

## $\Sigma XOAH\,\Theta ETIK\Omega N\, E\Pi I\Sigma THM\Omega N$

# TMHMA XHMEIA $\Sigma$

Τομέας Οργανικής Χημείας, Βιοχημείας και Φυσικών Προϊόντων

# ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

# Μελέτη ουθμιστικών μηχανισμών έκφοασης βιομοοίων, λειτουογικών ιδιοτήτων και μοοφολογικών χαοακτηοιστικών των καοκινικών κυττάοων μαστού

Ζωή Πιπερίγκου

Χημικός MSc

Επιβλέπων – Νίκος Κ. Καραμάνος, Καθηγητής

Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Χημείας

[Ζωή Πιπερίγκου]

© [2018] – Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος

Η υλοποίηση της Διδακτοφικής Διατφιβής συγχφηματοδοτήθηκε μέσω της Πφάξης «ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΥΠΟΤΡΟΦΙΩΝ ΓΙΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΣΠΟΥΔΩΝ» του Επιχειφησιακού Πφογφάμματος «Ανάπτυξη Ανθφώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», του ΕΣΠΑ 2014-2020 με τη συγχφηματοδότηση του Ευφωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.





## SCHOOL OF NATURAL SCIENCES

## DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Section of Organic Chemistry, Biochemistry and Natural Products

# PhD THESIS

Evaluation of the regulatory mechanisms governing biomolecules expression, functional properties and morphological characteristics of breast cancer cells

> Zoi Piperigkou Chemist MSc

Supervisor – Nikos K. Karamanos, Professor

Patras, 2018

University of Patras, Department of Chemistry

[Zoi Piperigkou]

© [2018] – All rights reserved

PhD Thesis has been co-financed by the Action "SCHOLARSHIPS PROGRAM FOR SECOND CYCLE POSTGRADUATE STUDIES" of the Operational Program "Human Resources Development, Education and Lifelong Learning", of NSRF 2014-2020 by the co-funding of the European Social Fund.



Στους γονείς μου, Σιμόνη και Κώστα

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο ερευνητικό Εργαστήριο Βιοχημείας, στην ερευνητική ομάδα: Βιοχημείας, Βιοχημικής Ανάλυσης και Παθοβιολογίας του Εξωκυττάριου Χώρου, του Τομέα Οργανικής Χημείας, Βιοχημείας και Φυσικών Προϊόντων, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών.

Μέρος της παρούσας διατριβής εκπονήθηκε στο εργαστήριο της ερευνητικής ομάδας του Καθηγητή PD Dr. rer. nat. Martin Götte, University Medical Centre of Münster, University of Münster, Γερμανία, στα πλαίσια του προγράμματος ERASMUS+ για σπουδές (2016-2017).

#### Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

ΝΙΚΟΛΑΟΣ Κ. ΚΑΡΑΜΑΝΟΣ, Καθηγητής (Επιβλέπων)
 Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών
 ΑΧΙΛΛΕΑΣ Δ. ΘΕΟΧΑΡΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής
 Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών
 ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΛΕΤΣΑΣ, Διευθυντής
 Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών (IBE), Ε.ΚΕ.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

#### Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

ΝΙΚΟΛΑΟΣ Κ. ΚΑΡΑΜΑΝΟΣ, Καθηγητής (Επιβλέπων)
 Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών
 ΑΧΙΛΛΕΑΣ. Δ. ΘΕΟΧΑΡΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής
 Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών
 ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΛΕΤΣΑΣ, Διευθυντής
 Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών (IBE), Ε.ΚΕ.Φ.Ε. «Δημόκριτος»
 ΜΑRΤΙΝ GÖTTE, Professor PD Dr. rer. nat.
 University of Münster, University Medical Center of Münster, Γερμανία
 ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Η. ΒΥΝΙΟΣ, Καθηγητής
 Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών
 ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ, Καθηγήτρια
 Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών
 ΣΠΥΡΙΔΩΝ Σ. ΣΚΑΝΔΑΛΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής
 Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών

This PhD Thesis has been conducted in the research Laboratory of Biochemistry, the Biochemistry, Biochemical Analysis and Matrix Pathobiology Research Group, Section of Organic Chemistry, Biochemistry and Natural Products, Department of Chemistry, University of Patras.

Part of this PhD Thesis has been conducted in the research Laboratory of Professor PD Dr. rer. nat. Martin Götte, University Medical Centre of Münster, University of Münster, Germany, during the ERASMUS+ studies exchange program (2016-2017).

#### The Advisory Committee

NIKOLAOS K. KARAMANOS, Professor (Supervisor)
 Department of Chemistry, University of Patras
 ACHILLEAS D. THEOCHARIS, Associate Professor
 Department of Chemistry, University of Patras
 DIMITRIOS KLETSAS, Director
 Institute of Biosciences and Applications (IBA), NCSR "Demokritos", Athens

#### **PhD Examination Committee**

NIKOLAOS K. KARAMANOS, Professor (Supervisor)
 Department of Chemistry, University of Patras
 ACHILLEAS D. THEOCHARIS, Associate Professor
 Department of Chemistry, University of Patras
 DIMITRIS KLETSAS, Director
 Institute of Biosciences and Applications (IBA), NCSR "Demokritos", Athens
 MARTIN GÖTTE, Professor Dr. rer. nat.
 University of Münster, University Medical Center of Münster, Germany
 DEMITRIOS H. VYNIOS, Professor
 Department of Chemistry, University of Patras
 EVANGELIA PAPADIMITRIOY, Professor
 Department of Pharmacy, University of Patras
 SYRIDON S. SKANDALIS, Assistant Professor
 Department of Chemistry, University of Patras

Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχουν δημοσιευθεί σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά με κριτές και έχουν παρουσιαστεί ως προφορικές ή/και αναρτημένες εργασίες σε διεθνή και ελληνικά επιστημονικά συνέδρια με κριτές.

#### Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά με κριτές

- I. Piperigkou, Z., Franchi, M., Götte, M., Karamanos, N.K., 2017. Estrogen receptor beta as epigenetic mediator of miR-10b and miR-145 in mammary cancer. *Matrix Biology J*, 64:94-111. [Impact factor (IF): 8.14, Featured in Faculty 1000 (F1000Prime) - https://f1000.com/prime/726362790]
- II. Piperigkou, Z., Karamanou, K., Bouris, P., Skandalis, S.S., Kletsas, D., Theocharis, A.D., Karamanos, N.K., 2016. Estrogen receptor beta as a key player in mediation of functional properties of aggressive breast cancer cells. *Matrix Biology J*, 56:4-23. (*IF*: 8.14)

#### Προφορικές ανακοινώσεις σε επιστημονικά συνέδρια με κριτές

- MicroRNA targeting as a regulatory mechanism of breast cancer cells with different estrogen receptor status. 6<sup>th</sup> FEBS Advanced Lecture Course: Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular targets (FEBS-MPST), Spetses, Greece, 2017
- Epigenetic alterations regulate the functional properties of breast cancer cells with different estrogen receptor status. 67<sup>th</sup> Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB) Conference, Ioannina, Greece, 2016
- MicroRNA targeting as a regulatory mechanism of breast cancer cells with different estrogen receptor status. 2<sup>nd</sup> Matrix Biology Europe (MBE) Conference, Athens, Greece, 2016
- The role of ERβ in regulation of functional properties and gene expression of matrix macromolecules in aggressive breast cancer cells. 5<sup>th</sup> FEBS Advanced Lecture Course: Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular targets (FEBS-MPST), Rhodes, Greece, 2015
- ERβ as a modulator of functional properties and gene expression of key matrix macromolecules in triple negative breast cancer cells. 3<sup>rd</sup> National Young Scientists Forum of Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB), Athens, Greece, 2015

Πρόσθετο συγγραφικό έργο σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά και κεφάλαια βιβλίων, κατά την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής

- Karamanos N.K., Piperigkou Z., Theocharis A.D., Hideto W., Franchi M., Baud S., Brezillon S., Götte M., Passi A., Vigetti D., Ricard-Blum S., Sanderson R., Neil T., Iozzo R.V. (2018) Proteoglycans: from chemical structure diversity to multifunctional cell regulation and therapeutics. *Chemical Reviews*. To be submitted. (*IF: 47.93*)
- Götte M., Spyrou A., Piperigkou Z., Karamanos N.K., Forsberg-Nilsson K. (2018) Proteoglycans and Glycosaminoglycans – multifunctional regulators of cancer progression. *Cancer Cell*. To be submitted. (*IF: 23.21*)
- Kyriakopoulou K., Kefali E., Piperigkou Z., Karamanos N.K. (2018) Advances in targeting epidermal growth factor receptor signaling pathway in mammary cancer: implications of estrogen receptors, epigenetics and extracellular matrix effectors. *Cellular Signalling*. To be submitted. (*IF: 3.94*)
- Piperigkou Z., Manou D., Karamanou K., Theocharis A.D. (2018) Strategies to Target Matrix Metalloproteinases as Therapeutic Approach in Cancer. In: Cal S., Obaya A. (eds) Proteases and Cancer. *Methods in Molecular Biology*, vol 1731. Humana Press, New York, NY
- Piperigkou Z., Theocharis A.D., Karamanos N.K. (2017) Insights into the key roles of epigenetics in matrix macromolecules-associated wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 129:16-36. (*IF: 11.76*)
- Karamanou K., Franchi M., Piperigkou Z., Perreau C., Maquart F.X., Vynios D.H., Brézillon S. (2017) Lumican effectively regulates the estrogen receptors-associated functional properties of breast cancer cells, expression of matrix effectors and epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature Scientific Reports*, 23(7):45138. (*IF: 5.23*)
- Afratis N., Karamanou K., Piperigkou Z., Vynios D.H., Theocharis A.D. (2017) The role of heparins and nano-heparins as therapeutic tool in breast cancer. *Glycoconjugate Journal*. 34(3):299-307. (*IF: 1.83*)
- Neagu M., Piperigkou Z., Karamanou K., Engin A.B., Docea A.O., Constantin C., Negrei C., Tsatsakis A. (2017) Protein bio-corona: critical issue in immune nanotoxicology. *Archives of Toxicology*, 91(3):1031-1048. (*IF: 5.98*)

- Piperigkou Z., Mohr B., Karamanos N.K., Götte M. (2016) Shed proteoglycans in the tumor stroma. *Cell and Tissue Research*, 365:643–655. (*IF: 3.68*)
- Piperigkou Z., Karamanou K., Engin A.B., Gialeli G., Nikitovic D., Vynios D.H., Pavao M.S.G., Golokhvast K.S., Shtilman M.I., Argiris A., Tsatsakis A. (2016) Emerging aspects of nanotoxicology in health and disease: from agriculture and food sector to cancer therapeutics. *Food and Chemical Toxicology*, 91:42-57. (*IF: 3.58*)
- Magoulas G., Rigopoulos A., Piperigkou Z., Gialeli C., Karamanos N.K., Takis P.G., Troganis A.N., Chrissanthopoulos A., Maroulis G., Papaioannou D. (2016) Synthesis and antiproliferative activity of two diastereomeric lignanamides serving as dimeric caffeic acid-L-DOPA hybrids. *Bioorganic Chemistry*, 66:132–144. (*IF: 2.42*)
- Piperigkou Z., Karamanou K., Afratis N., Bouris P., Gialeli C., Belmiro C., Pavao M.S.G., Vynios D.H. (2015) Biochemical and toxicological evaluation of nano-heparins in cell functional properties, proteasome activation and expression of key matrix molecules. *Toxicology Letters*, 240:32-42. (*IF: 3.52*)
- Bouris P., Skandalis S.S., Piperigkou Z., Afratis N., Karamanou K., Aletras A.J., Moustakas A., Theocharis A.D., Karamanos N.K. (2015) Estrogen receptor alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of specific matrix effectors and functional properties of breast cancer cells. *Matrix Biology J*, 43:42-60. (*IF*: 8.14)

#### Βραβεία - Υποτροφίες

- Poster Prize Award in the 6<sup>th</sup> FEBS-MPST Advanced Lecture Course, Spetses Greece, Sponsored by the Matrix Biology Ireland, 2017
- Recognized Reviewer Status for reviewing for the *Food and Chemical Toxicology Journal*, 2016
- Υποτροφία μετακίνησης για συμμετοχή στο Διεθνές Συνέδριο 6<sup>th</sup> FEBS-MPST Advanced Lecture Course, Spetses, Greece, από την Ελληνική Εταιρία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ), 2017
- Υποτροφία μετακίνησης για συμμετοχή στο Διεθνές Συνέδριο 2<sup>nd</sup> Matrix Biology Europe (MBE) Conference, Athens, Greece, από τη Γερμανική Εταιρία Μοριακής Βιολογίας (DGMB), 2016

Υποτροφίες μετακίνησης για συμμετοχή στα Συνέδρια της Ελληνικής Εταιρίας
 Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ), 2014-2017

### Κατά τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής συμμετείχα ενεργά στα παρακάτω εθνικά και διεθνή ερευνητικά προγράμματα:

- «Προηγμένες Ερευνητικές Δραστηριότητες στη Βιοϊατρική Τεχνολογία & Αγροδιατροφή» (MIS 5002469), Υποέργο «Προηγμένες Ερευνητικές Δραστηριότητες στη Βιοϊατρική Τεχνολογία & Αγροδιατροφή- Δυτική Ελλάδα» [ΒΙΤΑΔ-ΔΕ], που εντάσσεται στη «Δράση Στρατηγικής Ανάπτυξης Ερευνητικών και Τεχνολογικών Φορέων» και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης), Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ινστιτούτο Επιστημών Χημικής Μηχανικής (ITE-IEXMH, FORTH/ICE-HT), 2018
- Πράξη «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών για μεταπτυχιακές σπουδές δεύτερου κύκλου σπουδών» του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», του ΕΣΠΑ 2014-2020 με τη συγχρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου, 2018
- Horizon 2020 Action "Marie Skłodowska-Curie Research and Innovation Staff Exchange (RISE)", Project acronym: GLYCANC, "Matrix glycans as multifunctional pathogenesis factors and therapeutic targets in cancer", 2016-2017
- Short-term research grant from the German Academic Exchange Service (DAAD), 2016
- Δράση ERASMUS+ κινητικότητα για σπουδές του ακαδημαϊκού έτους 2015-2016
- THALES project. Investing in knowledge society through the European Social Fund (NSRF 2007-2013), Project acronym: BioCancerTalk "Intracellular crosstalk between ERα/β, EGF and IGF receptors in development and progression of breast cancer", 2014-2016

• Seventh Framework Program (FP7), Project acronym: NanoBarrier, "Extended self-life biopolymers for sustainable and multifunctional food packaging solutions", ITE-IEXMH, FORTH/ICE-HT, 2014-2015

# Ποόλογος

Κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής πολλές φορές σκέφτηκα τι θα γράψω σε αυτήν τη σελίδα. Όμως όλοι οι πρόλογοι που κατά καιρούς σκεφτόμουν κατέληγαν στο να θέλω να ευχαριστήσω μερικούς ανθρώπους που με βοήθησαν και μου συμπαραστάθηκαν κατά τη διάρκεια των χρόνων αυτών, γιατί η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής μπορεί να είναι μοναχική, ωστόσο ποτέ δεν μπορείς να τη διανύσεις μόνος σου. Ολοκληρώνοντας, λοιπόν, τη διδακτορική μου διατριβή και μετά από οκτώ χρόνια στο ερευνητικό εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών, θα ήθελα να αφιερώσω λίγα λόγια, εκφράζοντας ένα μεγάλο ευχαριστώ στους ανθρώπους που με βοήθησαν στην προσπάθειά μου αυτή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ, αν και φαντάζει λίγο, οφείλω στον επιβλέποντα μου, Καθηγητή κ. Νίκο Καραμάνο για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου αναθέτοντάς μου τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης, την άψογη συνεργασία και τις συμβουλές του σε επιστημονικό και προσωπικό επίπεδο, όποτε απευθύνθηκα σε αυτόν. Για τη βοήθειά του στο σχεδιασμό των πειραμάτων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Για την άμεση συγκατάθεσή του για τη συμμετοχή μου στο πρόγραμμα ERASMUS+ και για τη μετακίνησή μου στα πλαίσια του προγράμματος GLYCANC στη Γερμανία, διεξάγοντας εκεί μέρος της παρούσας μελέτης σε ένα νέο αντικείμενο, με στόχο την επιγενετική προσέγγιση της έρευνας. Για την ευκαιρία να συμμετάσχω σε μεγάλο αριθμό ελληνικών και διεθνών επιστημονικών συνεδρίων, σε πολλά από τα οποία συνέβαλα στη διοργάνωσή τους αποκτώντας σημαντική εμπειρία και στο θέμα αυτό. Ταυτόχρονα είχα τη δυνατότητα να παρουσιάσω τα αποτελέσματα της διατριβής μου με προφορικές και αναρτημένες ανακοινώσεις, ερχόμενη σε επαφή και ανταλλάσσοντας ιδέες με άλλους ερευνητές και διεθνώς καταξιωμένα πρόσωπα του πεδίου μας. Για όλες τις γνώσεις που αποκόμισα κοντά του και για την καθοριστική συμβολή του στη διαμόρφωση της ερευνητικής μου σκέψης και της επιστημονικής μου κατάρτισης που θεωρώ πως είναι ό,τι πολυτιμότερο μου πρόσφερε η διδακτορική διατριβή.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αχιλλέα Θεοχάρη για τις χρήσιμες συμβουλές του και τις πολύ ενδιαφέρουσες προτάσεις του, αλλά και για το γενικότερο ενδιαφέρον του όλα αυτά τα χρόνια. Η συνεργασία μας ήταν άψογη καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο Βιοχημείας και η βοήθειά του σε επιστημονικό και συμβουλευτικό επίπεδο ήταν πραγματικά πολύτιμη, συμβάλλοντας στη διαμόρφωση την επιστημονικής μου σκέψης. Ευχαριστώ θερμά τον Ερευνητή Α' κ. Δημήτρη Κλέτσα για τη συνεργασία μας που ξεκίνησε από τη διεξαγωγή της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Οι πολύτιμες συμβουλές του κατά τις συζητήσεις μας αυτά τα χρόνια, σε θέματα μοριακής βιολογίας και κυτταρικών καλλιεργειών, έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη και την ολοκλήρωση της διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης στον Καθηγητή, του Πανεπιστημίου του Münster, κ. Martin Götte, ο οποίος με δέχτηκε στο εργαστήριό του και ήταν πάντα πρόθυμος να βοηθήσει οποιαδήποτε στιγμή και για την ευκαιρία να ζήσω την εμπειρία της εργασίας σε υψηλών προδιαγραφών εργαστήρια του εξωτερικού, γνωρίζοντας νέους συνεργάτες.

Επιπλέον, ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Σπυρίδωνα Σκανδάλη, για τη συμμετοχή του στην επταμελή επιτροπή, για την αρμονική συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το διάστημα στο εργαστήριο, καθώς και για τις υποδείξεις και τις συμβουλές του, όποτε απευθύνθηκα σε αυτόν.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Βύνιο, για τη συμμετοχή του στην επταμελή επιτροπή, για τη διόρθωση του κειμένου, αλλά κυρίως για τη συνεργασία μας όλο αυτό το διάστημα και για τις επιστημονικές τους συμβουλές.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια του Τμήματος Φαρμακευτικής, κα. Ευαγγελία Παπαδημητρίου, για τη συμμετοχή της στην επταμελή επιτροπή και για την διόρθωση του κειμένου.

Ευχαριστώ τους Καθηγητές Burkhard Greve (University of Münster, Γερμανία) και Marco Franchi (University of Bologna, Ιταλία), καθώς και τον Dr. Christoph Riethmüller (Serend-ip, Münster, Germany) για την άριστη συνεργασία, συμβάλλοντας στη διεκπεραίωση μέρους των πειραματικών προσεγγίσεων της διδακτορικής διατριβής, καθώς και τα μέλη του ερευνητικού εργαστηρίου Γυναικολογίας της Πανεπιστημιακής Κλινικής του Πανεπιστημίου Münster.

Το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) για τη χρηματοδότηση μέρους της Διδακτορικής Διατριβής.

Οφείλω να ευχαριστήσω το φίλο μου και συνεργάτη Δρ. Παναγιώτη Μπούρη, για την ανιδιοτελή βοήθεια, την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου κατά την άψογη συνεργασία μας και κυρίως για την υπομονή του. Όλα τα στοιχεία ήταν καθοριστικά και μαζί με τις στιγμές που περάσαμε μαζί εντός και εκτός εργαστηρίου, συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, κάτι που με καθιστά πραγματικά ευγνώμων.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του ερευνητικού εργαστηρίου Βιοχημείας (Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών), για την πολύ καλή συνεργασία και το όμορφο κλίμα που δημιουργήσαμε στο χώρο του εργαστηρίου. Δε θα μπορούσα να ξεχάσω τους συνεργάτες των υπόλοιπων εργαστηρίων του Τμήματος Χημείας για τη συνεργασία και τις όμορφες στιγμές που περάσαμε.

Ευχαριστώ από καρδιάς τους φίλους μου, Φωτεινή Μοσχονά, Άννυ Δροσοπούλου, Ελένη Κόκκαλη, Φένια Ζούλα, Χρυσούλα Μονή, Σεβαστή Κουλουράκη, Ελένη Μιχαλιού, γιατί ήταν πάντοτε παρόντες όποτε κι αν τους χρειάστηκα, σε γέλιο, κλάμα, επιτυχία και απογοήτευση.

Τέλος, οφείλω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, Σιμόνη και Κώστα, που με στηρίζουν σε ό,τι και αν αποφασίσω, που πάντα κατανοούν τις ανάγκες μου, δείχνοντάς μου ότι με σκληρή δουλειά και υπομονή όλα μπορούν να γίνουν και που τα τελευταία χρόνια με τη συμπαράστασή τους κατάφερα πολλά. Στον αδελφό μου Νίκο για τη στήριξή του και γιατί ξέρω ότι είναι δίπλα μου σε κάθε στιγμή. Στους θείους μου, Γεωργία και Σταύρο, στον ξάδελφό μου Αντώνη και όλη την οικογένειά μου γιατί πάντα είναι εκεί για εμένα.

#### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι οιστρογονοϋποδοχείς (ERs) κατέχουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. Παρόλο που η συνεισφορά του ΕRa στη ρύθμιση της συμπεριφοράς των καρκινικών κυττάρων μαστού έχει μελετηθεί εκτενώς, οι βιολογικές δράσεις της ισομορφής του, ΕRβ, δεν είναι απολύτως αποσαφηνισμένες. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αποδείχθηκε ότι η καταστολή του ΕRβ στα επιθετικά, ΕRβθετικά, MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού (shERβ MDA-MB-231) οδήγησε σε αξιοσημείωτες φαινοτυπικές αλλαγές, καταστολή της διαδικασίας μετασχηματισμού από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό φαινότυπο (ΕΜΤ), καθώς και σε σημαντικές διαφοροποιήσεις στις ιδιότητες και στα επίπεδα γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης λειτουργικών συστατικών του εξωκυττάριου γώρου (ECM) των καρκινικών κυττάρων μαστού. Όπως παρατηρήθηκε από ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, η καταστολή του ERβ επηρεάζει σημαντικά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των shERβ MDA-MB-231 κυττάρων. Επιπλέον, η καταστολή του ΕRβ μειώνει την έκφραση των μεσεγχυματικών δεικτών fibronectin και vimentin, ενώ αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του επιθηλιακού δείκτη E-cadherin και τις κυτταρικές διεπαφές. Οι συγκεκριμένες αλλαγές ακολουθούνται από μειωμένα επίπεδα των λειτουργικών ιδιοτήτων που προάγουν την επιθετικότητα των συγκεκριμένων καρκινικών κυττάρων, όπως ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση, η διήθηση και η προσκόλληση. Αξίζει να σημειωθεί ότι η καταστολή του ERβ μειώνει τη μετανάστευση των MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών EGFR/IGF-IR και JAK/STAT. Επιπλέον, τα δεδομένα μας αποκάλυψαν ότι ο ERβ κατέχει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφικής και πρωτεϊνικής έκφρασης σημαντικών τελεστών του ΕCM, όπως των μεμβρανικών συνδεκανών και της ενδοκυττάριας σεργλυκίνης, πολλών MMPs, συστατικών του συστήματος ενεργοποίησης του πλασμινογόνου και υποδοχέων κινάσης τυροσίνης. Αυτά τα δεδομένα δείγνουν ξεκάθαρα ότι ο ΕRβ αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της κυτταρικής συμπεριφοράς και της σύστασης του ΕCM των υψηλού μεταστατικού δυναμικού, MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού, ανοίγοντας ένα νέο πεδίο έρευνας για την κατανόηση του ρόλου του και τη βελτίωση της φαρμακολογικής στόχευσης του μη-ορμονοεξαρτώμενου, επιθετικού καρκίνου του μαστού.

Οι επιγενετικές αλλαγές είναι υπεύθυνες για την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να μεταναστεύουν. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αποδείξαμε ότι η έκφραση

των ERs συνδέεται με τη διαφορική έκφραση πολλών miRNAs που σχετίζονται με την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού, στα MCF-7 και MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού, ενώ κυρίως τα miR-10b (ογκογενετικό miRNA) και miR-200b (αναστολέας του ΕΜΤ) φαίνεται να είναι εκείνα που εμπλέκονται στη ρύθμιση της επιθετικής συμπεριφοράς των MDA-MB-231 κυττάρων. Μάλιστα η έκφρασή τους διαμεσολαβείται από τη διεπικοινωνία των σηματοδοτικών μονοπατιών EGFR/IGF-IR με τη 17β-οιστραδιόλη (E2). Επιπλέον, η καλλιέργεια των ERα-θετικών, MCF-7, και ERβ-θετικών, MDA-MB-231, κυττάρων σε μέσο καλλιέργειας απουσία οιστρογόνων, έχει διαφορετικό αντίκτυπο στην έκφραση των παραπάνω miRNAs και στη συμπεριφορά αυτών των κυττάρων, γεγονός που εξηγεί τη στοχευμένη επίδραση της Ε2 στην έκφραση των miRNAs, αναλόγως της έκφρασης των ERs στα καρκινικά κύτταρα μαστού. Παράλληλα, η καταστολή του ERβ στα MDA-MB-231 κύτταρα οδήγησε σε σημαντικές αλλαγές έκφρασης συγκεκριμένων miRNAs, στα προφίλ συμπεριλαμβανομένων των miR-10b, miR-200b και miR-145 (ογκοκατασταλτικό miRNA). Η υπερέκφραση του miR-10b είτε η αποσιώπηση του miR-145 στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, αποκάλυψαν ότι τα συγκεκριμένα miRNAs ρυθμίζουν τις λειτουργικές ιδιότητες, το πρόγραμμα ΕΜΤ και την έκφραση σημαντικών τελεστών του ΕCM που είναι γνωστοί για την εμπλοκή τους στην επιθετικότητα του καρκίνου του μαστού. Τα δεδομένα έδειξαν ότι το miR-10b συμμετέχει ενεργά στη ρύθμιση των ιδιοτήτων, στην έκφραση δεικτών του ΕΜΤ και στη σηματοδότηση ERK1/2 στα shERβ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα, επηρεάζοντας έτσι τη σύσταση του ECM, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της επιθετικότητας των κυττάρων αυτών. Σημαντικότερη επίδραση παρουσιάζεται στη συνδεκάνη-1 και σε μόρια του πρωτεολυτικού καταρράκτη, κυρίως στις MMP2, MMP7, MMP9. Αντίστοιχα, η καταστολή του miR-145 επήγαγε σημαντικά την επιθετικότητα των shERβ MDA-MB-231 κυττάρων καθώς και τη διαδικασία ΕΜΤ. Επιπλέον, η καταστολή της έκφρασης του συγκεκριμένου miRNA οδήγησε σε σημαντικές μεταγραφικές και πρωτεϊνικές αλλαγές των ρυθμιστών του ECM, όπως του HER2 και πολλών MMPs, ενώ επήγαγε τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των ERK1/2 κινασών σε αυτά τα κύτταρα, υποδηλώνοντας τον κρίσιμο ρόλο του miR-145 στην ενεργοποίηση του συγκεκριμένου σηματοδοτικού μονοπατιού.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποδεικνύουν ότι οι αλλαγές που παρατηρούνται στην κυτταρική συμπεριφορά και στη σύσταση του ECM από την καταστολή του ERβ στα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού, είναι στενά

συνδεδεμένες με συγκεκριμένες επιγενετικές τροποποιήσεις σε επίπεδο miRNAs. Καταλήγοντας, η στόχευση των ERa/β-ρυθμιζόμενων miR-10b, miR-200b και miR-145 αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την έγκαιρη διάγνωση και την αποτελεσματική φαρμακολογική στόχευση του επιθετικού, μη-ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου του μαστού.

**Λέξεις κλειδιά:** Καρκίνος μαστού, Οιστρογονοϋποδοχείς, Οιστρογονοϋποδοχέας β, microRNAs, Μετασχηματισμός από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό φαινότυπο, Εξωκυττάριος χώρος, Κυτταρική σηματοδότηση, Μεταλλοπρωτεϊνάσες, Πρωτεογλυκάνες

#### ABSTRACT

Estrogen receptors (ERs) have pivotal roles in breast cancer growth and progression. Even though the contribution of ER $\alpha$  in the modulation of breast cancer cells' behavior is thoroughly studied, the biological functions of its isoform,  $ER\beta$ , are less elucidated. In the present doctoral thesis, we demonstrated that  $ER\beta$  suppression in the highly aggressive, ER $\beta$ -positive MDA-MB-231 breast cancer cells (shER $\beta$  MDA-MB-231) resulted in profound phenotypic changes, inhibition of EMT process and major changes in the properties as well as in gene and protein expression levels of certain functional matrix components of breast cancer cells in a 17-\beta-estradiol (E2)-independent manner. As observed by scanning electron microscopy, ER<sup>β</sup> suppression strongly affects the morphology of shER<sup>β</sup> MDA-MB-231 cells, which is followed by downregulated expression levels of the mesenchymal markers fibronectin and vimentin, whereas it increases the expression levels of epithelial marker E-cadherin and cell-cell junctions. These alterations are followed by reduced levels of cell functional properties that promote the aggressiveness of these cells, such as proliferation, migration, spreading capacity, invasion and adhesion. Notably, ERß suppression reduces the migration of MDA-MB-231 breast cancer cells via EGFR/IGF-IR and JAK/STAT signaling pathways. Moreover, our findings revealed that ER<sup>β</sup> has a crucial role in modulation of mRNA levels and protein expression of several matrix mediators, including the transmembrane syndecans and intracellular serglycin, several MMPs, plasminogen activation system components and receptor tyrosine kinases. These data clearly demonstrate that ER $\beta$  plays a crucial role in mediating cell behavior and ECM composition of the highly aggressive MDA-MB-231 cells and it opens a new area of research to further understand its role and to improve pharmaceutical targeting of the non-hormone-dependent breast cancer.

