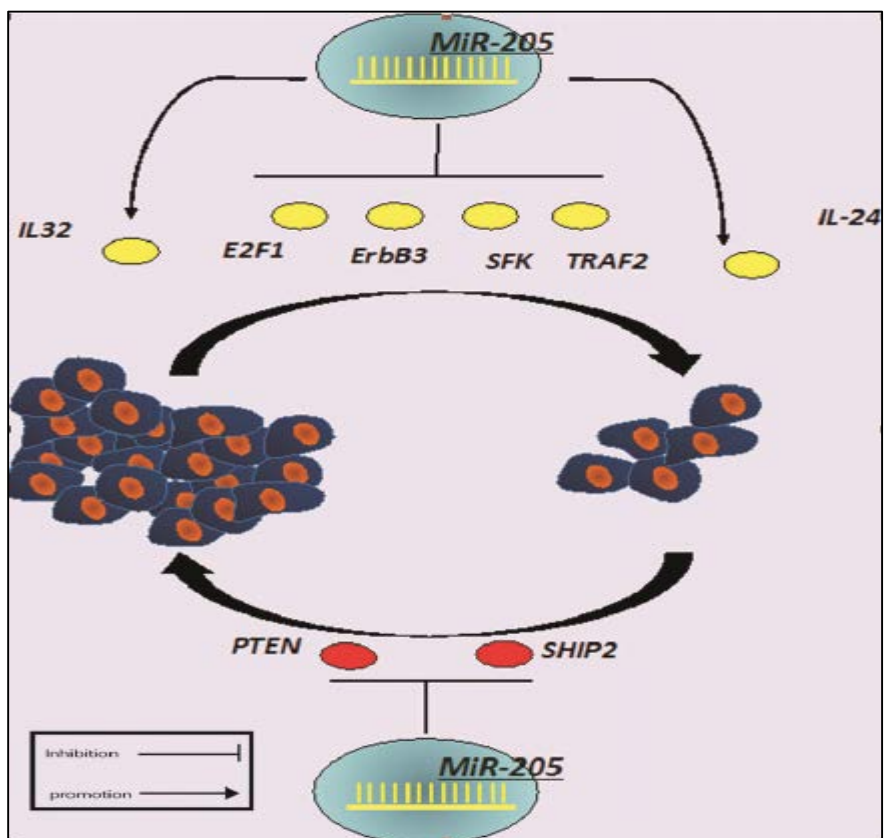
### **4.3. miRNAs με αμφίροπη δράση**

Η δράση των miRNAs δεν είναι απαραίτητα διακριτή. Είναι δυνατόν το ίδιο miRNA να δρα είτε ως ογκοκατασταλτικό είτε ως ογκογόνο. Οι ακριβείς παράγοντες που οδηγούν το ίδιο miRNA να εμφανίζει διαφορετικές ιδιότητες δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί, αλλά φαίνεται να σχετίζονται με το είδος των καρκινικών κυττάρων και τα εμπλεκόμενα γονίδια-στόχους<sup>150</sup>.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα το **miR-205**<sup>150</sup>. Το miR-205 έχει αναδειχθεί ως ογκοκατασταλτικό στα καρκινικά κύτταρα του μαστού από τις μελέτες των Wu et al (2009), όπου φάνηκε ότι α) αναστέλλει την έκφραση του ErbB3 και συνεπώς τον σχηματισμό του ογκογενετικού ετεροδιμερούς ErbB2/ErbB3, αναστέλλοντας τον υπέρμετρο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και β) αναστέλλει την έκφραση του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF-A, αναστέλλοντας την διηθητικότητα των καρκινικών κυττάρων<sup>126</sup>. Ανάλογες μελέτες έδειξαν ότι το ίδιο το ErbB2 δρα κατασταλτικά στην έκφραση του miR-205, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των κυκλινών και κυκλινοεξαρτώμενων κινασών που αποτελούν ορόσημο στην καρκινογένεση<sup>154</sup>. Η έκφραση του miR-205 βρέθηκε κατεσταλμένη σε κύτταρα από τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού<sup>155</sup>, γεγονός που επίσης υποδηλώνει τον ογκοκατασταλτικό ρόλο του. Ο ογκοκατασταλτικός αυτός ρόλος έχει αποδειχτεί και σε άλλους καρκίνους, όπως το μελάνωμα<sup>156</sup>, ο καρκίνος του προστάτη<sup>157</sup> και ο καρκίνος του νεφρού<sup>158</sup>.

Ωστόσο, το ίδιο miRNA έχει αποδεδειγμένα και ογκογονικές ιδιότητες. Οι Karaayvaz et al (2012) έδειξαν ότι η υπερέκφραση του miR-205 σχετίζεται με μειωμένη ολική επιβίωση στον καρκίνο του ενδομητρίου, γεγονός που οφείλεται στην ανασταλτική του δράση στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο PTEN και την συνεπακόλουθη επαγωγή ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού<sup>159</sup>.

Αντίστοιχος μηχανισμός υπάρχει και στον καρκίνο του ρινοφάρυγγα, όπου φαίνεται ότι το miR-205, μέσω της στόχευσης του PTEN, αναστέλλει τους αντι-αποπτωτικούς μηχανισμούς της ακτινοθεραπείας και συμβάλλει στην ανθεκτικότητα των όγκων στην ακτινοθεραπεία<sup>160</sup>.



Εικόνα 34. Η διτή δράση του miR-205 (Qin et al 2013)

Η δυνητική διτή δράση των miRNAs δεν σχετίζεται μόνο με το είδος των καρκινικών κυττάρων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα το **miR-93**, το οποίο στα καρκινικά κύτταρα του μαστού έχει τόσο ογκοκατασταλτική όσο και ογκογονική δράση. Το miR-93 είναι ένα miRNA που παραδοσιακά έχει συσχετιστεί με την ογκογένεση. Βρίσκεται αυξημένο σε πολλούς καρκίνους<sup>161</sup>, όπως στο τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, όπου έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση<sup>144</sup>. Η οικογένεια των miR-106b-25 (στην οποία ανήκει το miR-93) φάνηκε ότι επάγει καρκινογένεση μέσω της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού NOTCH1<sup>162</sup>.

Ωστόσο, υπάρχουν ερευνητικά δεδομένα που δείχνουν ότι το miR-93 έχει επίσης ογκοκατασταλτική δράση. Οι Liu et al (2012) έδειξαν ότι το miR-93 καταστέλλει τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα του μαστού, επιδρώντας κατασταλτικά σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το JAK/STAT, AKT3, SOX4, EZH1, και HMGA2<sup>114</sup>. Οι Shyamasundar et al (2016) έδειξαν

ότι στον τριπλά αρνητικά καρκίνο του μαστού, το miR-93 εμφανίζει και ογκοκατασταλτικό ρόλο, αναστέλλοντας την κινάση WNK1 και μειώνοντας το διηθητικό και μεταναστευτικό δυναμικό των κυττάρων<sup>115</sup>. Επιπρόσθετα δεδομένα παρουσιάστηκαν από τους Chang Bao et al (2020), όπου περιγράφηκε η ανασταλτική δράση του miR-93 στα ογκογονίδια E2F1 και CCND1<sup>116</sup>.

Ο ακριβής μηχανισμός που οδηγεί το ίδιο miRNA να εμφανίσει διαφορετικές ιδιότητες στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα δεν έχει εξακριβωθεί ακόμη.

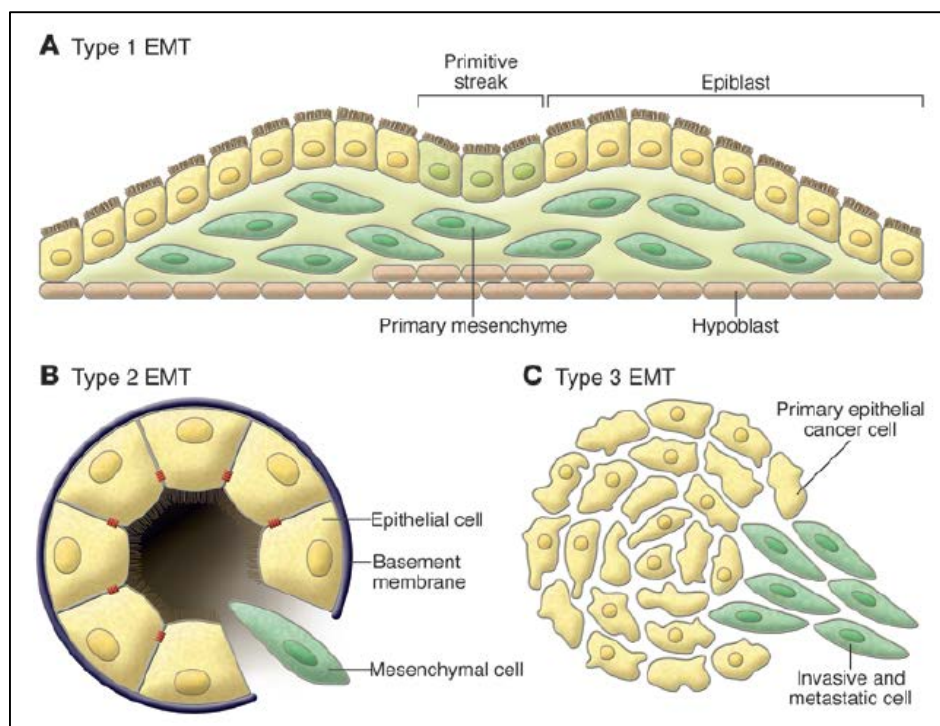
#### **4.4.EMT-miR stemness και αντίσταση στη θεραπεία**

##### **EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition)**

Η EMT είναι η Επιθηλιακή προς Μεσεγγυματική Μετάβαση, και ορίζεται ως η αλλαγή του φαινοτύπου των επιθηλιακών κυττάρων προς μεσεγγυματικού τύπου κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά έχουν ιδιότητες βλαστικών κυττάρων, με ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης, και δρουν ως πολυδύναμα κύτταρα που μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους.

Αν και είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιούν κατά κόρον τα καρκινικά κύτταρα, δεν αφορά μόνο αυτά. Για την ακρίβεια, η EMT είναι μια φυσιολογική διαδικασία, απαραίτητη για διάφορες αναπτυξιακές διαδικασίες. Διακρίνονται 3 τύποι EMT (Εικόνα 35)<sup>163</sup>:

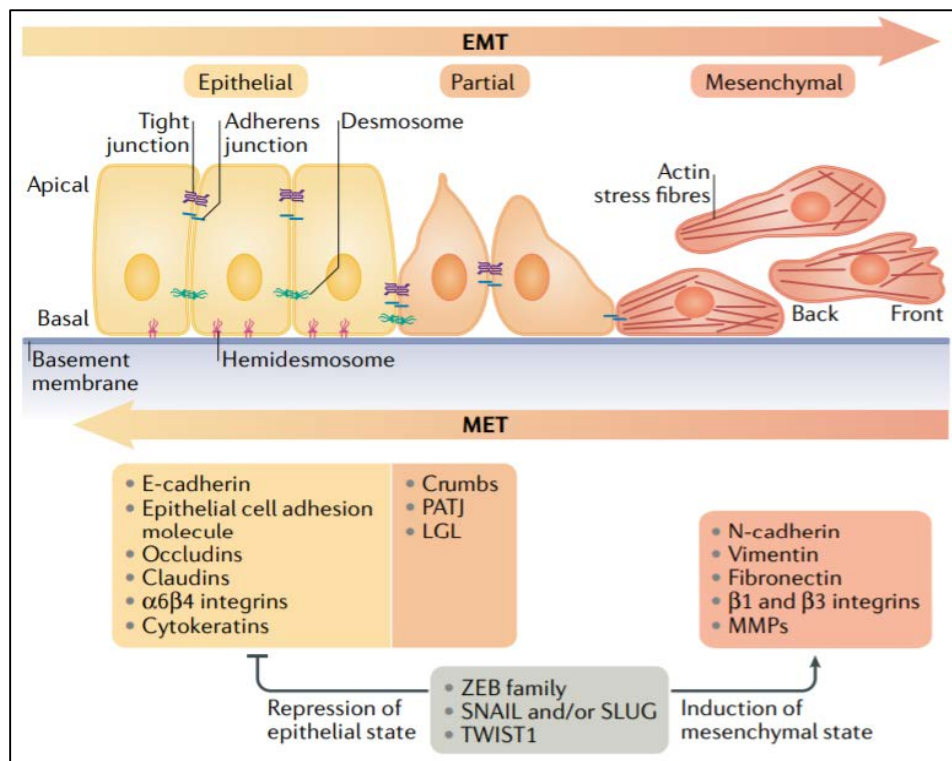
- Τύπου I → συμμετέχει στην εμβρυογένεση / οργανογένεση
- Τύπου II → συμμετέχει στην επούλωση των ιστών και στην ίνωση
- Τύπου III → συμμετέχει στην καρκινογένεση.



**Εικόνα 35.** Τύποι EMT (Kalluri & Weinberg 2009)

Όσον αφορά την καρκινογένεση, η EMT είναι η διαδικασία μέσω της οποίας τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν ικανότητα διήθησης και μετάστασης. Το βασικό μοριακό μονοπάτι που ελέγχει την διαδικασία αυτή είναι το μονοπάτι των E-cadherin και β-katenin. Η E-cadherin δρα ως σύνδεσμος προσκόλλησης μεταξύ γειτονικών κυττάρων, και συνδέεται στον ενδοκυττάριο χώρο με την β-katenin, η οποία συνδέεται με την ακτίνη του κυτταροσκελετού και κρατά το κύτταρο στη θέση του. Το πρώτο βήμα στην EMT είναι η απώλεια της E-cadherin ή μετατροπή της σε άλλη μορφή (πχ N-cadherin, φαινόμενο που ονομάζεται cadherin switching), με αποτέλεσμα την αποδέσμευση της β-katenin και ενεργοποίησή της στον πυρήνα. Η β-katenin ακολούθως δρα ως μεταγραφικός παράγοντας γονιδίων στόχων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Ενότητα 2.4.1.) αλλά και ως ενεργοποιητής άλλων μεταγραφικών παραγόντων όπως οι ZEB, SNAIL και TWIST που ενεργοποιούν την αλληλουχία γεγονότων που θα οδηγήσει στην EMT, καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον επιθηλιακό φαινότυπο και επάγοντας την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον μεσεγχυματικό φαινότυπο. Το αποτέλεσμα της EMT είναι μια δραματική αλλαγή στον κυτταροσκελετό και την εξωκυττάρια ύλη του κυττάρου (αποδόμηση των κυτταρικών εστιακών επαφών, αυξημένη έκφραση

φιμπρονεκτίνης, κολλαγόνων, μεταλλοπρωτεασών), που επιφέρουν αλλαγές στην μορφολογία και την κινητικότητα του (Εικόνα 36) και του προσδίδουν ικανότητα διήθησης και μετάστασης<sup>164</sup>.