The epigenetic alterations are responsible for the ability of the tumor cells to metastasize. In the present study, we demonstrated that ER status is associated with distinct miRNA expression profiles in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells, and that mainly miR-10b (oncogenic miRNA) and miR-200b (EMT inhibitor) are the key regulators of MDA-MB-231 cell behavior. Notably, the expression profiles of these miRNAs are mediated through EGFR/IGF-IR crosstalk with E2. Moreover, growing ER $\alpha$ -positive, MCF-7, and ER $\beta$ -positive, MDA-MB-231, cells in estrogen-free medium resulted in a diverse impact on miRNA expression and the behavior of these cells,

suggesting the specific effect of E2 on the miRNAs expression profile, depending on the ER status of breast cancer cells. Specifically, ERβ suppression in MDA-MB-231 breast cancer cells results in significant changes in the expression profiles of specific miRNAs that regulate breast cancer progression, including miR-10b, miR-200b and miR-145 (tumor-suppressive miRNA). Enhanced miR-10b expression or miR-145 silencing in shER<sup>β</sup> MDA-MB-231 cells revealed that these miRNAs can regulate the functional properties, EMT program and expression of major ECM components known as modulators of breast cancer aggressiveness. Our data pinpointed that miR-10b is strongly implicated in the regulation of functional properties, expression of EMT markers and ERK1/2 signaling in shER<sup>β</sup> MDA-MB-231 cells, thus affecting ECM composition and subsequently increasing the aggressiveness of these cells. Syndecan-1 and the proteolytic milieu macromolecules, especially MMP2, MMP7 and MMP9, are the most affected among ECM macromolecules. Accordingly, the inhibition of miR-145 expression significantly increased the aggressiveness of shERβ MDA-MB-231 cells and induced EMT. Furthermore, miR-145 silencing resulted in striking changes in mRNA levels and protein expression of major ECM mediators, such as HER2 and several MMPs, whereas it significantly increased the phosphorylated levels of ERK1/2 kinases in these cells, suggesting the crucial role of miR-145 in this signaling pathway.

In conclusion, these novel data suggest that the alterations in cell behavior and in ECM composition caused by ER $\beta$  suppression in MDA-MB-231 cells are closely related to certain epigenetic miRNA-induced alterations. Targeting the ER $\alpha/\beta$ -regulated miR-10b, miR-200b and miR-145 serves as a promising tool for early diagnosis and pharmaceutical targeting in aggressive, non-hormone-dependent breast cancer.

**Keywords:** Breast cancer; Estrogen receptors; Estrogen receptor beta; microRNAs; Epithelial-to-mesenchymal-transition; Extracellular matrix; Cellular signaling; Matrix metalloproteinases; Proteoglycans

# ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΟΡΟΙ

AP-1	Activator protein -1
APS	Ammonium persulfate
Ago	Argonaute
ATCC	American type culture collection
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CCL-2	C-C motif chemokine ligand 2
CCR	CC motif chemokine receptor
CDK	Cyclin dependent kinase
cDNA	Complementary DNA
cGMP	cyclic guanidine monophosphate
<b>CMF-HBSS</b>	Sterile calcium- and magnesium-free Hank's balanced salt solution
CS	Chondroitin sulfate
CX3CR	C3XC motif chemokine receptor
CXCR	CXC motif chemokine receptor
DAPI	4',6'-diamidino-2-phenylindole
DBD	DNA-Binding Domain
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DS	Dermatan sulfate
E2	17β-estradiol
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	Epithelial-to-mesenchymal transition
ER	Estrogen receptor
ERE	Estrogen response elements
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FBS	Fetal bovine serum

FGF	Fibroblast growth factor
GAG	Glycosaminoglycan
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GAS6	Growth arrest-specific gene 6
GCPR	G-coupled protein receptor
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GRO	Growth-regulated protein alpha (CXCL-1)
HA	Hyaluronan
HAS	Hyaluronan synthase
Нер	Heparin
Hepes	4-(2-hydroxyehtl)-1-piperazineethenesulfonic acid
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HPSE	Heparanase
HR	Hormone receptor
HRP	Horseradish peroxidase
HS	Heparan sulfate
Hsp	Heat shock protein
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
HYAL	Hyaluronidase
IC50	Inhibitory concentration 50%
Ig	Immunoglobulin
IGF-I	Insulin-like growth factor-I
IGF-IR	Insulin-like growth factor-I receptor
IL	Interleukin
JAK	Janus kinase
kDa	Kilo Dalton
KS	Keratan sulfate
LBD	Ligand-binding domain
mAb	Monoclonal antibody
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEM	Modified Eagle's Medium
mER	Membrane estrogen receptor

MET	Mesenchymal-to-epithelial transition
MMPs	Matrix metalloproteinases
mRNA	Messenger RNA
miRNA	microRNA
MT-MMPs	Membrane type MMPs
MWCO	Molecular weight cut-off
ncRNA	Non-coding RNA
NF-ĸB	Nuclear factor kappa B
PAIs	Plasminogen activator inhibitors
PAS	Plasminogen activation system
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyde
PG	Proteoglycan
PR	Progesterone receptor
РН	Pleckstrin homology
PI3K	Phosphatidylinositol-3'-Kinase
PKB/AKT	Protein kinase B
PLCγ	Phosphoinositide phospholipase $C\gamma$
РТВ	Phosphotyrosine-binding
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RARa1	Retinoic acid receptor a1
RISC	RNA-induced silencing complex
rRNA	Ribosomal RNA
RTK	Receptor tyrosine kinase
α-SMA	Smooth muscle actin
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SH2	Src homology-2
shRNA	Short hairpin RNA
SLRP	Small leucine-rich proteoglycan
Sp-1	Specificity protein-1
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGFβ	Transforming growth factor $\beta$

TGFβR	Transforming growth factor $\beta$ receptor
TKI	Tyrosine kinase inhibitor
TIMPs	Tissue inhibitors of metalloproteinase
TNF	Tumor necrosis factor
tPA	Tissue plasminogen activator
uPA	Urokinase plasminogen activator
uPAR	Urokinase plasminogen activator receptor
UTR	Untranslated region
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
ZO-1	Zonula occludens-1

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή
Καρκίνος: χαρακτηριστικά γνωρίσματα
Καρκίνος του μαστού
Κατηγοριοποίηση του καρκίνου του μαστού41
Μετασχηματισμός από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό φαινότυπο
Οιστρογόνα και οιστρογονοϋποδοχείς
ER-διαμεσολαβούμενη κυτταρική σηματοδότηση48
Γενομικό σηματοδοτικό μονοπάτι
Μη-γενομικό σηματοδοτικό μονοπάτι 50
Ο ρόλος των ERs στον καρκίνο του μαστού
Εισαγωγή στο δίκτυο του εξωκυττάριου χώρου
Συστατικά του εξωκυττάριου χώρου: δομικά χαρακτηριστικά, αλληλεπιδράσεις και λειτουργίες
Πρωτεογλυκάνες και Γλυκοζαμινογλυκάνες – πολυλειτουργικοί ρυθμιστές της εξέλιξης του καρκίνου
Μεμβρανικές και ενδοκυττάριες πρωτεογλυκάνες63
Συνδεκάνες63
Γλυπικάνες64
Σεργλυκίνη
Υαλουρονικό οξύ
Ένζυμα αποικοδόμησης του ΕCM
Μεταλλοπρωτεϊνάσες
Σύστημα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου67
Φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές – Ιντερλευκίνες
Υποδοχείς αυξητικών παραγόντων – εμπλοκή στον καρκίνο του μαστού
Ο ρόλος των microRNAs στην επιγενετική ρύθμιση του ECM στον καρκίνο
Εισαγωγικά στοιχεία

Βιοσύνθεση και τρόπος δράσης των microRNAs74
MicroRNAs και ECM – σχέση δύο κατευθύνσεων
Επιγενετική ρύθμιση των συστατικών του ECM μέσω των miRNAs
miRNA-διαμεσολαβούμενη ρύθμιση των ERs στον καρκίνο του μαστού
Καινοτόμες κλινικές εφαρμογές στη στοχευμένη μεταφορά miRNAs
Σκοπός
Πειραματικό μέρος
Κυτταρικές καλλιέργειες
Κυτταρικές σειρές και συνθήκες καλλιέργειας95
Διαμολύνσεις των καρκινικών κυττάρων μαστού
Διαμολύνσεις των καρκινικών κυττάρων μαστού με ιικά σωματίδια shRNA96
Διαμολύνσεις των καρκινικών κυττάρων μαστού με αλληλουχίες miRNAs
Αντιδραστήρια και χημικοί αναστολείς
Ηλεκτρονική μικροσκοπία
Ηλεκτρονική μικροσκοπία ανάστροφης φάσης98
Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)
Λειτουργικές ιδιότητες
Μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τις μεθόδους WST-1 και MTT 99
Μέτρηση της δυνατότητας εξάπλωσης των κυττάρων
Μέτρηση της κυτταρικής κινητικότητας με την τεχνική επούλωσης πληγής 101
Προσδιορισμός της διηθητικής ικανότητας των κυττάρων σε κολλαγόνο τύπου Ι 102
Προσδιορισμός της ικανότητας προσκόλλησης των κυττάρων σε κολλαγόνο τύπου 1 
Μελέτη έκφρασης σε μεταγραφικό επίπεδο
Απομόνωση ολικού RNA και ανάλυση real-time PCR
Μελέτη πρωτεϊνικής έκφρασης
Ανοσοαποτύπωση western

Ανοσοφθορισμός
Κυτταρομετρία ροής (FACS)
Υπολογισμός της εκκρινόμενης IL-6 με την ποσοτική μέθοδο ELISA 112
Προσδιορισμός ενζυμικής δραστικότητας
Μέτρηση της ενζυμικής δραστικότητας των ΜΜΡ-2 και ΜΜΡ-9 με τη μέθοδο του ζελατινογραφήματος
Μέτρηση της ενζυμικής δραστικότητας των uPA και tPA με τη μέθοδο του καζεϊνογραφήματος
Μέθοδος υπολογισμού της ενζυμικής δραστικότητας της ΜΤ1-ΜΜΡ114
Στατιστική ανάλυση και σχεδιασμός εικόνων114
Αποτελέσματα
ΜΕΡΟΣ Ι. Ο ΕRβ αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή των λειτουργικών ιδιοτήτων, της κυτταρικής σηματοδότησης και της έκφρασης μακρομορίων του ECM στα επιθετικά καρκινικά κύτταρα μαστού
<ol> <li>Η καταστολή του ΕRβ επάγει αλλαγές στα κυτταρικά χαρακτηριστικά και σε δείκτες ΕΜΤ στα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού</li></ol>
<ol> <li>Η καταστολή του ΕRβ στα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού οδηγεί σε διαφοροποιημένες κυτταρικές λειτουργείες</li></ol>
<ol> <li>Η καταστολή του ΕRβ επηρεάζει τα επίπεδα μεταγραφικής και πρωτεϊνικής έκφρασης σημαντικών ρυθμιστών του ECM</li></ol>
3.1 Ο ΕRβ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεογλυκανών και του υαλουρονικού οξέος
3.2 Ο ERβ επάγει αλλαγές στα προφίλ έκφρασης των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων και ρυθμίζει την ενεργοποίηση του ERK σηματοδοτικού μονοπατιού 133
4. Ο ΕRβ ρυθμίζει την κυτταρική μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων μαστού μέσω της διεπικοινωνίας EGFR/IGF-IR και της ενεργοποίησης του JAK/STAT σηματοδοτικού μονοπατιού
5. Ο ΕRβ ρυθμίζει την έκφραση και τη δραστικότητα μακρομορίων του εξωκυττάριου χώρου ανεξαρτήτως της δράσης της Ε2 στα ΕRβ-κατεσταλμένα καρκινικά κύτταρα μαστού
6. Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός κυτταρικού κλώνου shERβ MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων

Συζήτηση-Συμπεράσματα	183
Βιβλιογραφία	199
ПАРАРТНМА І	221
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ ΤΗΣ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ	223
CURRICULUM VITAE OF THE AUTHOR	229
ПАРАРТНМА II	235
EXTENDED ABSTRACT OF THE DOCTORAL DISSERTATION	237
Abstract	245
Introduction	

Main Goals and Objectives	250
Materials and methods	251
Results	252
Conclusions and perspectives	. 259
Acknowledgements	264
References	265
# Εισαγωγή

## Καρκίνος: χαρακτηριστικά γνωρίσματα

Ο καρκίνος αποτελεί μια σημαντική αιτία θνησιμότητας παγκοσμίως, με περισσότερους από 100 θανάτους ανά 100.000 ασθενείς [1]. Αποτελεί ένα σύνολο παθολογικών καταστάσεων που αναπτύσσονται με την πάροδο του χρόνου και περιλαμβάνουν την ανεξέλεγκτη διαίρεση των κυττάρων του σώματος. Τα κύτταρα που δεν υφίστανται πλέον τους φυσιολογικούς περιορισμούς στον πολλαπλασιασμό τους συσσωρεύονται σταδιακά στον ιστό προέλευσης και σχηματίζουν ένα συμπαγή όγκο. Ο όγκος αυτός μπορεί να παραμείνει στον ιστό ή να διηθήσει γειτονικούς ιστούς, οπότε πλέον χαρακτηρίζεται ως κακοήθης. Σε αρκετές περιπτώσεις, ένας αριθμός καρκινικών κυττάρων εισέρχεται στο κυκλοφορικό σύστημα και μεταφέρεται σε απομακρυσμένους ιστούς του σώματος. Κατά τη διαδικασία αυτή, η οποία καλείται μετάσταση, τα καρκινικά κύτταρα εγκαθίστανται στο νέο ιστό και δημιουργούν εκεί νέους όγκους. Έχει πλέον αποκαλυφθεί ότι ο καρκίνος αποτελεί μια νόσο που περιλαμβάνει δυναμικές διαφοροποιήσεις στο γονιδίωμα, οι οποίες δεν τυγγάνουν επιδιόρθωσης. Οι παράγοντες που προκαλούν αυτές τις γονιδιακές εξαλλαγές είναι κυρίως περιβαλλοντικοί και περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τον τρόπο ζωής, το κάπνισμα, τη διατροφή και την συσσωρευμένη έκθεση σε ακτινοβολία. Επιπλέον, σε μερικά είδη καρκίνου, σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου διαθέτει η γενετική προδιάθεση και το οικογενειακό ιστορικό. Τα θεμέλια αυτής της γνώσης τέθηκαν με την ανακάλυψη των μεταλλάξεων που δημιουργούν τα ογκογονίδια με ενισχυμένη δράση και τα ογκο-κατασταλτικά γονίδια με υπολειπόμενη λειτουργία. Οι γενετικές αλλαγές προσδίδουν στα κύτταρα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, τα οποία περιλαμβάνουν έξι κύριες βιολογικές λειτουργίες που λαμβάνουν γώρα κατά τη διάρκεια της πολύπλοκης διαδικασίας εξέλιξης των ανθρώπινων όγκων. Τα γαρακτηριστικά αυτά δίνουν τη δυνατότητα εξορθολογισμένης οργάνωσης της πολυπλοκότητας των νεοπλασματικών ασθενειών και περιλαμβάνουν τα εξής στοιχεία: i) συνεχής σηματοδότηση που οδηγεί σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, ii) αποφυγή καταστολέων ανάπτυξης, iii) αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο, iv) ικανότητα απεριόριστης αντιγραφής, v) δυνατότητα αγγειογένεσης και vi) ενεργοποίηση των διαδικασιών διήθησης και μετάστασης (Εικόνα 1) [2]. Τα στοιχεία που έπονται των παραπάνω χαρακτηριστικών είναι η γονιδιακή αστάθεια, η οποία δημιουργεί τη γενετική ποικιλομορφία, επισπεύδοντας την απόκτησή τους, καθώς και η φλεγμονή, η οποία ενισχύει πολλές από τις καρκινικές λειτουργίες, όπως η μετάσταση. Μια εννοιολογική προσέγγιση που έλαβε χώρα την περασμένη δεκαετία προσέθεσε δύο

αναδυόμενα χαρακτηριστικά σε αυτήν τη λίστα: *i*) επαναπρογραμματισμός της ενέργειας που καταναλώνεται στο μεταβολισμό και *ii*) αντίσταση στο ανοσοποιητικό σύστημα [3]. Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι ο καρκίνος χαρακτηρίζεται ως μια εξαιρετικά ετερογενής και πολύπλοκη νόσος, ενώ μέχρι σήμερα αριθμούν περισσότερα από 100 διακριτά είδη καρκίνου και υπότυποι όγκων που μπορούν να βρεθούν στο εσωτερικό συγκεκριμένων οργάνων, ενώ ο καρκίνος του μαστού αποτελεί μια εκ των συνηθέστερων μορφών που απαντώνται παγκοσμίως.



Εικόνα 1. Τα βασικά χαρακτηριστικά του καρκίνου. Οι περισσότεροι αν όχι όλοι οι τύποι καρκινικών κυττάρων αποκτούν μέσω διακριτών μηχανισμών παρόμοιες λειτουργικές δυνατότητες κατά την ανάπτυξή τους, οι οποίες περιλαμβάνουν: ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, αποφυγή αναστολέων ανάπτυξης, ενεργοποίηση διήθησης και μετάστασης, αέναη αντιγραφή, επαγωγή αγγειογένεσης και αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο. Ανατύπωση με άδεια από την αναφορά [3]. Copyright 2011 Elsevier science & technology journals.

## Καρκίνος του μαστού

Εξαιρώντας τους καρκίνους του δέρματος, ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τον πιο κοινό τύπο καρκίνου που διαγιγνώσκεται στις γυναίκες στις Η.Π.Α. Επίσης, χαρακτηρίζεται ως η δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες, παγκοσμίως, ακολουθώντας τον καρκίνο του πνεύμονα. Αναφορικά με την επιδημιολογία της συγκεκριμένης νεοπλασίας, από πρόσφατη έρευνα που πραγματοποίησε η American Cancer Society, προέκυψε ότι συνέβησαν περίπου 232.340 νέες περιπτώσεις διηθητικού καρκίνου του μαστού και 39.620 θάνατοι στις γυναίκες των Η.Π.Α. Μία στις οκτώ γυναίκες στις Η.Π.Α. θα εμφανίσει καρκίνο του μαστού στη διάρκεια της ζωής της. Τα

ποσοστά εμφάνισης της νόσου αυξάνονται ελαφρώς στις Αφροαμερικανίδες, μειώνονται στις γυναίκες της Λατινικής Αμερικής, ενώ παραμένουν σταθερά στις λευκές γυναίκες, από το 2006 μέχρι το 2010. Ιστορικά, οι λευκές γυναίκες χαρακτηρίζονται από τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης της νόσου σε γυναίκες ηλικίας 40 ετών και γηραιότερες. Τα ποσοστά εμφάνισης αυξάνονται σε περιπτώσεις καρκίνων που είναι θετικοί σε οιστρογονοϋποδογείς (ERs), σε νεότερες λευκές γυναίκες, σε Λατινοαμερικάνες ηλικίας 60-70 ετών και σε όλες τις Αφροαμερικανίδες. Αντιθέτως, οι καρκινικοί όγκοι αρνητικοί στους ERs παρεκκλίνουν μεταξύ των περισσότερων ηλικιακών και φυλετικών ομάδων, γεγονός που αντικατοπτρίζει την ετερογένεια της νόσου και τη συσχέτιση με διάφορους παράγοντες, όπως η παρουσία των ογκογονιδίων BRCA1 και BRCA2, η παχυσαρκία, το κάπνισμα, ακόμα και ο αριθμός τοκετών. Επιπλέον, δεδομένα του Διεθνούς Οργανισμού Υγείας (World Health Organization) για το 2012 έδειξαν ότι στην Ευρώπη νόσησαν από καρκίνο του μαστού συνολικά 458.337 γυναίκες και στην Ελλάδα 4.934 [4]. Η εκτεταμένη και υψηλού επιπέδου έρευνα που πραγματοποιείται στο πεδίο της παθοβιολογίας του καρκίνου του μαστού έχει συμβάλει στην εξέλιξη των διαγνωστικών και θεραπευτικών προσεγγίσεων που επιτρέπουν την αυξημένη αποτελεσματικότητα έγκαιρη διάγνωση, την των στοχευμένων φαρμακευτικών αγωγών, τη μείωση των ποσοστών θνησιμότητας και τη βελτίωση του προσδόκιμου ζωής [5, 6].

#### Κατηγοριοποίηση του καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από σημαντική φαινοτυπική και γονοτυπική ετερογένεια [7]. Ιδιαίτερα σημαντική για το χαρακτηρισμό του καρκίνου του μαστού είναι η παρουσία των ERs και του υποδοχέα της προγεστερόνης (PR). Και οι δύο αυτές ομάδες ορμονών, έχουν μελετηθεί εκτεταμένα σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού και έχουν μεγάλη προγνωστική αξία. Έχουν βρεθεί δύο γενετικά διακριτοί και λειτουργικοί ERs, ο ERa και ο ERβ. Ο πιο καλά μελετημένος υποδοχέας στον καρκίνο του μαστού είναι ο υαστού είναι ο ERα, καθώς το 70% περίπου των περιστατικών καρκίνου του μαστού έχουν χαρακτηριστεί ως θετικοί στο συγκεκριμένο υποδοχέα [8]. Έτσι, η παρουσία του ελέγχεται σε κάθε περίπτωση, διότι έχει μεγάλη σημασία στην κατηγοριοποίηση, την πρόγνωση και θεραπεία σε αυτήν την κακοήθεια. Ασθενείς με όγκους θετικούς στον ERα τείνουν να έχουν πιο αργή εξέλιξη

της νόσου, ενώ οι ασθενείς που οι όγκοι τους είναι αρνητικοί παρουσιάζουν ταχύτερη υποτροπή και μεταστάσεις [9].

Η κατηγοριοποίηση του καρκίνου του μαστού βασίζεται στην παρουσία ή μη, μορίων τα οποία είναι σημαντικά για την ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου. Στα μόρια αυτά ανήκουν οι ERs, ο PRs, καθώς και ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (HER2). Οι συγκεκριμένοι βιολογικοί δείκτες κατατάσσουν τους κυτταρικούς τύπους του καρκίνου του μαστού σε τέσσερις κύριους υποτύπους που καθορίζουν το σχεδιασμό της κατάλληλης θεραπείας: *i*) luminal A (ER+/PR+/HER2-), με χαμηλό ή μέτριο βαθμό διαφοροποίησης, *ii*) luminal B (ER+/PR+/HER2+), με υψηλό βαθμό διαφοροποίησης, *iii*) επιθετικοί HER2-θετικοί όγκοι (ER-/PR-/HER2+) και *iv*) τριπλά αρνητικοί (ER-/PR-/HER2-) όγκοι με επιθετική συμπεριφορά και κακή πρόγνωση [10, 11].

Η πλειοψηφία των ΕRα-θετικών καρκίνων, ακόμη και αν ανταποκρίνεται στην αρχική θεραπεία με αντι-οιστρογονικούς παράγοντες, όπως η ταμοξιφένη, τελικά αναπτύσσουν αντίσταση στη συγκεκριμένη θεραπεία, τείνοντας να δώσουν μεταστάσεις [12]. Η αντίσταση στις εφαρμοζόμενες ορμονικές θεραπείες οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην πυροδότηση by-pass μηχανισμών, όπως η ενεργοποίηση των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα που ομοιάζει της ινσουλίνης (IGF-IR) και του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), σε συνδυασμό με τη διεπικοινωνία τους με το σηματοδοτικό μονοπάτι του ERα [13]. Σε αυτούς τους τύπους καρκίνου η διαδικασία της μετασχηματισμού των κυττάρων από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό φαινότυπο (EMT) αποτελεί ένα μείζον βιολογικό φαινόμενο, μέσω του οποίου τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν αυξημένες επιθετικές ιδιότητες [14].

# Μετασχηματισμός από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό φαινότυπο

Η διαδικασία ΕΜΤ περιγράφει το μηχανισμό κατά τον οποίο τα κύτταρα χάνουν τα επιθηλιακά τους χαρακτηριστικά και αποκτούν εντονότερες μεταναστευτικές ιδιότητες [15]. Αυτή η παροδική και αντιστρεπτή διαδικασία κατηγοριοποιείται σε τρεις υποτύπους, αναλόγως του βιολογικού και λειτουργικού σταδίου στο οποίο λαμβάνει χώρα. Ο τύπος 1 ΕΜΤ συμβαίνει σε όλα τα στάδια ανάπτυξης των οργάνων, ο τύπος 2 λαμβάνει χώρα κατά τη διαδικασία επούλωσης πληγής με την παραγωγή ινοβλαστών στην περιοχή του τραύματος και τέλος ο τύπος 3 ΕΜΤ εντοπίζεται κατά τη διαδικασία της μετάστασης καρκινικών όγκων, όπου παρατηρείται ο μετασχηματισμός των επιθηλιακών κυττάρων προς διηθητικά και μεταστατικά μεσεγχυματικά κύτταρα που εμπλέκονται στην εξέλιξη του καρκίνου, μέσω της ενδοαγγείωσης και τη μετάστασης σε απομακρυσμένους ιστούς. Το πρόγραμμα ΕΜΤ χαρακτηρίζεται από έντονη παραγωγή συστατικών του ΕCM και σημαντικές αλλαγές στη μεταγραφική και πρωτεϊνες, μακρομόρια του ΕCM, μεμβρανικές πρωτεϊνες, μόρια προσκόλλησης και πρωτεϊνες του κυτταροσκελετού [16].

Κατά τη διαδικασία ΕΜΤ (Εικόνα 2) τα χαμηλής κινητικότητας επιθηλιακά κύτταρα που αναπτύσσονται διατεταγμένα σε στοιβάδες και γαρακτηρίζονται από ισχυρές κυτταρικές διεπαφές, χάνουν τις στενές αυτές προσκολλητικές διασυνδέσεις και τα δεσμοσώματα που συμβάλλουν στη διατήρησή τους. Ανάμεσα στα μόρια που συμβάλλουν στη διατήρηση των επιθηλιακών χαρακτηριστικών ανήκουν τα παρακάτω: ακτίνη, α-ακτινίνη, β-catenin, E-cadherin, syndecan-1, laminins, desmogleins, desmocollin, προσκολλητικά μόρια διεπαφών (JAMs), occludin, plakoglobin, plakophilin, vinculin και zona occludens (ZO-1) [17]. Η αποσυναρμολόγηση των εξειδικευμένων επαφών κυττάρου-κυττάρου οδηγεί στην ανακατανομή των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού και στην αποδιοργάνωση της κυτταρικής «πολικότητας» από την κορυφή προς τη βάση των επιθηλιακών κυττάρων. Στο στάδιο αυτό μειώνεται σταδιακά η έκφραση των επιθηλιακών δεικτών, E-cadherin και β-catenin, διότι χάνονται οι κυτταρικές διεπαφές, ενώ ξεκινά η αύξηση της έκφρασης μεσεγγυματικών δεικτών, όπως της vimentin. Παράλληλα, επηρεάζεται η έκφραση των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών: ακτίνη, cytokeratins, S100A4 και ακτίνη των λείων μυικών κυττάρων (α-SMA).



Εικόνα 2. Κατά τη διαδικασία ΕΜΤ τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν αρχικά τις στενές διεπαφές (2) και παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στον κυτταροσκελετό (2). Εν συνεχεία, παρατηρείται η μεταγραφική μετατόπιση από την έκφραση επιθηλιακών δεικτών (π.χ. E-cadherin) προς την έκφραση μεσεγχυματικών πλέον δεικτών (π.χ. vimentin) (3). Τα μεσεγχυματικά κύτταρα εμφανίζουν έντονες μορφολογικές διαφοροποιήσεις και αποκτούν χαρακτηριστικά έντονης κινητικότητας και μετανάστευσης (4). Ανατύπωση από την αναφορά [18]. Copyright 2018 R&D Systems, Inc. All Rights Reserved.

Στη συνέχεια, παρατηρείται η λεγόμενη μεταγραφική μετατόπιση, κατά την οποία συμβαίνει η πλήρης καταστολή των επιθηλιακών δεικτών και η ενεργοποίηση των μεσεγχυματικών γονιδίων, η οποία ρυθμίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες snail και ZEB και συνοδεύεται από εμφανείς πλέον φαινοτυπικές και κυτταροσκελετικές αλλαγές. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των μεσεγχυματικών κυττάρων περιλαμβάνουν το επίμηκες σχήμα, την απουσία επαφών κυττάρου-κυττάρου και την παρουσία πολλών κυτταροπλασματικών προεκβολών που βοηθούν στην εδραίωση ενός επιθετικού φαινοτύπου. Επιπλέον, αυξάνεται περαιτέρω η έκφραση της vimentin και η εξωκυττάρια απόθεση της fibronectin. Οι μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται στο στάδιο αυτό είναι: snail1, snail2/slug, ZEB1, ZEB2 και Twist-1. Κατά το τελευταίο στάδιο της διαδικασίας ΕΜΤ τα κύτταρα αποκτούν σημαντικά αυξημένη κινητικότητα, η οποία συνοδεύεται από αυξημένα επίπεδα της N-cadherin, αυξημένη έκκριση MMPs και ιντεγκρινών (α5β6 και α5β1), εκτός των υπολοίπων μεσεγχυματικών δεικτών (π.χ. vimentin, fibronectin) [17]. Σημειώνεται ότι είναι δυνατόν, υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις, τα διαφοροποιημένα κύτταρα να

επαναφέρουν τις προσκολλητικές επαφές κυττάρου-κυττάρου. Αυτός ο μετασχηματισμός από μεσεγχυματικό σε επιθηλιακό φαινότυπο (MET) συνοδεύεται από τη μείωση των επιπέδων μεσεγχυματικών δεικτών και μεταγραφικών παραγόντων, όπως fibronectin, vimentin και snail, ακολουθούμενη από την αύξηση των επιθηλιακών δεικτών, όπως η E-cadherin [19].