**Εικόνα 36.** Η διαδικασία της EMT (Dongre et al 2018)

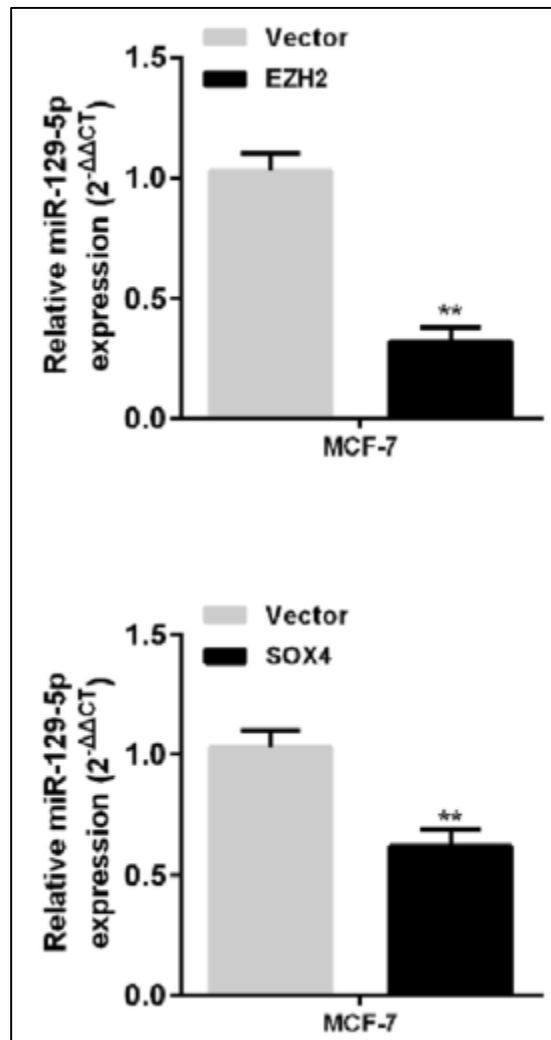
### Ο ρόλος των microRNAs στην EMT

Ερευνητικά δεδομένα έχουν δείξει ότι τα miRNAs παίζουν καίριο ρόλο στα κακοήθη χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης και της διαμεσολαβούμενης από την EMT μετάστασης<sup>165</sup>. Υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των miRNAs, των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, της επαγωγής της EMT και των συμμετεχόντων μεταγραφικών παραγόντων<sup>166</sup>.

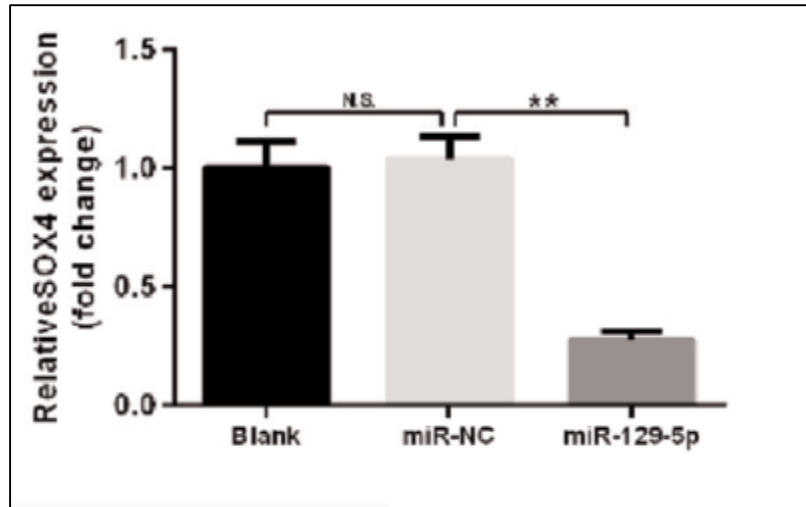
Η διαδικασία της EMT, εκτός από απαραίτητη για την επαγωγή της καρκινογένεσης, έχει φανεί ότι συμμετέχει επίσης στον μηχανισμό της αντίστασης των καρκινικών κυττάρων στην φαρμακοθεραπεία<sup>167</sup>. Η επαγωγή της φαρμακευτικής αντίστασης μέσω της EMT μπορεί να διαμεσολαβείται από miRNAs, οπότε και το φαινόμενο ονομάζεται EMT-miR stemness.

Στον καρκίνο του μαστού υπάρχουν δεδομένα από διάφορες μελέτες που καταδεικνύουν τον ρόλο των miRNAs στην EMT-miR stemness<sup>168</sup>.

Χαρακτηριστική είναι η μελέτη των Luan et al (2016), οι οποίοι έδειξαν ότι το ογκοκατασταλτικό **miR-129-5p** φάνηκε να αυξάνει την έκφραση της E-cadherin, ενός διαμεσολαβητή του επιθηλιακού φαινοτύπου, και να καταστέλλει την έκφραση των N-cadherin και vimentin, διαμεσολαβητών του μεσεγχυματικού φαινοτύπου, σε κύτταρα του μαστού που είχαν εκτεθεί σε χημειοθεραπευτικά<sup>169</sup>. Για το πείραμα αυτό, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά MCF-7 καρκινικών κυττάρων μαστού. Αρχικά, οι ερευνητές μελέτησαν την σχέση του miR-129-5p με το SOX4, ένα γονίδιο-κλειδί που συμμετέχει στην επιγενετική ρύθμιση της EMT, και έδειξαν ότι υπάρχει μια αμφίδρομη ρύθμιση μεταξύ των δύο, όπου η έκφραση του SOX4 καταστέλλει την έκφραση του miR-129-5p μέσω EZH2-διαμεσολαβούμενης τροποποίησης του υποκινητή του (Εικόνα 37), αλλά και το miR-129-5p καταστέλλει την έκφραση του SOX4 (Εικόνα 38).

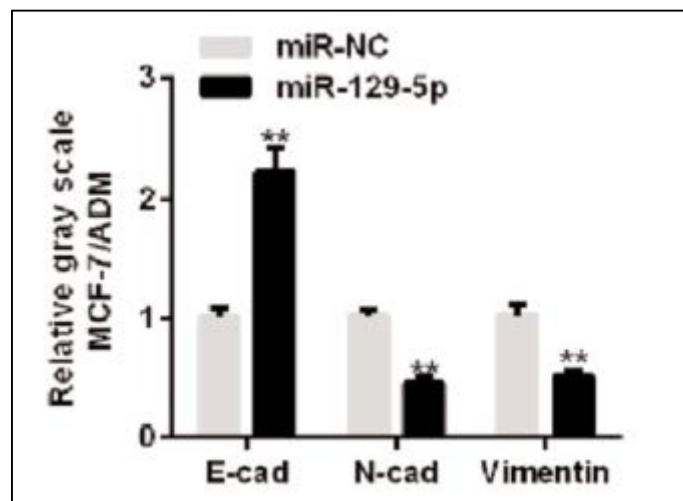


Εικόνα 37. Καταστολή της έκφρασης του miR-129-5p παρουσία EZH2 και SOX4 (Luan et al 2016)



**Εικόνα 38.** Καταστολή της έκφρασης του SOX4 παρουσία miR-129-5p (Luan et al 2016)

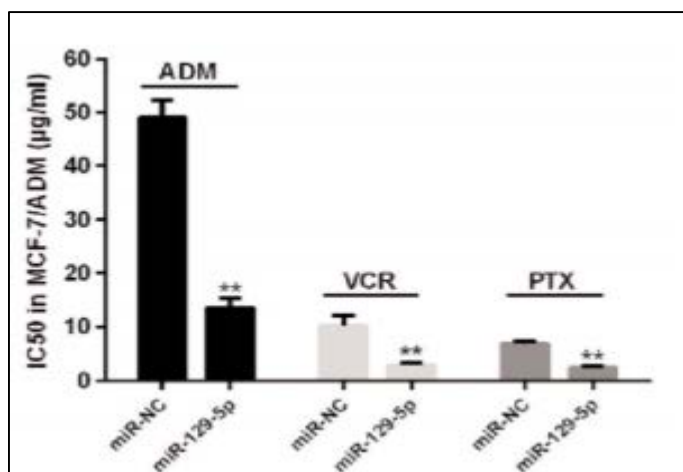
Δεδομένου του ότι το miR-129-5p καταστέλλει το SOX4, το οποίο είναι βασικός ρυθμιστής της EMT, το επόμενο βήμα ήταν να ελεγχθεί ο ακριβής ρόλος του miR-129-5p στην ρύθμιση της EMT. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν μιμητές του miR-129-5p στα κύτταρα MCF-7/ADM, όπου η έκφραση του miR-129-5p ήταν μειωμένη, και φάνηκε ότι η υπερέκφραση του miR-129-5p οδήγησε στην αυξημένη έκφραση της E-cadherin και μειωμένη έκφραση της N-cadherin και vimentin (Εικόνα 39).



**Εικόνα 39.** Ρύθμιση της έκφρασης των E-cadherin, N-cadherin, και Vimentin παρουσία miR-129-5p (Luan et al 2016)



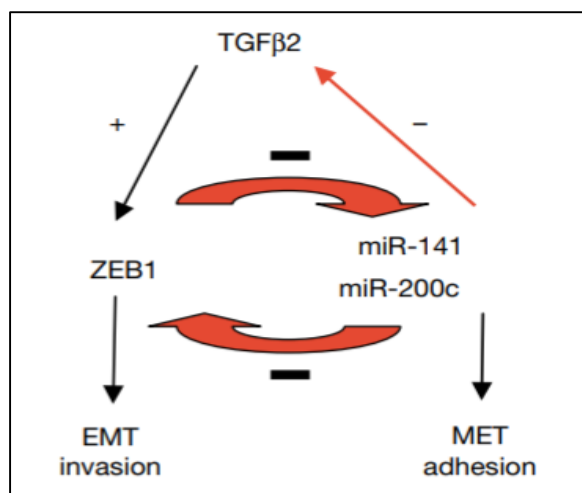
Τέλος, εξετάστηκε το αντίκτυπο της καταστολής της EMT στην EMT-επαγόμενη αντίσταση στην φαρμακοθεραπεία. Φάνηκε ότι η υπερέκφραση του miR-129-5p μείωσε την IC50 των χημειοθεραπευτικών (η IC50 είναι ένας δείκτης που εκφράζει την συγκέντρωση του φαρμάκου που απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων κατά 50%), δείχνοντας ότι η επαγόμενη από το miR-129-5p αναστροφή της EMT σχετίζεται με αυξημένη ανταπόκριση στην φαρμακοθεραπεία (Εικόνα 40)<sup>169</sup>.



**Εικόνα 40.** IC50 χημειοθεραπευτικών μετά από έκθεση στο miR-129-5p (Luan et al 2016)

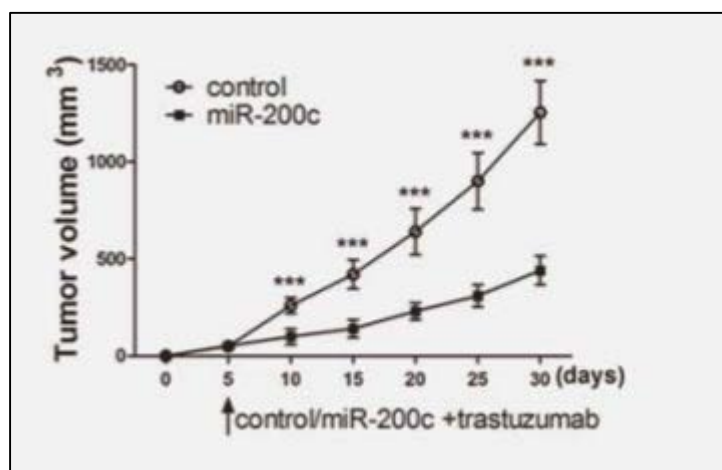
ADM=Adriamycin, VCR=Vincristine, PTX=Paclitaxel

Τα **miR-200c** και **miR-141** είναι επίσης ογκοκατασταλτικά miR τα οποία συμμετέχουν κατασταλτικά στην διαδικασία της EMT. Η έκφραση του miR-200c και miR-141, καταστέλλοντας τον TGFβ2, καταστέλλει τον ZEB1, έναν μεταγραφικό παράγοντα απαραίτητο για την EMT, και ενεργοποιεί την επιθηλιακή διαφοροποίηση και αντιστροφή της EMT σε καρκινικά κύτταρα μαστού<sup>170</sup>. Αντιστρόφως, ο ίδιος ο ZEB1 έχει κατασταλτική δράση στα miR-200c και miR-141, και η καταστολή τους αποτελεί προϋπόθεση για την εξέλιξη του καρκίνου σε διηθητικό στάδιο. Υπάρχει ουσιαστικά ένα κύκλωμα αλληλεπίδρασης μεταξύ του ZEB1 και των miRs, το οποίο ανάλογα με την αρχική σηματοδότηση μπορεί να σταθεροποιήσει είτε την επιθηλιακή είτε την μεσεγχυματική διαφοροποίηση (Εικόνα 41).



**Εικόνα 41.** Κύκλωμα αλληλεπίδρασης μεταξύ των ZEB1, miR-141, miR-200c (Burk et al 2008)

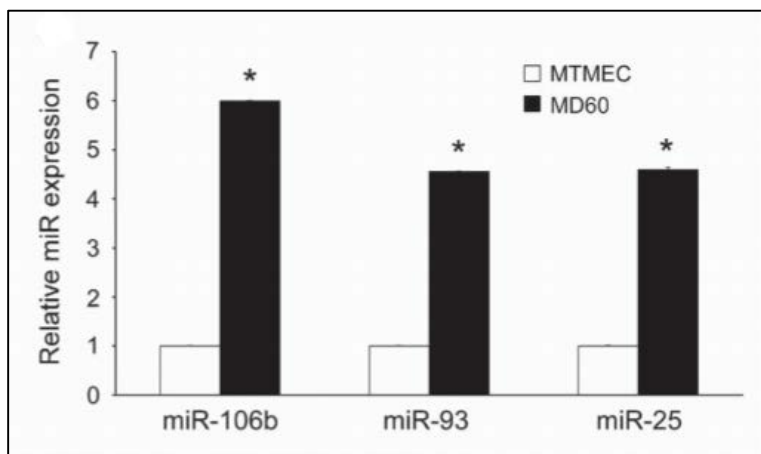
Ο μηχανισμός αυτός έχει αντίκτυπο στην φαρμακευτική ανταπόκριση των καρκινικών κυττάρων. Σε πειραματικό μοντέλο HER2-θετικών καρκινικών κυττάρων μαστού ανθεκτικών στο trastuzumab (στοχευμένη anti-HER2 θεραπεία), το miR-200c βρέθηκε κατεσταλμένο, και η TGFβ σηματοδότηση αυξημένη. Η επαναφορά της λειτουργικότητας του miR-200c κατέστειλε την διηθητικότητα των καρκινικών κυττάρων και επανέφερε την ευαισθησία στο trastuzumab, καταστέλλοντας τον ZEB1 και τον ZNF217, έναν μεταγραφικό ενεργοποιητή του TGFβ (Εικόνα 42)<sup>171</sup>.



**Εικόνα 42.** Ανταπόκριση του όγκου με την προσθήκη miR-200c (Bai et al 2014)

Το σύμπλοκο **miR-106b-25**, το οποίο περιλαμβάνει τα miR-106b, miR-93 και miR-25, δρα καταστέλλοντας την E-cadherin, μέσω απενεργοποίησης του EP300, ενός μεταγραφικού ενεργοποιητή της. Το αποτέλεσμα είναι η επαγωγή EMT, με αυξημένη κινητικότητα και

δηθητικότητα των καρκινικών κυττάρων, μια διαδικασία η οποία φαίνεται να σχετίζεται με ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία<sup>172</sup>. Σε πειραματικό μοντέλο καρκινικών κυττάρων μαστού ανθεκτικών στη δοξορουμπικίνη, όλα τα miRs του συμπλόκου 106b-25 βρέθηκαν σε αυξημένες συγκεντρώσεις (Εικόνα 43).

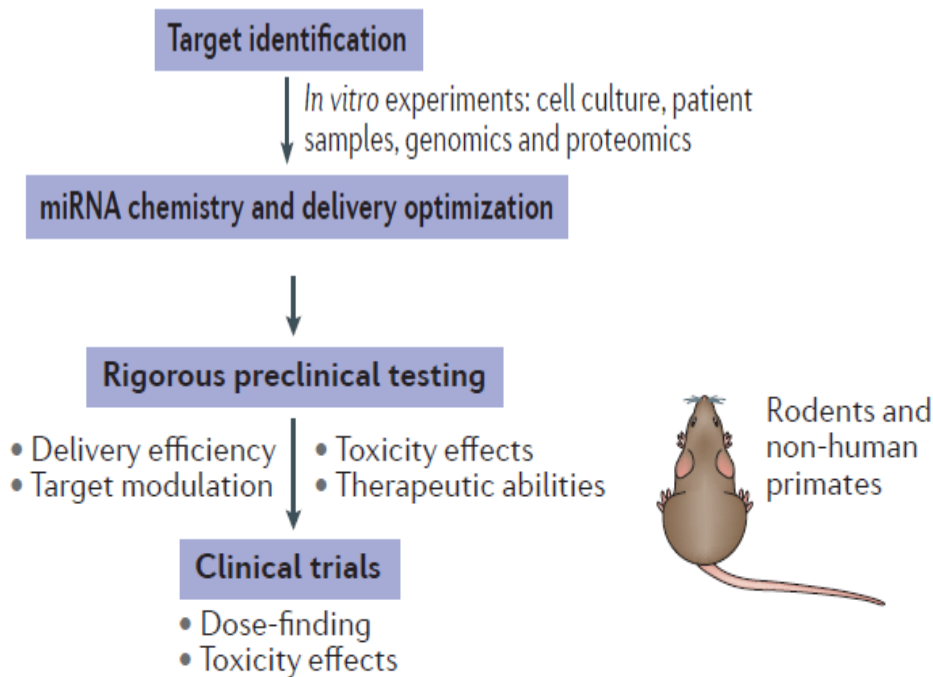


**Εικόνα 43.** Συγκέντρωση των miRs του συμπλόκου miR-106b-25 σε πρώιμα κύτταρα καρκίνου του μαστού (MTMEC) και κύτταρα ανθεκτικά στη δοξορουμπικίνη (MD60) (Zhou et al 2013)

Τα δεδομένα αυτά δείχνουν τον κομβικό ρόλο που διαδραματίζουν τα miRNAs στην επαγωγή της EMT ως μέθοδο αντίστασης στην αντικαρκινική θεραπεία, και καταδεικνύουν έναν πιθανό θεραπευτικό στόχο – την επιλεκτική τους στόχευση ως μηχανισμό αναστροφής της EMT και επαναφοράς της ευαισθησίας των καρκινικών κυττάρων στην θεραπεία.

#### **4.5. miRNAs ως θεραπευτικοί στόχοι**

Τα miRNAs αποτελούν έναν πολλά υποσχόμενο κλάδο στην θεραπεία των ανθρώπινων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Εκτός από την στόχευσή τους ως μηχανισμό αναστροφής της EMT που αναλύσαμε στην Ενότητα 4.4., το μεγάλο εύρος τους προσδίδει διαφορετικές δυνητικές θεραπευτικές επιλογές – είτε με την καταστολή των oncomiRs που προάγουν την καρκινογένεση, είτε με την επαγωγή των ογκοκατασταλτικών miRs που την καταστέλλουν.



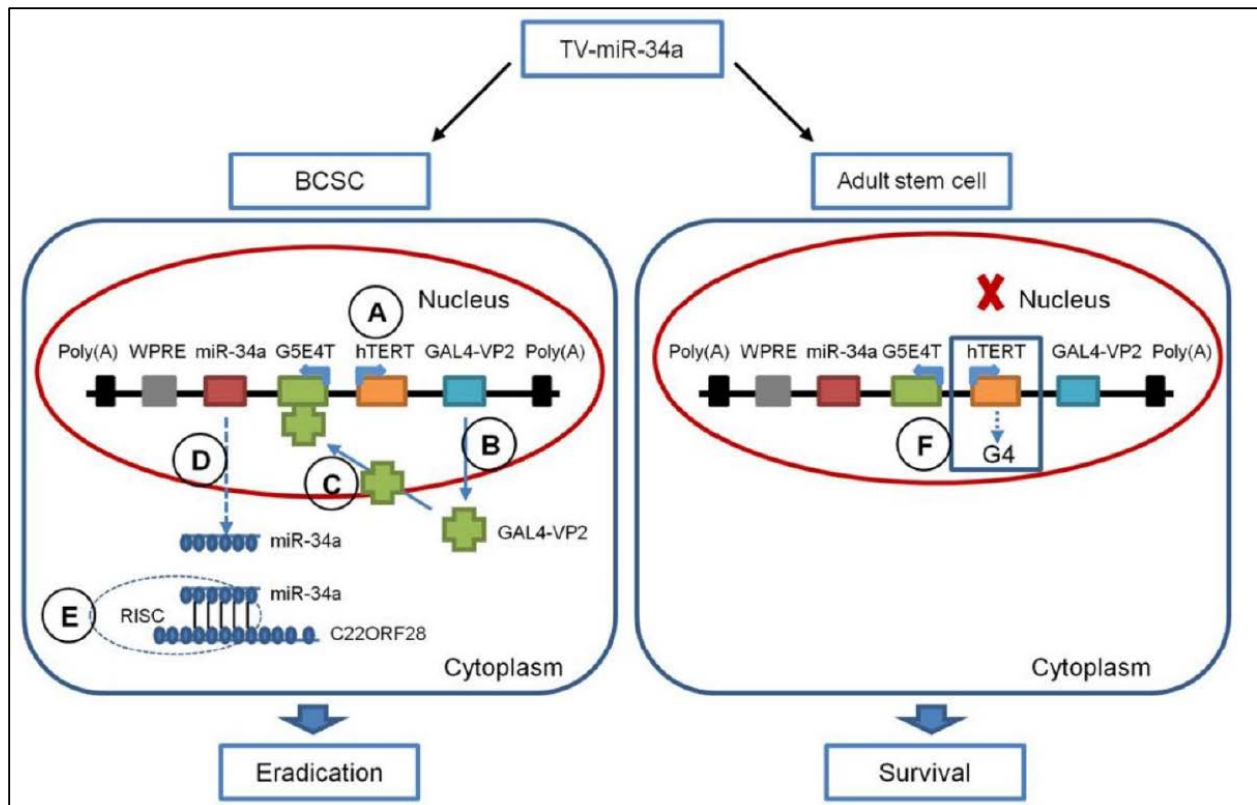
**Εικόνα 44.** Ανάπτυξη θεραπευτικών ουσιών βασισμένων στα miRNAs (Rupaimoole & Slack 2017)

Στην Εικόνα 44 συνοψίζονται τα απαραίτητα βήματα για την δημιουργία θεραπευτικών ουσιών που βασίζονται στα miRNAs. Το πρώτο βήμα είναι η εύρεση του στόχου, χρησιμοποιώντας δείγματα ασθενών, κυτταροκαλλιέργειες, και τεχνικές γενωμικής και πρωτεωμικής ώστε να εντοπιστούν τα miRNA που συμμετέχουν στην παθογένεση της νόσου και να επιλεγθούν τα κατάλληλα miRNA στόχοι. Το επόμενο βήμα είναι η επιλογή των κατάλληλων φορέων ώστε τα miRNA να εισαχθούν σε βιολογικά συστήματα *in vivo*. Ένα από τα μεγάλα προβλήματα που υπάρχουν στη θεραπευτική βασισμένη σε ριβονουκλεοτίδια είναι η αποδόμηση από νουκλεάσες και η διαφυγή από το ενδόσωμα – ένας μηχανισμός που χρησιμοποιείται για να υπερκεράσει αυτό το πρόβλημα είναι η χημική τροποποίηση των μορίων RNA ή η χρήση μεθόδων εγκύστωσης όπως πχ με λιπιδικά νανοσωματίδια<sup>92</sup>. Και αυτοί οι μηχανισμοί όμως έχουν τα δικά τους προβλήματα, τα σημαντικότερα εκ των οποίων είναι η πυροδότηση ανοσοαντίδρασης από τον ξενιστή και η έλλειψη ειδικής στόχευσης του πάσχοντος ιστού<sup>92</sup>. Εάν ολοκληρωθεί επιτυχώς και αυτό το βήμα, τα θεραπευτικά μόρια πρέπει να ακολουθήσουν την συμβατική πορεία ελέγχου νέων φαρμακευτικών ουσιών, και να δοκιμαστούν εκτενώς αρχικά σε προκλινικές μελέτες, σε μελέτες τρωκτικών και κατώτερων θηλαστικών, και επί επιτυχών αποτελεσμάτων τελικά και σε κλινικές μελέτες σε ανθρώπους.

Στην παρούσα χρονική στιγμή δεν υπάρχουν θεραπευτικά μόρια βασισμένα σε miRNAs σε προχωρημένα στάδια κλινικών μελετών για τον καρκίνο. Ένα μόριο που χρησιμοποιήθηκε σε κλινική μελέτη φάσης I ήταν το μόριο MRX34, που βασίζεται στην στόχευση και επαγωγή του miR-34a, και χρησιμοποιήθηκε στην θεραπεία διαφόρων ειδών συμπαγών καρκίνων, όπως ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος, το μελάνωμα και ο καρκίνος του πνεύμονα. Η κλινική μελέτη διακόπηκε πρόωρα λόγω εμφάνισης σοβαρών ανεπιθύμητων ανοσοδιαμεσολαβούμενων αντιδράσεων που οδήγησαν σε τέσσερις θανάτους ασθενών, αλλά η επιτυχής δοσοεξαρτώμενη τροποποίηση των γονιδίων στόχων παρέχει ενθαρρυντικά στοιχεία (proof-of-concept) για την θεραπευτική βασιζόμενη σε miRNA<sup>173</sup>. Άλλα μόρια που έχουν δοκιμαστεί σε φάσης I κλινικές μελέτες είναι το MRG-106, ένας αναστολέας του miR-155, για τη θεραπεία της σπογγοειδούς μυκητίασης (δερματικό T-λέμφωμα)<sup>174</sup>, και τα TargomiRs, μιμητές των miR-15/16, για τη θεραπεία του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και του μεσοθηλιώματος<sup>175</sup>.