Στον καρκίνο του μαστού έχει παρατηρηθεί ότι ΕRα-θετικοί όγκοι που αρχικά ανταποκρίνονται σε ενδοκρινείς θεραπείες, εμφανίζουν σταδιακά επιθετική συμπεριφορά και μορφολογικές αλλαγές. Ανάμεσα τους δύο ERs, η συνεισφορά του ΕRα στον επαναπρογραμματισμό του ΕΜΤ έχει μελετηθεί εκτενέστερα καθότι η πλειοψηφία (70%) των καρκινικών όγκων μαστού χαρακτηρίζονται ως ΕRα-θετικοί. Η αλληλεπίδραση του ERa, που διατηρεί την επιθηλιακή μορφολογία των καρκινικών κυττάρων μαστού, με διάφορα σηματοδοτικά μόρια που επάγουν τη διαδικασία ΕΜΤ οδηγεί στην απόκτηση επιθετικής συμπεριφοράς από τα καρκινικά κύτταρα. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια των TGF-β (αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού), Wnt, Notch και Hedgehog είναι εκείνα που εμπλέκονται κατά κύριο λόγο στη διαδικασία EMT. Χαρακτηριστικά, η παρουσία ERa καταστέλλει την κυτταρική σηματοδότηση κυρίως μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού που πυροδοτεί ο TGF-β και συμμετέχουν οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB και snail [20]. Επιπλέον, η καταστολή του ERα στα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα μαστού, MCF-7, επάγει τη διαδικασία EMT προσδίδοντας στα κύτταρα μεσεγχυματική μορφολογία και επιθετικά χαρακτηριστικά, ρυθμίζοντας την έκφραση κομβικών δεικτών ΕΜΤ, όπως E-cadherin, vimentin, fibronectin και snail [21]. Από την άλλη μεριά, ο ρόλος του ERβ στη ρύθμιση του EMT δεν έχει ακόμα πλήρως εξακριβωθεί και αυτό γιατί η παρουσία πολλών ισομορφών του φαίνεται να επηρεάζει τη δράση των υπολοίπων, οδηγώντας σε αμφιλεγόμενα συμπεράσματα σγετικά με τους μηγανισμούς ρύθμισης του ΕΜΤ.

## Οιστρογόνα και οιστρογονοϋποδοχείς

Τα οιστρογόνα, τα κύρια στεροειδή του γυναικείου φύλου, αποτελούν τάξη των στεροειδών ορμονών, η οποία περιλαμβάνει την οιστρόνη (E1), την οιστραδιόλη (E2) και την οιστρόλη (E3). Απουσία εγκυμοσύνης, οι επικρατέστερες μορφές οιστρογόνων είναι η οιστρόνη και η E2, ενώ η οιστρόλη επικρατεί κατά την εγκυμοσύνη [22]. Τα οιστρογόνα ελέγχουν πολλές κυτταρικές διεργασίες, μεταξύ αυτών την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των αναπαραγωγικών οργάνων. Συγκεκριμένα, η 17β-οιστραδιόλη είναι η πιο ισχυρή μορφή στεροειδών ορμονών που συναντάται στην κυκλοφορία και εμπλέκεται σε μεγάλο μέρος φυσιολογικών λειτουργιών που ποικίλουν, αναλόγως του σταδίου ανάπτυξης των αναπαραγωγικών οργάνων και εντοπίζονται στη ρύθμιση της ομοιόστασης του καρδιαγγειακού, μυοσκελετικού, ανοσοποιητικού και κεντρικού νευρικού συστήματος. Η Ε2 συνεισφέρει επίσης στην εδραίωση και την εξέλιξη πολλών νεοπλασιών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, του ενδομήτριου, των ωοθηκών και της μήτρας [23].

Οι πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών (NHRs) είναι μέλη της μεγάλης οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων που δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Στους NHRs συμπεριλαμβάνονται οι υποδοχείς ανδρογόνων, ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών, ο PR, ο υποδοχέας μεταλλοκορτικοειδών και οι ERs. Η δράση των NHRs εξαρτάται από τις στεροειδείς ορμόνες, οι οποίες προέρχονται από τη χοληστερόλη. Εξαιτίας της υδρόφοβης φύσης τους, οι στεροειδείς ορμόνες διαχέονται διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης, επιτρέποντας στα εξωκυττάρια σήματα να ρυθμίζουν ενδοκυτταρικές διαδικασίες, αναλόγως τον ιστό [24, 25].

Οι βιολογικές δράσεις των οιστρογόνων ελέγχονται στενά από τους ERs, οι οποίοι απαντώνται σε δυο ισομορφές, τον ERa και τον ERβ, και ενεργοποιούνται κατά κύριο λόγο από την E2, η οποία προσδένεται με παρόμοια συγγένεια και στους δύο ERs (K<sub>d</sub>= 0.2 nM vs 0.6 nM, αντίστοιχα) [26]. Εξαιτίας της δυσκολίας τους να ταυτοποιηθούν, αρχικά επικρατούσε η άποψη ότι οι στεροειδείς υποδοχείς δεν είχαν υποτύπους, γι' αυτό και ήταν γνωστή η παρουσία ενός μόνο ER. Το 1996, ο Kuiper και συνεργάτες ανακάλυψαν σε μία βιβλιοθήκη cDNA με προέλευση τον προστάτη αρουραίου, έναν νέο τύπο ER, ο οποίος ονομάστηκε ERβ, ενώ ο κλασσικός έως τότε ER, ονομάστηκε ERβ1) κλωνοποιήθηκε από τον Ogawa το 1998 και βρέθηκε να περιέχει 530 κατάλοιπα αμινοξέων και M<sub>r</sub>=59.2 kDa [28]. Και οι δύο ERs κωδικοποιούνται από δύο διακριτά

γονίδια που εκφράζονται, αναλόγως του ιστού, σε διαφορετικά επίπεδα. Το ανθρώπινο γονίδιο του ERa (*ESR1*) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 και περιλαμβάνει οκτώ εξόνια που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη μεγέθους 66 kDa και 595 αμινοξέων [29]. Ομοίως, το γονίδιο του ERβ (*ESR2*) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14, με οκτώ εξόνια που κωδικοποιούν την αντίστοιχη πρωτεΐνη μεγέθους 58.2 kDa και 530 αμινοξέων, όπως αναφέρθηκε παραπάνω [30].

Η στοιχειώδης δομή των δύο ERs είναι παρόμοια, ενώ παρουσιάζουν σχετικά χαμηλά επίπεδα ομολογίας της συνολικής τους αλληλουχίας (47%). Η Εικόνα 3 περιγράφει τη δομική συσγέτιση ανάμεσα στους ERa και ERβ. Η δομική οργάνωση των υποδοχέων περιλαμβάνει έξι λειτουργικές περιοχές (A-F) με διαφορετικούς βαθμούς συντηρημένων αλυσίδων. Η αμινο-τελική Α/Β περιοχή (NTD) που δεν είναι καλά συντηρημένη μεταξύ των δύο ισομορφών, χαρακτηρίζεται από τη λειτουργία της αυτόνομης διενεργοποίησης, AF-1 και AF-2, η οποία αποτελεί τη βασική διαφορά μεταξύ των δύο υποτύπων ERs. Το γεγονός ότι οι συγκεκριμένες περιογές παρουσιάζουν μόνο 30% ομολογία, μπορεί να εξηγεί το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τον ΕRβ είναι διαφορετικές από εκείνες που αλληλεπιδρούν με τον ERa [31]. Δεν έχει ταυτοποιηθεί ξεκάθαρη δευτεροταγής δομή για τη συγκεκριμένη περιοχή, ενώ δεν είναι διαθέσιμα ούτε δομικά δεδομένα. Καλύτερα χαρακτηρισμένα μέρη αποτελούν η υψηλά συντηρημένη (96%) C περιοχή που φιλοξενεί την κεντρική περιοχή πρόσδεσης DNA (DBD) και η διατηρημένη Ε περιοχή που διαθέτει την περιοχή δέσμευσης του προσδέτη (LBD), για τα οποία είναι διαθέσιμα αρκετά δομικά και λειτουργικά δεδομένα. Οι δύο εναπομείνασες περιοχές, D και F (ομολογία 30% και 18%, αντίστοιγα), ποικίλουν σε μέγεθος και ομολογία: η D περιογή θεωρείται πεπτίδιο σύνδεσης μεταξύ των DBD και LBD, ενώ η F αποτελεί την καρβοξυ-τελική προέκταση της LBD και φαίνεται να ρυθμίζει την ενεργοποίηση της γονιδιακής μεταγραφής. Τέλος, η πολυλειτουργική καρβοξυ-τελική περιοχή (Ε), στην οποία δεσμεύεται η Ε2, παρουσιάζει 56% ομολογία ανάμεσα στους δύο ERs [24, 32].



Εικόνα 3. Δομική συσχέτιση των ανθρώπινων ΕRα και ΕRβ. Οι περιοχές A-F αποτελούν την κλασική ονοματολογία των δομικά όμοιων αλληλουχιών αμινοζέων. Η ομολογία των αμινοζέων των αλυσίδων μεταξύ των δύο ERs εκφράζεται σε ποσοστό. Ανατύπωση με άδεια από την αναφορά [31]. Copyright 2000 Elsevier science & technology journals.

# ER-διαμεσολαβούμενη κυτταρική σηματοδότηση

Το 1997 διαπιστώθηκε για πρώτη φορά η ταχύτατη παραγωγή cAMP σε απόκριση στην E2, η οποία προήλθε από την πρόσδεση της E2 σε μία πρωτεΐνη-υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη. Κατά τις δεκαετίες 1980 και 1990, αυξάνονται οι αναφορές ότι η E2 ενεργοποιεί ταχύτατα πολλές διεργασίες, όπως τη ροή ιόντων ασβεστίου, την παραγωγή cAMP, την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C και των κινασών PKC και PKA. Η πρόσδεση της E2 σε κάποιον ER ήταν απαραίτητη προϋπόθεση στην πλειοψηφία των μελετών. Αυτά τα σηματοδοτικά γεγονότα είναι πιθανό να προκύπτουν από την ενεργοποίηση G πρωτεϊνών από την E2, κατατάσσοντας τους ERs στα μέλη της οικογένειας των GPCR υποδοχέων και εξηγώντας ότι οι ERs εντοπίζονται και στην κυτταρική μεμβράνη. Παρόλα αυτά δεν είναι ακόμα σαφές εάν οι ERs καλύπτουν την κυτταρική μεμβράνη, όπως συμβαίνει με τους κλασικούς 7TM υποδοχείς ή εάν οι ERs ενεργοποιούν άλλους GPCR υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη, οδηγώντας έμμεσα στην ενεργοποίηση G πρωτεϊνών. Μέσω ενεργοποίησης G πρωτεϊνών ή μέσω άλλων μηχανισμών, το σύμπλοκο E2/ER πυροδοτεί σηματοδοτικούς καταρράκτες που επηρεάζουν πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών [33].

Πλέον είναι γνωστό ότι ο εντοπισμός των ERs παρατηρείται κυρίως στον πυρήνα, ενώ εντοπίζονται επίσης σε μικρότερα ποσοστά στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στα

μιτοχόνδρια και στην κυτταρική μεμβράνη [34]. Η ενεργοποίηση των ERs πραγματοποιείται *i*) μέσω της εξειδικευμένης δέσμευσης ενός προσδέτη, όπως η E2, *ii*) μέσω της φωσφορυλίωσής τους σε συγκεκριμένες περιοχές, *iii*) ακόμα και με συνδυασμό των παραπάνω (**Εικόνα 4**). Η μεταγραφική ρύθμιση από τη σηματοδότηση των ERs αποτελεί μία ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία στην οποία συμμετέχει μεγάλος αριθμός ρυθμιστικών παραγόντων, ενώ σημαντικό ρόλο παίζει η διεπικοινωνία με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια [13, 35]. Οι ERs εκδηλώνουν τις δράσεις τους με παρόμοιο τρόπο, μέσω δύο διακριτών σηματοδοτικών μονοπατιών, το γενομικό και το μηγενομικό μονοπάτι.

### Γενομικό σηματοδοτικό μονοπάτι

Το κλασικό, ERE-εξαρτώμενο, σηματοδοτικό μονοπάτι των ERs αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό ρύθμισης των γονίδιων-στόχων των ERs. Σε αυτό τον τύπο σηματοδότησης η E2 δεσμεύεται αρχικά στους ERs, οι οποίοι βρίσκονται ως επί το πλείστον στον πυρήνα. Μετά την πρόσδεση, οι ERs υφίστανται σημαντικές διαμορφωτικές τροποποιήσεις και σχηματίζουν είτε ομοδιμερή (ERα-ERα, ERβ-ERβ) είτε ετεροδιμερή (ERα-ERβ), αλληλεπιδρώντας με άλλα ρυθμιστικά μόρια και τις heat shock πρωτεΐνες (Hsp). Στη συνέχεια τα ενεργοποιημένα διμερή εισέρχονται στον πυρήνα και δεσμεύονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA που είναι γνωστές ως ERE, επάγοντας τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων, προκειμένου να αυξήσουν ή να καταστείλουν τη γονιδιακή έκφραση. Η σύνδεση με το DNA γίνεται μέσω της DBD περιοχής, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ενώ ταυτόχρονα στρατολογούνται και άλλες πρωτεΐνες συν-ενεργοποιητές για να σχηματιστούν λειτουργικά ER σύμπλοκα, συμμετέχοντας στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (**Εικόνα 4**) [36].

Ένας ικανός αριθμός στοιχείων υποστηρίζει την ύπαρξη ενός ακόμα σηματοδοτικού μονοπατιού στο οποίο οι ERs ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων που στερούνται των στοιχείων ERE. Ο μηχανισμός αυτός αφορά στη διεπικοινωνία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως c-Fos/c-Jun, AP-1, Sp-1 και NF-κB, οι οποίοι προσδένονται στον υποκινητή γονιδίων-στόχων (**Εικόνα 4**) [37].

Επιπρόσθετα, οι ERs έχουν την ικανότητα να δρουν και ανεξάρτητα από την πρόσδεση υποστρώματος, μέσω της ενεργοποίησής τους με φωσφορυλίωση από αυξητικούς παράγοντες ή κυτταροκίνες που ενεργοποιούν άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια,

συμπεριλαμβανομένων και αυτών των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων όπως ο EGF, ο IGF και ο TGF-β, καθώς και παράγοντες οι οποίοι ρυθμίζουν τα επίπεδα κυτταρικής φωσφορυλίωσης όπως η PKA και η PKC [38]. Για παράδειγμα, ο ERa διαθέτει πολλές θέσεις φωσφορυλίωσης και αποτελεί μόριο-στόχο από πολλές κινάσες όπως οι ΜΑΡΚ, ΡΚΑ και ΡΚC. Πιο συγκεκριμένα, οι Ser 104/106,118 και 167 βρίσκονται στην Α/Β περιοχή του ΕRα που κωδικοποιεί τη μη-ορμονοεξαρτώμενη λειτουργία ενεργοποίησης της μεταγραφής AF-1. Όπως είναι φυσικό η φωσφορυλίωση αυτής της περιοχής μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην μεταγραφική δραστικότητα του ERa, καθώς επηρεάζει την ικανότητα διμερισμού του υποδογέα και την αλληλεπίδρασή του με μόρια συν-ενεργοποιητές σηματοδοτικών μονοπατιών. Επιπλέον παράδειγμα αποτελεί η ενεργοποίηση των καθοδικών του HER2 σηματοδοτικών μορίων, ERK1 και ERK2, τα οποία φωσφορυλιώνουν τους ERs, οδηγώντας στην ενεργοποίησή τους ανεξαρτήτως προσδέτη [39]. Η διεπικοινωνία των σηματοδοτικών μονοπατιών των ERs με αυτά των υποδοχέων κινασών τυροσίνης (RTKs), όπως του EGFR και του IGF-IR, είναι ένα αρκετά συχνό φαινόμενο το οποίο λειτουργεί ως μηχανισμός αντίστασης στις ενδοκρινείς θεραπείες στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού (Εικόνα 4) [13, 40].

#### Μη-γενομικό σηματοδοτικό μονοπάτι

Παρόλο που η Ε2 δρα κυρίως μέσω του γενομικού, ΕRE-εξαρτώμενου σηματοδοτικού μονοπατιού, έχουν αναφερθεί και εναλλακτικοί μηχανισμοί δράσης της Ε2, όπως το ταχύτατο (διάρκειας από δευτερόλεπτα έως μερικά λεπτά), μη-γενομικό μονοπάτι μέσω των ERs που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη (mERs) (Εικόνα 4). Η μετακίνηση των ERs στην κυτταρική μεμβράνη είναι συνήθως αποτέλεσμα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, ενώ συνήθως οφείλεται και στη δράση πρωτεϊνών-προσαρμογέων (π.χ. Shc) [41]. Ο συγκεκριμένος τρόπος δράσης συχνά είναι αποτέλεσμα ρύθμισης ροών ιόντων καθώς και απελευθέρωσης αγγειοδραστικών μορίων. Η μη-γενομική σηματοδότηση συχνά περιλαμβάνει διαμεσολάβηση διαφόρων σηματοδοτικών μορίων, όπως Ca<sup>2+</sup>, cAMP, φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης, μονοξειδίου του αζώτου (NO), αλλά και των ενδοκυττάριων κινασών Raf-1/MEK 1-2/ERK-1/2 MAP κινασών και PI3/Akt [42]. Πρόσφατα βρέθηκε ότι ένας GPCR υποδοχέας (GPR30) στην κυτταρική μεμβράνη εμπλέκεται στη μη-γενομική σηματοδότηση οιστρογόνων, επάγοντας την παραγωγή cAMP και cGMP και ενεργοποιώντας τα MAPK και PI3/Akt σηματοδοτικά μονοπάτια

που προσδίδουν στα οιστρογόνα την ιδιότητα της αντι-απόπτωσης [43, 44]. Μετά την πρόσδεση του υποστρώματος, οι ERs επάγουν την γρήγορη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Src και SHC, έχοντας ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλέγματος SHC-GRB2-SOS. Ο σχηματισμός αυτός οδηγεί στην ενεργοποίηση των Ras, Raf και MAPKs, καθώς και των ERK-1/2, JNK και p38. Τα μόρια αυτά στη συνέχεια μεταφέρονται στον πυρήνα και συμμετέχουν στην μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Ο αντιαποπτωτικός ρόλος των οιστρογόνων επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης των GPCRs και του μονοπατιού της Akt κινάσης [45].



**Εικόνα 4.** Σηματοδοτικά μονοπάτια της δράσης των ERs. Μέσω του κλασικού, γενομικού μονοπατιού, οι ERs ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων-στόχων μετά την αλληλεπίδρασή τους, μέσω των ERE περιοχών στο DNA, με πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. c-Fos, c-Jun, AP-1, Sp1). Οι ERs ενεργοποιούνται επίσης ανεξαρτήτου πρόσδεσης στην ERE περιοχή του γονιδίου, ή/και ανεξαρτήτως υποστρώματος, μέσω φωσφορυλίωσης από άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Στο μη-γενομικό σηματοδοτικό μονοπάτι, στρατολογούνται πολλά ρυθμιστικά μόρια, όπως: Ca<sup>2+</sup>, NO, RTKs, GPCRs και ενδοκυττάριες πρωτεϊνικές κινάσες (π.χ. PI3K/Akt, MAPK, PKA, PKC) και σηματοδοτικά μόρια (π.χ. cAMP). This image is a modification of QIAGEN's original, copyrighted image by Zoi Piperigkou. The original image may be found at www.QIAGEN.com/ch/shop/genes-and-pathways/pathway-details/?pwid=166, Πηγή:[46].

## Ο ρόλος των ERs στον καρκίνο του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί έναν τύπο νεοπλασίας που χαρακτηρίζεται ως εξαιρετικά πολύπλοκη με μεγάλο βαθμό ετερογένειας, η οποία οφείλεται κατά κύριο λόγο στις δράσεις πληθώρας βιομορίων. Η έκφραση και κατανομή των ΕRa και ERβ στον ιστό μαστού παρουσιάζει σημαντικές διαφορές. Συγκεκριμένα, από ανοσοϊστολογικές μελέτες αποκαλύπτεται ότι ο ERa εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα των επιθηλιακών (luminal) κυττάρων μαστού. Αντίθετα, η κατανομή του ERβ είναι ευρύτερη και εντοπίζεται στον πυρήνα τόσο των επιθηλιακών κυττάρων αλλά και των μυοεπιθηλιακών. Ασθενής χρώση του συγκεκριμένου ER παρατηρείται επίσης στα ενδοθηλιακά και στα λιπώδη κύτταρα, στα λεμφοκύτταρα και στα κύτταρα του στρώματος [47]. Το ισοζύγιο μεταξύ των ERa και ERβ αποτελεί στοιχείο κρίσιμης σημασίας τόσο για την ανάπτυξη όσο και για το σχεδιασμό της κατάλληλης θεραπείας του καρκίνου του μαστού, διότι η έκφρασή τους κατατάσσει τα καρκινικά κύτταρα

Το σηματοδοτικό μονοπάτι E2/ERa είναι ένα από τα σημαντικότερα μονοπάτια στον καρκίνο του μαστού, διότι το 70% των όγκων χαρακτηρίζονται ως ERa-θετικοί. Ο ERa είναι ο κύριος υπότυπος των ERs στο επιθήλιο του μαστού και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία του συγκεκριμένου αδένα, καθώς και στην εγκαθίδρυση, την ανάπτυξη, την εξέλιξη και τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, γι' αυτό και αποτελεί κομβικό μόριο για την ανάπτυξη φαρμακευτικών παραγόντων για την αντιμετώπιση της συγκεκριμένης νεοπλασίας [9, 48]. Παρόλο που η πλειοψηφία των ERa-θετικών όγκων αρχικά αποκρίνεται στην αντι-οιστρογονική θεραπεία (π.χ. ταμοξιφαίνη), τελικά αναπτύσσουν αντοχή σε αυτήν τη θεραπεία, χωρίς να παρουσιάσουν αλλαγή στο προφίλ έκφρασης του ER και είναι πιθανό να εμφανιστεί καρκίνος στην περιοχή του ενδομητρίου [49].

Γνωρίζοντας ότι τα οιστρογόνα και οι ERs ρυθμίζουν σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων μαστού, στον πρωταρχικό όγκο, έχει αναπτυχθεί μεγάλος αριθμός ενδοκρινών θεραπειών που βασίζεται *i*) στην αναστολή της σύνθεσης οιστρογόνων και *ii*) στην παρεμπόδιση της δράσης τους μέσω των υποδοχέων τους. Εξειδικευμένοι ρυθμιστές των ERs, όπως η ταμοξιφαίνη που εμποδίζει την πρόσδεση των οιστρογόνων στον ERa, εφαρμόζονται τα τελευταία 30 χρόνια στις γυναίκες με ERa-θετικούς όγκους [50]. Η αναστολή του ενζύμου αρωματάση αποτελεί το «gold standard» για την επικουρική ενδοκρινή θεραπεία του πρώιμου και του προχωρημένου

σταδίου καρκίνου του μαστού σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, οι οποίες εμφανίζουν ER-θετικούς όγκους. Οι αναστολείς (AIs) που έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται στην κλινική πρακτική, αφορούν στην αντιστρεπτή [anastrozole/Arimidex (AstraZeneca) και letrozole/Femara (Novartis)] και στη μη-αντιστρεπτή αναστολή του ενζύμου [exemestane/Aromasin (Pfizer)], οπότε σταματά η σύνθεση οιστρογόνων από τα πρόδρομα μόριά της (τεστοστερόνη) [51]. Οι συγκεκριμένοι αναστολείς τρίτης γενιάς επιδεικνύουν αυξημένη αποτελεσματικότητα και μεγαλύτερο διάστημα επιβίωσης χωρίς τη νόσο (disease-free survival), συγκριτικά με την ταμοξιφαίνη που χρησιμοποιείται ως αρχική θεραπεία του πρώιμου καρκίνου του μαστού. Το fulvestrant (Faslodex, AstraZeneca) αποτελεί ένα ακόμα φάρμακο αντι-οιστρογονικής ενδοκρινούς θεραπείας μεταστατικού καρκίνου του μαστού, το οποίο οδηγεί στην αποικοδόμηση του ΕRα και την απομάκρυνση του από τον πυρήνα και εφαρμόζεται μετά τη θεραπεία με ταμοξιφαίνη και AIs [52, 53].

Τα καρκινικά κύτταρα μαστού στα οποία απουσιάζει ο ΕRα συχνά εμφανίζουν περισσότερο επιθετικό φαινότυπο και υψηλή μεταστατικότητα, ενώ η σηματοδότησή του ρυθμίζει τη διαδικασία ΕΜΤ μέσω των ΕΜΤ-σχετιζόμενων μεταγραφικών παραγόντων [54, 55]. Σε αυτό το πλαίσιο, πρόσφατα αποδείξαμε ότι η καταστολή του ERa στα χαμηλής μεταστατικότητας καρκινικά κύτταρα μαστού, MCF-7, οδηγεί σε σημαντικές φαινοτυπικές αλλαγές που συνοδεύονται από διαφοροποιήσεις στη μεταγραφική και πρωτεινική έκφραση χαρακτηριστικών δεικτών του προγράμματος ΕΜΤ. Συνέπεια της καταστολής του ΕRα είναι τα κύτταρα αυτά να παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα πολλαπλασιασμού, μετανάστευσης και διήθησης, τα οποία επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων EGFR και HER2, αλλά και πολλών τελεστών του ECM, όπως MMPs/TIMPs και τα συστατικά ενεργοποίησης του πλασμινογόνου (uPA, tPA, PAI-1), μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού EGFR-ERK. Συνοψίζοντας, η καταστολή του ERa στα καρκινικά κύτταρα μαστού έχει ως αποτέλεσμα έναν πιθανό ΕΜΤ που χαρακτηρίζεται από κομβικές αλλαγές στα προφίλ έκφρασης συγκεκριμένων μακρομορίων του ECM, υπογραμμίζοντας το ρυθμιστικό τους ρόλο στην ενδοκρινή αντίσταση [21].

Αν και η συνεισφορά του ΕRα στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού έχει μελετηθεί εκτενώς, ο ρόλος της ισομορφής του, ΕRβ, παραμένει αμφιλεγόμενος. Οι ERα και ERβ παρουσιάζουν υψηλή ομολογία στην αλληλουχία τους, κυρίως στις περιοχές δέσμευσης DNA και πρόσδεσης της E2. Ωστόσο, οι μικρές δομικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ισομορφές των ERs (π.χ. AF-1) εξηγούν τις διαφορετικές και ανταγωνιστικές βιολογικές τους δράσεις, ρυθμίζοντας την κυτταρική συμπεριφορά κατά τη διαφοροποίηση και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. Βιβλιογραφικές αναφορές υποδηλώνουν ότι σε περιπτώσεις που εκφράζονται και οι δύο ERs, ο ERβ μειώνει τα επίπεδα πολλαπλασιασμού καθώς και το σχηματισμό όγκου που προκαλεί ο ERa, ενώ δύναται να ρυθμίζει την ενδογενή γονιδιακή έκφραση [56, 57]. Επιπλέον, ERβ-knockout ποντίκια παρουσιάζουν μειωμένη θνησιμότητα, θυλάκωση ωοθηκών και ανώμαλη κύηση, τονίζοντας το ρόλο του στον ομαλό αναπαραγωγικό φαινότυπο [58]. Σε ορισμένες περιπτώσεις όπου οι καρκινικοί όγκοι μαστού χαρακτηρίζονται από ανθεκτικότητα σε αντι-οιστρογόνα, τα επίπεδα έκφρασης του ERβ ενισχύονται [59].

## Εισαγωγή στο δίκτυο του εξωκυττάριου χώρου

Το σύνολο των κυττάρων των ιστών και των οργάνων ενός οργανισμού είναι ενσωματωμένα ή αγκυροβολημένα σε εξειδικευμένα ικριώματα τριών διαστάσεων (3D) τα οποία καλούνται εξωκυττάριοι χώροι (ECMs). Οι ECMs αποτελούν πολύπλοκα δίκτυα αποτελούμενα από διασυνδεδεμένα μακρομόρια. Παρέχουν το χώρο στον οποίο εδρεύουν τα κύτταρα, επηρεάζοντας τον κυτταρικό φαινότυπο και τις ιδιότητες, όπως τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την επιβίωση.

Οι μοριακές αλλαγές στο εσωτερικό των καρκινικών κυττάρων καθώς και η δυναμική αλληλεπίδραση των καρκινικών κυττάρων με το περιβάλλον στρώμα, το οποίο καλύπτεται από το μικροπεριβάλλον του όγκου, αποτελούν τις κινητήριες δυνάμεις για την εξέλιξη του καρκίνου αλλά και σημαντικά στοιχεία για θεραπευτικές προσεγγίσεις. Το μικροπεριβάλλον του όγκου είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για την εξέλιξη του καρκίνου. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλά στάδια της ανάπτυξης του καρκίνου μέσω της πολύπλοκης διεπικοινωνίας ανάμεσα στα καρκινικά κύτταρα και τα συστατικά του περιβάλλοντος στρώματος, κατευθύνοντας την πρόοδο της νόσου [60]. Το καρκινικό στρώμα αποτελείται από συστατικά του ECM, μεταξύ αυτών πρωτεογλυκάνες (PGs), διάφοροι τύποι κολλαγόνου, ινοσυνδετίνη, λαμινίνες, υαλουρονικό (HA), γλυκοπρωτεΐνες, καθώς και αυξητικούς παράγοντες (GFs), χημειοκίνες και κυτταροκίνες που αποθηκεύονται στον ECM. Ένας μεγάλος αριθμός κυτταρικών πληθυσμών εντοπίζεται στον ECM του καρκινικού στρώματος, όπως ινοβλάστες, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και ενδοθηλιακά κύτταρα, τα

οποία μαζί με τα καρκινικά κύτταρα είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των συστατικών του ECM [61]. Το καρκινικό στρώμα διαφέρει κατά πολύ από έναν φυσιολογικό ιστό αναφορικά με τη σύνθεση του ECM και τους κυτταρικούς πληθυσμούς που υπάρχουν σε αυτό. Καθώς οι όγκοι αναπτύσσονται, το καρκινικό στρώμα εξελίσσεται μέσω της διεπικοινωνίας μεταξύ των καρκινικών και των στρωματικών κυττάρων, η οποία καθοδηγεί τη γενικότερη αναδιαμόρφωση του ιστού προκειμένου να ρυθμιστεί η εξέλιξη του όγκου [61, 62]. Η αναδιαμόρφωση του ιστού χαρακτηρίζεται από αλλαγές στον αριθμό και τους τύπους των κυτταρικών πληθυσμών που διαθέτουν, οι οποίες με τη σειρά τους επηρεάζουν τη δομή και τη λειτουργία του ECM. Παραδείγματος χάριν, οι GFs που εκκρίνουν τα καρκινικά κύτταρα στρατολογούν και ενεργοποιούν κύτταρα του στρώματος, όπως ινοβλάστες, φλεγμονώδη και ενδοθηλιακά κύτταρα προκειμένου να συνθέσουν συστατικά του ECM, ρυθμιστές της φλεγμονής και να δημιουργήσουν νέα αιμοφόρα αγγεία. Επίσης, τα ενεργοποιημένα κύτταρα του στρώματος εκκρίνουν παράγοντες που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και τη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων, προωθώντας την εξάπλωση του όγκου. Σε γενικές γραμμές, ο αναδιοργανωμένος, προσωρινός ECM δημιουργείται διαθέτει που τόσο προσκολλητικές όσο και αντι-προσκολλητικές ιδιότητες και ομοιάζει στον ΕCM που παράγεται κατά τη διαδικασία επούλωσης πληγής και είναι εμπλουτισμένος σε γλυκοπρωτεΐνες, κολλαγόνα, ΗΑ, ένζυμα αποικοδόμησης του ΕCM, αυξητικούς παράγοντες (GFs), κυτταροκίνες και χημειοκίνες και προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κινητικότητα [63, 64]. Παρόλο που η σύσταση και η αρχιτεκτονική του φυσιολογικού ιστού εξουδετερώνουν τις ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων, ο αναδιοργανωμένος ECM στο καρκινικό στρώμα ενεργοποιεί τον καρκινικό κυτταρικό φαινότυπο και την επιθετικότητα [62]. Ο ΕCM παρέχει εξειδικευμένα σήματα στα κύτταρα, ρυθμίζοντας τη συμπεριφορά τους και ενεργοποιώντας βιολογικές διαδικασίες που είναι σημαντικές για την ομαλή ανάπτυξη των οργάνων και την ομοιόσταση των ιστών (Εικόνα 5). Οι λειτουργικές μεταλλάξεις και τροποποιήσεις των συστατικών του ECM έχουν συσχετιστεί με πολλές παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν την πολύπλοκη διεπικοινωνία ανάμεσα στα καρκινικά κύτταρα και το μικροπεριβάλλον του όγκου διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην εδραίωση της μετάστασης [65].