Αν και τα miRNAs δεν έχουν φτάσει ακόμα στην κλινική εφαρμογή στον καρκίνο, υπάρχουν εκτεταμένα δεδομένα από προκλινικές μελέτες που προσδίδουν μια συγκεκριμένη αισιοδοξία ότι η στόχευση των miRNAs θα οδηγήσει στη δημιουργία φαρμάκων στο μέλλον.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα το **miR-34**, το οποίο είναι ένα γνωστό ογκοκατασταλτικό miRNA (Ενότητα 4.1.). Οι Lin et al (2017) πραγματοποίησαν ανάλυση με μικροσυστοιχίες (microarrays) για να εντοπίσουν διαφορές στην έκφραση των miRNAs ανάμεσα σε υγιή κύτταρα και καρκινικά κύτταρα, και εντόπισαν το miR-34a ως το καταλληλότερο miRNA για στόχευση δεδομένης της σημαντικής καταστολής του στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα<sup>176</sup>. Η παρατήρηση αυτή ακολούθως τεκμηριώθηκε και σε έλεγχο από βιοπτικό υλικό ασθενών, όπου η έκφραση miR-34a βρέθηκε μειωμένη σε καρκινικά κύτταρα του μαστού συγκριτικά με υγιή κύτταρα, και μάλιστα περισσότερο μειωμένη όσο πιο προχωρημένο το στάδιο του καρκίνου. Δημιούργησαν νανοσωματίδια ώστε να μεταφέρουν ένα miR-34a πλασμίδιο (TV-miR-34a) στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα και να επάγουν έκφραση του miR-34a σε αυτά, μια διαδικασία που είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών βλαστικών κυττάρων τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Η μέθοδος αυτή έχει δυναμική εφαρμογή σαν θεραπευτικός στόχος με στόχο τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα, τόσο μεμονωμένα όσο και σε συνδυασμό με την δοσεταξέλη, της οποίας τη δραστηριότητα φάνηκε να ενισχύει<sup>176</sup>.



**Εικόνα 45.** Σχηματικό διάγραμμα του TV-miR34a συστήματος (Lin et al 2017)

Το TV-miR34a μεταφέρεται με την βοήθεια ενός hTERT υποκινητή με το σύστημα VISA. Ο υποκινητής επάγει την έκφραση μιας πρωτεΐνης σύντηξης, της GALA-VP2, επιλεκτικά στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα του μαστού αλλά όχι στα ενήλικα κύτταρα. Η έκφραση της GALA-VP2 μέσω του υποκινητή G5E4T επάγει την έκφραση της miR-34a πρωτεΐνης, η οποία ενσωματώνεται στο RISC, και οδηγεί σε εκρίζωση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων μέσω αναστολής της έκφρασης του C22ORF28 (μιας πρωτεΐνης απαραίτητης για την λειτουργικότητα των βλαστικών κυττάρων).

Το **miR-let7** είναι επίσης ένα καλά μελετημένο ογκοκατασταλτικό miRNA (Ενότητα 4.1.). Οι Sun et al (2016) έδειξαν ότι το miR-let7 ενισχύει την αντικαρκινική δράση της ενδοκρινικής θεραπείας και συγκεκριμένα της ταμοξιφαίνης, αναστέλλοντας το σηματοδοτικό μονοπάτι της Wnt/b-katenin το οποίο έχει ενεργοποιηθεί από τους οιστρογονικούς υποδοχείς που εκφράζουν τα καρκινικά κύτταρα<sup>101</sup>.

Τα ER-θετικά καρκινικά κύτταρα εκφράζουν οιστρογονικούς υποδοχείς, χρησιμοποιούν δηλαδή τα οιστρογόνα του οργανισμού για να πολλαπλασιαστούν, εξ 'ου και αυτοί οι όγκοι χαρακτηρίζονται ως ορμονοευαίσθητοι. Η θεραπεία αυτών των καρκίνων περιλαμβάνει ενδοκρινικά φάρμακα, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την ταμοξιφαίνη, ένα φάρμακο το οποίο έχει συμπεριληφθεί στην Λίστα των Βασικότερων Φαρμάκων του Παγκοσμίου Οργανισμού

Υγείας. Η ταμοξιφαίνη είναι ένας επιλεκτικός διαμορφωτής υποδοχέων οιστρογόνων (SERM – Selective Estrogen Receptor Modulator), και δρα ως μερικός αγωνιστής των υποδοχέων οιστρογόνων των καρκινικών κυττάρων του μαστού – στους οποίους προσδένεται και δεν επιτρέπει την πρόσδεση των οιστρογόνων, με αποτέλεσμα την θανάτωση των καρκινικών κυττάρων. Η ταμοξιφαίνη έφερε μία από τις μεγαλύτερες επαναστάσεις στον χώρο της ογκολογίας όταν εισήλθε στην κλινική πρακτική, αλλά δεν ανταποκρίνονται όλοι οι ασθενείς με ορμονοευαίσθητους όγκους στην ταμοξιφαίνη, και ακόμα και σε περίπτωση ανταποκρίσεων, τα καρκινικά κύτταρα συχνά εμφανίζουν μηχανισμούς αντίστασης στο φάρμακο με αποτέλεσμα οι ασθενείς να υποτροπιάζουν.

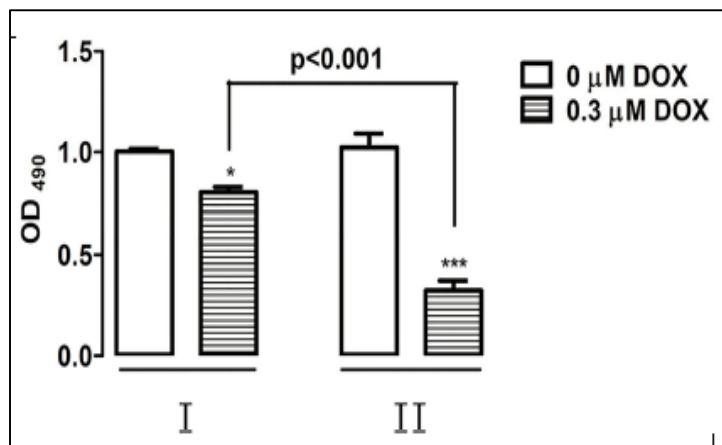
Οι Sun et al (2016) χρησιμοποίησαν το miR-let-7 για να ενισχύσουν την αντικαρκινική δράση της ταμοξιφαίνης<sup>101</sup>. Δεδομένης της λειτουργικότητάς του στην καταστολή των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, τα οποία είναι εκείνα που ενοχοποιούνται για την αντίσταση στη θεραπεία και πρόοδο του καρκίνου, η μέθοδος αυτή παρουσιάζει έναν δυνητικό θεραπευτικό στόχο ενάντια στην αντίσταση στην αντικαρκινική φαρμακοθεραπεία.

Σε παρόμοιες γραμμές στόχευσης της αντίστασης στην θεραπεία κινείται και το **miR-519d**. Οι Xie et al (2017) ανέδειξαν ότι το miR-519d βρίσκεται σημαντικά μειωμένο στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα του μαστού, και ότι η επαγωγή της έκφρασής του αυξάνει κατά πολύ την ευαισθησία των βλαστικών κυττάρων στο χημειοθεραπευτικό σισπλατίνη μέσω ενεργοποίησης του μηχανισμού της απόπτωσης<sup>129</sup>.

Παρομοίως, το **miR-27a** φάνηκε να σχετίζεται με την ευαισθησία των καρκινικών βλαστικών κυττάρων στην ακτινοθεραπεία, καθώς η μειωμένη έκφρασή του προσδίδει αυξημένη ακτινοαντοχή στα καρκινικά κύτταρα. Ο άξονας του miR-27a και του στόχου του, CDC27, μπορεί συνεπώς να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην τροποποίηση της ανταπόκρισης στην ακτινοθεραπεία<sup>177</sup>.

Το **miR-155**, αντιθέτως, είναι ένα γνωστό oncomiR (Ενότητα 4.2.). Οι Zuo et al (2017) έδειξαν ότι το miR-155 είναι αυξημένο στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, και τους προσδίδει αυξημένες βλαστικές ιδιότητες. Η αναστολή του miR-155 κατέστειλε τον αριθμό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό τους, και επιπρόσθετα τα κατέστησε πιο ευαίσθητα στο χημειοθεραπευτικό δοξορουμπικίνη<sup>146</sup>. Το miR-155 συνεπώς αποτελεί έναν πιθανό θεραπευτικό στόχο στην αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού. Αντίστοιχα δεδομένα υπάρχουν στην

βιβλιογραφία σχετικά με την στόχευση του miR-155 και σε άλλους καρκίνους, όπως ο καρκίνος των ωοθηκών<sup>178</sup>.



**Εικόνα 46.** Αποτελεσματικότητα της δοξορουμπικίνης με (I) και χωρίς (II) αναστολέα του miR-155 (Zuo et al 2017)

#### **4.6. miRNAs ως διαγνωστικοί στόχοι**

Τα miRNAs εμφανίζουν χαρακτηριστικά που τα καθιστούν δυνητικά ελκυστικούς βιοδείκτες. Ως βιοδείκτης έχει οριστεί από το NIH ένα χαρακτηριστικό που μπορεί να μετρηθεί αντικειμενικά και μπορεί να αξιολογείται ως δείκτης φυσιολογικών βιολογικών διεργασιών, παθογόνων διεργασιών ή φαρμακολογικών αποκρίσεων σε μια θεραπευτική παρέμβαση (Biomarkers and Surrogate Endpoints, Biomarkers Definitions Working Group 2001). Οι βιοδείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο διαγνωστικά, για την ανίχνευση γενετικής προδιάθεσης, την διάγνωση ή την πρόγνωση μιας νόσου, όσο και θεραπευτικά, για την πρόβλεψη ανταπόκρισης στη θεραπεία, την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία, ή την εξατομίκευση της θεραπείας. Αν και στην ογκολογία δεν υπάρχει κάποιος ιδανικός βιοδείκτης, υπάρχουν μόρια που χρησιμοποιούνται ευρέως και έχουν αλλάξει το διαγνωστικό και θεραπευτικό στερέωμα πολλών καρκίνων. Το χαρακτηριστικότερο παράδειγμα είναι το PSA, το ειδικό προστατικό αντιγόνο, το οποίο χρησιμοποιείται επιτυχώς, πέραν από τη διάγνωση και την παρακολούθηση της θεραπευτικής ανταπόκρισης, και ως μέθοδος screening των ασυμπτωματικών ανδρών για παρουσία καρκίνου προστάτη και έχει σώσει μέσω πρώιμης διάγνωσης τη ζωή χιλιάδων ανδρών παγκοσμίως. Ωστόσο, υπάρχει μεγάλο κενό στον χώρο των βιοδεικτών στην ογκολογία, και συνεχώς αναζητούνται νέα μόρια που θα μπορούσαν να αποτελέσουν την επόμενη μεγάλη ανακάλυψη στον τομέα αυτό.



Τα miRNAs έχουν φανεί ότι είναι σταθερά μόρια, και διατηρούν την συγκέντρωσή τους ακόμα και σε ακραίες συνθήκες, όπως υψηλές θερμοκρασίες σε σημείο βρασμού, χαμηλές θερμοκρασίες σε σημείο ψύξης, πολύ ψηλά και πολύ χαμηλά pH, και συνθήκες παρατεταμένης αποθήκευσης<sup>179</sup>. Όπως είδαμε στις προηγούμενες ενότητες, υπάρχουν miRNAs με συγκεκριμένους στόχους που εκφράζονται με αρκετή ειδικότητα και σταθερότητα, ακόμα και για καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Επίσης, καθώς τα miRNAs συμμετέχουν στην επιγενετική τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης μεγάλου τμήματος του γονιδιώματος, υπάρχει η δυνατότητα να μελετηθούν πολλά διαφορετικά miRNAs για διαφορετικές κυτταρικές διεργασίες και διαφορετικά στάδια της καρκινογένεσης διαφόρων καρκίνων. Μπορούν να μετρηθούν είτε στον ίδιο τον όγκο είτε στην κυκλοφορούσα μορφή τους στα υγρά του σώματος, με μοριακές τεχνικές όπως RT-PCR, μικροσυστοιχίες ή Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς – Next Generation Sequencing (NGS).

Ωστόσο, υπάρχουν ακόμα εμπόδια στην χρήση των miRNAs σαν αξιόπιστους βιοδείκτες. Για αρχή, οι μετρήσεις των ίδιων miRNAs από διαφορετικούς παρατηρητές δεν φέρνουν πάντα τα ίδια αποτελέσματα, και υπάρχουν μεγάλες ασυνέχειες στα δεδομένα διαφορετικών μελετών<sup>179</sup>. Ακόμα και αν υπάρχει ειδικότητα στην έκφραση των miRNAs, οι τεχνολογίες που έχουμε διαθέσιμες στην παρούσα χρονική περίοδο για την ανίχνευσή τους μπορεί να μην επαρκούν. Σε μια ανασκόπηση των διαθέσιμων «μοριακών υπογραφών» βασιζόμενων σε miRNA από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες, βρέθηκε πολύ μεγάλη απόκλιση στα miRNA που ήταν κοινά στις υπογραφές για τον ίδιο καρκίνο μεταξύ των διαφορετικών ομάδων<sup>180</sup>. Ακόμα και το miR-21, το οποίο εμφάνισε την μεγαλύτερη συνοχή μεταξύ των διαφορετικών μελετών για την συσχέτισή του με τον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου, δεν είναι ξεκάθαρο εάν μπορεί να χρησιμοποιηθεί διαγνωστικά για αυτόν τον σκοπό, καθώς η συγκέντρωσή του μπορεί να μην σχετίζεται με την παρουσία καρκίνου αλλά με την ύπαρξη φλεγμονής – το ίδιο miR βρίσκεται αυξημένο σε νόσους πλην του καρκίνου με φλεγμονώδες υπόβαθρο, και ο καρκίνος κεφαλής και τραχήλου είναι χαρακτηριστικός για το έντονο φλεγμονώδες υπόβαθρό του<sup>180</sup>.