Εικόνα 5. Σχηματική επισκόπηση των ECMs, των συστατικών τους και των υποδοχέων κυτταρικής επιφάνειας. Οι ECMs κατατάσσονται σε δύο τύπους, τους ενδιάμεσους (interstitial) και τους περικυτταρικούς (pericellular). Η βασική μεμβράνη, ένας τύπος περικυτταρικού ECM, εντοπίζεται μεταζύ των επιθηλιακών κυττάρων και του συνδετικού ιστού. Αυτή η στοιβάδα αποτελείται από ένα δίκτυο κολλαγόνου τύπου IV και συστατικά του ECM, όπως λαμινίνη, ιντεγκρίνες και περλεκάνη. Τα επιθηλιακά κύτταρα είναι αγκυροβολημένα στις βασικές μεμβράνες μέσω των ημιδεσμοσωμάτων που σχηματίζονται από τις αλληλεπιδράσεις μεταζύ των ιντεγκρινών με τις λαμινίνες. Η αλληλεπίδραση μεταζύ των μακρομορίων δημιουργεί ένα δυναμικό και πολύπλοκο 3D δίκτυο. Τα κύτταρα προσδένονται στα συστατικά του ECM μέσω εξειδικευμένων κυτταρικών υποδοχέων και συν-υποδοχέων (ιντεγκρίνες, PGs κυτταρικής επιφάνειας και CD44) που μεταφέρουν το σήμα στα κύτταρα ρυθμίζοντας έτσι πολλές κυταρικές λειτουργίες. Ανατύπωση με άδεια από την αναφορά [61]. Copyright 2016 Elsevier science & technology journals.

# Συστατικά του εξωκυττάριου χώρου: δομικά χαρακτηριστικά, αλληλεπιδράσεις και λειτουργίες

# Πρωτεογλυκάνες και Γλυκοζαμινογλυκάνες – πολυλειτουργικοί ρυθμιστές της εξέλιξης του καρκίνου

Οι PGs αποτελούν τα πιο σημαντικά δομικά και λειτουργικά βιομακρομόρια των ιστών. Αποτελούνται από έναν πρωτεϊνικό κορμό πάνω στον οποίο βρίσκονται ομοιοπολικά συνδεδεμένες μία ή περισσότερες αλυσίδες GAGs, του ίδιου ή διαφορετικού τύπου, σε κατάλοιπα του πρωτεογλυκανικού πρωτεϊνικού σερίνης κορμού, μέσω τετρασακγαριτικής σύνδεσης, που αποτελείται από ξυλόζη (Xyl), δύο κατάλοιπα γαλακτόζης (Gal) και γλυκουρονικό οξύ (GlcA). Οι GAGs είναι μεγάλου μήκους, αρνητικά φορτισμένοι ετεροπολυσακχαρίτες που περιέχουν επαναλαμβανόμενους δισακχαριτικές μονάδες αποτελούμενες κυρίως από Ν-ακετυλιωμένες εξοζαμίνες [Νακετυλο-D-γαλακτοζαμίνη (GalNAc) ή Ν-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη (GlcNAc)] και ένα D-/L-εξουρονικό οξύ [D-GlcA ή L-ιδουρονικό (IdoA)]. Διαφορές στον τύπο του μονοσακγαρίτη στην επαναλαμβανόμενη μονάδα καθώς και το ποσοστό θείωσής τους, κατατάσσουν τις GAGs στις εξής κατηγορίες: υαλουρονικό οξύ (HA), θειική χονδροϊτίνη (CS), θειική δερματάνη (DS), ηπαρίνη (Hep), θειική ηπαράνη (HS) και θειική κερατάνη (KS). Το HA είναι η μόνη GAG που βιοσυντίθεται στην κυτταρική μεμβράνη και όχι στο σύμπλεγμα Golgi και δεν είναι συνδεδεμένη σε πρωτεϊνικό κορμό. Η KS στερείται ουρονικού οξέος και περιέχει γαλακτόζη στη δισακγαριτική δομική μονάδα της. Επιπλέον, οι GAGs είναι μεγάλου μήκους πολυμερή με ποικίλα μοριακά μεγέθη αναλόγως του τύπου τους και του ιστού προέλευσης και είναι υποκατεστημένες με θειικές ομάδες σε πολλές θέσεις, είτε στις υδροξυλομάδες των εξοζαμινών, της D-Gal και του εξουρονικού οξέος, είτε στην αμινομάδα της Dγλυκοζαμίνης (κυρίως στη Hep, ένα υψηλά θειωμένο ανάλογο της HS και σε μικρότερο βαθμό στη HS). Το HA είναι η μόνη GAG που δεν είναι υποκατεστημένη με θειικές ομάδες (Εικόνα 6) [66]. Συνολικά, κάθε αλυσίδα GAG είναι ένα μωσαϊκό δισακχαριτών με μέγεθος και δομή που ποικίλει, ο συνδυασμός των οποίων δημιουργεί ένα εξαιρετικά πολύπλοκο μοτίβο που είναι διακριτό για κάθε ξεχωριστή αλυσίδα [67, 68].

Οι PGs εντοπίζονται ενδοκυτταρικά και στην κυτταρική επιφάνεια, ωστόσο είναι άφθονες και στους ECMs. Αλληλεπιδρούν με μεγάλο αριθμό GFs, κυτταροκινών και χημειοκινών, υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας και μόρια του ECM, είτε μέσω του πρωτεϊνικού τους κορμού, είτε, κυρίως, μέσω των πλευρικών αλυσίδων GAGs, συμμετέχοντας σε πληθώρα κυτταρικών ιδιοτήτων όπως η κυτταρική σηματοδότηση, ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση, η διαφοροποίηση, η απόπτωση και η προσκόλληση [69]. Η δομική ποικιλομορφία των αλυσίδων GAG στον πρωτεϊνικό κορμό των PG που είναι αποτέλεσμα επιπλέον θείωσης των υδροξυλομάδων, ο μεγάλος αριθμός GAGs που συνδέονται στις PGs και η κατανομή των PGs, είναι στοιχεία που εξηγούν τις σπουδαίες PG-διαμεσολαβούμενες βιολογικές λειτουργίες. Οι PGs και οι GAGs αποτελούν πολυλειτουργικά μόρια συμμετέχοντας στην οργάνωση των ιστών σε φυσιολογικές καταστάσεις, αλλά και στην εξέλιξη πολλών ασθενειών, καθώς η έκφραση και η δομή τους τροποποιείται κατά την αναδιαμόρφωση του ECM σε όλες τις παθολογίες [70-72]. Επίσης, πρόσφατες μελέτες περιγράφουν ότι οι επιγενετικές τροποποιήσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση και τη λειτουργία των GAGs/PGs [73, 74]. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, κατανοούμε γιατί οι PGs αποτελούν καινοτόμους βιοδείκτες σε πολλές περιπτώσεις νεοπλασιών και εφαρμόζονται τόσο στη διαγνωστική όσο και σε θεραπευτικές προσεγγίσεις [75].



Εικόνα 6. (Η λεζάντα της εικόνας παρατίθεται στην επόμενη σελίδα).

Εικόνα 6. Οι κύριοι δισακχαρίτες των GAGs και οι περιοχές θείωσης. Οι GAGs, CS, DS, HS και Ηερ είναι συνδέονται ομοιοπολικά σε κατάλοιπο σερίνης του PG κορμού μέσω μίας κοινής τετρασακχαριτικής σύνδεσης, Xyl-Gal-Gal-GlcA. Το HA δε συνδέεται σε PG κορμό, ενώ δε διαθέτει θέσεις θείωσης. Η KS I συνδέεται σε κατάλοιπο L-Asn μέσω N-γλυκοζιδικής σύδεσης, η KS II σε κατάλοιπο L-Ser ή L-Thr μέσω Ο-γλυκοζιδικού δεσμού, ενώ η KS III σε κατάλοιπο L-Ser με Ο-γλυκοζιδική σύνδεση. Πηγή: [66].

Αναλόγως του κυτταρικού και υποκυτταρικού τους εντοπισμού, της ομολογίας της πρωτεϊνικής αλυσίδας και της παρουσίας ξεχωριστών πρωτεϊνικών μοτίβων, οι PGs κατατάσσονται σε τέσσερις οικογένειες: ενδοκυττάριες, κυτταρικής επιφάνειας, περικυτταρικές-βασικής μεμβράνης και εξωκυττάριες. Οι μεμβρανικές PGs είτε διαχέονται στην πλασματική μεμβράνη (συνδεκάνες, CSPG, betaglycan, phosphacan και η «μερικής απασχόλησης» PG, CD44), είτε είναι αγκυροβολημένες μέσω ενός γλυκοφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης-GPI (γλυπικάνες). δεσμού Η οικογένεια των περικυτταρικών PGs αποτελείται από την περλεκάνη, την αγκρίνη και από τα κολλαγόνα τύπου XV και XVIII. Οι εξωκυτταρικές PGs είναι συνήθως εκκρινόμενες [hyalectans, small-leucine-rich PGs (SLRPs), testicans/SPARC/osteonectin CWCV και Kazal-like domain (SPOCK)], ενώ κάποιες PGs, όπως οι συνδεκάνες, αποικοδομούνται πρωτεολυτικά και αποσπώνται από την κυτταρική επιφάνεια (Εικόνα 7) [70, 76].



Εικόνα 7. Απεικόνιση του φυσιολογικού ιστού και του καρκινικού στρώματος, καθώς και των βασικών αλληλεπιδράσεων και των λειτουργιών των PGs. Ο φυσιολογικός ιστός αποτελείται κυρίως από ECM πλούσιο σε κολλαγόνο και SLRPs που συνδέονται με ίνες κολλαγόνου και μικρά σύμπλοκα HA-versican. Αυτός ο ECM υποστηρίζει την προσκόλληση των στρωματικών κυττάρων ελέγχοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση. Η διεπικοινωνία ανάμεσα στα καρκινικά και τα στρωματικά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός προσωρινού ECM που είναι πλούσιος σε PGs, όπως SLRPs (decorin, fibromodulin, lumican), hyalectans (versican), περικυτταρικές PGs (perlecan), αποικοδομημένες PGs κυτταρικής επιφάνειας (syndecans) και ενδοκυττάριες PGs (σεργλυκίνη). Οι PGs του ECM, όπως η versican, αλληλεπιδρούν με το HA σχηματίζοντας μεγάλα συσσωματώματα, αλλά και με τον EGFR, προάγοντας την κυτταρική κινητικότητα και τον πολλαπλασιασμό. Ο ρόλος της κάθε PG αναφέρεται στο κάτω μέρος του σχήματος. Ανατύπωση με άδεια από την αναφορά [69]. Copyright 2017 Elsevier science & technology journals.

# Μεμβρανικές και ενδοκυττάριες πρωτεογλυκάνες

#### Συνδεκάνες

Οι συνδεκάνες ανήκουν στην οικογένεια των διαμεμβρανικών HSPGs και αποτελούνται από τέσσερα μέλη (συνδεκάνες-1, -2, -3 και -4) (Πίνακας 1) [70]. Αρχικά, οι συνδεκάνες συσχετίστηκαν με την κυτταρική επιφάνεια, ωστόσο αποκαλύφθηκε ότι ο εντοπισμός τους μπορεί να είναι κυτταροπλασματικός, ακόμα και πυρηνικός [77]. Οι συνδεκάνες αλληλεπιδρούν με GFs και τους αντίστοιχους υποδοχείς τους και συνεισφέρουν στην οργάνωση των μικροϊνιδίων του κυτταροσκελετού, στην κυτταρική μετανάστευση και προσκόλληση. Τα μόρια αυτά ρυθμίζουν την κυτταρική προσκόλληση στον ECM πυροδοτώντας τον σχηματισμό εστιακών προσφύσεων και κυτταρικών διεπαφών, μέσω σηματοδοτικών δικτύων που ρυθμίζουν πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως η αποκατάσταση ιστού, η επούλωση πληγής και το στρώμα καρκινικών όγκων [78]. Μία πρόσφατη μελέτη σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού δείχνει ότι οι συνδεκάνες ρυθμίζουν τα κανάλια Ca<sup>2+</sup> των διαμεμβρανικών υποδοχέων TRPCs, μέσω φωσφορυλίωσης της κυτταροπλασματικής πρωτεϊνικής κινάσης C α, για τον έλεγχο της κυτταρικής προσκόλλησης και της διαμόρφωσης του κυτταροσκελετού [79]. Επιπρόσθετα, η λειτουργία των συνδεκανών μπορεί να τροποποιηθεί από την αποικοδόμηση της εξωκυττάριας περιοχής τους από μόρια αποικοδόμησης του ECM, όπως ηπαρινάση (HPSE) και MMPs, που μετατρέπουν τους μεμβρανικούς αυτούς συνυποδοχείς σε διαλυτά μόρια με ρυθμιστική δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων και του παρακείμενου στρώματος [80, 81].

Σε αυτό το πλαίσιο, η έκφραση των συνδεκανών τροποποιείται σημαντικά κατά τη διαφοροποίηση και σε πληθώρα παθολογικών καταστάσεων, όπως ο καρκίνος, όπου σε πολλές περιπτώσεις συσχετίζεται με την πρόγνωση της νόσου [82, 83]. Η απουσία της μεμβρανικής συνδεκάνης-1 σχετίζεται άμεσα με την εξέλιξη πολλών τύπων καρκίνου, όπως εγκεφάλου, αυχένα, γαστρικού και πνεύμονα [84]. Από την άλλη μεριά, η έκφραση της συνδεκάνης-1 σε μεταστατικές καρκινικές σειρές μαστού, συγκριτικά με τις λιγότερο μεταστατικές και με καλύτερη πρόγνωση [85]. Αναφορικά με τη διαλυτή συνδεκάνη-1, αυξημένα επίπεδα στο μικροπεριβάλλον του όγκου έχουν συσχετιστεί με την εξέλιξη του όγκου, δρώντας έτσι ως αρνητικός ρυθμιστής σε πολλές νεοπλασίες [86, 87]. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι οι HSPGs αλληλεπιδρούν με RTKs και ιντεγκρίνες. Σε πρόσφατες μελέτες, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της συνδεκάνης-2 και -4 και η διεπικοινωνία τους με τους υποδοχείς EGFR και IGF-IR και

τα σηματοδοτικά τους μονοπάτια. Σε ΕRα-θετικά καρκινικά κύτταρα μαστού, τα επίπεδα έκφρασης της συνδεκάνης-2 ελέγχονται μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού EGFR, ενώ τα επίπεδα έκφρασης της συνδεκάνης-4 ελέγχονται από τη σηματοδότηση του IGF-IR. Επιπλέον, τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης των συνδεκανών-2 και -4 έχουν συσγετιστεί με την αυξημένη μεταναστευτική δυνατότητα των καρκινικών κυττάρων μαστού [82, 83]. Σε πρόσφατο μοντέλο καρκίνου του μαστού σε ποντικό, η συνδεκάνη-1 οδηγεί στη δημιουργία όγκου πυροδοτώντας το Wnt-1/β-catenin σηματοδοτικό μονοπάτι [88]. Σε άλλη μελέτη, σχηματίζει τριτοταγές σηματοδοτικό σύμπλοκο με τους FGF-2/FGFR1, αυξάνοντας την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων μαστού [89]. Σε πολλούς τύπους καρκίνου αλληλεπιδρά με τις ιντεγκρίνες ανβ3 και ανβ5, προωθώντας την αγγειογένεση, τη διήθηση και τη μετανάστευση σε τριπλά αρνητικές καρκινικές σειρές μαστού [90]. Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι η εξωκυττάρια περιοχή της συνδεκάνης-1 σχετίζεται άμεσα με τον IGF-IR, όπου μαζί με τις ιντεγκρίνες ανβ3 ή/και ανβ5 σχηματίζουν ένα σηματοδοτικό σύμπλοκο που προάγει τη μετανάστευση καρκινικών και ενδοθηλιακών κυττάρων [91]. Τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν ότι οι πολύπλοκοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί, διαμεσολαβούμενοι από συνδεκάνες, που ελέγχουν τις κυτταρικές λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων αποτελούν κρίσιμους παράγοντες για την εξέλιξη του όγκου, λειτουργώντας παράλληλα ως προγνωστικοί βιοδείκτες και ελκυστικοί φαρμακολογικοί στόχοι.

#### **Γλυπικάνες**

Οι γλυπικάνες αποτελούνται από έξι μέλη αγκυροβολημένα στην κυτταρική μεμβράνη μέσω αγκύρας GPI (GPI-anchor) στο C-τελικό τους άκρο (Πίνακας 1). Εμπεριέχουν δεκατέσσερα κατάλοιπα Cys που παρουσιάζουν ομολογία με τις περιοχές πλούσιες σε Cys των πρωτεϊνών Frizzled. Οι γλυπικάνες τροποποιούνται με έως και τρεις αλυσίδες HS κοντά στη νεομεμβράνη (juxtamembrane). Εκφράζονται κυρίως από τα μεσεγχυματικά και τα επιθηλιακά κύτταρα [72]. Στον καρκίνο του μαστού τα επίπεδα της γλυπικάνης-1 παρουσιάζουν μεγάλη αύξηση και μεσολαβούν στην κυτταρική μετανάστευση [40].

### Σεργλυκίνη

Το μόνο χαρακτηρισμένο μέλος των ενδοκυττάριων PGs είναι η σεργλυκίνη, η οποία εκφράζεται τόσο σε αιμοποιητικά όσο και σε ενδοθηλιακά, λεία μυικά κύτταρα, αλλά

και σε ινοβλάστες. Δομικά, η σεργλυκίνη αποτελείται από έως και οκτώ αλυσίδες CS/DS/HS/Hep που βρίσκονται συνδεδεμένες σε ένα στενό τμήμα του πρωτεϊνικού της κορμού, το οποίο χαρακτηρίζεται από επαναλήψεις Ser/Gly (Πίνακας 1). Ο ενδοκυτταρικός βιολογικός ρόλος της σεργλυκίνης έγκειται στη συγκρότηση εκκριτικών κοκκίων και την αλληλεπίδραση με ποικίλα συνοδά μόρια, όπως είναι οι GFs, κυτταροκίνες και πρωτεολυτικά ένζυμα [92]. Όταν η σεργλυκίνη εκκρίνεται είναι σε θέση να ρυθμίσει τη μεταφορά, προστασία και ενεργοποίηση των συνοδών της μορίων [93]. Η έκφραση της σεργλυκίνης, όπως και πολλών άλλων PGs, έχει βρεθεί τροποποιημένη στον καρκίνο του μαστού. Η σεργλυκίνη εκφράζεται και εκκρίνεται από τα πιο κακοήθη κύτταρα του μαστού και επηρεάζει πολλές από τις λειτουργικές ιδιότητες, όπως η κυτταρική διήθηση [94, 95]. Η εμπλοκή της σεργλυκίνης στη μετάσταση των όγκων επιβεβαιώθηκε in vivo χρησιμοποιώντας το μοντέλο MMTV-PyMT [96]. Πρόσφατη μελέτη σε καρκινικά κύτταρα μαστού υποδεικνύει ότι η σεργλυκίνη επάγει τη διαδικασία ΕΜΤ και την αντίσταση στη χημειοθεραπεία, οδηγώντας στη βιοσύνθεση πρωτεολυτικών ενζύμων. Επιπλέον, εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του IL-8/CXCR2 σηματοδοτικού καταρράκτη και καθοδικών σηματοδοτικών μορίων, όπως PI3K, Src και Rac, τα οποία προάγουν την ανάπτυξη και εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων μαστού [97].

Πίνακας 1. Τύποι και δομικά χαρακτηριστικά των μεμβρανικών (διαμεμβρανικές και αγκυροβολημένες) και ενδοκυττάριων PGs. Πηγή: [66].



# Υαλουρονικό οξύ

Το υαλουρονικό οξύ (HA) περιέχει επαναλαμβανόμενες δισακχαριτικές μονάδες GlcA και GlcNAc. Το HA προσδένεται είτε στις συνθάσες του (HAS1-3), είτε στους κυτταρικούς του υποδοχείς, επηρεάζοντας ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες. Σε περιπτώσεις φλεγμονής και κατά την εξέλιξη του καρκίνου, το HA απαντάται σε ποικίλα μοριακά μεγέθη δρώντας ως σηματοδοτικό μόριο αλληλεπιδρώντας με τους υποδοχείς του, CD44 και RHAMM. Ο CD44 είναι δυνατό να αλληλεπιδράσεων παραμένει ασαφής [98]. Το μέγεθος του HA εξαρτάται από τη δραστικότητα των ενζύμων που συνθέτουν HA, και αυτών που το αποικοδομούν (υαλουρονιδάσες, HYAL-1 έως -4, HYAL-P1, PH-20) [61, 99]. Στον καρκίνο του μαστού, τα περισσότερο επιθετικά καρκινικά κύτταρα υπερεκφράζουν τη HAS2 και τη HYAL-2 [100]. Επομένως, η κατανόηση του ρόλου του HA στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού είναι κρίσιμης σημασίας [99].

## Ένζυμα αποικοδόμησης του ΕCM

## Μεταλλοπρωτεϊνάσες

Οι MMPs αποτελούν μία οικογένεια 42 ενδοπεπτιδασών που είναι δομικά και λειτουργικά παρόμοιες και εμφανίζουν εξειδίκευση ως προς τα συστατικά του ECM που αποικοδομούν. Εκκρίνονται από τα κύτταρα συνήθως στην ανενεργό τους μορφή και ακολούθως ενεργοποιούνται [101]. Εκτός από την αναδιοργάνωση του ECM, συμβάλλουν στη ρύθμιση GFs και των υποδοχέων τους, κυτταροκινών, μορίων προσκόλλησης, μεμβρανικών PGs, καθώς και του προγράμματος EMT (**Εικόνα 8**) [64, 102]. Στον καρκίνο του μαστού εκφράζεται μια πληθώρα MMPs, ωστόσο διαφορετικές MMPs ρυθμίζουν συγκεκριμένες κυτταρικές λειτουργίες, όπως την κυτταρική μετανάστευση και τη διήθηση [103-105]. Έχουμε αποδείζει ότι η δράση της E2 ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση και τη δραστικότητα των MMPs. Επιπρόσθετα, η έκφραση και η δραστικότητα των MMPs/TIMPs είναι πιθανό να ελέγχεται από τους EGFR και IGF-IR [40, 106]. Ο EGF επάγει την έκφραση της MMP-9 σε καρκινικά κύτταρα μαστού [107], ενώ η χορήγηση IGF-I ενισχύει τη δραστικότητα της MT1-MMP σε MCF-7 καρκινικά κύτταρα μαστού [108].



Εικόνα 8. Οι πρωτεολυτικές δράσεις των MMPs κατά την εξέλιξη του όγκου. Μέσω των αλληλεπιδράσεών τους με μόρια του ECM και της αποκοδόμησής του στον πρωταρχικό όγκο, επάγουν το φαινόμενο ΕΜΤ στα καρκινικά κύτταρα, τα οποία αποικοδομούν το στρώμα, εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος, εξαγγειώνονται από το ενδοθήλιο και μεταναστεύουν/διεισδύουν στον παρακείμενο ιστό, προωθώντας τη μετάσταση  $\sigma \varepsilon$ απομακρυσμένους ιστούς. Ανατύπωση με άδεια από την αναφορά [64]. Copyright 2011 John Wiley & Sons.

## Σύστημα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου

Η πλασμίνη (πρωτεάση σερίνης) απαντάται ευρέως στους ECMs και παράγεται από την αποικοδόμηση του πλασμινογόνου από τους δύο ενεργοποιητές του, tPA και uPA, υποβοηθούμενο από τον μεμβρανικό υποδοχέα του, uPAR. Η δραστικότητα της πλασμίνης και των ενεργοποιητών της ελέγχονται από ειδικούς ενδογενείς αναστολείς, την α2-αντιπλασμίνη και τους αναστολείς PAIs. Η πλασμίνη δρα απευθείας σε πρωτεΐνες του ECM ενεργοποιώντας αρκετές pro-MMPs, οδηγώντας σε περαιτέρω αποικοδόμηση του ECM. Αρκετές μελέτες έχουν υποδείξει τη συμμετοχή του uPA στο μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων μαστού [109]. Το σύμπλοκο uPA/uPAR είναι ικανό να αλληλεπιδράσει με ιντεγκρίνες και να επάγει τη σηματοδότηση μέσω PI3K/AKT και RAS-RAF-MEK-ERK για να επηρεάζει την ανάπτυξη και τη γονιδιακή έκφραση [110].

# Φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές – Ιντερλευκίνες

Κατά τη φλεγμονώδη ανοσοαπόκριση απελευθερώνεται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μεγάλος αριθμός σηματοδοτικών μορίων, όπως σηματοδοτικές πρωτεΐνες [π.χ. χημειοκίνες, ιντερλευκίνες (ILs), GFs και ιντερφερόνες], και ελεύθερες ρίζες. Φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές, όπως οι χημειοκίνες και οι ILs, εμπλέκονται στην εξέλιξη πολλών τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του μαστού. Συγκεκριμένα, η IL-8 έχει εξέχοντα προ-αγγειογενετικό ρόλο ενώ οι βιολογικές δράσεις της διαμεσολαβούνται από τους υποδογείς CXCR-1,-2. Η έκφρασή της ρυθμίζεται από ένα πλήθος διαφορετικών ερεθισμάτων. Η διέγερση των CXCR-1,-2 επάγει ένα εύρος σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως των ΡΙ3Κ, ΡΚC, ΑΚΤ, ΜΑΡΚ και RhoGTPάσης [111]. Η έκφραση της IL-8 έχει συνδεθεί αρνητικά με την έκφραση των ERs στα καρκινικά κύτταρα μαστού, ενώ η έκφρασή της έχει συσγετιστεί με την επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων μαστού [112, 113]. Η IL-6 μπορεί να δρα μέσω του κλασικού μονοπατιού σηματοδοτώντας είτε μέσω του IL-6Ra ενεργοποιώντας τα μονοπάτια PI3K και MAPK είτε μέσω του διαλυτού υποδοχέα της sIL-6Ra [114]. Τόσο η έκφραση της IL-8 όσο και της IL-6 εξαρτάται από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες και κυρίως από τον NF-κB [115], ενώ η σηματοδότηση και των δύο αυτών ILs έχει συσχετιστεί με το φαινόμενο EMT σε καρκινικά κύτταρα μαστού [116]. Χορήγηση της IL-6 σε ERα-θετικά καρκινικά κύτταρα μαστού προωθεί τη μεταγραφική δραστηριότητα του ER [117], ενώ η έκφρασή της έχει βρεθεί ελαφρώς υψηλότερη στους ΕR-αρνητικούς όγκους [118].

# Υποδοχείς αυξητικών παραγόντων – εμπλοκή στον καρκίνο του μαστού

Η παρουσία του υποδοχέα EGFR είναι καθοριστική για την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού, ενώ η έκφρασή του είναι αντιστρόφως ανάλογη με την έκφραση του ΕRa [119]. Τα τελευταία χρόνια για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού χρησιμοποιούνται θεραπείες που στοχεύουν τον EGFR, οι οποίες περιλαμβάνουν τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAb) [120] και ειδικών αναστολέων κινάσης τυροσίνης [121, 122]. Ο ΕRα φαίνεται να αλληλεπιδρά με τον EGFR μετά την ενεργοποίησή του από την Ε2 και μέσω του μονοπατιού ΜΑΡΚ επάγονται τα επίπεδα έκφρασης του ΕRa. Σε πολλούς κυτταρικούς τύπους απαιτείται η παρουσία του ERa για την εκδήλωση της βιολογικής δράσης του EGF. Η διεπικοινωνία του EGFR με τους ERs εμπλέκεται στην έκφραση μακρομορίων του ECM των καρκινικών κυττάρων μαστού και στις λειτουργικές ιδιότητές τους [40, 123]. Η Ε2 σε συνδυασμό με τους EGF/IGF-Ι προάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μαστού και την κυτταρική μετανάστευση μέσω του EGFR [124]. Η ενεργοποίηση του EGFR και των καθοδικών μονοπατιών PI3K/Akt και MAPK, καθώς και η αλληλεπίδρασή τους με γονίδια που ρυθμίζονται από τους ERs, παίρνουν μέρος στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού [125]. Ο EGF αυξάνει επίσης την κυτταρική προσκόλληση μέσω της κινάσης FAK, ενώ οδηγεί στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και την φωσφορυλίωση των ERK1/2 [126]. Ο υποδογέας IGF-IR είναι σημαντικός σε κυτταρικές βιολογικές διεργασίες, όπως η διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός, ο ΕΜΤ και η προστασία στην απόπτωση. Τόσο ο IGF-IR όσο και ο EGFR ενεργοποιούν κοινά σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως αυτά των MAPK και Akt. Η διεπιοινωνία των EGFR/ IGF-IR με τους ERs επηρεάζουν τις κυτταρικές λειτουργίες, καθώς και τη φυσιολογική έκφραση σημαντικών βιομορίων για την ομοιόσταση του ECM (Εικόνα 9) [40].



**Εικόνα 9.** Ο ρόλος της διεπικοινωνίας μεταζύ των σηματοδοτικών μονοπατιών των ERs με αυτά των EGFR/IGFR στη ρύθμιση των λειτουργικών ιδιοτήτων των καρκινικών κυττάρων μαστού. Ανατύπωση με άδεια από την αναφορά [13]. Copyright 2014 Elsevier science & technology journals.

Η οικογένεια του TGF ρυθμίζει ένα εύρος φυσιολογικών αλλά και παθολογικών καταστάσεων [127, 128]. Η υπο-οικογένεια TGF-β αποτελείται από 3 διακριτά μέλη, TGF-β1/-β2 και -β3, όπου ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τις συνθήκες η έκφρασή τους μπορεί να επάγεται από πληθώρα ερεθισμάτων, όπως τα στεροειδή και η IL-1. Ο TGF-β εμφανίζεται επίσης στον ECM ως σύμπλοκο με PGs αποθηκευμένος σε ανενεργή μορφή. Στον καρκίνο του μαστού, ο TGF-β αρχικά καταστέλλει την ογκογένεση μέσω αναστολής της ανάπτυξης και επαγωγής της απόπτωσης, ενώ κατόπιν συχνά υπερεκφράζεται προωθώντας τον EMT [129]. Η σηματοδότηση του TGF-β έπειτα από την συγκρότηση του τετραμερούς των υποδοχέων διαμεσολαβείται από το κανονικό (Smad 2/3-διαμεσολαβούμενο) και το μη κανονικό μονοπάτι [130]. Όσον αφορά τα μονοπάτια των TGF-β και ERα, η σηματοδότησή τους προκαλεί αντικρουόμενα αποτελέσματα στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων [131]. Έχει βρεθεί πως η σηματοδότηση μέσω του συμπλόκου E2/ERα προκαλεί την αποικοδόμηση των Smad 2/3, ενώ αντίθετα ο TGF-β είναι σε θέση να καταστείλει τη μεταγραφή γονιδίων επαγόμενη από τον ERα [132]. Η οικογένεια PDGF αποτελείται από 5 διαφορετικά διμερή PDGF-AA,-BB,-AB,-CC και -DD, τα οποία σηματοδοτούν μέσω διμερών των δύο υποδοχέων PDGF-α και -β, με τα προσδέματα να παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς τα διμερή υποδοχέων. Μετά την αυτοφωσφορυλίωση των υποδοχέων είναι δυνατόν να ενεργοποιηθούν τα ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως των SRC, PI3K, PLCγ και RAS [133]. Η έκφραση του PDGFR επάγεται από τον TGF-β και τα οιστρογόνα [134]. Στον καρκίνο του μαστού ο PDGF εμφανίζει αγγειογενετικό ρόλο [135]. Υψηλά επίπεδα PDGF στο πλάσμα αλλά και σε καρκινώματα μαστού σχετίζονται με αυξημένο μεταστατικό δυναμικό, χαμηλή απόκριση σε θεραπεία αλλά και με μικρό χρόνο επιβίωσης των ασθενών. Πρόσφατα δεδομένα αποδεικνύουν την ενισχυμένη σηματοδότηση του PDGFR λόγω ανάπτυξης ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων μαστού σε αναστολείς της αρωματάσης [136, 137].

Η οικογένεια των RTK υποδοχέων TAM αποτελείται από 3 μέλη, τους Tyro3, Axl και Mer. Σε αυτούς προσδένονται τα δύο κοινά προσδέματα πρωτεΐνη S και Gas6. Ο υποδοχέας Axl ενεργοποιείται έπειτα από παρακρινή ή αυτοκρινή πρόσδεση του Gas6, ομοδιμερίζεται, αυτοφωσφορυλιώνεται και επάγει πλήθος σηματοδοτικών μονοπατιών. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα Axl μπορεί να γίνει και με το σχηματισμό ετεροδιμερών, με υποδοχείς όπως ο EGFR, PDGFR και β3 ιντεγκρίνη. Τα ετεροδιμερή Axl/EGFR και Axl/PDGFR εμφανίζονται σε καρκινικά κύτταρα μαστού που ανθίσταται σε θεραπεία [138], ενώ έχουν ταυτοποιηθεί miRNAs τα οποία στοχεύουν τον υποδοχέα Axl [139]. Η έκφραση του Axl έχει παρατηρηθεί σε καρκίνο του μαστού επάγοντας την EMT [140-142]. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από αναστολή της σηματοδότησης του Axl μόνο ή σε συνδυασμό είναι αξιοσημείωτα [138].

Ένα σημαντικό σηματοδοτικό μονοπάτι που συμμετέχει στην επαγωγή του ΕΜΤ είναι το Wnt/β-catenin κανονικό μονοπάτι, το οποίο καθορίζει την ικανότητα της πολυλειτουργικής πρωτεΐνης, β-catenin, να μεταναστεύει στον πυρήνα των κυττάρων ρυθμίζοντας τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων. Παρουσία των Wnt σηματοδοτικών μορίων, αυτά αλληλεπιδρούν με τα διμερή των αντίστοιχων υποδοχέων (Frizzled) και συν-υποδοχέων LRP5/6. Η πρόσδεση των Wnts στους υποδοχείς τους επάγει τη δέσμευση της axin στον LRP5/6 και του Dishevelled στον Frizzled, με αποτέλεσμα την αποδιάταξη του σύμπλοκου καταστροφής. Ως εκ τούτου, οι κινάσες δεν φωσφορυλιώνουν την β-catenin, η οποία συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και η ενεργή μορφή της μεταναστεύει στον πυρήνα όπου αλληλεπιδρά με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο TCF/LEF-1, επάγοντας τη μεταγραφή γονιδίωνστόχων [143, 144].

Η κατανόηση των μηχανισμών δράσης των παραπάνω σηματοδοτικών μονοπατιών, θα συμβάλει στην ανάπτυξη νέων πιθανών φαρμακολογικών στόχων στα πλαίσια της αξιοποίησης των μορίων του ECM για το σχεδιασμό καινοτόμων θεραπειών ελέγχοντας τις ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων.
# Ο ρόλος των microRNAs στην επιγενετική ρύθμιση του ECM στον καρκίνο

## Εισαγωγικά στοιχεία

Τα τελευταία χρόνια, μεγάλος αριθμός δημοσιεύσεων εστιάζει στην επιγενετική θεραπεία μεγάλου αριθμού ασθενειών, γεγονός που δεν αποτελεί έκπληξη καθώς η επιγενετική συνδέει τις αλλαγές που συμβαίνουν στη δομή της χρωματίνης με τον κυτταρικό φαινότυπο και πολλές από τις λειτουργίες ενός βιολογικού συστήματος [145, 146]. Το να κατανοήσουμε πώς αυτές οι αλλαγές ενορχηστρώνονται είναι φυσικά θεμελιώδους κλινικής σημασίας. Οι συχνότεροι και έντονα αλληλοεξαρτώμενοι επιγενετικοί μηγανισμοί που παραμένουν στενά συνδεδεμένοι με τη γονιδιακή έκφραση περιλαμβάνουν: τη μεθυλίωση του DNA, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών και ρυθμιστικά μη-κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs) [147-151]. Η δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ των επιγενετικών μηχανισμών ρυθμίζει την αναδιοργάνωση της χρωματίνης και συνεπακόλουθα επηρεάζει την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού μεταγραφικών παραγόντων και σηματοδοτικών μορίων [152, 153]. Στην παρούσα διατριβή, επικεντρωθήκαμε στη μελέτη της εκτενώς χαρακτηρισμένης υπο-οικογένειας ncRNAs, αυτή των microRNAs (miRNAs), καθώς ανάμεσα στα υπόλοιπα συστατικά του επιγενώματος, τα miRNAs έχουν ευρέως μελετηθεί στο πλαίσιο της αναγεννητικής ιατρικής. Επιπλέον, εμπλέκονται σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, όπως στη διαδικασία επούλωσης πληγής, αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις όπως η ίνωση και ο καρκίνος [154].

Η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να μεταναστεύουν εξαρτάται από τις γενετικές και επιγενετικές τροποποιήσεις που υφίστανται. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην κατανόηση της συμπεριφοράς των καρκινικών κυττάρων προσφέρει το πεδίο των miRNAs. Αποτελούν μικρά, ενδογενή, μονόκλωνα μόρια RNA, μήκους κατά προσέγγιση 17-25 νουκλεοτιδίων, τα οποία ήρθαν στο επίκεντρο επιστημονικών μελετών ως πιθανοί μετα-μεταφραστικοί ρυθμιστές πληθώρας κυτταρικών διεργασιών [155, 156]. Μέσω της εξειδικευμένης δέσμευσής τους σε συγκεκριμένες αλληλουχίες των mRNAs-στόχων, τα ώριμα miRNAs πυροδοτούν ένα είδος κυτταρικού επαναπρογραμματισμού που οδηγεί στην αποσταθεροποίηση, στην αποικοδόμηση ή/και στην αναστολή της μεταγραφής του συγκεκριμένου mRNA [157, 158]. Είναι πολύ ενδιαφέρον το γεγονός ότι περισσότερα από το 60% των mRNAs που μεταφράζονται σε πρωτεΐνες αποτελούν

στόχους των miRNAs, όπως αυτό αποδείχθηκε από προβλέψεις βιοπληροφορικής [159]. Ιστορικά, το πρώτο miRNA που ανακαλύφθηκε στο σκώληκα *Caenorhabiditis elegans*, το 1993, όπου ένα μη κωδικοποιητικό RNA με σχήμα φουρκέτας και μήκος 22 νουκλεοτιδίων, το οποίο κωδικεύεται από το γονίδιο lin-4, αποδείχθηκε ότι προσδένεται στο mRNA του lin-14 και καταστέλλει τη μετάφρασή του [160, 161]. Μέχρι σήμερα, έχουν ανακαλυφθεί περισσότερα από 2500 ανθρώπινα, ώριμα miRNAs, σύμφωνα με την τελευταία ενημέρωση της βάσεως δεδομένων miRbase (www.miRbase.org; έκδοση v20, Ιούνιος 2013).

#### Βιοσύνθεση και τρόπος δράσης των microRNAs

Το μονοπάτι βιογένεσης και ωρίμανσης του miRNA περιγράφεται ως γραμμικό και καθολικό ανάμεσα στα miRNAs των θηλαστικών και παρουσιάζεται στην Εικόνα 10. Αναλυτικά, ο συγκεκριμένος καταρράκτης ωρίμανσης ξεκινά στον πυρήνα με την παραγωγή του πρωταρχικού μετάγραφου miRNA (pri-miRNA), από την RNA πολυμεράση ΙΙ [162]. Στη συνέχεια, το pri-miRNA αποικοδομείται από το ένζυμο Drosha με δράση RNAase III ενδονουκλεάσης, οδηγώντας στη δημιουργία του πρόδρομου miRNA, με δομή φουρκέτας και μήκος 70 νουκλεοτιδών (pre-miRNA). Το pre-miRNA εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα μέσω του συστατικού του συμπλέγματος πυρηνικού πόρου, Ran-GTP-Exportin 5, και συμπλέκεται με το ένζυμο τύπου RNA πολυμεράσης ΙΙ, Dicer, όπου αποικοδομείται περαιτέρω, παράγοντας τα διμερή RNA μήκους 22 νουκλεοτιδίων [163, 164]. Σύμφωνα με το τρέχον μοντέλο, η εξειδίκευση της αρχικής αποικοδόμησης από τη Drosha, με την καθοδήγηση της πρωτεΐνης DGCR8/Pasha, καθορίζει τα δύο άκρα του ώριμου miRNA [165]. Έπειτα από επεξεργασία του διμερούς miRNA:miRNA\* από το ένζυμο ελικάση, η αλυσίδα με χαμηλότερο ποσοστό συμπληρωματικότητας ζευγών βάσεων στο 5' άκρο της με την Dicer επιλέγεται ως το ώριμο miRNA, ενώ η συμπληρωματική αλυσίδα, miRNA\*, αποικοδομείται και καταστρέφεται. Το ώριμο πλέον miRNA προσαρτάται με τις πρωτεΐνες Argonaute (Ago2) στο σύμπλεγμα RISC (RNA-induced silencing complex). Μία αλληλουχία 6-7 νουκλεοτιδίων στο 5' άκρο του μονόκλωνου miRNA σχηματίζει ζεύγη βάσεων με τα mRNA-στόχους, κυρίως στις 3' μη-μεταφραζόμενες (3'UTR) περιοχές τους. Αναλόγως του βαθμού συμπληρωματικότητας, το mRNA-στόχος δύναται να αποικοδομηθεί, να αποσταθεροποιηθεί ή να παρεμποδιστεί η μετάφρασή του [156, 166].



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών βιογένεσης των miRNAs και της μεταμεταφραστικής αποσιώπησης mRNA-στόχων, μέσω αποικοδόμησης, στην περίπτωση της μεγάλης συμπληρωματικότητας ή να οδηγήσουν στη μεταφραστική καταστολή λόγω χαμηλής συμπληρωματικότητας. Καινοτόμες εφαρμογές των miRNAs περιλαμβάνουν την ενσωμάτωση νουκλεϊκών αλυσίδων miRNA (μιμητές ή καταστολείς) σε βιοδιασπώμενα λιποσώματα που λειτουργούν ως νανομεταφορείς και χρησιμοποιούνται ως διαγνωστικά εργαλεία και σε θεραπευτικές στρατηγικές σε πολλές κλινικές εφαρμογές. Ανατύπωση με άδεια από την αναφορά [74]. Copyright 2018 Elsevier science & technology journals.

Παρόλο που τα miRNAs αποτελούν κυρίως αρνητικούς ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης, αυξημένη έκφραση των mRNA-στόχων μπορεί να παρατηρηθεί εάν η πρόσδεση του miRNA πραγματοποιηθεί στο 5' άκρο του mRNA ή εάν το mRNAστόχος είναι μεταγραφικός καταστολέας. Έτσι, στην περίπτωση του καρκίνου και αναλόγως της φύσης του mRNA-στόχου, τα miRNAs δύνανται να δρουν είτε επάγοντας συγκεκριμένη κυτταρική λειτουργία, είτε ως ογκοκατασταλτικά μόρια [167-169]. Ακόμα μεγαλύτερη πολυπλοκότητα στον τρόπο λειτουργίας τους παρατηρείται μέσω της ταυτόχρονης ρύθμισης των γονιδίων-στόχων με τα miRNAs που εντοπίζονται σε ιντρόνια, μέσω της μεταγραφής των συμπλόκων miRNAs και τέλος, μέσω περαιτέρω επιγενετικών τροποποιήσεων [167, 170, 171]. Έχουν αναπτυχθεί πολλοί υπολογιστικοί αλγόριθμοι, όπως το TargetScan και το PicTar, που χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη των mRNAs που ρυθμίζονται από ένα miRNA και αντίστροφα. Επιπλέον, δημόσιες βάσεις δεδομένων όπως το miRbase (www.mirbase.org), το DIANA (http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php) και το www.microrna.org, είναι διαθέσιμες και αποτελούν βασικό εργαλείο στην έρευνα των miRNAs.

#### MicroRNAs και ECM – σχέση δύο κατευθύνσεων

Πρόσφατες μελέτες πρωτεομικής ανάλυσης αποκαλύπτουν ότι καθένα από τα 2500 ανθρώπινα ώριμα miRNAs μπορεί να στοχεύσει περισσότερα από ένα mRNAs. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψιν ότι η στόχευση αυτή σε μεταγραφικό επίπεδο δεν απαιτεί πλήρη συμπληρωματικότητα των δύο αλυσίδων, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι μεγάλο μέρος του συνόλου των κυτταρικών διεργασιών ρυθμίζεται από miRNAs [172]. Πράγματι, η διαφοροποιημένη έκφραση πολλών miRNAs συσχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αντοχή στην απόπτωση, τη διαφοροποίηση, τη φλεγμονώδη απόκριση και την εξέλιξη του καρκίνου και μπορεί να προβλέψει την πιθανότητα επιτυχούς αντικαρκινικής θεραπευτικής παρέμβασης [173-175]. Επιπλέον, η μελέτη της έκφρασης συγκεκριμένων miRNAs μπορεί να διακρίνει διαφορετικούς καρκινικούς υποτύπους στον καρκινικό όγκο και να αναγνωρίσει διαφορετικούς τύπους καρκίνου όταν χρησιμοποιείται ως βιοδείκτης του ορού του αίματος [176]. Παρόλο που τα συγκεκριμένα ευρήματα δίνουν έμφαση στην κλινικοπαθολογική σημασία των miRNAs, δεδομένα από in vitro και in vivo πειραματικά μοντέλα επιβεβαιώνουν τη μηγανιστική συνεισφορά της διαφοροποιημένης έκφρασης των miRNAs στο σύνολο των σταδίων της εξέλιξης του καρκίνου [3, 177]. Συνεπακόλουθα, γίνεται αντιληπτό ότι τα miRNAs ως μετα-μεταφραστικά σημεία ελέγχου της έκφρασης RNA και πρωτεϊνών, εμπλέκονται και στη ρύθμιση των συστατικών του ECM. Οι τρόποι αυτής της ρύθμισης που έχουν περιγραφεί περιλαμβάνουν: i) την άμεση στόχευση των mRNAs των συστατικών του ECM, ii) την έμμεση ρύθμιση του ECM μέσω miRNAδιαμεσολαβούμενης στόχευσης μεταγραφικών ενεργοποιητών και καταστολέων, iii) τον επιγενετικό έλεγχο των miRNAs που στοχεύουν τον ECM και iv) τη συνεργατική ρύθμιση των miRNAs με τους υποδοχείς του ECM. Σημειώνεται ότι η ρυθμιστική σχέση των miRNAs με τον ECM δεν μπορεί να είναι μονής κατεύθυνσης, καθώς η

έκφραση ενός miRNA σε έναν τύπο κυττάρων μπορεί να καθορίζεται από την 3'UTR περιοχή ενός συγκεκριμένου mRNA του ECM, όπως της versican και του CD44 και από μεγάλο αριθμό σηματοδοτικών μονοπατιών [74, 167, 178].

#### Επιγενετική ρύθμιση των συστατικών του ECM μέσω των miRNAs

Ο κλασικός ρυθμιστικός τρόπος δράσης των miRNAs στα mRNAs-στόχους περιλαμβάνει την πρόσδεση της αλυσίδας miRNA στην 3'UTR περιοχή του mRNA (Εικόνα 10). Η συγκεκριμένη άμεση ρύθμιση των συστατικών του ECM αποκαλύπτεται από πληθώρα παραδειγμάτων που συνοπτικά παρουσιάζονται στην Εικόνα 11.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα ενός πολυλειτουργικού miRNA είναι η περίπτωση του προ-μεταστατικού miR-10b. Στην περίπτωση της διαμεσολαβούμενης από το miR-10b ρύθμισης της συνδεκάνης-1, η καταστολή της συγκεκριμένης HSPG μέσω των εξειδικευμένων miR-10b -3'UTR αλληλεπιδράσεων σε καρκινικά κύτταρα μαστού και σε ενδομητρικά κύτταρα, επηρεάζοντας και στις δύο περιπτώσεις τόσο τις λειτουργικές τους ιδιότητες (κινητικότητα, ικανότητα διήθησης και ανοχή στη ραδιοθεραπεία), αλλά και σε κυτταρικό επίπεδο, αυξήθηκε ο σχηματισμός φιλοποδίων και η προσκόλληση σε χαρακτηριστικές γλυκοπρωτεΐνες του ECM, όπως κολλαγόνο και fibronectin. Ο μηχανισμός κάτω από τον οποίο επιτυγχάνεται αυτή η ρύθμιση εντοπίζεται στην κυτταρική σηματοδότηση μέσω των μονοπατιών IL-6, FAK κινάσης και Rho-GTPase [179]. Η συγκεκριμένη μελέτη αποδεικνύει τη ρύθμιση ενός συν-υποδοχέα του ΕCM από ένα miRNA, η οποία επηρεάζει ταυτόχρονα πληθώρα κυτταρικών διεργασιών που σχετίζονται με την εξέλιξη του καρκίνου. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η εξαρτώμενη από το miR-10b καταστολή της συνδεκάνης-1 μειώνει τη διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων μαστού, η οποία συσγετίζεται με τη μειωμένη έκφραση MMPs και τη μειωμένη ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού FAK/β-integrin/HGF/c-Met [180]. Επιπρόσθετα, η στόχευση του μεταγραφικού παράγοντα HOXD10 που διαμεσολαβείται από το miR-10b ενισχύει την έκφραση προ-διηθητικών παραγόντων, όπως της MT1-MMP και του υποδοχέα του uPAR, επηρεάζοντας τον πρωτεολυτικό καταρράκτη, τόσο σε καρκινικά κύτταρα μαστού αλλά και σε κύτταρα γλοιώματος, έχοντας ως αποτέλεσμα την έντονα συνεργική προ-μεταστατική επίδραση του συγκεκριμένου miRNA [181]. Η έκφραση της συνδεκάνης-1 ρυθμίζεται επίσης από τα miR-143 και miR-145, τα οποία στοχεύουν άμεσα τη συγκεκριμένη PG, οδηγώντας σε

μειωμένη κυτταρική ανάπτυξη στις νεοπλασίες μελανώματος, ωοθηκών και ουροθηλιακού καρκινώματος [182, 183]. Η επαγόμενη από τον TGF-β έκφραση του miR-143 στοχεύει και άλλα μέλη των συνδεκανών, όπως τη συνδεκάνη-4 που συμμετέχει στην κυτταρική προσκόλληση [184]. Επιπλέον, τα miR-143 και miR-145 επηρεάζουν τον πρωτεολυτικό καταρράκτη του ECM, όπως παρατηρείται από τη ρύθμιση της MMP-13 και του αναστολέα PAI-1, αντίστοιχα [185, 186]. Η συνδεκάνη-1 αποτελεί ένα καλό παράδειγμα υποδογέα του ΕCM που επηρεάζει την έκφραση miRNAs και των αντίστοιχων στόχων τους, καθώς δρα ανοδικά πολλών miRNAs επηρεάζοντας την έκφρασή τους. Αυτό αποδείχθηκε στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων προστάτη, όπου η αποσιώπιση της συνδεκάνης-1 οδήγησε στη μειωμένη έκφραση του ενζύμου που ελέγχει την παραγωγή miRNAs, Dicer. Η συνεπακόλουθη αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης του ώριμου miR-133-3p και των στόχων του οδήγησε στην επαγωγή του ΕΜΤ [187]. Επιπλέον, η υπερέκφραση της συνδεκάνης-1 έχει συσχετιστεί με την έκφραση του miR-126 και την επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στον καρκίνο του προστάτη [188]. Τέλος, η συνδεκάνη-1 έχει βρεθεί να συμμετέχει στο ρυθμιστικό βρόχο που αποτελείται από την MMP-9 και το miR-494, τα οποία ρυθμίζουν την αγγειογένεση στην περίπτωση του μυελοβλαστώματος [189]. Όπως αναφέρουν πρόσφατες αναφορές, η συνδεκάνη-1 και το ένζυμο HPSE εμπλέκονται μηγανιστικά στη βιογένεση των εξοσωμάτων [190, 191], επομένως είναι δελεαστική η υπόθεση ότι η συγκεκριμένη PG επηρεάζει και τη έκκριση πολλών miRNAs μέσω αυτής της διαδικασίας.

Η οικογένεια του miR-29 αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα της περίπτωσης όπου ένα miRNA στοχεύει άμεσα πολλά μόρια του ECM. Το miR-29c καταστέλλει την έκφραση δύο τύπων κολλαγόνου (Ι και ΙΙΙ) επηρεάζοντας την κυτταρική κινητικότητα και την καρδιακή ίνωση σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα [192, 193]. Επίσης, το συγκεκριμένο miRNA παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση πρωτεολυτικών ενζύμων που συμμετέχουν στην αγγειογένεση. Έτσι, το miR-29 στοχεύει άμεσα το mRNA της MMP-2, ενώ στην περίπτωση των λείων μυικών κυττάρων αορτής περιγράφεται ένας έμμεσος τρόπος ρύθμισης. Η χορήγηση οξειδωμένης LDL σε αυτά τα κύτταρα οδήγησε στην τροποποιημένη έκφραση των MMP-2 και MMP-9 που εξαρτάται από την παρουσία του miR-29b [186]. Τέλος, το miR-29 ρυθμίζει την έκφραση της λαμινίνης LAMC2 και της ιντεγκρίνης α6 στις νεοπλασίες κεφαλής και τραχήλου, αντιπροσωπεύοντας την περίπτωση ρύθμισης ενός συστατικού του ECM και του υποδοχέα του από ένα μόνο miRNA [194]. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται αύξηση των επιπέδων έκφρασης κάποιου mRNA όταν υπερεκφράζεται κάποιο miRNA, όπως συμβαίνει με τα mRNA των myosin-9, transgelin και actin gamma 2 όταν υπερεκφράζεται το miR-145 [195]. Συγκεκριμένα, φαίνεται η έκφραση του HA, της GAG που αποτελεί κύριο συστατικό των ενδιάμεσων ECMs, ρυθμίζεται έμμεσα από τα miRNAs, μέσω της δράσης τους στα βιοσυνθετικά ένζυμα, τις HASes. Σε καρκινικά κύτταρα μαστού και ωοθηκών, η αναστολή του miRNA let-7 οδήγησε στην αύξηση των επιπέδων της HAS2 που αποτελεί στόχο του συγκεκριμένου miRNA, προάγοντας την επιβίωση, τη διήθηση και την προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων [196]. Επιπλέον, το let-7c αναστέλλει την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt που ρυθμίζεται από τον ERa επηρεάζοντας τις λειτουργίες των βλαστικών καρκινικών κυττάρων μαστού [197]. Ο πολλά CD44, στοχεύεται άμεσα υποδογέας του HA, από miRNAs συμπεριλαμβανομένων των miR-34, miR-199a-3p, miR-328, miR-373 και miR-520c, επηρεάζοντας την κυτταρική μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό [198, 199]. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι η αλληλεπίδραση του ΗΑ με το CD44 σε καρκίνους κεφαλής και τραχήλου, επηρεάζει έμμεσα την έκφραση του miR-302 μέσω της επαγωγής μεταγραφικών παραγόντων διαφοροποίησης [200], περιγράφοντας ακόμα ένα παράδειγμα των διεργασιών κυτταρικής σηματοδότησης που ρυθμίζουν τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs. Αναφορικά με τον έμμεσο τρόπο ρύθμισης των συστατικών του ECM, έχει αναφερθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα του miR-21, γεγονός που οφείλεται στην αλληλεπίδραση του ΗΑ με τον υποδοχέα του CD44 που ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι c-Jun. Οι επιπτώσεις της υπερέκφρασης του miR-21 στην περίπτωση αυτή οδηγούν στην παραγωγή της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης, Bcl-2, και στην επαγωγή πρωτεϊνών που προάγουν την κυτταρική επιβίωση και την αντίσταση στο φάρμακο doxorubicin [201]. Η υπερέκφραση του miR-143 παρεμποδίζει την EGFR-διαμεσολαβούμενη κυτταρική διήθηση, ρυθμίζοντας έμμεσα την έκφραση της MMP-9 σε κύτταρα οστεοσαρκώματος [202].

Δεν υπόκεινται σε miRNA-ρύθμιση μόνο τα βιοσυνθετικά μόρια του ECM, αλλά και τα ένζυμα αποικοδόμησης και αναδιοργάνωσης του ECM, τα οποία απομακρύνουν τα φυσικά εμπόδια των διαδικασιών μετανάστευσης διαμέσου των ιστών [73]. Μια αντίστροφη σχέση παρατηρείται ανάμεσα στο miR-1258 και το ένζυμο HPSE, σε μεταστατικούς καρκίνους μαστού και καρκίνους πνεύμονα, όπου η έκφραση του miR-1258 συσχετίζεται με χαμηλά επίπεδα επιβίωσης [203, 204]. Επίσης, έχει δοθεί

ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη μελέτη των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των MMPs, καθώς ρυθμίζονται άμεσα από τα miRNAs σε ασθένειες όπως οστεοαρθρίτιδα [205], γλοιοβλάστωμα και πολλές νεοπλασίες [206]. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το miR-21 εμπλέκεται στην παθολογία του γλοιοβλαστώματος μέσω του ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διήθησης και της απόπτωσης. Επιπλέον, το συγκεκριμένο miRNA ενεργοποιεί και άλλες MMPs, μέσω της μειορύθμισης των ενδογενών αναστολέων τους, συνεισφέροντας με αυτόν τον τρόπο στην επιθετικότητα των κυττάρων του γλοιώματος. Η εξειδικευμένη καταστολή του miR-21 με χρήση αντινοηματικών ολιγονουκλεοτιδίων αυξάνει σημαντικά τα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα των RECK και TIMP-3, παρεμποδίζοντας την ενζυμική δραστικότητα in vitro και in vivo δρώντας ως μια καινοτόμα αντικαρκινική θεραπεία [207, 208]. Το miR-145 επηρεάζει τον πρωτεολυτικό καταρράκτη μέσω της καταστολής των PAI-1, ADAM-17 και συνδεκάνης-1 [195, 209, 210], ενώ έχει βρεθεί ότι ρυθμίζει τη βιοσύνθεση του ΕCM μέσω της στόχευσης του μεταγραφικού παράγοντα SOX9 [211]. Στον καρκίνο του μαστού, ο ρόλος του είναι αμφιλεγόμενος, ωστόσο πολλές αναφορές συσχετίζουν την έκφρασή του με αυξημένη απόπτωση και μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κάτι που ενισχύει το ρόλο του ως ογκοκατασταλτικό miRNA [195, 212, 213].

Η επαγόμενη υπερέκφραση του miR-146a στα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα μαστού, MDA-MB-435-LvBr2 μειώνει σημαντικά το μεταναστευτικό και το διηθητικό δυναμικό αυτών των κυττάρων μέσω της καταστολής των MMP-1, uPA και uPAR [214]. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ένα miRNA μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση περισσότερων της μίας MMPs εξαιτίας της δομικής ομολογίας που παρουσιάζουν. Παραδείγματος χάριν, το miR-143 καταστέλλει τη μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση των MMP-2 και MMP-9 σε καρκινικά κύτταρα παγκρέατος [215]. Επίσης, η MMP-13 χαρακτηρίζεται και αυτή ως άμεσος στόχος του miR-143 σε *in vivo* μοντέλα οστεοσαρκώματος [216]. Μέσω της άμεσης στόχευσης των 3'UTR περιοχών των MMP-2 και MMP-9 από τα miR-29b και miR-125, καταστέλλονται οι διαδικασίες αγγειογένεσης, μετανάστευσης και διήθησης σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων [217, 218].