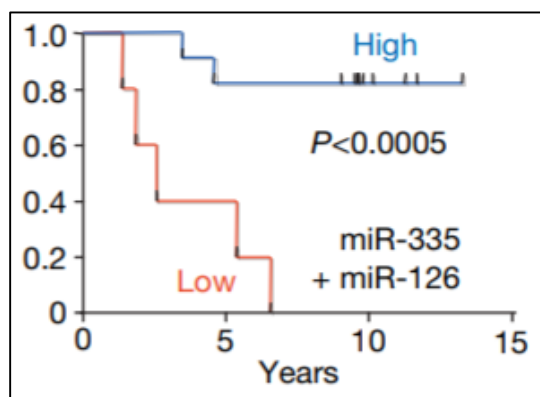
Επιπρόσθετα, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τα miRNAs ελευθερώνονται στα υγρά του σώματος όπου η συγκέντρωσή τους θα μελετηθεί, όπως πχ το αίμα ή τα ούρα, και η σημασία αυτού, δεν είναι πλήρως κατανοητοί<sup>179</sup>. Υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα – η θεωρία ότι τα miRNAs απελευθερώνονται παθητικά στην κυκλοφορία από καρκινικά κύτταρα που πεθαίνουν<sup>181</sup> δεν συμβαδίζει με τα ευρήματα των Cookson et al (2012), οι οποίοι έδειξαν ότι το προφίλ των κυκλοφορούντων miRNAs αντανακλά μεν την παρουσία καρκίνου μαστού, αλλά δεν συμβαδίζει

δε με το προφίλ των miRNAs εντός του καρκίνου<sup>182</sup>, γεγονός που υποστηρίζει μια ενεργή και όχι παθητική διαδικασία έκκρισης των miRNAs από καρκινικά κύτταρα<sup>183</sup>. Η διαδικασία αυτή δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί.

Τέλος, δεν έχει βρεθεί κάποιο ενδογενές miRNA το οποίο να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μόριο ελέγχου (housekeeping control) για την φυσιολογική συγκέντρωση των miRNA στα υγρά του σώματος<sup>179</sup>.

Παρά τους περιορισμούς, υπάρχουν miRNAs τα οποία έχουν δώσει ενθαρρυντικά δεδομένα σαν πιθανοί βιοδείκτες<sup>184</sup>. Συγκεκριμένα για τον καρκίνο του μαστού, η πρώτη γονιδιακή υπογραφή βασισμένη σε miRNAs εντόπισε ένα σύνολο 13 miRNAs τα οποία μπόρεσαν με 100% επιτυχία να διακρίνουν καρκινικά από υγιή κύτταρα μαστού<sup>185</sup>. Ακολούθησαν και άλλα παρόμοια πονήματα, με τους Blenkiron et al (2007) να εντοπίζουν 133 miRNAs με διαφορετική έκφραση σε καρκινικά κύτταρα μαστού συγκριτικά με τα υγιή<sup>186</sup>.

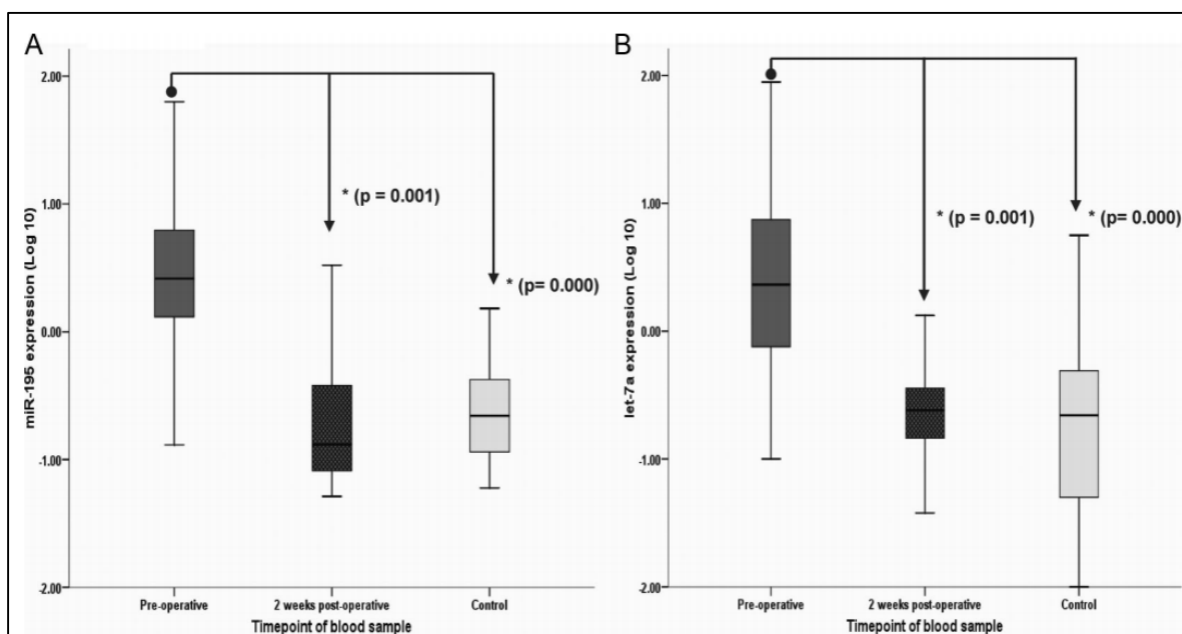
Η απώλεια της έκφρασης των **miR-126** και **miR-335** βρέθηκε να σχετίζεται με φτωχότερη επιβίωση ελεύθερη μεταστάσεων σε ασθενείς με καρκίνο μαστού – με τα δύο αυτά miRNAs να μην εντοπίζονται σχεδόν καθόλου στους πρωτοπαθείς όγκους ασθενών που υποτροπιάζουν<sup>187</sup> (Εικόνα 47).



**Εικόνα 47.** Συσχέτιση των miR-126 και miR-335 με την επιβίωση ελεύθερη μεταστάσεων (Tavazoie et al 2008)

Τα επίπεδα των κυκλοφορούντων **miR-195** και **miR-let-7a** βρέθηκαν αυξημένα σε ασθενείς με καρκίνο μαστού (συμπεριλαμβανομένων και ασθενών με *in situ* καρκίνο) συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες, και ελαττωμένα μετεγχειρητικά σε επίπεδα ανάλογα των υγιών μαρτύρων μετά από ριζική χειρουργική αφαίρεση των όγκων<sup>188</sup> (Εικόνα 39). Το εύρημα ότι τα επίπεδα του miR-let-7

βρέθηκαν αυξημένα στο αίμα των ασθενών με καρκίνο μαστού δεν ήταν αναμενόμενο, δεδομένου ότι το miR-let-7 είναι ένα γνωστο ογκοκατασταλτικό miR και τα επίπεδά του βρίσκονται μειωμένα στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (Ενότητα 4.1.) – αυτό όπως και παρόμοια ευρήματα τονίζουν την έλλειψη δεδομένων που υπάρχει σχετικά με την διαδικασία της έκκρισης των miRNAs από τα καρκινικά κύτταρα στην περιφέρεια και την ανάγκη περισσότερης έρευνας στον χώρο. Στην ίδια μελέτη βρέθηκαν και συσχετίσεις με τα επίπεδα των miRNAs και τα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά της νόσου, όπως τα χαμηλότερα επίπεδα του miR-let-7 σε ασθενείς με διηθημένους λεμφαδένες συγκριτικά με εκείνους χωρίς λεμφαδενική διήθηση, και τα υψηλότερα επίπεδα των miR-10b και miR-21 σε ασθενείς με ER-αρνητική νόσο (αρνητικοί οιστρογονικοί υποδοχείς) συγκριτικά με αυτούς με ER-θετική νόσο (θετικοί οιστρογονικοί υποδοχείς).



**Εικόνα 48.** Έκφραση των miR-195 και miR-let-7 στο αίμα ασθενών με καρκίνο μαστού προ-και μετεγχειρητικά (Heneghan et al 2010)

Το **miR-155** μελετήθηκε από τους Zhu et al (2009), και βρέθηκε αυξημένο σε όγκους με θετικούς προγεστερονικούς υποδοχείς συγκριτικά με όγκους με αρνητικούς προγεστερονικούς υποδοχείς<sup>189</sup>. Το ίδιο miRNA φάνηκε σε συνεπακόλουθη μετα-ανάλυση να εμφανίζει υψηλή διαγνωστική ακρίβεια για την διάγνωση του καρκίνου του μαστού, με 79% ειδικότητα και 85% ευαισθησία<sup>190</sup>.

Διαφορετική προσέγγιση ακολούθησαν οι Godfrey et al (2013), οι οποίοι μελέτησαν προοπτικά το miRNA προφίλ γυναικών οι οποίες δεν είχαν διαγνωστεί ποτέ με καρκίνο μαστού, με τον στόχο

να εντοπίσουν την παρουσία διαφορών που να σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου μαστού στο μέλλον<sup>191</sup>. Εντοπίστηκαν 3 miRNAs (miR-18a, miR-181a, miR-222) με συγκριτικά αυξημένη έκφραση στο αίμα των γυναικών που τελικά ανέπτυξαν καρκίνο μαστού, αν και ο αριθμός των γυναικών δεν ήταν αρκετά μεγάλος για να είναι τα αποτελέσματα στατιστικά σημαντικά. Εντούτοις, η προσπάθεια αυτή αναδεικνύει την δυνητική χρησιμότητα των miRNAs και σαν εργαλεία screening στον ασυμπτωματικό πληθυσμό.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με το ρόλο που διαδραματίζουν τα μικρά μη κωδικά μόρια RNA στη ρύθμιση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων στο καρκίνο του μαστού.

Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα έχουν αναγνωριστεί ως μια διακριτή κατηγορία καρκινικών κυττάρων με χαρακτηριστικά που παρομοιάζουν τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα – ικανότητα αυτοανανέωσης, διαφοροποίησης σε άλλους κυτταρικούς τύπους και υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό. Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα χρησιμοποιούν κοινούς μοριακούς μηχανισμούς και σηματοδοτικά μονοπάτια με τα φυσιολογικά και το αποτέλεσμα της δράσης τους είναι η επαγωγή του ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού που χαρακτηρίζει την καρκινογένεση. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα βασικούς ρυθμιστές της καρκινογένεσης, της μετάστασης, και της αντίστασης των καρκινικών κυττάρων σε αντικαρκινικές θεραπείες. Δεδομένου ότι ο καρκίνος παραμένει μια ανίατη ασθένεια με σχεδόν 10 εκατομμύρια θανάτους από καρκίνο παγκοσμίως μέσα στο 2020 και σημαντική επίπτωση στην ποιότητα ζωής πολλών εκατομμυρίων ακόμα, υπάρχει μεγάλη ανάγκη ανεύρεσης διαγνωστικών και θεραπευτικών αντικαρκινικών καινοτομιών. Ο καρκίνος του μαστού μεσουρανά μέσα στο στερέωμα της ογκολογίας ως ο πιο συχνός καρκίνος στις γυναίκες, η πρωταρχική αιτία θανάτου από καρκίνου στις γυναίκες, και ο πιο συχνά διαγνωσμένος καρκίνος και στα δύο φύλα. Από το 1971 οπότε και ο τότε πρόεδρος των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής Richard Nixon ανήγγειλε την έναρξη του «Πολέμου ενάντια στον Καρκίνο», ο κλάδος της ογκολογίας κατέχει το μερίδιο του λέοντος στον χώρο της έρευνας στις Επιστήμες Υγείας, και το αποτέλεσμα αυτής της παγκόσμιας προσπάθειας έχει επιφέρει ριζικές αλλαγές στην αντιμετώπιση πολλών καρκίνων και έχει σώσει εκατοντάδες χιλιάδες ζωές ανά τον κόσμο. Ωστόσο, ο καρκίνος σαν νόσος, όπως και ο καρκίνος του μαστού συγκεκριμένα, δεν έχει θεραπευθεί, και μερικές από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στην αντιμετώπισή του παραμένουν η εγκαθίδρυση της μετάστασης, η οποία στην συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων ισοδυναμεί με θάνατο, και η ανάπτυξη μηχανισμών αντίστασης στην φαρμακοθεραπεία – διαδικασίες στις οποίες εμπλέκονται κατά κόρον τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα.

Ο κλάδος της Μοριακής Βιολογίας και της Γενετικής γνώρισε την δική του επανάσταση με την ανακάλυψη της επιγενετικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης – την ανακάλυψη δηλαδή ότι στην τελική έκφραση της γενετικής πληροφορίας δεν συμμετέχει μόνο ο γενετικός κώδικας όπως

αυτός έχει διαμορφωθεί από το γονιδίωμα του οργανισμού, αλλά και επίκτητες αλλαγές που διαμεσολαβούνται από ένα πολύπλοκο ρυθμιστικό σύστημα και δημιουργούν ένα δεύτερο «επιγένομα» σαν μιας μορφής δεύτερο γενετικό κώδικα. Μια από τις κατηγορίες μορίων που συμμετέχουν σ' αυτό το ρυθμιστικό σύστημα είναι τα μικρά μη κωδικά μόρια RNA (miRNAs), τα οποία μετά από την ανακάλυψή τους σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα έχουν συσχετισθεί με μια πληθώρα γονιδίων, μοριακών λειτουργιών, φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων. Συμπεριλαμβανόμενα σ' αυτές είναι και τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα, όπου τα miRNAs φαίνεται να διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο. Μελέτες έχουν δείξει την μεγάλη πολυλειτουργικότητα των miRNAs, τα οποία, ανάλογα με το μόριο το οποίο στοχεύουν, μπορούν να δρουν με ποικίλους τρόπους στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα – ως ογκοκατασταλτικά, αναστέλλοντας τη διαδικασία της καρκινογένεσης, ως ογκογονίδια, προάγοντας την καρκινογένεση και μετάσταση, και ως επαγωγείς EMT, βλαστικού φαινοτύπου και αντίστασης στην αντικαρκινική θεραπεία. Η έκφραση των oncomiRs ή αντίστοιχα η καταστολή των ογκοκατασταλτικών miRNAs φαίνεται να αποτελεί ορόσημο της καρκινογένεσης, και πειραματικά δεδομένα έχουν αρχίσει να έρχονται στην επιφάνεια αναδεικνύοντας την συσχέτιση της έκφρασης διαφόρων miRNAs με συγκεκριμένους καρκίνους, και επιπρόσθετα συγκεκριμένους υποτύπους καρκίνων. Η συσχέτιση αυτή ανοίγει νέους ορίζοντες τόσο στην διαγνωστική όσο και στην θεραπευτική φαρέτρα του ερευνητή, όπου διαφορετικά miRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καρκινικοί βιοδείκτες ή ως θεραπευτικοί στόχοι αντίστοιχα.

### **Μελλοντικές προοπτικές και στόχοι**

Αν και πολλά υποσχόμενος, ο κλάδος των miRNAs στον χώρο του καρκίνου, και συγκεκριμένα στον χώρο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων στον καρκίνο του μαστού, βρίσκεται ακόμα σε εμβρυικό στάδιο. Υπάρχουν πολλές προκλήσεις που πρέπει να ξεπεραστούν και ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν έως ότου η έρευνα στον κλάδο αυτό φέρει αποτελέσματα τα οποία θα εισχωρήσουν στην καθημερινή κλινική πρακτική. Η μεγάλη πολυπλοκότητα του συστήματος των miRNAs δεν έχει ακόμη ξεκαθαριστεί. Χρειάζονται περισσότερα δεδομένα αναφορικά με την ειδικότητα και ευαισθησία των εκάστοτε miRNAs προς το μόριο στόχο στο οποίο μελετώνται, ώστε η στόχευσή τους είτε διαγνωστικά είτε θεραπευτικά να έχει το αναμενόμενο αποτέλεσμα. Με την χρήση των δεδομένων μεγάλης κλίμακας (big data) και τις νέες εξελίξεις στον χώρο της γενωμικής και πρωτεωμικής ίσως αυτές οι συσχετίσεις να μην είναι τόσο μακριά. Βασικά

αναπάντητα ερωτήματα όπως ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τα miRNAs διαφεύγουν από το καρκινικό κύτταρο, είτε βλαστικό είτε ώριμο, στην περιφέρεια προσφέρουν πρόσφορο έδαφος για έρευνα, καθώς, εάν απαντηθούν, θα μπορούσαν να θέσουν τις βάσεις για τη χρήση αυτών των μορίων σαν βιοδείκτες με μια απλή αιμοληψία από την ασθενή. Επιπρόσθετα, στην άλλη άκρη της ερευνητικής διαδικασίας, ο κλάδος της βασικής έρευνας στην βιοχημεία και φαρμακολογία καλείται να βρει νέες μεθόδους ώστε να μπορέσουν τα miRNAs τα οποία κρίνονται κατάλληλα ως θεραπευτικοί στόχοι να αξιοποιηθούν φαρμακολογικά και να μετατραπούν σε φάρμακα – υπάρχουν προβλήματα που παραμένουν άλυτα σχετικά με την αποδόμηση αυτών των μορίων ή με την χρήση των σωστών φορέων. Πολλά από τα μόρια miRNA που έφτασαν σε πρώιμης φάσης κλινικές μελέτες αποσύρθηκαν λόγω επαγωγής ανεπιθύμητων ανοσολογικής φύσεως αντιδράσεων, που σχετίζονται κυρίως με τους φορείς που χρησιμοποιούνται για την εισαγωγή τους στο κύτταρο – αντιδράσεις οι οποίες θα μπορούσαν να αντιμετωπιστούν με σχεδιασμό διαφορετικών φορέων, πιθανώς με την χρήση της νανοτεχνολογίας.

Μέσα σ' αυτό τον κυκεώνα πληροφοριών, διαφαίνεται ότι τα miRNAs προσδίδουν μια νέα, ελπιδοφόρα προοπτική στον κλάδο της ερευνητικής ογκολογίας, και την ευκαιρία μιας πιο εξειδικευμένης, πιο «εξατομικευμένης» προσέγγισης στη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου. Δεν έχουμε φτάσει ακόμα στο σημείο να χρησιμοποιούμε την miRNA γονιδιακή υπογραφή του όγκου για την λήψη θεραπευτικών αποφάσεων, όπως γίνεται με τις εγκαθιδρυμένες γονιδιακές υπογραφές OncotypeDX και MammaPrint, αλλά ίσως στο μέλλον να έχουμε την χαρά να εξερευνήσουμε μια νέα μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού με βάση το miRNA προφίλ του.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Khan YS, Sajjad H. Anatomy, Thorax, Mammary Gland. *StatPearls*. Published online July 31, 2021. Accessed August 28, 2021.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547666/>
2. The significance of axillary node levels in the study of breast carcinoma - Berg - 1955 - Cancer - Wiley Online Library. Accessed August 28, 2021.  
[https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(1955\)8:4%3C776::AID-CNCR2820080421%3E3.0.CO;2-B](https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(1955)8:4%3C776::AID-CNCR2820080421%3E3.0.CO;2-B)
3. SR Wellings. A hypothesis of the origin of human breast cancer from the terminal ductal lobular unit. *Pathol Res Pract*. 1980;166(4):515-535. doi:10.1016/S0344-0338(80)80248-2
4. Bertos NR, Park M. Breast cancer — one term, many entities? *J Clin Invest*. 2011;121(10):3789. doi:10.1172/JCI57100
5. AE Giuliano, JL Connolly, SB Edge, et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(4):290-303. doi:10.3322/CAAC.21393
6. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nat* 2000 4066797. 2000;406(6797):747-752. doi:10.1038/35021093
7. T Sorlie, CM Perou, R Tibshirani, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869-10874. doi:10.1073/PNAS.191367098
8. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2019;30(8):1194-1220. doi:10.1093/ANNONC/MDZ173
9. Cardoso F, Paluch-Shimon S, Senkus E, et al. 5th ESO-ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 5). *Ann Oncol*. 2020;31(12):1623-1649. doi:10.1016/J.ANNONC.2020.09.010
10. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004 108. 2004;10(8):789-799. doi:10.1038/nm1087
11. JM Bishop. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*. 1991;64(2):235-248. doi:10.1016/0092-8674(91)90636-D



12. Campbell PJ, Getz G, Korbel JO, et al. Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nat* 2020 5787793. 2020;578(7793):82-93. doi:10.1038/s41586-020-1969-6
13. D Hanahan, RA Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
14. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/J.CELL.2011.02.013
15. PC Nowell. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194(4260):23-28. doi:10.1126/SCIENCE.959840
16. Singh VK, Saini A, Kalsan M, Kumar N, Chandra R. Describing the Stem Cell Potency: The Various Methods of Functional Assessment and In silico Diagnostics. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4(NOV):134. doi:10.3389/FCELL.2016.00134
17. T Reya, SJ Morrison, MF Clarke, IL Weissman. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-111. doi:10.1038/35102167
18. D Bonnet, JE Dick. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3(7):730-737. doi:10.1038/NM0797-730
19. M Al-Hajj, MS Wicha, A Benito-Hernandez, SJ Morrison, MF Clarke. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):3983-3988. doi:10.1073/PNAS.0530291100
20. SK Singh, C Hawkins, ID Clarke, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004;432(7015):396-401. doi:10.1038/NATURE03128
21. CA O'Brien, A Pollett, S Gallinger, JE Dick. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007;445(7123):106-110. doi:10.1038/NATURE05372
22. L Ricci-Vitiani, DG Lombardi, E Pilozzi, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007;445(7123):111-115. doi:10.1038/NATURE05384
23. P Dalerba, SJ Dylla, IK Park, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(24):10158-10163. doi:10.1073/PNAS.0703478104
24. Thankamony AP, Saxena K, Murali R, Jolly MK, Nair R. Cancer Stem Cell Plasticity – A

- Deadly Deal. *Front Mol Biosci.* 2020;7:79. doi:10.3389/FMOLB.2020.00079
25. PB Gupta, CM Fillmore, G Jiang, et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell.* 2011;146(4):633-644.  
doi:10.1016/J.CELL.2011.07.026
  26. J Chen, Y Li, TS Yu, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature.* 2012;488(7412):522-526. doi:10.1038/NATURE11287
  27. Shimokawa M, Ohta Y, Nishikori S, et al. Visualization and targeting of LGR5+ human colon cancer stem cells. *Nat 2017 5457653.* 2017;545(7653):187-192.  
doi:10.1038/nature22081
  28. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer 2003 312.* 2003;3(12):895-902. doi:10.1038/nrc1232
  29. S Doulatov, F Notta, E Laurenti, JE Dick. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell.* 2012;10(2):120-136. doi:10.1016/J.STEM.2012.01.006
  30. E Battle, H Clevers. Cancer stem cells revisited. *Nat Med.* 2017;23(10):1124-1134.  
doi:10.1038/NM.4409
  31. JE Visvader, GJ Lindeman. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(10):755-768. doi:10.1038/NRC2499
  32. A Vassilopoulos, C Chisholm, T Lahusen, H Zheng, CX Deng. A critical role of CD29 and CD49f in mediating metastasis for cancer-initiating cells isolated from a Brca1-associated mouse model of breast cancer. *Oncogene.* 2014;33(47):5477-5482.  
doi:10.1038/ONC.2013.516
  33. X LV, Y Wang, Y Song, X Pang, H Li. Association between ALDH1+/CD133+ stem-like cells and tumor angiogenesis in invasive ductal breast carcinoma. *Oncol Lett.* 2016;11(3):1750-1756. doi:10.3892/OL.2016.4145
  34. O Leis, A Eguiara, E Lopez-Arribillaga, et al. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene.* 2012;31(11):1354-1365.  
doi:10.1038/ONC.2011.338
  35. CT Jordan, D Upchurch, SJ Szilvassy, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia.* 2000;14(10):1777-1784. doi:10.1038/SJ.LEU.2401903
  36. A Blair, DE Hogge, LE Ailles, PM Lansdorp, HJ Sutherland. Lack of expression of Thy-1

- (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. *Blood*. 1997 May 1;89(9):3104-12. PMID: 9129012
37. R Bjerkvig, BB Tysnes, KS Aboody, J Najbauer, AJ Terzis. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(11):899-904. doi:10.1038/NRC1740
  38. DL Clarke, CB Johansson, J Wilbertz, et al. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science*. 2000;288(5471):1660-1663. doi:10.1126/SCIENCE.288.5471.1660
  39. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(19):10711. doi:10.1073/PNAS.96.19.10711
  40. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nat* 1999 4016751. 1999;401(6751):390-394. doi:10.1038/43919
  41. MM Mueller, NE Fusenig. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(11):839-849. doi:10.1038/NRC1477
  42. RM Bachoo, EA Maher, KL Ligon, et al. Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell*. 2002;1(3):269-277. doi:10.1016/S1535-6108(02)00046-6
  43. BM Ogle, M Cascalho, JL Platt. Biological implications of cell fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(7):567-575. doi:10.1038/NRM1678
  44. AJ Wagers, IL Weissman. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004;116(5):639-648. doi:10.1016/S0092-8674(04)00208-9
  45. TF Warner, RG Krueger. The multicellular (as opposed to the monoclonal) origin of the murine myeloma cell. *J Theor Biol*. 1975;54(2):175-179. doi:10.1016/S0022-5193(75)80122-6
  46. D Duelli, Y Lazebnik. Cell fusion: a hidden enemy? *Cancer Cell*. 2003;3(5):445-448. doi:10.1016/S1535-6108(03)00114-4
  47. WJ Jeong, EJ Ro, KY Choi. Interaction between Wnt/ $\beta$ -catenin and RAS-ERK pathways and an anti-cancer strategy via degradations of  $\beta$ -catenin and RAS by targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *NPJ Precis Oncol*. 2018;2(1). doi:10.1038/S41698-018-0049-Y

48. R Nusse, H Clevers. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*. 2017;169(6):985-999. doi:10.1016/J.CELL.2017.05.016
49. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-337. doi:10.1038/NATURE11252
50. Xu X, Zhang M, Xu F, Jiang S. Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities. *Mol Cancer* 2020 191. 2020;19(1):1-35. doi:10.1186/S12943-020-01276-5
51. Niu T, Zhang W, Xiao W. MicroRNA regulation of cancer stem cells in the pathogenesis of breast cancer. *Cancer Cell Int* 2021 211. 2021;21(1):1-14. doi:10.1186/S12935-020-01716-8
52. Harrison DA. The JAK/STAT Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(3). doi:10.1101/CSHPERSPECT.A011205
53. K Banerjee, H Resat. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review. *Int J cancer*. 2016;138(11):2570-2578. doi:10.1002/IJC.29923
54. Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006 79. 2006;7(9):678-689. doi:10.1038/nrm2009
55. V Venkatesh, R Nataraj, GS Thangaraj, et al. Targeting Notch signalling pathway of cancer stem cells. *Stem cell Investig*. 2018;5(2). doi:10.21037/SCI.2018.02.02
56. Kontomanolis EN, Kalagasidou S, Pouliliou S, et al. The Notch Pathway in Breast Cancer Progression. *Sci World J*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/2415489
57. Yang L, Xie G, Fan Q, Xie J. Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications. *Oncogene* 2010 294. 2009;29(4):469-481. doi:10.1038/onc.2009.392
58. CR Cochrane, A Szczepny, DN Watkins, JE Cain. Hedgehog Signaling in the Maintenance of Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)*. 2015;7(3):1554-1585. doi:10.3390/CANCERS7030851
59. Sekulic A, Migden MR, Oro AE, et al. Efficacy and Safety of Vismodegib in Advanced Basal-Cell Carcinoma. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1113713>. 2012;366(23):2171-2179. doi:10.1056/NEJMoa1113713
60. Migden MR, Guminski A, Gutzmer R, et al. Treatment with two different doses of sonidegib in patients with locally advanced or metastatic basal cell carcinoma (BOLT): a