Επιπρόσθετα, τα miRNAs μπορούν να ρυθμίζουν άμεσα το φαινόμενο EMT, αλλά και την έκφραση των ERs [219, 220]. Το miR-200b είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής του EMT και της μετάστασης, καθώς μελέτες έδειξαν ότι η μειωμένη έκφραση του συγκεκριμένου miRNA συσχετίζεται με κακή κλινική εικόνα σε περιπτώσεις ασθενών με καρκίνο του μαστού [221, 222]. Εκτός των άλλων, το miR-200b συμμετέχει στη ρύθμιση της αγγειογένεσης και της ενδοθηλιακής μετανάστευσης, μέσω της άμεσης στόχευσης του VEGFR2 και του μεταγραφικού παράγοντα ETS1, του οποίου η δράση είναι γνωστή αναφορικά με την παραγωγή πρωτεϊνών του ECM στους ινοβλάστες (π.χ. κολλαγόνο τύπου 1 α2, TGF-β, λουμικάνη και ντεκορίνη) [223, 224]. Το miR-200b ρυθμίζει επίσης την έκφραση της ντεκορίνης και της fibronectin, των οποίων η διαφοροποιημένη έκφραση επηρεάζει τις διαδικασίες αγγειογένεσης και EMT, μέσω ενός TGF-β εξαρτώμενου τρόπου δράσης [225, 226].



**Εικόνα 11.** Η διαμεσολαβούμενη από miRNAs στόχευση του ECM αποτελεί το κλειδί για τη ρύθμιση βασικών λειτουργικών ιδιοτήτων, όπως του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της μετανάστευσης και της επιβίωσης. Ανατύπωση με άδεια από την αναφορά [74]. Copyright 2018 Elsevier science & technology journals.

#### miRNA-διαμεσολαβούμενη ρύθμιση των ERs στον καρκίνο του μαστού

Δεδομένα των τελευταίων ετών συσχετίζουν την έκφραση των miRNAs με την εξέλιξη πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού. Μετά την

ενεργοποίησή τους από τα οιστρογόνα, οι ΕRα και ERβ ρυθμίζουν άμεσα ή έμμεσα τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων μέσω πρόσδεσης DNA και ενδοκυττάριων σηματοδοτικών μονοπατιών. Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι τα miRNAs επηρεάζουν τη διαμεσολαβούμενη από οιστρογόνα γονιδιακή έκφραση μέσω της άμεσης στόχευσης του mRNA του ERa, οδηγώντας στην αποσταθεροποίησή του ή στο μειωμένο μεταγραφικό δυναμικό, επηρεάζοντας έτσι (ενισχύοντας ή καταστέλλοντας) την αντίσταση στις ενδοκρινείς θεραπείες. Ανεξάρτητες συγκριτικές μελέτες αποκάλυψαν τη διαφορά στην έκφραση πληθώρας miRNAs ανάμεσα σε ERa- θετικές και αρνητικές καρκινικές σειρές μαστού με τη βοήθεια μιρκοσυστοιχών miRNA [227, 228]. Συγκεκριμένα, στα ΕRα-αρνητικά καρκινικά κύτταρα μαστού υπερεκφράζονται τα miR-10, miR-221/222, miR-22, miR-150 και miR-29a. Όσον αφορά στα ΕRα-θετικά καρκινικά κύτταρα μαστού, τα miRNAs που έχουν βρεθεί να στοχεύουν τη μεγάλου μήκους 3' UTR περιοχή (~4.3 kb) του ΕRα αφορούν στα let-7, miR-10b, miR-18a, miR-19b, miR-20b, miR-21, miR-22, miR-130, miR-142-5p, miR-200 kat miR-206 [229, 230]. Χορήγηση του αγωνιστή του ERa, PPT, στα MCF-7 καρκινικά κύτταρα μαστού μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του miR-206 κατά 80%, ενώ στην περίπτωση που χορηγήθηκε στα ίδια κύτταρα ο αγωνιστής του ERβ, η έκφραση του miR-206 αυξήθηκε κατά 60%. Οι ερευνητές βρήκαν ότι η έκφραση του miR-206 είναι σημαντικά αυξημένη στα ΕRβ-θετικά MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού σε σχέση με τα ERα-θετικά MCF-7 κύτταρα και αυτό μπορεί να λειτουργεί ως ένας αρνητικός βρόχος ανατροφοδότησης που ρυθμίζει προσωρινά την έκφραση του ERa [231]. Επιπλέον, η έκφραση του miR-206 είναι αντιστρόφως ανάλογη με την έκφραση του ERa, αλλά όχι με αυτήν του ERβ, σε καρκινικούς όγκους μαστού [232]. Διαμόλυνση του miRNA-145 σε ERα-θετικές καρκινικές σειρές μαστού μειώνει σημαντικά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERa, μέσω της αλληλεπίδρασης δύο περιοχών στόχευσης του miRNA-145 στο mRNA του ERa, μειώνοντας τα επίπεδα του καθοδικού του στόχου, της κυκλίνης D1 [233]. Πρόσφατες μελέτες βιοπληροφορικής αποδεικνύουν ότι μέλη των οικογενειών miR-10 και miR-200 στοχεύουν άμεσα τους ΕRα και ERβ [159, 234].

Από μηχανιστική σκοπιά, τα οιστρογόνα επάγουν την έκφραση της Dicer, που συμμετέχει στη διαδικασία ωρίμανσης των miRNAs, ενώ η καταστολή του ERa μπορεί να συνεισφέρει στη μείωση αυτή. Επιπρόσθετα, μερικά miRNAs όπως τα miR-29, miR-103/107, miR-200 και το let-7 παρεμποδίζουν την έκφραση της Dicer προάγοντας τη διαδικασία EMT. Η υπερέκφραση του miR-200c στα τριπλά αρνητικά καρκινικά κύτταρα μαστού προκαλεί αύξηση των επιπέδων της Dicer [235]. Έχει βρεθεί επίσης

ότι στα καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7, η E2 μέσω του ERa αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Ago2 που συμμετέχει στη δράση των miRNAs [236], ενώ η αυξημένη έκφρασή της ενισχύει την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων μαστού μέσω της καταστολής της E-cadherin [237]. Επιπρόσθετα, στα ERβ-θετικά καρκινικά κύτταρα μαστού, η καταστολή του EGFR/MAPK σηματοδοτικού μονοπατιού, παρεμποδίζει σημαντικά την έκφραση της Ago2, γεγονός που υποδηλώνει τη δράση του EGF μέσω του υποδοχέα του και του MAPK μονοπατιού στην αυξημένη σταθερότητα της Ago2 [228]. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν ακόμη ικανοποιητικά δεδομένα που να αποσαφηνίζουν τόσο τη ρύθμιση του ERβ από κάποια miRNAs, αλλά και αντίστροφα, το ρόλο των ERs στην έκφραση των miRNAs. Η κατανόηση αυτών των μηχανισμών θα ανοίξει το δρόμο για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις για την ανάκτηση της ενδοκρινούς ευαισθησίας και απόκρισης σε αντι-οιστρογονικές θεραπείες.

#### Καινοτόμες κλινικές εφαρμογές στη στοχευμένη μεταφορά miRNAs

Η μεταφορά φαρμάκων είναι μια πολλά υποσχόμενη εφαρμογή της νανοτεχνολογίας, στα πλαίσια της στογευμένης θεραπείας. Η πρόοδος που παρατηρείται σε εφαρμογές της νανοϊατρικής για την αντιμετώπιση πολλών ασθενειών συνεισφέρει στην αντιμετώπιση των περιορισμών που εμφανίζουν οι τρέχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης συστημάτων μεταφοράς βασισμένων σε νανοσωματίδια είναι πολλά, γεγονός που τα καθιστά πολύ ελκυστικά τα τελευταία χρόνια τόσο στη θεραπευτική πολλών ασθενειών αλλά και ως διαγνωστικά εργαλεία. Το αξιοσημείωτα αυξημένο εμβαδόν επιφάνειας, η βελτιωμένη σταθερότητα, η δυνατότητα συσσωμάτωσης και αλλαγής μεγέθους, ο αυξημένος χρόνος ζωής, η ειδική και εκλεκτική μεταφορά φαρμάκων με τις ελάχιστες παρενέργειες, είναι μερικά μόνο από τα πλεονεκτήματα των νανοσωματιδίων. Επιπλέον, τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων χαρακτηρίζονται από την ικανότητα συνδυασμένης θεραπείας καθώς και την αποφυγή της φαρμακοανθεκτικότητας, καθιστώντας εφικτή την εφαρμογή δύο ή περισσότερων φαρμάκων αλλά και ενός περιβαλλοντικά υπεύθυνου τρόπου απελευθέρωσης του φαρμάκου. Τα νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων κερδίζουν συνεχώς το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για πολλές εφαρμογές [238-240]. Καθώς τα miRNAs ρυθμίζουν την έκφραση και τη δραστικότητα των συστατικών του ΕCM, με άμεσο ή έμμεσο τρόπο, επηρεάζοντας την πρόοδο πολλών ασθενειών,

αποτελούν πλέον ελκυστικούς υποψηφίους για την εφαρμογή καινοτόμων θεραπευτικών στρατηγικών [241, 242].

Αναλόγως του mRNA-στόχου, τα miRNAs δρουν είτε ως επαγωγείς είτε ως καταστολείς της γονιδιακής έκφρασης. Επομένως, η αποκατάσταση των επιπέδων έκφρασης ογκο-κατασταλτικών miRNAs είτε η καταστολή των miRNAs που υπερεκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα, μέσω συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων RNA, αποτελεί μια πιθανή καινοτόμα φαρμακευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Προκειμένου να ελέγξουμε τη δράση των miRNAs, έχουν αναπτυχθεί δύο μηγανισμοί στόγευσης: i) οι διπλής έλικας συνθετικοί μιμητές που αποκαθιστούν την έκφραση των miRNAs και ii) οι ολιγονουκλεοτιδικοί καταστολείς της έκφρασης των miRNAs (γνωστοί και ως anti-miRNAs) [243, 244]. Μερικά από τα γαρακτηριστικά των miRNAs περιλαμβάνουν το μικρό μέγεθος, η γνωστή και συντηρημένη νουκλεοτιδική αλυσίδα και η ιδιότητα που διατηρεί ένα miRNA να στοχεύει περισσότερα του ενός mRNA ενός σηματοδοτικού μονοπατιού οδηγώντας σε γονιδιακές αλλαγές των καθοδικών του στόχων σε πολλές βιολογικές διεργασίες. Τα στοιχεία αυτά καθιστούν τα miRNAs θεραπευτικούς παράγοντες ή/και θεραπευτικούς στόχους [245]. Κατά την ομοιοπολική τους σύζευξη με το μεταφορέα τους, το φορτίο απελευθερώνεται στο κύτταρο-στόχο μέσω υδρόλυσης ή αναγωγής. Αυτό το σύστημα μεταφοράς χαρακτηρίζεται από μεγάλη σταθερότητα και δυνατότητα προστασίας του miRNA στην κυκλοφορία του αίματος. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της «θεραπείας miRNA» είναι οι μεγάλοι χρόνοι ημιζωής των μιμητών miRNAs και των anti-miRNAs στα κύτταρα, εκδηλώνοντας τις δράσεις τους ακόμα και αν έχουν απομακρυνθεί από την κυκλοφορία [246]. Τα παραπάνω οφέλη των miRNAs οδήγησαν στην ανάπτυξη μίας νέας τάξης φαρμακευτικών στόχων παρουσιάζοντας τη «θεραπεία miRNA» ως μελλοντική πρόκληση για κλινικές εφαρμογές. Τα ιικά ογήματα μεταφοράς εμφανίζουν υψηλότερη ικανότητα ενσωμάτωσης miRNAs, ωστόσο χαρακτηρίζονται από αυξημένη κυτταροτοξικότητα και ανοσοαπόκριση [247]. Από την άλλη μεριά, τα μη-ιικά συστήματα μεταφοράς miRNAs χαρακτηρίζονται από ελαττωμένη τοξικότητα και ανοσογονικότητα, αυξημένη κυτταρική πρόσληψη, υδατοδιαλυτότητα, αντοχή στη φαγοκυττάρωση και στην αποικοδόμηση από ενδονουκλεάσες [244]. Οι εφαρμογές των μη-ιικών συστημάτων μεταφοράς εστιάζονται στο σχεδιασμό λιποσωμικών, πολυμερικών και ανόργανων οχημάτων, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως σε προσεγγίσεις στοχευμένης μεταφοράς φαρμάκων [248]. Το πιο σημαντικό στοιχείο που πρέπει να ληφθεί υπόψιν προκειμένου να σχεδιαστεί ένας ασφαλής και αποδοτικός

νανομεταφορέας miRNA είναι η ανατομία του οργάνου-στόχου, η θεραπευτική δόση, το μικροπεριβάλλον του ιστού και η σύσταση του ECM για κάθε κυτταρικό τύπο.

Τα πολυμερικά συστήματα μεταφοράς χρησιμοποιούνται κατά κόρον ως μεταφορείς miRNAs και βασίζονται στη σύζευξη των φωσφορικών ομάδων των miRNAs με τις αμινομάδες κατιονικών πολυμερών, προστατεύοντας έτσι τα νουκλεϊκά οξέα από συνθετικούς αποικοδόμηση. Ανάμεσα στους πολυμερικούς μεταφορείς συγκαταλέγονται: το poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA), η poly-amidoamine (PAMAM), η poly-ethylenimine (PEI) και η χιτοζάνη [248, 249]. Επίσης, η σύζευξη με την υδρόφιλη polyethylene glycol (PEG) μπορεί να αυξήσει την απόδοση της σύζευξης και να βελτιώσει το χρόνο ημιζωής του σωματίου μεταφοράς στον ορό αίματος [250]. Η στοχευμένη μεταφορά των anti-miR-21 και anti-miR-10b PLGA-PEG πολυμερικών νανοσωματιδίων μειώνει το μέγεθος του όγκου σε in vivo πειραματικό μοντέλο καρκίνου του μαστού [251]. Επιπλέον, η χρήση πολυμερικών συμπλεγμάτων βασισμένων στο PLGA που έχουν ενσωματώσει με μεγάλη απόδοση το miR-26a, εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα ανάπλασης οστού σε μοντέλο οστεοπόρωσης [252], υποδηλώνοντας τη σημασία του συγκεκριμένου νανομεταφορέα σε εφαρμογές μηγανικής ιστού. Τέλος, νανομεταφορείς PLGA/PEI του miR-145 γαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα κυτταρικής πρόσληψης και αυξάνουν τα επίπεδα του συγκεκριμένου miRNA σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου, η οποία συνοδεύεται από αναστολή της εξέλιξης του όγκου in vitro [253].

Τα συνθετικά κατιονικά λιποσώματα αποτελούν οχήματα μεταφοράς νουκλεϊκών οξέων βασισμένα σε λιπίδια, τα οποία χρησιμοποιούνται εκτενώς ως μεταφορείς εξαιτίας της ενθυλάκωσης και της ενδοκυττάριας απελευθέρωσης του miRNA φορτίου τους με αυξημένη απόδοση και ελαττωμένες ανεπιθύμητες επιδράσεις. Τα ανιονικά miRNAs συνδέονται με τα κατιονικά λιποσώματα και δημιουργούν ένα ουδέτερο φορτίο που μπορεί εύκολα να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη μέσω ενδοκυττάρωσης, επιτρέποντας στο μιμητή miRNA ή στον ανταγωνιστή anti-miRNA να στοχεύσουν πολλά mRNAs, ελέγχοντας έτσι την έκφρασή τους και επιτυγχάνοντας ικανοποιητική κυτταρική πρόσληψη και απελευθέρωση του miRNA στο κυτταρόπλασμα όπου ακολουθεί η ενδοκυττάρια διάλυση του νανοσωματιδίου [254]. Για παράδειγμα, το miR-126 που προάγει την αγγειογένεση in vitro, όταν ενθυλακώθηκε σε PEG-λιποσώματα και μεταφέρθηκε σε ισχαιμικό μοντέλο ίνωσης οδήγησε στην επαγωγή του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF και τη βελτίωση της ροής του αίματος [255]. Έχει σχεδιαστεί και χρησιμοποιείται ευρέως σε κλινικές

εφαρμογές ένας μεγάλος αριθμός κατιονικών λιποσωμικών νανομεταφορέων miRNAs. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα αποτελούν τα: Lipofectamine (Invitrogen), DharmaFECT (Dharmacon), RNAi-MAX (Invitrogen), SilentFECT (Bio-Rad) και SiPORT (Invitrogen). Η σημασία της χρήσης τους έγκειται στο γεγονός ότι αυτοί οι λιποσωμικοί σχηματισμοί είναι βιοαποικοδομήσιμοι, βιοσυμβατοί, μη-ανοσογονικοί, μη-παθογόνοι και διαθέτουν αυξημένη συγγένεια με την κυτταρική επιφάνεια [256]. Τα ανόργανα συστήματα μεταφοράς miRNAs έχουν αναπτυχθεί λόγω της μεγάλης σταθερότητας που παρουσιάζουν *in vivo*, των αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων, της βιοσυμβατότητας και των χαμηλών επιπέδων κυτταροτοξικότητας που παρουσιάζουν. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs), πυριτίου (SiO<sub>2</sub>-NPs) και σιδήρου (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs). Ένα ενδιαφέρον παράδειγμα των AuNPs σε εφαρμογή αναγέννησης ιστού περιλαμβάνει την ενθυλάκωση του αρνητικά φορτισμένου miR-29b, η οποία είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη πρόσληψη του miR-29b, την είσοδό του στο κυτταρόπλασμα και τη ρύθμιση της οστεογένεσης, σε χαμηλές

θεραπευτικές δόσεις [257].

Πολλοί από τους νανομεταφορείς miRNA που αναπτύχθηκαν κατάφεραν να εισέλθουν σε κλινικές δοκιμές. Το πρώτο σύστημα μεταφοράς που εισήχθη σε κλινική δοκιμή φάσης Ι ήταν ο μιμητής του miR-34 συζευγμένος με λιποσώματα (MRX34) για την αντιμετώπιση πολλαπλών συμπαγών όγκων (NCT01829971). Η τεχνολογία EDV<sup>TM</sup> (EnGeneIC Dream Vector) αποτελεί την πρώτη στην κατηγορία της κυτταροανοσοθεραπείας, η οποία χρησιμοποιεί επισημασμένα με αντισώματα, μη-ζώντα κύτταρα για τη μεταφορά υψηλών συγκεντρώσεων γημειοθεραπευτικών φαρμάκων σε καρκινικά κύτταρα. Ενδοφλέβια χορήγηση των EDV μεταφορέων των μιμητών του miR-16 που στογεύουν τον υποδογέα EGFR (Vectibix® Sequence), για τη θεραπεία του μεσοθηλιώματος και του καρκίνου του πνεύμονα (ΝCT02766699). Ο ρόλος των μιμητών των miR-200b και miR-21 στην επούλωση της πληγής σε ασθενείς με διαβήτη, θα εκτιμηθεί επίσης σε κλινικές δοκιμές (NCT02581098). Ο ρόλος του anti-miR-122 στη χρόνια ηπατική ίνωση (ηπατίτιδα C) εξετάζεται ήδη σε διαφορετικές κλινικές δοκιμές φάσης ΙΙ (NCT01646489, NCT01200420, NCT01872936, NCT02031133, NCT02508090). Τέλος, η επίδραση των anti-miR-103/107 συζευγμένων με GalNAc σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 και μη-αλκοολικές ασθένειες του ήπατος εξετάζεται σε τρέχουσες κλινικές δοκιμές (ΝCT02612662, NCT02826525) [258].

Τα νανοσυστήματα που σχεδιάζονται και χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά miRNAs και τη συνεπακόλουθη ρύθμιση της σύστασης του ECM αποτελούν μεγάλη πρόκληση

για την ανάπτυξη καινοτόμων θεραπευτικών προσεγγίσεων για τη βελτίωση και την ανάπτυξη ασφαλών και αποδοτικών οχημάτων μεταφοράς miRNAs που θα συμβάλλουν στη διάγνωση και τη θεραπεία για την άμβλυνση, στο μέτρο του δυνατού, της εξέλιξης πληθώρας ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου.

## Σκοπός

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί μια πολύπλοκη και εξαιρετικά ετερογενή νεοπλασία, η οποία χαρακτηρίζεται από μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας. Τα οιστρογόνα και κυρίως η ορμόνη Ε2 κατέχουν κεντρικούς ρόλους στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της εξέλ του καρκίνου του μαστού, δρώντας κυρίως μέσω των λειτουργικών υποδοχέων τους, ERα και ERβ. Οι ERs ρυθμίζονται από εξωκυττάρια σήματα, όπως οι GFs, εκδηλώνοντας τις δράσεις τους και ανεξαρτήτως των οιστρογόνων, ενώ οι δομικές διαφορές που τους χαρακτηρίζουν εξηγούν τις διακριτές τους βιολογικές λειτουργίες. Η μεγάλη πλειοψηφία των επιστημονικών μελετών υποστηρίζει ότι τα ΕRα-θετικά καρκινικά κύτταρα μαστού παρουσιάζουν επιθηλιακή μορφολογία, η οποία συσχετίζεται με χαμηλό μεταστατικό δυναμικό, ενώ αντίθετα, η παρουσία του ΕRβ σχετίζεται με μεσεγχυματική μορφολογία που προσδίδει στα καρκινικά κύτταρα έντονη διηθητική και μεταστατική ικανότητα. Σε πρόσφατη μελέτη περιγράψαμε το μοριακό μηχανισμό μέσω του οποίου η αποσιώπηση του ΕRα στα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα μαστού, MCF-7, οδηγεί στην επαγωγή του ΕΜΤ μέσω σημαντικών αλλαγών στις βασικές λειτουργικές ιδιότητες, στα μορφολογικά χαρακτηριστικά και στα επίπεδα μεταγραφικής και πρωτεϊνικής έκφρασης τελεστών του ECM και σηματοδοτικών μορίων. Παρόλο που η συνεισφορά του ΕRα στον καρκίνο του μαστού έχει ευρέως μελετηθεί, ο ρόλος του ΕRβ παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος.

Η εξέλιξη του καρκίνου χαρακτηρίζεται από την πρόοδο διακριτών σταδίων, τα οποία περιλαμβάνουν: την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του όγκου, τη διήθηση στο αγγειακό σύστημα και σε παρακείμενους ιστούς, την αγγειογένεση και τελικά τη μετάσταση. Η πρόοδος αυτών των σταδίων απαιτεί από τα καρκινικά κύτταρα την απόκτηση ενός επιθετικού φαινοτύπου, ο οποίος συνοδεύεται από κυτταροσκελετικές αλλαγές και απώλεια κυτταρικών διεπαφών. Η συγκεκριμένη διαδικασία καλείται ΕΜΤ και προσδίδει στα καρκινικά κύτταρα αυξημένη μεταναστευτική και διηθητική ικανότητα. Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες η διαδικασία αυτή μπορεί να γίνει αντιστρεπτή (πρόγραμμα ΜΕΤ) και τότε τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν μειωμένη επιθετικότητα. Οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα καρκινικά κύτταρα και το μικροπεριβάλλον του όγκου βρίσκονται σε δυναμική αλληλεπίδραση και ρυθμίζονται από τον ECM. Αυτό το δυναμικό και λειτουργικό δίκτυο, τα μακρομοριακά συστατικά του οποίου αλληλεπιδρούν και συμμετέχουν στη ρύθμιση της κυτταρικής σηματοδότησης, επηρεάζει σημαντικά τη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων. Ανάμεσα στα λειτουργικά μόρια του ECM κατατάσσονται οι PGs που αλληλεπιδρούν με διάφορα σηματοδοτικά μόρια, ρυθμίζοντας κρίσιμες κυτταρικές λειτουργίες και οι

MMPs, οι οποίες μέσω της ενζυμικής αποικοδόμησης του ECM συμβάλλουν στην ανακύκλωση των συστατικών του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Επομένως, η σημασία της διεπικοινωνίας μεταξύ των κρίσιμων τελεστών του ECM, συμβάλλει στην κατανόηση των ρυθμιστικών μηχανισμών της παθοφυσιολογίας και των ιδιοτήτων των καρκινικών κυττάρων μαστού.

Τα τελευταία χρόνια μεγάλος αριθμός μελετών συνδέει την ύπαρξη μετα-μεταγραφικών επιγενετικών τροποποιήσεων, στο επίπεδο των miRNAs, με τα διακριτά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων και τους μηχανισμούς που ελέγχουν τη μεταναστευτική τους ικανότητα. Η διαφοροποιημένη έκφραση πολλών miRNAs έχει συσχετιστεί με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αντοχή στην απόπτωση, τη διαφοροποίηση, τη φλεγμονώδη απόκριση και την εξέλιξη του καρκίνου. Επιπλέον, τα miRNAs μπορούν να ρυθμίζουν άμεσα την έκφραση πολλών μακρομορίων του ECM, το φαινόμενο EMT αλλά και την έκφραση των ERs. Ωστόσο, δεν υπάρχει ακόμα μεγάλος αριθμός δεδομένων που να αποδεικνύει το ρόλο των ERs στην έκφραση των miRNAs.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, το αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής εντοπίζεται στην κατανόηση των ρυθμιστικών μηχανισμών που ελέγχουν την κυτταρική συμπεριφορά και την έκφραση χαρακτηριστικών σηματοδοτικών βιομορίων του ΕCM που αποτελούν κομβικά σημεία στην ανάλυση των μηγανιστικών θεμελίων του καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε ο ρόλος του ΕRβ, που αποτελεί αναπόσπαστο συστατικό των επιθετικών καρκινικών κυττάρων μαστού MDA-MB-231, τόσο στη μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση μορίων του ECM, όσο και στις βασικές κυτταρικές λειτουργίες και στα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια, που συμβάλλουν στη διηθητική και μεταστατική τους ικανότητα. Σε επόμενο στάδιο αξιολογήθηκε ο ρόλος των επιγενετικών τροποποιήσεων, σε επίπεδο miRNAs, στη ρύθμιση μορφολογικών χαρακτηριστικών, λειτουργικών ιδιοτήτων, έκφρασης σηματοδοτοτικών μορίων, καθώς και στη σύσταση του ECM, σε καρκινικά κύτταρα μαστού με διαφορετική έκφραση ERa/ERβ και επιθετικότητα. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν τα in vitro καρκινικά κυτταρικά μοντέλα μαστού: i) MCF-7 (χαμηλού μεταστατικού δυναμικού, ERα-θετικά) ii) MDA-MB-231 και (υψηλής μεταστατικότητας, ΕRβ-θετικά), πριν και μετά την καταστολή του ΕRβ. Τέλος, μελετήθηκε η διεπικοινωνία των σηματοδοτικών μονοπατιών EGFR/IGF-IR με τον ERβ και την E2, στην έκφραση miRNAs που εμπλέκονται στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού, όπως τα miR-10b και miR-200b.

Πειφαματικό μέφος

## Κυτταρικές καλλιέργειες

## Κυτταρικές σειρές και συνθήκες καλλιέργειας

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινες γονικές (parental) καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού και παραγόμενες από αυτές κυτταρικές σειρές έπειτα από διαμόλυνση (transfection) των κυττάρων με ιικά σωματίδια (lentiviral particles) τα οποία περιέχουν εξειδικευμένα shRNAs για την καταστολή συγκεκριμένων γονιδίωνστόχων. Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές και τα χαρακτηριστικά τους περιγράφονται στον **Πίνακα 2**. Οι καλλιέργειές τους πραγματοποιήθηκαν με συστηματική καλλιέργεια σε ειδικό επωαστήρα, σε περιβάλλον κορεσμένο 95% σε υγρασία, παρουσία 5% CO<sub>2</sub> και θερμοκρασία 37°C.

Κυτταρική σειρά	Περιγραφή		
MDA-MB-231	Κυτταρικός τύπος αδενοκαρκινώματος μαστού;		
	επιθηλιακού τύπου; υπότυπος basal B; μεσεγχυματικής		
	μορφολογίας; υψηλής μεταστατικότητας; έκφραση τω ογκογονιδίων wnt3+ και wnt7h+; μετάλλαξη της K-Ra		
	GTΡασης; ERβ- και EGFR- θετική; ERα- και HER2-		
	αρνητική		
MCF-7	Κυτταρικός τύπος αδενοκαρκινώματος μαστού;		
	υπότυπος luminal; επιθηλιακής μορφολογίας; χαμηλής		
	μεταστατικότητας; ERa- και IGF-IR-θετική; EGFR-		
	αρνητική		
shERβ MDA-MB-231	MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού στα οποία		
	πραγματοποιήθηκε καταστολή του ΕRβ, έπειτα από		
	διαμόλυνση των κυττάρων με lentiviral σωματίδια τα		
	οποία περιέχουν shRNAs έναντι του ανθρώπινου ΕRβ		
MDA-MB-231 ctrl	Σταθερά διαμολυσμένα κύτταρα με control shRNA		
	lentiviral σωματίδια (scrambled RNA sequence).		
	Χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα αναφοράς των shERβ		
	MDA-MB-231 κυττάρων		

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν.

Οι γονικές κυτταρικές σειρές MCF-7 και MDA-MB-231 αποκτήθηκαν από την εταιρία American Type Tissue Collection (ATCC) και καλλιεργήθηκαν σε πλήρες μέσο καλλιέργειας Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) συμπληρωμένο με 10% v/v βόειο εμβρυϊκό ορό (FBS), 1.0 mM πυροσταφυλικό νάτριο, 2mM L-γλουταμίνη και ένα μίγμα από αντιμικροβιακούς παράγοντες (100 IU/mL πενικιλίνη, 100 μg/mL στρεπτομυκίνη, 10 μg/mL θειική γενταμυκίνη και 2.5 μg/mL αμφοτερισίνη B). Οι σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές MDA-MB-231 ctrl και shERβ MDA-MB-231 καλλιεργήθηκαν με το παραπάνω μέσο καλλιέργειας παρουσία 0.8 μg/mL πουρομυκίνης (αντιβιοτικό επιλογής). Τα κύτταρα κάθε φορά συλλέγονταν σε μέσο καλλιέργειας έπειτα από ενζυμική κατεργασία με διάλυμα θρυψίνης 0.05% w/v σε 1X PBS (phosphate-buffered saline) το οποίο περιείχε 0.02% w/v Na<sub>2</sub>EDTA.