- multicentre, randomised, double-blind phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(6):716-728. doi:10.1016/S1470-2045(15)70100-2
61. F Xu, L Na, Y Li, L Chen. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. *Cell Biosci.* 2020;10(1). doi:10.1186/S13578-020-00416-0
  62. B Vanhaesebroeck, MWD Perry, JR Brown, F Andre, K Okkenhaug. PI3K inhibitors are finally coming of age. *Nat Rev Drug Discov.* Published online 2021. doi:10.1038/S41573-021-00209-1
  63. Wang S, Liu M, Lian S, et al. Which Is the Most Appropriate PI3K Inhibitor for Breast Cancer Patients with or without PIK3CA Status Mutant? A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Biomed Res Int.* 2020;2020. doi:10.1155/2020/7451576
  64. P Narayan, TM Prowell, JJ Gao, et al. FDA Approval Summary: Alpelisib Plus Fulvestrant for Patients with HR-positive, HER2-negative, PIK3CA-mutated, Advanced or Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2021;27(7):1842-1849. doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-3652
  65. J Lessard, G Sauvageau. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature.* 2003;423(6937):255-260. doi:10.1038/NATURE01572
  66. GP Dimri, J-L Martinez, JLL Jacobs, et al. The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 2002 Aug 15;62(16):4736-45. PMID: 12183433
  67. M Srinivasan, DJ Bharali, T Sudha, et al. Downregulation of Bmi1 in breast cancer stem cells suppresses tumor growth and proliferation. *Oncotarget.* 2017;8(24):38731-38742. doi:10.18632/ONCOTARGET.16317
  68. From DNA to RNA - Molecular Biology of the Cell - NCBI Bookshelf. Accessed August 29, 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26887/>
  69. Weinhold B. Epigenetics: The Science of Change. *Environ Health Perspect.* 2006;114(3):A160. doi:10.1289/EHP.114-A160
  70. Moore LD, Le T, Fan G. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacol* 2013 381. 2012;38(1):23-38. doi:10.1038/npp.2012.112
  71. M Kulis, M Esteller. DNA methylation and cancer. *Adv Genet.* 2010;70(C):27-56. doi:10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2

72. Locke WJ, Guanzon D, Ma C, et al. DNA Methylation Cancer Biomarkers: Translation to the Clinic. *Front Genet.* 2019;10:1150. doi:10.3389/FGENE.2019.01150
73. Yin J. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science DNA Methyltransferase and its Clinical Applications DNA Methyltransferase and its Clinical Applications. doi:10.1088/1755-1315/512/1/012082
74. KK Wong. DNMT1: A key drug target in triple-negative breast cancer. *Semin Cancer Biol.* 2021;72:198-213. doi:10.1016/J.SEMCANCER.2020.05.010
75. Yu J, Qin B, Moyer AM, et al. DNA methyltransferase expression in triple-negative breast cancer predicts sensitivity to decitabine. *J Clin Invest.* 2018;128(6):2376-2388. doi:10.1172/JCI97924
76. EJ Richards, SC Elgin. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell.* 2002;108(4):489-500. doi:10.1016/S0092-8674(02)00644-X
77. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 2011 213. 2011;21(3):381-395. doi:10.1038/cr.2011.22
78. MA Gluzak, E Seto. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene.* 2007;26(37):5420-5432. doi:10.1038/SJ.ONC.1210610
79. EM Michalak, ML Burr, AJ Bannister, MA Dawson. The roles of DNA, RNA and histone methylation in ageing and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(10):573-589. doi:10.1038/S41580-019-0143-1
80. Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7). doi:10.3390/IJMS18071414
81. Zhang Q, Wang T, Geng C, et al. Exploratory clinical study of chidamide, an oral subtype-selective histone deacetylase inhibitor, in combination with exemestane in hormone receptor-positive advanced breast cancer. *Chinese J Cancer Res.* 2018;30(6):605. doi:10.21147/J.ISSN.1000-9604.2018.06.05
82. Jiang Z, Li W, Hu X, et al. Tucidinostat plus exemestane for postmenopausal patients with advanced, hormone receptor-positive breast cancer (ACE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2019;20(6):806-815. doi:10.1016/S1470-2045(19)30164-0
83. TR Cech, JA Steitz. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones.

- Cell*. 2014;157(1):77-94. doi:10.1016/J.CELL.2014.03.008
84. RC Lee, RL Feinbaum, V Ambros. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-854. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y
  85. BP Lewis, CB Burge, DP Bartel. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15-20. doi:10.1016/J.CELL.2004.12.035
  86. A Fire, S Xu, MK Montgomery, SA Kostas, SE Driver, CC Mello. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-811. doi:10.1038/35888
  87. Y Lee, K Jeon, JT Lee, S Kim, VN Kim. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002;21(17):4663-4670. doi:10.1093/EMBOJ/CDF476
  88. Ma C, Liu Y, He L. microRNAs - powerful repression comes from small RNAs. *Sci China C Life Sci*. 2009;52(4):323. doi:10.1007/S11427-009-0056-X
  89. MS Ebert, PA Sharp. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell*. 2012;149(3):515-524. doi:10.1016/J.CELL.2012.04.005
  90. Y Peng, CM Croce. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2016;1. doi:10.1038/SIGTRANS.2015.4
  91. J Hayes, PP Peruzzi, S Lawler. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med*. 2014;20(8):460-469. doi:10.1016/J.MOLMED.2014.06.005
  92. R Rupaimoole, FJ Slack. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(3):203-221. doi:10.1038/NRD.2016.246
  93. S Vermeire, X Hebuterne, H Tilg, G De Hertogh, P Gineste, JM Steens. Induction and Long-term Follow-up With ABX464 for Moderate-to-severe Ulcerative Colitis: Results of Phase IIa Trial. *Gastroenterology*. 2021;160(7):2595-2598.e3. doi:10.1053/J.GASTRO.2021.02.054
  94. HL Janssen, HW Reesink, EJ Lawitz, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med*. 2013;368(18):1685-1694. doi:10.1056/NEJMOA1209026
  95. D Adams, A Gonzalez-Duarte, WD O'Riordan, et al. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med*. 2018;379(1):11-21.

doi:10.1056/NEJMOA1716153

96. Pichler M, Calin GA. MicroRNAs in cancer: from developmental genes in worms to their clinical application in patients. *Br J Cancer* 2015 1134. 2015;113(4):569-573.  
doi:10.1038/bjc.2015.253
97. AQ Khan, EI Ahmed, NR Elareer, K Junejo, M Steinhoff, S Uddin. Role of miRNA-Regulated Cancer Stem Cells in the Pathogenesis of Human Malignancies. *Cells*. 2019;8(8):840. doi:10.3390/CELLS8080840
98. E Bernstein, SY Kim, MA Carmell, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*. 2003;35(3):215-217. doi:10.1038/NG1253
99. RU Takahashi, H Miyazaki, T Ochiya. The role of microRNAs in the regulation of cancer stem cells. *Front Genet*. 2014;4(JAN). doi:10.3389/FGENE.2013.00295
100. F Yu, H Yao, P Zhu, et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*. 2007;131(6):1109-1123. doi:10.1016/J.CELL.2007.10.054
101. X Sun, C Xu, SC Tang, et al. Let-7c blocks estrogen-activated Wnt signaling in induction of self-renewal of breast cancer stem cells. *Cancer Gene Ther*. 2016;23(4):83-89.  
doi:10.1038/CGT.2016.3
102. H Okuda, F Xing, PR Pandey, et al. miR-7 suppresses brain metastasis of breast cancer stem-like cells by modulating KLF4. *Cancer Res*. 2013;73(4):1434-1444.  
doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2037
103. H Zhang, K Cai, J Wang, et al. MiR-7, inhibited indirectly by lincRNA HOTAIR, directly inhibits SETDB1 and reverses the EMT of breast cancer stem cells by downregulating the STAT3 pathway. *Stem Cells*. 2014;32(11):2858-2868. doi:10.1002/STEM.1795
104. X Zhang, G Wan, S Mlotshwa, et al. Oncogenic Wip1 phosphatase is inhibited by miR-16 in the DNA damage signaling pathway. *Cancer Res*. 2010;70(18):7176-7186.  
doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0697
105. M Han, M Liu, Y Wang, et al. Antagonism of miR-21 reverses epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotype through AKT/ERK1/2 inactivation by targeting PTEN. *PLoS One*. 2012;7(6). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0039520
106. Yu F, Deng H, Yao H, Liu Q, Su F, Song E. Mir-30 reduction maintains self-renewal and inhibits apoptosis in breast tumor-initiating cells. *Oncogene* 2010 2929. 2010;29(29):4194-4204. doi:10.1038/onc.2010.167



107. M Ouzounova, T Vuong, PB Ancey, et al. MicroRNA miR-30 family regulates non-attachment growth of breast cancer cells. *BMC Genomics*. 2013;14. doi:10.1186/1471-2164-14-139
108. di Gennaro A, Damiano V, Brisotto G, et al. A p53/miR-30a/ZEB2 axis controls triple negative breast cancer aggressiveness. *Cell Death Differ* 2018 2512. 2018;25(12):2165-2180. doi:10.1038/s41418-018-0103-x
109. F Yu, Y Jiao, Y Zhu, et al. MicroRNA 34c gene down-regulation via DNA methylation promotes self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in breast tumor-initiating cells. *J Biol Chem*. 2012;287(1):465-473. doi:10.1074/JBC.M111.280768
110. L Kang, J Mao, Y Tao, et al. MicroRNA-34a suppresses the breast cancer stem cell-like characteristics by downregulating Notch1 pathway. *Cancer Sci*. 2015;106(6):700-708. doi:10.1111/CAS.12656
111. EY Park, E Chang, EJ Lee, et al. Targeting of miR34a-NOTCH1 axis reduced breast cancer stemness and chemoresistance. *Cancer Res*. 2014;74(24):7573-7582. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1140
112. QD Huang, SR Zheng, YJ Cai, et al. IMP3 promotes TNBC stem cell property through miRNA-34a regulation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(9):2688-2696. doi:10.26355/EURREV\_201805\_14965
113. P Bonetti, M Climent, F Panebianco, et al. Dual role for miR-34a in the control of early progenitor proliferation and commitment in the mammary gland and in breast cancer. *Oncogene*. 2019;38(3):360-374. doi:10.1038/S41388-018-0445-3
114. S Liu, SH Patel, C Ginestier, et al. MicroRNA93 regulates proliferation and differentiation of normal and malignant breast stem cells. *PLoS Genet*. 2012;8(6). doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.1002751
115. S Shyamasundar, JP Lim, BH Bay. miR-93 inhibits the invasive potential of triple-negative breast cancer cells in vitro via protein kinase WNK1. *Int J Oncol*. 2016;49(6):2629-2636. doi:10.3892/IJO.2016.3761
116. C Bao, J Chen, D Chen, et al. MiR-93 suppresses tumorigenesis and enhances chemosensitivity of breast cancer via dual targeting E2F1 and CCND1. *Cell Death Dis*. 2020;11(8). doi:10.1038/S41419-020-02855-6
117. Z Yang, Y Han, K Cheng, G Zhang, X Wang. miR-99a directly targets the mTOR

- signalling pathway in breast cancer side population cells. *Cell Prolif.* 2014;47(6):587-595. doi:10.1111/CPR.12146
118. Y Zhu, F Yu, Y Jiao, et al. Reduced miR-128 in breast tumor-initiating cells induces chemotherapeutic resistance via Bmi-1 and ABCC5. *Clin Cancer Res.* 2011;17(22):7105-7115. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0071
  119. X Kong, J Zhang, J Li, J Shao, L Fang. MiR-130a-3p inhibits migration and invasion by regulating RAB5B in human breast cancer stem cell-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;501(2):486-493. doi:10.1016/J.BBRC.2018.05.018
  120. F Chen, N Luo, Y Hu, X Li, K Zhang. MiR-137 Suppresses Triple-Negative Breast Cancer Stemness and Tumorigenesis by Perturbing BCL11A-DNMT1 Interaction. *Cell Physiol Biochem.* 2018;47(5):2147-2158. doi:10.1159/000491526
  121. S Cheng, Y Huang, C Lou, Y He, Y Zhang, Q Zhang. FSTL1 enhances chemoresistance and maintains stemness in breast cancer cells via integrin  $\beta$ 3/Wnt signaling under miR-137 regulation. *Cancer Biol Ther.* 2019;20(3):328-337. doi:10.1080/15384047.2018.1529101
  122. Wolfson B, Eades G, Zhou Q. Roles of microRNA-140 in stem cell-associated early stage breast cancer. *World J Stem Cells.* 2014;6(5):591. doi:10.4252/WJSC.V6.I5.591
  123. FM Troschel, N Bohly, K Borrmann, et al. miR-142-3p attenuates breast cancer stem cell characteristics and decreases radioresistance in vitro. *Tumour Biol.* 2018;40(8). doi:10.1177/1010428318791887
  124. Zhang Y, Xu B, Zhang X. Effects of miRNAs on functions of breast cancer stem cells and treatment of breast cancer. *Onco Targets Ther.* 2018;11:4263. doi:10.2147/OTT.S165156
  125. Shimono Y, Mukohyama J, Nakamura S, Minami H. MicroRNA Regulation of Human Breast Cancer Stem Cells. *J Clin Med.* 2016;5(1):2. doi:10.3390/JCM5010002
  126. H Wu, S Zhu, YY Mo. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer. *Cell Res.* 2009;19(4):439-448. doi:10.1038/CR.2009.18
  127. V Mayoral-Varo, A Calcabrini, MP Sanchez-Bailon, J Martin-Perez. miR205 inhibits stem cell renewal in SUM159PT breast cancer cells. *PLoS One.* 2017;12(11). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0188637
  128. H Fu, L Fu, C Xie, et al. miR-375 inhibits cancer stem cell phenotype and tamoxifen resistance by degrading HOXB3 in human ER-positive breast cancer. *Oncol Rep.*