## Διαμολύνσεις των καρκινικών κυττάρων μαστού

#### Διαμολύνσεις των καρκινικών κυττάρων μαστού με ιικά σωματίδια shRNA

Οι σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές MDA-MB-231 ctrl και shERβ MDA-MB-231 προέκυψαν από τη διαμόλυνση των MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού με εξειδικευμένα short hairpin RNAs (shRNAs). Τα shRNAs έναντι του γονιδίου του ανθρώπινου ERβ [ERβ shRNA (h2) lentiviral particles, sc-44297-V] παρελήφθησαν από τη Santa Cruz Biotechnology, Inc. Τα ERβ shRNA (h2) lentiviral particles αποτελούν ένα σύνολο shRNAs από ικά σωματίδια τα οποία περιλαμβάνουν τρεις δομές με συγκεκριμένο στόχο (target-specific) που κωδικοποιούν 19-25 νουκλεοτίδια [συν τη φουρκέτα (hairpin)] και είναι σχεδιασμένα να καταστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση του ERβ. Ως αρνητικά control χρησιμοποιήθηκαν τα control shRNA Lentiviral Particles-A (sc-108080; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), τα οποία κωδικοποιούν μια shRNA αλληλουχία η οποία δεν οδηγεί σε αποικοδόμηση κάποιου συγκεκριμένου γονιδίου.

Οι διαμολύνσεις των MDA-MB-231 κυττάρων με τα shRNAs έναντι του γονιδίου του ανθρώπινου ERβ ή τα control shRNAs πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το διάλυμα επιμόλυνσης polybrene (sc-134220; Santa Cruz Biotechnology, Inc), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τη δημιουργία των σταθερά διαμολυσμένων κυττάρων προστέθηκαν στο μέσο καλλιέργειας 0.8 μg/mL πουρομυκίνης (puromycin dihydrochloride, sc-108071; Santa Cruz Biotechnology, Inc),

η οποία έχει το ρόλο του αντιβιοτικού επιλογής. Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν οι κλώνοι των shERβ MDA-MB-231 κυττάρων που ήταν ανθεκτικοί στην πουρομυκίνη και η επιτυχία της διαμόλυνσης ελέγχθηκε ως προς τη γονιδιακή έκφραση του ERβ με realtime PCR ανάλυση. Εν συνεχεία, οι σταθερά διαμολυσμένοι κλώνοι των MDA-MB-231 ctrl και shERβ MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού καλλιεργήθηκαν συστηματικά με πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM 10% FBS παρουσία 0.8 μg/mL πουρομυκίνης.

#### Διαμολύνσεις των καρκινικών κυττάρων μαστού με αλληλουχίες miRNAs

Για τη μελέτη του ρόλου των διάφορων microRNAs, τα καρκινικά κύτταρα μαστού καλλιεργήθηκαν σε πλάκες κυτταρικών καλλιεργειών 6 κελίων μία ημέρα πριν τη διαμόλυνση, προκειμένου να καλύψουν το 70% της επιφάνειας του κελίου μετά από 24 ώρες. Οι διαμολύνσεις των MCF-7, MDA-MB-231 ctrl και shERβ MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση microRNA precursors (premiRNA) ή inhibitors (anti-miRNA) που ενισχύουν ή καταστέλλουν την έκφραση του εκάστοτε miRNA, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν διαμολύνσεις με τα: pre-miR-10b (10 nM), pre-miR-200b (10 nM), anti-miR-10b (20 nM) και anti-miR-145 (20 nM), με χρήση του αντιδραστηρίου DharmaFECT σε μέσο καλλιέργειας Opti-MEM, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ως αρνητικό control χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία control #1 (10nM, ABI). Μετά το πέρας 24 ωρών από τη διαμόλυνση των καρκινικών κυττάρων, το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας Opti-MEM αντικαταστάθηκε με το πλήρες μέσο καλλιέργειας DMEM 10% FBS. Η επιτυχία της εκάστοτε διαμόλυνσης ελέγθηκε με ανάλυση real-time PCR των επιπέδων έκφρασης των συγκεκριμένων miRNAs, με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών που περιγράφονται στον Πίνακα 3. Η επιτυχία της διαμόλυνσης βασίζεται στο κατά πόσο επιβεβαιώνεται η αναμενόμενη υπερέκφραση ή η καταστολή της έκφρασης του miRNA που μελετάται κάθε φορά. Τέλος, τα πειράματα μελέτης των λειτουργικών ιδιοτήτων, γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης πραγματοποιήθηκαν έπειτα από 48-72 ώρες από τη διαμόλυνση.

Πίνακας 3. Κατάλογος με τα miRNA και τις μεθόδους real-time PCR που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία ελέγχου και επαλήθευσης των πειραμάτων διαμολύνσεων με τα αντίστοιχα precursor και inhibitor (anti-) miRNAs.

miRBase ID	Αριθμός πρόσβασης στη βάση δεδομένων miRBase	Αλληλουχία ώριμου miRNA
hsa-miR-10b	MIMAT0000254	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG
hsa-miR-145	MIMAT0000437	GUCCAGUUUUCCCAGGAAUCCCU
hsa-miR-200b	MIMAT0000318	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGA

## Αντιδραστήρια και χημικοί αναστολείς

Το μέσο καλλιέργειας DMEM, ο ορός FBS, το πυροσταφυλικό νάτριο, η L-γλουταμίνη, η πενικιλίνη, η στρεπτομυκίνη, η θειική γενταμυκίνη και η αμφοτερισίνη Β αποκτήθηκαν από την εταιρία Biosera LTD (Courtaboeuf Cedex, France). Το μέσο καλλιέργειας OPTI-MEM αποκτήθηκε από την εταιρία Gibco. Το αντιδραστήριο διαμόλυνσης DharmaFECT αποκτήθηκε από την εταιρία Dharmacon, GE Healthcare, UK. Τα microRNA pre-miR-10b, pre-miR-200b, anti-miR-10b, anti-miR-145 και negative control #1 αποκτήθηκαν από την εταιρία Thermofisher Scientific. O κυτταροστατικός παράγοντας κυτταραβίνη (cytarabine) που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα μελέτης της κυτταρικής μετανάστευσης, αποκτήθηκε από την εταιρία Sigma-Aldrich. Οι ειδικοί χημικοί αναστολείς του EGFR, AG1478 (1 μM), του IGF-IR, AG1024 (1 μM) και της JAK-2, tyrphostin AG490 (20 μM) αποκτήθηκαν όλοι από την εταιρία Sigma-Aldrich. Όλοι οι χημικοί αναστολείς διαλυτοποιήθηκαν σε διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO). Για την τήρηση των ίδιων συνθηκών στα κύτταρα αναφοράς προστέθηκε επίσης DMSO σε αντίστοιχη ποσότητα. Η ορμόνη 17β-οιστραδιόλη (E2) αποκτήθηκε από την εταιρία Sigma-Aldrich και εφαρμόστηκε σε τελική συγκέντρωση 10 nM.

## Ηλεκτρονική μικροσκοπία

## Ηλεκτρονική μικροσκοπία ανάστροφης φάσης

Κατά τη διάρκεια κάθε πειραματικής προσέγγισης που πραγματοποιήθηκε, λαμβάνονταν αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των κυτταρικών καλλιεργειών, προκειμένου να ελεγχθεί η κυτταρική μορφολογία ανά τακτά χρονικά διαστήματα, όπως ορίζουν τα εκάστοτε πειραματικά πρωτόκολλα. Οι φωτογραφίες ελήφθησαν από μικροσκόπια ανάστροφης φάσης, σε μεγεθύνσεις 4x, 10x και 40x, αναλόγως των απαιτήσεων των πειραμάτων και συγκεκριμένα από τα μικροσκόπια OLYMPUS CKX41 με ενσωματωμένη μια CMOS ψηφιακή κάμερα (SC30) και Zeiss Axioplan με ενσωματωμένη μία Zeiss Axioplan MRC ψηφιακή κάμερα. Οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν από το λογισμικά ImageJ 1.4.3.67 (Launcher Symmetry Software), Zeiss Zen 2011 blue edition και Zeiss Zen 2011 black edition (ZEN Software).

#### Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

Στα καρκινικά κύτταρα μαστού που επιστρώθηκαν είτε σε φλάσκες κυτταρικών καλλιεργειών, είτε σε matrigel millipore φίλτρο, μετά το πέρας 24 ωρών ή 48 ώρες μετά τις διαμολύνσεις με τα pre- ή anti-miRNAs, πραγματοποιήθηκαν πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O) 0.2M pH 7.4. Στη συνέχεια, ακολούθησε επώαση με το διάλυμα Καrnovsky's (4% παραφορμαλδεΰδη, 5% γλουταραλδεΰδη, 0.04M διάλυμα φωσφορικών) για 2-3 ώρες, προκειμένου να σταθεροποιηθούν τα κύτταρα στο πλαστικό της πλάκας κυτταρικών καλλιεργειών. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού 0.1%, επώαση 20 λεπτών με διάλυμα 1% OsO<sub>4</sub> σε ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού, αφυδάτωση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης και τέλος επώαση 15 λεπτών με hexamethyldisilazane (Sigma-Aldrich Inc.). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κατάλληλες επιφάνειες επικαλυμμένες με φιλμ χρυσού-παλλαδίου πάχους 5nm (Emitech Sputter Coating K550) αναλύθηκαν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Philips 515, Eindhoven, The Netherlands), σε λειτουργία δευτερογενών ηλεκτρονίων (secondary electron mode).

## Λειτουργικές ιδιότητες

## Μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τις μεθόδους WST-1 και MTT Τα καρκινικά κύτταρα επιστρώθηκαν σε πλάκες κυτταρικών καλλιεργειών 96 κελίων και αναπτύχθηκαν έως ότου να καλύψουν το 60-70% της επιφάνειας του κελίου. Στη συνέχεια, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 16 ώρες και κατόπιν επωάστηκαν με τους κατά περίπτωση παράγοντες, αναλόγως των απαιτήσεων των

πειραμάτων. Μετά από 24 ώρες επώασης, προστέθηκε στο μέσο καλλιέργειας το αντιδραστήριο Premix WST-1 (water-soluble tetrazolium salt) Cell Proliferation Assay System (Takara Bio Inc.) σε αναλογία 1:10, για 1 ώρα στους 37°C και μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 450 nm, με τη χρήση του φωτομέτρου ΤΕCAN Infinite M200. Για τα πειράματα των διαμολύνσεων με miRNAs χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο 3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), όπου 24 και 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση των καρκινικών κυττάρων μαστού με τα pre-miR-10b, pre-miR-200b, anti-miR-10b και anti-miR-145, όπως περιεγράφηκε παραπάνω, πραγματοποιήθηκε η επίστρωσή τους σε πλάκες κυτταρικών καλλιεργειών 96 κελίων για 24 ώρες. Εν συνεχεία, προστέθηκε στο μέσο καλλιέργειας το ΜΤΤ άλας τετραζολίου σε αναλογία 1:10 και τα κύτταρα επωάστηκαν για 4 ώρες στους 37°C. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η διάλυση του άλατος φορμαζάνης και μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 570 nm. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι το άλας τετραζολίου αποικοδομείται από το σύστημα της αναγωγάσης του ηλεκτρικούτετραζολίου που υπάρχει στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων και είναι ενεργή μόνο σε ζωντανά κύτταρα, προς σχηματισμό της χρωστικής φορμαζάνης (Εικόνα 12). Η ολική δραστικότητα της συγκεκριμένης μιτοχονδριακής δεϋδρογονάσης σε ένα δείγμα αυξάνεται με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων. Καθώς η αύξηση της ενζυμικής δραστικότητας οδηγεί στην αύξηση της παραγωγής φορμαζάνης, η ποσότητα της φορμαζάνης σχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των μεταβολικά ενεργών κυττάρων στο δείγμα.



**Εικόνα 12.** Αποικοδόμηση του άλατος τετραζολίου προς φορμαζάνη. (ΕC= πρωτονιοδέκτης, RS= σύστημα μιτοχονδριακής δεϋδρογονάσης).

#### Μέτρηση της δυνατότητας εξάπλωσης των κυττάρων

Προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα εξάπλωσης (spreading) των καρκινικών κυττάρων, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πλάκες κυτταρικών καλλιεργειών 6 κελίων, παρουσία ορού, για 24 ώρες, σε τέτοια συγκέντρωση προκειμένου να επιτευχθεί χαμηλή πυκνότητα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες με θρεπτικό υλικό απουσία ορού και η κυτταρική επιφάνεια υπολογίστηκε με τη βοήθεια του λογισμικού ImageJ 1.4.3.67 (Launcher Symmetry Software), έπειτα από τη λήψη πέντε αντιπροσωπευτικών φωτογραφιών σε κάθε κελίο της πλάκας, χρησιμοποιώντας ψηφιακή κάμερα συνδεδεμένη με μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή της επιφάνειας κάθε κυττάρου στα πέντε πεδία λήψης των φωτογραφιών και τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ο επί τοις εκατό μέσος όρος των επιφανειών των κυττάρων, σε τρία ανεξάρτητα πειράματα.

## Μέτρηση της κυτταρικής κινητικότητας με την τεχνική επούλωσης πληγής

Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πλάκες καλλιέργειας 12 κελίων, όπου και αναπτύχθηκαν έως ότου να καλύψουν το 90-100% της επιφάνειας του κελίου, προκειμένου να δημιουργηθεί μια κυτταρική μονοστοιβάδα. Εν συνεγεία, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 16 ώρες και γαράχθηκε η πληγή στο μέσο του κελίου, με τη γρήση αποστειρωμένου ρύγχους 100 μL. Τα κύτταρα που αποκολλήθηκαν κατά τη διαδικασία του σχηματισμού της πληγής απομακρύνθηκαν από το κελίο μετά από επαναλαμβανόμενες πλύσεις με θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Στη συνέχεια, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η συμβολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στη μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων, προστέθηκε σε κάθε κελίο ο κυτταροστατικός παράγοντας κυτταραβίνη (cytarabine) σε συγκέντρωση 10 μM και παρέμεινε μέχρι το τέλος του πειράματος. Όταν το μέσο καλλιέργειας ήταν καθαρό από τα επιπλέοντα κύτταρα, εισήχθησαν οι εκάστοτε παράγοντες, όπου ήταν αναγκαίο και έπειτα λήφθηκαν φωτογραφίες της πληγής, σε μεγέθυνση 10x, στα γρονικά διαστήματα 0, 24 και 48 ωρών μετά τη δημιουργία της πληγής, αναλόγως των απαιτήσεων του πειράματος. Η μέτρηση της επιφάνειας της πληγής έγινε με το λογισμικό ανάλυσης εικόνων ImageJ 1.4.3.67 (Launcher Symmetry Software) και έπειτα υπολογίστηκε το κλείσιμο της πληγής μεταξύ των χρονικών σημείων που λήφθηκαν οι εικόνες. Για τα πειράματα των διαμολύνσεων με miRNAs, 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση των καρκινικών κυττάρων με τα pre-miR-10b, pre-miR-200b, anti-miR-10b και anti-miR-

145, όπως περιεγράφηκε παραπάνω, πραγματοποιήθηκε η επίστρωσή τους σε πλάκες κυτταρικών καλλιεργειών 12 κελίων για 24 ώρες προκειμένου να καταληφθεί το 100% της επιφάνειας του κελίου και εν συνεχεία ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία.

## Προσδιορισμός της διηθητικής ικανότητας των κυττάρων σε κολλαγόνο τύπου Ι

Η ικανότητα διήθησης των καρκινικών κυττάρων μελετήθηκε χρησιμοποιώντας τα ειδικά διαμορφωμένα κελία διήθησης BD Biocoat<sup>TM</sup> Matrigel<sup>TM</sup> Invasion Chambers (BD Biosciences). Ká $\theta$ ε κελίο (invasion chamber) περιέχει μια PET μεμβράνη με πόρους μεγέθους 8 μm, η οποία είναι επιστρωμένη με matrigel matrix. Κατάλληλος αριθμός καρκινικών κυττάρων επιστρώθηκε, παρουσία ή απουσία παραγόντων, στο πάνω μέρος της μεμβράνης, για 24 ώρες. Το θρεπτικό υλικό στο επάνω μέρος της επιφάνειας της μεμβράνης δεν περιείχε ορό, ενώ το θρεπτικό υλικό κάτω από τη μεμβράνη περιείχε 5% ορό, ο οποίος λειτουργούσε ως χημειοελκυστικό. Τα κύτταρα το οποία δεν διήθησαν τη μεμβράνη απομακρύνθηκαν με μια αποστειρωμένη ωτογλυφίδα, ενώ στα κύτταρα που μετανάστευσαν διαμέσου του matrigel matrix πραγματοποιήθηκε γρώση με τολουϊδίνη. Έπειτα, η μεμβράνη φωτογραφήθηκε από μια CMOS ψηφιακή (SC30) συνδεδεμένη με μικροσκόπιο Olympus CKX41 κάμερα και οι αντιπροσωπευτικές εικόνες των διηθούντων κυττάρων αναλύθηκαν και μετρήθηκαν από το λογισμικό ανάλυσης εικόνων ImageJ 1.4.3.67 (Launcher Symmetry Software). Για τα πειράματα των διαμολύνσεων με miRNAs 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση των καρκινικών κυττάρων μαστού με τα pre-miR-10b, pre-miR-200b, anti-miR-10b και

καρκινικών κυττάρων μαστού με τα pre-miR-10b, pre-miR-200b, anti-miR-10b και anti-miR-145, όπως περιεγράφηκε παραπάνω, πραγματοποιήθηκε η επίστρωσή τους στο πάνω μέρος της μεμβράνης η οποία είναι επιστρωμένη με matrigel matrix, για 24 ώρες, σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Στη συνέχεια, στα κύτταρα που διήθησαν τη μεμβράνη πραγματοποιήθηκε χρώση με τη βαφή DiffQuik (Medion, Duedingen, Switzerland). Η μεμβράνη φωτογραφήθηκε από CMOS ψηφιακή κάμερα συνδεδεμένη σε ένα μικροσκόπιο και οι αντιπροσωπευτικές εικόνες των διηθούντων κυττάρων αναλύθηκαν και μετρήθηκαν με το λογισμικό ανάλυσης εικόνων ImageJ 1.4.3.67 (Launcher Symmetry Software).

Η διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων αξιολογήθηκε επίσης από την ικανότητά τους να διηθούν πήκτωμα κολλαγόνου τύπου Ι, με μια διαδικασία η οποία περιγράφεται αναλυτικά από τους De Wever et al. [259]. Συγκεκριμένα, το διάλυμα

κολλαγόνου τύπου Ι (Advanced Biomatrix) με τελική συγκέντρωση 1 mg/mL προετοιμάστηκε αναμειγνύοντας: 4 όγκους κολλαγόνου τύπου Ι, 5 όγκους CMF-HBSS, 1 όγκο MEM (10X), 1 όγκο 0.25 M NaHCO<sub>3</sub>, 2.65 όγκους από το μέσο καλλιέργειας και 0.3 όγκους NaOH 1 M. Το ψυχρό διάλυμα κολλαγόνου επιστρώθηκε σε πλάκες καλλιέργειας 12 κελίων όπου και απλώθηκε ομοιογενώς και αφέθηκε για τουλάχιστον 1 ώρα μέσα στον κυτταρικό επωαστήρα για να μετατραπεί σε πήκτωμα. Πριν την επίστρωσή τους στο πήκτωμα, τα καρκινικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 16 ώρες απουσία ορού και αφότου το πήκτωμα στερεοποιήθηκε επιστρώθηκαν σε αυτό 5 × 10<sup>4</sup> καρκινικά κύτταρα/κελίο. Έπειτα, έγινε η προσθήκη των εκάστοτε παραγόντων, όπου ήταν αναγκαίο και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες στον κυτταρικό επωαστήρα. Μετά το πέρας των 24 ωρών, λήφθηκαν φωτογραφίες σε όλη την επιφάνεια του κελίου, σε μεγέθυνση 10x, με χρήση του μικροσκοπίου ανάστροφης φάσης OLYMPUS CKX41 εξοπλισμένου με ψηφιακή, έγχρωμη κάμερα CMOS (SC30). Οι εικόνες των διηθούντων κυττάρων αναλύθηκαν και μετρήθηκαν από το λογισμικό ανάλυσης εικόνων ImageJ 1.4.3.67 (Launcher Symmetry Software).

## Προσδιορισμός της ικανότητας προσκόλλησης των κυττάρων σε κολλαγόνο τύπου Ι

Προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα προσκόλλησης των καρκινικών κυττάρων, ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο, όπως περιγράφεται σε προηγούμενη εργασία [260]. Επιγραμματικά, παρασκευάστηκαν 40 μg/mL κολλαγόνου τύπου Ι σε PBS και διάλυμα BSA 0.1% (w/v) σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Έπειτα, μια πλάκα κυτταρικών καλλιεργειών 96 κελίων επιστρώθηκε με διάλυμα κολλαγόνου τύπου Ι 30 μg/ml, για 12 ώρες στους 4°C. Στη συνεχεία, το διάλυμα κολλαγόνου απομακρύνθηκε και η πλάκα αφέθηκε να στεγνώσει. Αφού τα καρκινικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού για 8 ώρες πριν την έναρξη της διαδικασίας, αποκολλήθηκαν από το μέσο καλλιέργειας με διάλυμα PBS-EDTA 1X, επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε διάλυμα BSA 0.1% σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού και επιστρώθηκαν στην πλάκα 96 κελίων σε συγκέντρωση 2×10<sup>4</sup> κύτταρα/κελίο. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 30 λεπτά στον κυτταρικό επωαστήρα προκειμένου να προσκολληθούν στην επιφάνεια του κάθε κελίου. Αυτά που δεν προσκολλήθηκαν, απομακρύνθηκαν μετά από πλύση με θρεπτικό υλικό απουσία ορού και εν συνεχεία, επωάστηκαν με θρεπτικό υλικό παρουσία 10% (v/v) ορού για 4 ώρες προκειμένου να

ανακάμψουν. Μετά την περίοδο επώασης, προστέθηκε στο μέσο καλλιέργειας το αντιδραστήριο Premix WST-1 σε αναλογία 1:10 σε σχέση με τον τελικό όγκο μέσα στο κελίο και η οπτική απορρόφηση του κάθε κελίου μετρήθηκε σε μήκος κύματος 450 nm με μήκος κύματος αναφοράς στα 650 nm.

## Μελέτη έκφρασης σε μεταγραφικό επίπεδο

#### Απομόνωση ολικού RNA και ανάλυση real-time PCR

Τα καρκινικά κύτταρα μαστού αναπτύχθηκαν παρουσία 10% FBS έως ότου καλύψουν το 70-80% της επιφάνειας του μέσου καλλιέργειας και έπειτα αποκολλήθηκαν από το μέσο καλλιέργειας κατόπιν ενζυμικής κατεργασίας με διάλυμα τρυψίνης 0.05% (w/v) σε 1X PBS το οποίο περιείχε 0.02% (w/v) Na2EDTA. Κατά περίπτωση, μετά την ανάπτυξή τους τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 16 ώρες και εν συνεχεία επωάστηκαν με τους εκάστοτε παράγοντες για επιλεγμένα χρονικά διαστήματα, αναλόγως των απαιτήσεων του εκάστοτε πειράματος. Αφότου έγινε πλύση των κυττάρων εις διπλούν με διάλυμα 1X PBS, το ολικό RNA απομονώθηκε με τη χρήση είτε του NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II Kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany) είτε του rna-OLS (OMNI Life Science, Hamburg, Germany). Για τα πειράματα των διαμολύνσεων με miRNAs, 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση των καρκινικών κυττάρων μαστού με τα premiR-10b, pre-miR-200b, anti-miR-10b και anti-miR-145, όπως περιεγράφηκε παραπάνω, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του ολικού RNA με τη χρήση του innuPREP RNA Mini Kit (Analytik Jena AG, Germany). Ο υπολογισμός της ποσότητας του ολικού απομονωμένου RNA πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση της οπτικής του απορρόφησης στα 260 nm. Για να ελεγχθεί η καθαρότητα του ολικού RNA μετρήθηκε επίσης η οπτική πυκνότητά του στα 280 nm. Ο λόγος καθαρότητας A260nm/A280nm ήταν σε κάθε περίπτωση μεταξύ των αποδεκτών τιμών 1.8 και 2.1.

Στη συνέχεια, το ολικό RNA μετατράπηκε στο συμπληρωματικό του cDNA με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR), χρησιμοποιώντας είτε το PrimeScript<sup>TM</sup> 1<sup>st</sup> strand cDNA synthesis kit perfect real time (Takara Bio Inc) ή το High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Η ενίσχυση του cDNA και η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης έγινε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time qPCR) σε 20μL διαλύματος αντίδρασης, χρησιμοποιώντας το KAPA Taq ReadyMix

DNA Polymerase (KAPABIOSYSTEMS) και το QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen), σύμφωνα με τις οδηγίες του εκάστοτε κατασκευαστή. Η μετατροπή του ολικού RNA σε cDNA έγινε με τη χρήση των θερμοκυκλοποιητών Rotor Gene Q (Qiagen) και Light-Cycler (Roche, IN). Όλες οι αντιδράσεις έγιναν εις τριπλούν, ενώ σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκε και η αντίστοιγη καμπύλη διαλυτοποίησης (melting curve) για να ελεγχθεί η ταυτοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης βάσει του ζεύγους εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά. Επιπλέον, για κάθε ζεύγος εκκινητών πραγματοποιήθηκε επίσης μια πρότυπη καμπύλη για να ελεγχθεί η απόδοση της τεχνικής. Για να γίνει η ποσοτικοποίηση, το σημείο συσσώρευσης του προϊόντος της αντίδρασης στην πρώιμη λογαριθμική φάση του διαγράμματος πολλαπλασιασμού υπολογίστηκε προσδιορίζοντας το κατώφλι λίγο πάνω από το υπόβαθρο φθορισμού. Το σημείο αυτό ορίζεται ως αριθμός κύκλων κατωφλιού (Ct number). Η σχετική έκφραση του κάθε γονιδίου υπολογίστηκε με τη μέθοδο ΔΔCt. Ο αριθμός Ct του γονιδίου στόχου κανονικοποιήθηκε βάση του αριθμού Ct του γονιδίου αναφοράς (GAPDH). Η μεταβολή σε φορές (fold change) προσδιορίστηκε ως  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο παρουσιάζονται στους Πίνακες 4 και 5.

Γονίδιο- στόχος		Αλληλουχία εκκινητών (5'-3')	Τυβριδοποίησης (°C)
ERα	F	TGATGAAAGGTGGGATACGA	60
	R	AAGGTTGGCAGCTCTCATGT	
ERβ	F	TCCATGCGCCTGGCTAAC	60
	R	CAGATGTTCCATGCCCTTGTTA	
EGFR	F	ATGCTCTACAACCCCACCAC	60
	R	GCCCTTCGCACTTCTTACAC	
HER2	F	CTGCACCCACTCCTGTGTGCACCTG	60
	R	CTGCCGTCGCTTGATGAGGATC	
IGF-IR	F	ACG AGT GGA GAA ATC TGC GG	60
	R	ATG TGG AGG TAG CCC TCG AT	
IL-8	F	CTCCAAACCTTTCCACCCC	57
	R	GATTCTTGGATACCACAGAGAATG	
E-Cadherin	F	TACGCCTGGGACTCCACCTA	60
	R	CCAGAAACGGAGGCCTGAT	
Vimentin	F	GGCTCGTCACCTTCGTGAAT	60
	R	GAGAAATCCTGCTCTCCTCGC	
Fibronectin	F	CATCGAGCGGATCTGGCCC	60
	R	GCAGCTGACTCCGTTGCCCA	
Snail2/Slug	F	AGACCCTGGTTGCTTCAAGGA	60
	R	CTCAGATTTGACCTGTCTGCAAA	
ZEB-1	F	GAAAATGAGCAAAACCATGATCCT	62
	R	CCCTGCCTCTGGTCCTCTTC	
ZEB-2	F	CACGATCCAGACCGCAATTA	60
	R	CATCGCGTTCCTCCAGTTTT	
MMP-1	F	CCTCGCTGGGAGCAAACA	60
	R	TTGGCAAATCTGGCGTGTAA	
MMP-2	F	CGTCTGTCCCAGGATGACATC	62
	R	ATGTCAGGAGAGGCCCCATA	
MMP-7	F	GCTGGCTCATGCCTTTGC	60
	R	TCCTCATCGAAGTGAGCATCTC	
MMP-9	F	TTCCAGTACCGAGAGAAAGCCTAT	60
	R	GGTCACGTAGCCCACTTGGT	
MT1-MMP	F	CATGGGCAGCGATGAAGTCT	60
	R	CCAGTATTTGTTCCCCTTGTAGAAGTA	
TIMP_1	F	CGCTGACATCCGGTTCGT	60
1 1111 - 1	R	TGTGGAAGTATCCGCAGACACT	
TIMP_2	F	GGGCACCAGGCCAAGTT	60
1 IIVII -2	P		00
μDΛ	F		60
	P I	GAAGTGTGAGACTCTCGTGTAGAC	
tDΛ	F		60
uA	D I'		
DAT 1	к Б		60
1 /1-1	D D	CCCATGAAAACCACTCTTCCCTCTC	
1	71		1

Πίνακας 4. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην real-time PCR ανάλυση.

Serglycin	F	GTTGGCGTGCAGCTGGGAGA	60
	R	GGCTCTCCGCGTAGGATAACCTTG	
CD44s	F	ATAATAAAGGAGCAGCACTTCAGGA	60
	R	ATAATTTGTGTCTTGGTCTCTGGTAGC	
CD44v3	F	ATAATGGCTGGGAGCCAAATGAAGAAA	60
	R	ATAATCATCATCATCAATGCCTGATCCAGA	
CD44v6	CD44v6 F ATAATCAGAAGGAACAGTGGTTTGGCA		60
	R	ATAATGTCTTCTTTGGGTGTTTGGCGA	
CD44v9	F	ATAATGAGCTTCTCTACATCACATGAAGGC	60
	R	TAATGTCAGAGTAGAAGTTGTTGGATGGTC	
HAS1	F	GGAATAACCTCTTGCAGCAGTTTC	60
	R	GCCGGTCATCCCCAAAAG	
HAS2	F	TCGCAACACGTAACGCAAT	60
	R	ACTTCTCTTTTTCCACCCCATTT	
HAS3	F	AACAAGTACGACTCATGGATTTCCT	60
	R	GCCCGCTCCACGTTGA	
AS1-HAS2	F	AGCGGCCTCACTCCTTCAGCAAAG	60
	R	GACCGTTGCTGCCTGTTGGGTCTC	
HYAL-1	F	GATTGCAGTGTCTTCGATGTGGTA	60
	R	GGGAGCTATAGAAAATTGTCATGTCA	
HYAL-2	F	CTAATGAGGGTTTTGTGAACCAGAATAT	60
	R	GCAGAATCGAAGCGTGGATAC	
GAPDH	F	AGGCTGTTGTCATACTTCTCAT	60
	R	GGAGTCCACTGGCGTCTT	

Πίνακας 5. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην real-time PCR ανάλυση που ακολούθησε τις διαμολύνσεις των καρκινικών κυττάρων με τα pre- ή anti-miRNAs.