- 2017;37(2):1093-1099. doi:10.3892/OR.2017.5360
129. Q Xie, S Wang, Y Zhao, Z Zhang, C Qin, X Yang. MiR-519d impedes cisplatin-resistance in breast cancer stem cells by down-regulating the expression of MCL-1. *Oncotarget*. 2017;8(13):22003-22013. doi:10.18632/ONCOTARGET.15781
  130. L Zhou, LC Zhao, N Jiang, et al. MicroRNA miR-590-5p inhibits breast cancer cell stemness and metastasis by targeting SOX2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017 Jan;21(1):87-94. PMID: 28121351
  131. R El Helou, G Pinna, O Cabaud, et al. miR-600 Acts as a Bimodal Switch that Regulates Breast Cancer Stem Cell Fate through WNT Signaling. *Cell Rep*. 2017;18(9):2256-2268. doi:10.1016/J.CELREP.2017.02.016
  132. C Lin, B Gao, X Yan, et al. MicroRNA 628 suppresses migration and invasion of breast cancer stem cells through targeting SOS1. *Onco Targets Ther*. 2018;11:5419-5428. doi:10.2147/OTT.S164575
  133. D Schwarzenbacher, C Klec, B Pasculli, et al. MiR-1287-5p inhibits triple negative breast cancer growth by interaction with phosphoinositide 3-kinase CB, thereby sensitizing cells for PI3Kinase inhibitors. *Breast Cancer Res*. 2019;21(1). doi:10.1186/S13058-019-1104-5
  134. J Chu, Y Li, X Fan, et al. MiR-4319 Suppress the Malignancy of Triple-Negative Breast Cancer by Regulating Self-Renewal and Tumorigenesis of Stem Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2018;48(2):593-604. doi:10.1159/000491888
  135. SM Johnson, H Grosshans, J Shingara, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005;120(5):635-647. doi:10.1016/J.CELL.2005.01.014
  136. YS Lee, A Dutta. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev*. 2007;21(9):1025-1030. doi:10.1101/GAD.1540407
  137. Q Li, Y Yao, G Eades, Z Liu, Y Zhang, Q Zhou. Downregulation of miR-140 promotes cancer stem cell formation in basal-like early stage breast cancer. *Oncogene*. 2014;33(20):2589-2600. doi:10.1038/ONC.2013.226
  138. Wu D, Zhang J, Lu Y, et al. miR-140-5p inhibits the proliferation and enhances the efficacy of doxorubicin to breast cancer stem cells by targeting Wnt1. *Cancer Gene Ther* 2018 263. 2018;26(3):74-82. doi:10.1038/s41417-018-0035-0
  139. DZ Liu, B Chang, XD Li, QH Zhang, YH Zou. MicroRNA-9 promotes the proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells via down-regulating FOXO1. *Clin Transl*

- Oncol.* 2017;19(9):1133-1140. doi:10.1007/S12094-017-1650-1
140. I Bahena-Ocampo, M Espinosa, G Ceballos-Cancino, et al. miR-10b expression in breast cancer stem cells supports self-renewal through negative PTEN regulation and sustained AKT activation. *EMBO Rep.* 2016;17(5):648-658. doi:10.15252/EMBR.201540678
141. SJ Song, L Poliseno, MS Song, et al. MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET-family-dependent chromatin remodeling. *Cell.* 2013;154(2):311. doi:10.1016/J.CELL.2013.06.026
142. Y Wu, W Shi, T Tang, et al. miR-29a contributes to breast cancer cells epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion via down-regulating histone H4K20 trimethylation through directly targeting SUV420H2. *Cell Death Dis.* 2019;10(3). doi:10.1038/S41419-019-1437-0
143. C Lv, F Li, X Li, et al. MiR-31 promotes mammary stem cell expansion and breast tumorigenesis by suppressing Wnt signaling antagonists. *Nat Commun.* 2017;8(1). doi:10.1038/S41467-017-01059-5
144. J Hu, J Xu, Y Wu, et al. Identification of microRNA-93 as a functional dysregulated miRNA in triple-negative breast cancer. *Tumour Biol.* 2015;36(1):251-258. doi:10.1007/S13277-014-2611-8
145. S Jiang, HW Zhang, MH Lu, et al. MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res.* 2010;70(8):3119-3127. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4250
146. J Zuo, Y Yu, M Zhu, et al. Inhibition of miR-155, a therapeutic target for breast cancer, prevented in cancer stem cell formation. *Cancer Biomark.* 2018;21(2):383-392. doi:10.3233/CBM-170642
147. Y Wang, Y Yu, A Tsuyada, et al. Transforming growth factor- $\beta$  regulates the sphere-initiating stem cell-like feature in breast cancer through miRNA-181 and ATM. *Oncogene.* 2011;30(12):1470-1480. doi:10.1038/ONC.2010.531
148. L Liu, W Zhou, CT Cheng, et al. TGF $\beta$  induces “BRCAness” and sensitivity to PARP inhibition in breast cancer by regulating DNA-repair genes. *Mol Cancer Res.* 2014;12(11):1597-1609. doi:10.1158/1541-7786.MCR-14-0201
149. N Muhammad, S Bhattacharya, R Steele, RB Ray. Anti-miR-203 suppresses ER-positive breast cancer growth and stemness by targeting SOCS3. *Oncotarget.* 2016;7(36):58595-

58605. doi:10.18632/ONCOTARGET.11193
150. AY Qin, XW Zhang, L Liu, et al. MiR-205 in cancer: an angel or a devil? *Eur J Cell Biol.* 2013;92(2):54-60. doi:10.1016/J.EJCB.2012.11.002
  151. T Tang, Z Yang, Q Zhu, et al. Up-regulation of miR-210 induced by a hypoxic microenvironment promotes breast cancer stem cells metastasis, proliferation, and self-renewal by targeting E-cadherin. *FASEB J.* 2018;32(12):6965-6981. doi:10.1096/FJ.201801013R
  152. B Li, Y Lu, L Yu, et al. miR-221/222 promote cancer stem-like cell properties and tumor growth of breast cancer via targeting PTEN and sustained Akt/NF- $\kappa$ B/COX-2 activation. *Chem Biol Interact.* 2017;277:33-42. doi:10.1016/J.CBI.2017.08.014
  153. CW Cheng, JC Yu, YH Hsieh, et al. Increased Cellular Levels of MicroRNA-9 and MicroRNA-221 Correlate with Cancer Stemness and Predict Poor Outcome in Human Breast Cancer. *Cell Physiol Biochem.* 2018;48(5):2205-2218. doi:10.1159/000492561
  154. R Adachi, S Horiuchi, Y Sakurazawa, T Hasegawa, K Sato, T Sakamaki. ErbB2 down-regulates microRNA-205 in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;411(4):804-808. doi:10.1016/J.BBRC.2011.07.033
  155. J Radojicic, A Zaravinos, T Vrekoussis, M Kafousi, DA Spandidos, EN Stathopoulos. MicroRNA expression analysis in triple-negative (ER, PR and Her2/neu) breast cancer. *Cell Cycle.* 2011;10(3):507-517. doi:10.4161/CC.10.3.14754
  156. Y Xu, T Brenn, ER Brown, V Doherty, DW Melton. Differential expression of microRNAs during melanoma progression: miR-200c, miR-205 and miR-211 are downregulated in melanoma and act as tumour suppressors. *Br J Cancer.* 2012;106(3):553-561. doi:10.1038/BJC.2011.568
  157. S Majid, AA Dar, S Saini, et al. MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer.* 2010;116(24):5637-5649. doi:10.1002/CNCR.25488
  158. Majid S, Saini S, Dar AA, et al. MicroRNA-205 Inhibits Src-Mediated Oncogenic Pathways in Renal Cancer. *Cancer Res.* 2011;71(7):2611-2621. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3666
  159. Karaayvaz M, Zhang C, Liang S, Shroyer KR, Ju J. Prognostic Significance of miR-205 in Endometrial Cancer. *PLoS One.* 2012;7(4):35158.

- doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0035158
160. C Qu, Z Liang, J Huang, et al. MiR-205 determines the radioresistance of human nasopharyngeal carcinoma by directly targeting PTEN. *Cell Cycle*. 2012;11(4):785-796. doi:10.4161/CC.11.4.19228
  161. F Petrocca, A Vecchione, CM Croce. Emerging role of miR-106b-25/miR-17-92 clusters in the control of transforming growth factor beta signaling. *Cancer Res*. 2008;68(20):8191-8194. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1768
  162. AL Guarnieri, CG Towers, DJ Drasin, et al. The miR-106b-25 cluster mediates breast tumor initiation through activation of NOTCH1 via direct repression of NEDD4L. *Oncogene*. 2018;37(28):3879-3893. doi:10.1038/S41388-018-0239-7
  163. R Kalluri, RA Weinberg. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420-1428. doi:10.1172/JCI39104
  164. A Dongre, RA Weinberg. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(2):69-84. doi:10.1038/S41580-018-0080-4
  165. MA Jafri, MH Al-Qahtani, JW Shay. Role of miRNAs in human cancer metastasis: Implications for therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol*. 2017;44:117-131. doi:10.1016/J.SEMCANCER.2017.02.004
  166. Pan G, Liu Y, Shang L, Zhou F, Yang S. EMT-associated microRNAs and their roles in cancer stemness and drug resistance. *Cancer Commun*. 2021;41(3):199-217. doi:10.1002/CAC2.12138
  167. KR Fischer, A Durrans, S Lee, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*. 2015;527(7579):472-476. doi:10.1038/NATURE15748
  168. P Mallini, T Lennard, J Kirby, A Meeson. Epithelial-to-mesenchymal transition: what is the impact on breast cancer stem cells and drug resistance. *Cancer Treat Rev*. 2014;40(3):341-348. doi:10.1016/J.CTRV.2013.09.008
  169. QX Luan, BG Zhang, XJ Li, MY Guo. MiR-129-5p is downregulated in breast cancer cells partly due to promoter H3K27m3 modification and regulates epithelial-mesenchymal transition and multi-drug resistance. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016 Oct;20(20):4257-4265. PMID: 27831649

170. Burk U, Schubert J, Wellner U, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep.* 2008;9(6):582. doi:10.1038/EMBOR.2008.74
171. WD Bai, XM Ye, MY Zhang, et al. MiR-200c suppresses TGF- $\beta$  signaling and counteracts trastuzumab resistance and metastasis by targeting ZNF217 and ZEB1 in breast cancer. *Int J cancer.* 2014;135(6):1356-1368. doi:10.1002/IJC.28782
172. Y Zhou, Y Hu, M Yang, et al. The miR-106b~25 cluster promotes bypass of doxorubicin-induced senescence and increase in motility and invasion by targeting the E-cadherin transcriptional activator EP300. *Cell Death Differ.* 2014;21(3):462-474. doi:10.1038/CDD.2013.167
173. MS Beg, AJ Brenner, J Sachdev, et al. Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs.* 2017;35(2):180-188. doi:10.1007/S10637-016-0407-Y
174. Foss FM, Querfeld C, Porcu P, et al. Phase 1 trial evaluating MRG-106, a synthetic inhibitor of microRNA-155, in patients with cutaneous t-cell lymphoma (CTCL). [https://doi.org/10.1200/JCO20173515\\_suppl7564](https://doi.org/10.1200/JCO20173515_suppl7564). 2017;35(15\_suppl):7564-7564. doi:10.1200/JCO.2017.35.15\_SUPPL.7564
175. van Zandwijk N, Pavlakis N, Kao S, et al. MesomiR 1: A Phase I study of TargomiRs in patients with refractory malignant pleural mesothelioma (MPM) and lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol.* 2015;26:ii16. doi:10.1093/ANNONC/MDV090.2
176. X Lin, W Chen, F Wei, BP Zhou, MC Hung, X Xie. Nanoparticle Delivery of miR-34a Eradicates Long-term-cultured Breast Cancer Stem Cells via Targeting C22ORF28 Directly. *Theranostics.* 2017;7(19):4805-4824. doi:10.7150/THNO.20771
177. YQ Ren, F Fu, J Han. MiR-27a modulates radiosensitivity of triple-negative breast cancer (TNBC) cells by targeting CDC27. *Med Sci Monit.* 2015;21:1297-1303. doi:10.12659/MSM.893974
178. W Chen, L Huang, C Hao, et al. MicroRNA-155 promotes apoptosis in SKOV3, A2780, and primary cultured ovarian cancer cells. *Tumour Biol.* 2016;37(7):9289-9299. doi:10.1007/S13277-016-4804-9
179. WT Kim, WJ Kim. MicroRNAs in prostate cancer. *Prostate Int.* 2013;1(1):2224-2228. doi:10.12954/PI.12011

180. J Jarry, D Schadendorf, C Greenwood, A Spatz, LC van Kempen. The validity of circulating microRNAs in oncology: five years of challenges and contradictions. *Mol Oncol*. 2014;8(4):819-829. doi:10.1016/J.MOLONC.2014.02.009
181. JC Brase, D Wuttig, R Kuner, H Sultmann. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer*. 2010;9. doi:10.1186/1476-4598-9-306
182. VJ Cookson, MA Bentley, BV Hogan, et al. Circulating microRNA profiles reflect the presence of breast tumours but not the profiles of microRNAs within the tumours. *Cell Oncol (Dordr)*. 2012;35(4):301-308. doi:10.1007/S13402-012-0089-1
183. L Pigati, SC Yaddanapudi, R Iyengar, et al. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One*. 2010;5(10). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0013515
184. MA Cortez, C Bueso-Ramos, J Ferdin, G Lopez-Berestein, AK Sood, GA Calin. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(8):467-477. doi:10.1038/NRCLINONC.2011.76
185. MV Iorio, M Ferracin, CG Liu, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65(16):7065-7070. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1783
186. C Blenkiron, LD Goldstein, NP Thorne, et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol*. 2007;8(10). doi:10.1186/GB-2007-8-10-R214
187. SF Tavazoie, C Alarcon, T Oskarsson, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*. 2008;451(7175):147-152. doi:10.1038/NATURE06487
188. HM Heneghan, N Miller, AJ Lowery, KJ Sweeney, J Newell, MJ Kerin. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg*. 2010;251(3):499-505. doi:10.1097/SLA.0B013E3181CC939F
189. W Zhu, W Qin, U Atasoy, ER Sauter. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. *BMC Res Notes*. 2009;2. doi:10.1186/1756-0500-2-89
190. Wang F, Hou J, Jin W, et al. Increased Circulating MicroRNA-155 as a Potential Biomarker for Breast Cancer Screening: A Meta-Analysis. *Molecules*. 2014;19(5):6282. doi:10.3390/MOLECULES19056282
191. AC Godfrey, Z Xu, CR Weinberg, et al. Serum microRNA expression as an early marker



for breast cancer risk in prospectively collected samples from the Sister Study cohort.  
*Breast Cancer Res.* 2013;15(3). doi:10.1186/BCR3428