F

Γονίδιο- στόχος	Αλληλουχία (5'-3')-Κωδικός εκκινητή	Τύπος εκκινητή
18S rRNA	Hs99999901_s1	ABI TaqMan
Actin gamma-2	Hs01123712_m1	ABI TaqMan
E-cadherin	Hs00170423_m1	ABI TaqMan
	F: TCAGCATCACGATGACCTTGAA	συμβατικός
Vimentin	R: CTGCAGAAAGGCACTTGAAAGC	εκκινητής real-time PCR
	F: CCAAGCATCACCCTGGGAGT	συμβατικός
Fibronectin	R: CGAAGCAGAACAGGCAATGTG	εκκινητής real-time PCR
Snail2/Slug	F: ATCTGCCAGACGCGAACTCA	συμβατικός
	R: GGCAACCAGACAACCGACAT	εκκινητής real-time PCR
ZEB2	F: TGGGCTAGTAGGCTGTGTCCA	συμβατικός
	R: TCATCTTCAACCCTGAAACAGAGG	εκκινητής real-time PCR

	F: CAATTGGAAGATTGGAAGATTCAGC	συμβατικός
EGFR	R: CCAGTCAGGTTACAGGGCACA	εκκινητής real-time
		PCR
IGF-IR	Hs00541255_21	ABI TaqMan
	F: AAGCGGCCCTAAGGGAGTGT	συμβατικός
HER2	R: CATTGCTGTTCCTTCCTCATGG	εκκινητής real-time
		PCR
	F: TCCAATCTCTCTCTCCCTGATCG	συμβατικός
VEGF	R: GGGCAGAGCTGAGTGTTAGCAA	εκκινητής real-time
		PCR
MMP-2	Hs00234422_m1	ABI TaqMan
MMP-7	F: GCTGGCTCATGCCTTTGC	συμβατικός
	R: TCCTCATCGAAGTGAGCATCTC	εκκινητής real-time
		PCR
MMP-9	Hs00234579_m1	ABI TaqMan
MT1-MMP	Hs00237119_m1	ABI TaqMan
Syndecan-	Hs00174579_m1	ABI TaqMan
1		
Sydecan-2	Hs00299807_m1	ABI TaqMan
Syndecan-	Hs00161617_m1	ABI TaqMan
4		
Integrin αv	Hs00233808_m1	ABI TaqMan
IL-6	F:	συμβατικός
	GAGAAAGGAGACATGTAACAAGAGT	εκκινητής real-time
	R: GCGCAGAATGAGATGAGTTGT	PCR
IL-6R	F: ATGCTGGCCGTCGGCTGCGCGCTG	συμβατικός
	R: TCTGAGCTCAAACCGTAGTCT	εκκινητής real-time
		PCR

## Μελέτη πρωτεϊνικής έκφρασης

## Ανοσοαποτύπωση western

Τα καρκινικά κύτταρα αναπτύχθηκαν παρουσία ορού έως ότου καλύψουν το 70-80% της επιφάνειας του μέσου καλλιέργειας. Στη συνέχεια, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 16 ώρες και επωάστηκαν με τους εκάστοτε παράγοντες για διάφορα χρονικά διαστήματα, αναλόγως των απαιτήσεων του κάθε πειράματος. Για τα πειράματα των διαμολύνσεων με miRNAs, 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση των καρκινικών κυττάρων με τα pre-miR-10b, pre-miR-200b, anti-miR-10b και anti-miR-145, όπως περιεγράφηκε παραπάνω, ακολουθήθηκε η εξής πειραματική πορεία. Τα κύτταρα εκπλύθηκαν δύο φορές με ψυχρό PBS και επωάστηκαν με το διάλυμα λύσης,
το οποίο αποτελείται από: 25 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10% (v/v) γλυκερόλη, 1% (v/v) Triton X-100, μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Roche Diagnostics ή Chemicon, Millipore, CA) και 0.5 mM NaVO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως αναστολέας των φωσφατασών. Για να διασφαλιστεί ότι κάθε δείγμα περιέχει ίδια ποσότητα πρωτεΐνης, η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης του εκχυλίσματος προσδιορίστηκε φωτομετρικά με τη μέθοδο Bradford (Quick Start<sup>TM</sup> Bradford Protein Assay, Biorad ή Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay, Thermofisher Scientific).

Η αναγωγή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με β-μερκαπτοαιθανόλη σε διάλυμα Laemmli (Biorad) και θέρμανση στους 95°C για 5 λεπτά, προκειμένου να επιτευχθεί η αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, ίση ποσότητα δείγματος φορτώθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και πραγματοποιήθηκε ο διαγωρισμός των πρωτεϊνών με τη διαδικασία της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης. Οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης σε μεμβράνη πολυβινυλιδενίου (PVDF) (Macherey Nagel ή GE Healthcare). Οι μεμβράνες επωάστηκαν με 5% (w/v) BSA σε Tris-buffered saline pH 7.4 το οποίο περιείχε 0.05% Tween-20 (TBS-T), για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να παρεμποδιστούν οι μη-ειδικές δεσμεύσεις του πρωτοταγούς αντισώματος και εν συνεχεία επωάστηκαν με τα πρωτοταγή αντισώματα για 16 ώρες στους 4°C. Μετά από τρεις πλύσεις με το διάλυμα TBS-T, οι μεμβράνες επωάστηκαν με το δευτεροταγές (secondary) αντίσωμα, το οποίο ήταν συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πρωτοταγή και δευτεροταγή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. Μετά από τρεις πλύσεις των μεμβρανών με διάλυμα TBS-T, ακολούθησε η ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών, η οποία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του υποστρώματος χημειοφωταύγειας υπεροξειδάσης (ECL) (Immobilon<sup>TM</sup> Western, Millipore). Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών πραγματοποιήθηκε είτε μέσω έκθεσης της μεμβράνης σε επιστημονικό x-ray φιλμ (FujiFilm) ή από αυτόματο σύστημα ανίχνευσης χημειοφωταύγειας (BioRad) και το αντίστοιχο λογισμικό Quantity One.

Αντίσωμα		Κατασκευαστής
ERβ	Rabbit	Abcam
p-p44/42 MAPK (Erk1/2)	Rabbit	Cell Signaling
(Thr202/Tyr204)		Technology
p44/42 MAPK (Erk1/2)	Rabbit	Cell Signaling
		Technology
p-AKT	rabbit	Cell Signaling
		Technology
AKT	rabbit	Cell Signaling
		Technology
p-Stat3	Rabbit	Cell Signaling
		Technology
Stat3	Rabbit	Cell Signaling
		Technology
p-FAK	Mouse	BD Biosciences
FAK	Mouse	BD Biosciences
Fibronectin	Rabbit	Sigma-Aldrich
Biotin-HABP (4 µg/ml)	Bovine	Calbiochem, Millipore
E-Cadherin, clone 36, monoclonal	Mouse	BD Biosciences
Vimentin, clone 13.2, monoclonal	Mouse	Sigma-Aldrich
ZO-1	Mouse	ThermoFisher Scientific
Syndecan-1 (DL-101)	Mouse	Santa Cruz
		Biotechnology
Syndecan-4	Mouse	Santa Cruz
		Biotechnology
α-Tubulin, clone B-5-1-2	Mouse	Sigma-Aldrich
Serglycin	Rabbit	Homemade
anti-rabbit IgG Peroxidase Conjugated	Goat	Calbiochem
anti-mouse IgG Peroxidase Conjugated	Goat	Calbiochem
Alexa-Fluor 488 anti-mouse IgG	Goat	Invitrogen Corporation
Alexa-Fluor 488 anti-rabbit IgG	Goat	Invitrogen Corporation

**Πίνακας 6.** Τα πρωτοταγή και δευτεροταγή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις τεχνικές της ανοσοαποτύπωσης western και του ανοσοφθορισμού.

#### Ανοσοφθορισμός

Για τη διαδικασία του ανοσοφθορισμού, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πλάκες καλλιέργειας 6, 12 ή 24 κελίων στις οποίες έχουν τοποθετηθεί γυάλινες καλυπτρίδες. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν για 24 ώρες, έως ότου να καλύψουν το 60-70% του κελίου. Κατά περίπτωση, μετά την ανάπτυξή τους τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού

για 16 ώρες και εν συνεγεία επωάστηκαν με τους εκάστοτε παράγοντες για διάφορα χρονικά διαστήματα, αναλόγως των απαιτήσεων της κάθε πειραματικής προσέγγισης. Για τα πειράματα των διαμολύνσεων με miRNAs, 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση των καρκινικών κυττάρων μαστού με τα pre-miR-10b, pre-miR-200b, anti-miR-10b και anti-miR-145, όπως περιεγράφηκε παραπάνω, ακολουθήθηκε η εξής πειραματική πορεία. Πραγματοποιήθηκε μία πλύση με διάλυμα PBS pH 7.4 και ακολούθησε η σταθεροποίηση των κυττάρων με 4% παρα-φορμαλδεΰδη σε PBS για 10 λεπτά. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PBS-T (PBS + 0.1% Tween 20) και οι καλυπτρίδες επωάστηκαν με 0.5% Triton X-100 σε PBS-Τ για 10 λεπτά, ώστε να γίνει διαπερατή η κυτταρική μεμβράνη. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι όταν επρόκειτο να γίνει χρώση των κυττάρων για τον εντοπισμό μεμβρανικών αντιγόνων, το στάδιο επώασης με 0.5% Triton X-100 παραλειπόταν. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν τρεις πλύσεις με PBS-T και οι καλυπτρίδες επωάστηκαν με 5% BSA σε PBS-T για 1 ώρα σε παρεμποδιστούν θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να οι μη-ειδικές αλληλεπιδράσεις του πρωτοταγούς αντισώματος που θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια. Έπειτα, τα καλύμματα επωάστηκαν με το πρωτοταγές αντίσωμα για 16 ώρες στους 4°C, σε συνθήκες υγρασίας. Για τη χρώση του ΗΑ, οι καλυπτρίδες επωάστηκαν με 5% BSA σε PBS-T, ασπράδια αυγού (2) διαλυμένα σε dH2O και 5% ξηρό γάλα σε PBS προκειμένου να παρεμποδιστούν οι ενδογενείς βιοτίνη και αβιδίνη. Μετά το πέρας της επώασης, ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PBS-T, επώαση με το κατάλληλο δευτεροταγές αντίσωμα για 1 ώρα σε σκοτεινό θάλαμο, τρεις πλύσεις με PBS-T και μία πλύση με dd H2O. Τέλος, οι καλυπτρίδες επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με τη χρήση του αντιδραστηρίου ProLong Gold antifade (Thermofisher Scientific) που περιείγε το αντίσωμα DAPI για τη χρώση των πυρήνων και αφότου στέγνωσαν παρατηρήθηκαν σε μεγέθυνση 60x και 63x στα μικροσκόπια OLYMPUS CKX41 με ενσωματωμένη CMOS ψηφιακή κάμερα (SC30) και ειδικά φίλτρα φθορισμού και στο συνεστιακό (confocal) μικροσκόπιο LSM 510 ΜΕΤΑ με ενσωματωμένη μια Zeiss Axioplan MRM κάμερα και φακό εμβάπτισης ελαίου Plan-Apochromat 63x/1.40 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Οι εικόνες επεξεργάστηκαν από το λογισμικά Zeiss Zen blue edition και Zeiss Zen black edition (ZEN software). Όλα τα πρωτοταγή και δευτεροταγή αντισώματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

#### Κυτταρομετρία ροής (FACS)

Η συγκεκριμένη τεχνική, επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πρωτεϊνών και βιοδεικτών σε ένα κυτταρικό αιώρημα μέσω ηλεκτρονικού ανιχνευτή το οποίο διαχέεται από κυτταρομετρητή ροής και βομβαρδίζεται με ακτίνα laser. Στη συγκεκριμένη διατριβή, ανιχνεύθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των πρωτεϊνών CD44 και CD24, οι οποίες αποτελούν χαρακτηριστικούς δείκτες φαινοτύπου βλαστοκυττάρων (stem cell phenotype), όπως περιγράφεται σε πρόσφατη δημοσίευση [261]. Συγκεκριμένα, τα καρκινικά κύτταρα μαστού, διαμολυσμένα ή μη με τα pre- ή anti-miRNAs, συλλέχθηκαν έπειτα από επώαση για 10 λεπτά στους 37°C με διάλυμα 2 mM EDTA σε PBS απαλλαγμένο από τα ιόντα  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$  και ήπια ανακίνηση. Στη συνέχεια  $1 \times 10^5$ κύτταρα σε 100 μl PBS/ 0.1% BSA (PBS/BSA) επωάστηκαν με 10 μl από τα anti-CD44-APC, anti-CD24-PE και τα APC και PE isotype controls για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και απουσία φωτός. Ακολούθως, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν (450 g, 30 sec) και εκπλύθηκαν 2 φορές με 300 μl PBS/BSA. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 1 ml PBS/BSA και ακολούθησε η κυτταρομετρία ροής σε CyFlow Space (Sysmex/Partec, Görlitz, Germany) εξοπλισμένο με μία 25 mW 638 nm κόκκινη δίοδο laser και μία 20 mW 488 nm μπλε laser αργού. Ο φθορισμός εκπομπής, μετρήθηκε σε μήκος κύματος 675 nm (BP675/20 nm) και στα 590 nm (BP 590/50 nm). Τα isotype controls τοποθετήθηκαν στο πρώτο τεταρτημόριο (Q) και στη συνέχεια οι πύλες ελευθερώθηκαν για τα υπόλοιπα δείγματα. Ο τύπος CD44(-) CD24(-) τοποθετείται στο τεταρτημόριο Q3, ο τύπος CD44(+) CD24(-) στο Q4, ο τύπος CD44(+) CD24(+) στο Q2 και ο τύπος CD44(-) CD24(+) στο Q1. Η πρωτεϊνική έκφραση του CD24 μετρήθηκε επίσης στο σύνολο του κυτταρικού πληθυσμού θέτοντας την αντίστοιχη πύλη (RN1) ως FL2.

#### Υπολογισμός της εκκρινόμενης IL-6 με την ποσοτική μέθοδο ELISA

Τα καρκινικά κύτταρα επιστρώθηκαν σε πλάκες καλλιέργειας 6 κελίων όπου και αναπτύχθηκαν έως ότου να καλύψουν το 60-70% της επιφάνειας και έπειτα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας απουσία ορού για 48 ώρες οπότε και συλλέχθηκε το θρεπτικό υλικό. Το μέσο καλλιέργειας συμπυκνώθηκε χρησιμοποιώντας τα φίλτρα φυγοκέντρησης Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices ή Vivaspin 6 (Sartorius Stedim Biotech), MWCO 5000 Da και τα υπερκείμενα τέθηκαν σε ποσοτική ELISA. Τα εκκρινόμενα πρωτεϊνικά επίπεδα της IL-6 υπολογίστηκαν εφαρμόζοντας το συγκεκριμένο kit ELISA της ImmunoTools, σύμφωνα με της οδηγίες του κατασκευαστή και μετρώντας την οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 450 nm σε ένα φωτόμετρο TECAN Infinite M200. Η συγκέντρωση της IL-6 καθορίστηκε από την αντίστοιχη καμπύλη πρότυπων συγκεντρώσεων.

#### Προσδιορισμός ενζυμικής δραστικότητας

# Μέτρηση της ενζυμικής δραστικότητας των MMP-2 και MMP-9 με τη μέθοδο του ζελατινογραφήματος

Τα καρκινικά κύτταρα μαστού αναπτύχθηκαν παρουσία ορού έως ότου καλύψουν το 70-80% της επιφάνειας του μέσου καλλιέργειας και εν συνεχεία καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 16 ώρες. Μετά από 24 ώρες καλλιέργειας με τους εκάστοτε παράγοντες, συλλέχθηκε το μέσο καλλιέργειας και συμπυκνώθηκε χρησιμοποιώντας τα φίλτρα φυγοκέντρησης Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices. Έπειτα, ίση ποσότητα των συμπυκνωμένων υπερκειμένων προθερμάνθηκε σε Laemmli διάλυμα στους 37°C για 30 λεπτά και φορτώθηκε σε 10% πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (30:1), το οποίο περιείγε και 0.1% (w/v) ζελατίνη και πραγματοποιήθηκε ο διαγωρισμός των πρωτεϊνών με τη διαδικασία της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης, απουσία αναγωγικών συνθηκών. Μετά την ηλεκτροφόρηση, τα πηκτώματα εκπλύθηκαν με 2.5% Triton X-100 για να απομακρυνθεί το SDS και έπειτα επωάστηκαν στους 37 °C για περίπου 20 ώρες στο διάλυμα επώασης: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl και 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Μετά το πέρας της επώασης, τα πηκτώματα χρωματίστηκαν για 20 λεπτά με το διάλυμα χρώσης: 0.25% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250/ 43% (v/v) μεθανόλη/ 7% (v/v) οξικό οξύ και τέλος αποχρωματίστηκαν από διάλυμα 40% (v/v) μεθανόλης / 7% (v/v) οξικού οξέος. Η περιογή ενζυμικής δραστικότητας των πρωτεϊνών εμφανίστηκε ως λευκή ζώνη στο μπλε υπόβαθρο του πηκτώματος.

# Μέτρηση της ενζυμικής δραστικότητας των uPA και tPA με τη μέθοδο του καζεϊνογραφήματος

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η ίδια με αυτή του ζελατινογραφήματος όπως περιεγράφηκε παραπάνω, με τη διαφορά ότι αντί της ζελατίνης, στο καζεϊνογράφημα χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα 2 mg/ml καζεΐνης, ενώ το πήκτωμα περιέχει επίσης και 10 μg/ml ανθρώπινο πλασμινογόνο. Επιπλέον, ως διάλυμα πλύσεων χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M Tris-HCl pH 8, 50mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0.1 mg/ml NaN<sub>3</sub>, το οποίο περιέχει και 2.5% Triton X-100 ενώ το διάλυμα επώασης είναι το ίδιο με το διάλυμα πλύσεων, χωρίς το Triton X-100.

#### Μέθοδος υπολογισμού της ενζυμικής δραστικότητας της ΜΤ1-ΜΜΡ

Η δραστικότητα της MT1-MMP εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας το πεπτίδιο 5-FAM/QXLTM520 FRET ως υπόστρωμα, στο διάλυμα αντίδρασης SensoLyte 520 MMP-14 Assay Kit (AnaSpec, San Jose, USA). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στους 37°C, εις τριπλούν. Ο φθορισμός μετρήθηκε στα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής, στα 470 nm και 520 nm. Η δραστικότητα της MT1-MMP προσδιορίστηκε σε κυτταρικά εκχυλίσματα σύμφωνα με το πρωτόκολλο του προμηθευτή, όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενη μελέτη [262, 263].

#### Στατιστική ανάλυση και σχεδιασμός εικόνων

Οι αναφερόμενες τιμές στα διαγράμματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση (SD). Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα unpaired two-tailed T-test και θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές όταν για το επίπεδο σημαντικότητας ίσχυε η συνθήκη  $p \le 0.05$ . Η στατιστική ανάλυση και ο σχεδιασμός των διαγραμμάτων πραγματοποιήθηκαν από το λογισμικό GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). Για τη σχεδίαση του συνόλου των εικόνων που παρατίθενται στα κεφάλαια «Αποτελέσματα» και «Συζήτηση-Συμπεράσματα», καθώς και μέρος των εικόνων του κεφαλαίου «Εισαγωγή» της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό σχεδίασης Xara Photo and Graphic Designer 2013. Οι χημικές δομές των εικόνων 6 και 12 σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού ChemDraw Ultra 12.

Αποτελέσματα

## ΜΕΡΟΣ Ι. Ο ΕΠβ αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή των λειτουργικών ιδιοτήτων, της κυτταρικής σηματοδότησης και της έκφρασης μακρομορίων του ΕCM στα επιθετικά καρκινικά κύτταρα μαστού

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί μια ετερογενή και πολύπλοκη νεοπλασία, στην εξέλιξη και την πρόοδο της οποίας τα οιστρογόνα και οι υποδοχείς τους κατέχουν βασικό ρόλο. Ο ρόλος των ER σηματοδοτικών μονοπατιών στον καρκίνο του μαστού έχει πλέον εδραιωθεί, έπειτα από περισσότερα από 30 χρόνια βασικής και κλινικής έρευνας. Παρόλο που η συμβολή του ERα στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού έχει μελετηθεί εκτενώς, ο ρόλος της ισομορφής του, ΕRβ, δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί πλήρως. Σε προηγούμενες μελέτες της εργαστηριακής μας ομάδας, αποκαλύψαμε τη μοριακή βάση που διέπει την αναδιοργάνωση του ECM, η οποία φαίνεται να επηρεάζεται από τη δράση των οιστρογόνων και των υποδοχέων τους στον καρκίνο του μαστού [40, 106]. Επιπλέον, μόλις το 2015, αποδείζαμε ότι η καταστολή της έκφρασης του ERa στα θετικά σε ERa-θετικά MCF-7 καρκινικά κύτταρα μαστού επάγει τη διαδικασία ΕΜΤ, καθώς αυξάνει την επιθετική συμπεριφορά των κυττάρων αυτών μέσω αλλαγών στις λειτουργικές ιδιότητες, αλλά και στα επίπεδα μεταγραφικής και πρωτεϊνικής έκφρασης ρυθμιστικών μακρομορίων του ECM και σηματοδοτικών μορίων [21]. Επομένως, κύριο στόχο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η εξακρίβωση του ρόλου που κατέχει ο ΕRβ, ο οποίος αποτελεί αναπόσπαστο στοιχείο των επιθετικών καρκινικών κυττάρων μαστού MDA-MB-231, στη ρύθμιση της μορφολογίας, των λειτουργικών ιδιοτήτων και την έκφραση μακρομορίων του ΕCM που εμπλέκονται στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται οι GFRs, οι MMPs και οι ενδογενείς αναστολείς τους, τα συστατικά ενεργοποίησης του πλασμινογόνου και οι PGs. Επιπλέον, μελετήθηκε ο ρόλος της E2, πριν και μετά την καταστολή του ΕRβ, στην έκφραση των παραπάνω μορίων.

# 1. Η καταστολή του ΕRβ επάγει αλλαγές στα κυτταρικά χαρακτηριστικά και σε δείκτες ΕΜΤ στα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού

Προκειμένου να επιτευχθεί η σταθερή καταστολή του ERβ τα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού διαμολύνθηκαν με shRNA ενάντια στο γονίδιο του ανθρώπινου ERβ. Για την παραλαβή σταθερά διαμολυσμένων κλώνων, προστέθηκαν

0.8µg/ml πουρομυκίνης στο μέσο καλλιέργειας. Η παρατηρούμενη καταστολή της έκφρασης του ERβ σε επίπεδο mRNA, πραγματοποιήθηκε βαθμιδωτά, καθώς προχωρούσαν οι κυτταρικές γενεές από την πρώτη διαμόλυνση. Όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 13A**, η διαμόλυνση με το shRNA έναντι του ERβ συνοδεύτηκε από την τελική μείωση των επιπέδων έκφρασης του ERβ στο επίπεδο του 70% στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, σε σύγκριση με τα MDA-MB-231 κύτταρα αναφοράς (MDA-MB-231 ctrl). Η συγκεκριμένη καταστολή παρατηρήθηκε μετά το πέρας έξι κυτταρικών γενεών και παρέμεινε σταθερή στις επόμενες κυτταρικές γενεές. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ώριμες συμπληρωματικές αλυσίδες που κατασκευάστηκαν για την αποσιώπηση του γονιδίου του ERβ, στοχεύουν τρεις κοινές περιοχές ανάμεσα στις ισομορφές του ERβ. Για το λόγο αυτό, η παρατηρούμενη καταστολή του ERβ στο επίπεδο του 70%

Οι πρώτες μικροσκοπικές παρατηρήσεις των shERβ MDA-MB-231 κυττάρων, έδειξαν ότι η καταστολή της έκφρασης του ERβ επηρέασε σημαντικά τη μορφολογία των MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων. Είναι γνωστό το γεγονός ότι τα MDA-MB-231 κύτταρα παρουσιάζουν τον τυπικό μεσεγχυματικό, επιθετικό φαινότυπο και αναπτύσσονται ως ανεξάρτητα και επιμήκη κύτταρα με χαρακτηριστική ατρακτοειδή μορφολογία (**Εικόνα 13B**). Ωστόσο, όπως φαίνεται από τις εικόνες μικροσκοπίου ανάστροφης φάσης, μετά την καταστολή του ERβ, τα MDA-MB-231 κύτταρα χαρακτηρίζονται από την τάση να σχηματίζουν επαφές κυττάρου-κυττάρου, αποκτώντας χαρακτηριστικά επιθηλιακών κυττάρων (**Εικόνα 13B**).



Εικόνα 13 (η λεζάντα παρατίθεται στην επόμενη σελίδα).

**Εικόνα 13.** Η καταστολή του ERβ στα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού. (A) Ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA του ERβ. (B) Μικροσκοπία ανάστροφης φάσης για τον έλεγχο της κυτταρικής μορφολογίας των MDA-MB-231 κυττάρων αναφοράς (MDA-MB-231 ctrl) και σε αυτά που διαμολύνθηκαν με τα shRNA lentiviral σωματίδια έναντι του ERβ (shERβ MDA-MB-231). Με βέλη απεικονίζονται τα κυτταρικά συσσωματώματα (μεγέθυνση 10x και 32x, μπάρα 10μm). Ο αστερίσκος (\*\*) υποδεικνύει τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές ( $p \le 0.01$ ) σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Ανατύπωση με άδεια από την αναφορά [264]. Copyright 2016 Elsevier science & technology journals.

Σε επόμενο επίπεδο, πραγματοποιήθηκε εκ βάθους μελέτη της μορφολογίας των καρκινικών κυττάρων, πριν και μετά την καταστολή του ΕRβ, με χρήση της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM). Όπως αποκαλύφθηκε από τις εικόνες SEM, τα MDA-MB-231 ctrl κύτταρα χαρακτηρίζονται από ένα σχετικά σφαιρικό σχήμα, με διάμετρο που κυμαίνεται από 15 έως 25 μm, ενώ αναπτύσσονται απομακρυσμένα το ένα από το άλλο (Εικόνα 14Α). Τα περισσότερα κύτταρα εμφανίζουν ακανόνιστο ή επίμηκες σχήμα, ενώ διαθέτουν λεπτές και μεγάλου μήκους κυτταρικές προεκβολές, οι οποίες εξαπλώνονται προς όλες τις κατευθύνσεις (Εικόνες 14B, C και D). Επίσης, πολλά από τα MDA-MB-231 ctrl κύτταρα διαθέτουν έναν εμφανή πυρήνα και σχετικά μικρό κυτταρόπλασμα, καθώς και πολλές κυτταρικές προεκβολές (filiforms/filopodia) στην κυτταρική επιφάνεια και κυρίως στην περιοχή του πυρήνα (Εικόνα 14D). Από την άλλη μεριά, τα περισσότερα από τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα χαρακτηρίζονται από ένα ωοειδές σχήμα και σχετικά στρογγυλό περίγραμμα, ενώ εμφανίζονται ομαδοποιημένα και με τάση να αναπτύσσουν επαφές κυττάρου-κυττάρου (Εικόνες 14Ε, F, G και Η). Σε γενικές γραμμές, τα κύτταρα αυτά ομοιάζουν περισσότερο με μικρά, επίπεδα κύτταρα διαμέτρου 35-100 μm, με επίπεδο πυρήνα, ενώ κάποιες φορές εμφανίζουν αρκετά μεγάλο κυτταρόπλασμα. Πολύ λίγα κύτταρα διαθέτουν λεπτές κυτταροπλασματικές προεκβολές (filiforms/filopodia), ενώ οι ελάχιστες προεκβολές που παρατηρούνται βρίσκονται κατανεμημένες κυρίως στην περιφέρεια κάθε κυττάρου (Εικόνες 14Ε, F, G και Η).



Εικόνα 14 (η λεζάντα παρατίθεται στην επόμενη σελίδα).

Εικόνα 14. Έλεγχος των ΕΠβ-εζαρτώμενων κυτταρικών χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων μαστού με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης. (A) Τα MDA-MB-231 ctrl κύτταρα παρουσιάζουν σφαιρικό σχήμα και εμφανίζονται απομακρυσμένα το ένα από το άλλο (μπάρα 10μm). (B) Κάποια MDA-MB-231 ctrl κύτταρα παρουσιάζουν επίμηκες σχήμα και λεπτές κυτταροπλασματικές προεκβολές (μπάρα 10μm). (C) Ένα σφαιρικό MDA-MB-231 ctrl κύτταρο παρουσιάζεται στο δεζί μέρος της εικόνας, ενώ στα αριστερά φαίνεται ένα επίμηκες κύτταρο με πολλές κυτταροπλασματικές προεκβολές (μπάρα 10μm). (D) Ένα σφαιρικό MDA-MB-231 ctrl κύτταρο με εμφανή πυρήνα, εμφανίζει πολύ λεπτές κυτταροπλασματικές προεκβολές (μπάρα 10μm). (Ε), (F) Τα περισσότερα εκ των shERβ MDA-MB-231 κυττάρων εμφανίζονται ως πεπλατυσμένα, ωοειδή κύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν επαφές κυττάρου-κυττάρου και διαθέτουν πολύ λίγες κυτταρικές προεκβολές (μπάρα 0.1 και 10μm, αντίστοιχα). (G) Τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα διαθέτουν μικρό πυρήνα και σχετικά μεγάλο κυτταρόπλασμα, ενώ εμφανίζονται ομαδοποιημένα (μπάρα 10μm). (Η) Πεπλατυσμένα και στρογγυλά shERβ MDA-MB-231 κύτταρα που εμφανίζουν επαφές κυττάρου-κυττάρου και σχετικά μεγάλο κυτταρόπλασμα (μπάρα 10μm). Ανατύπωση με άδεια από την αναφορά [264]. Copyright 2016 Elsevier science & technology journals.

Οι παρατηρούμενες αλλαγές στην κυτταρική μορφολογία των shERβ MDA-MB-231 κυττάρων θεωρήθηκε ότι σχετίζονται με τον επαναπρογραμματισμό της διαδικασίας ΕΜΤ. Προκειμένου να εξακριβωθεί εάν υπάρχει τέτοια συσχέτιση, μελετήθηκαν τα MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα ως προς τη μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση χαρακτηριστικών δεικτών του ΕΜΤ, μέσω της ανάλυσης realtime PCR και του ανοσοφθορισμού, αντίστοιχα (Εικόνα 15). Αρχικά, όπως φαίνεται στην Εικόνα 15A, τα shERβ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις στην οργάνωση του κυτταροσκελετού, όπως αυτό παρουσιάζεται έπειτα από χρώση για τις πρωτεΐνες α-tubulin και F-actin. Χαρακτηριστικό της πρωτεΐνης α-tubulin (50 kDa) είναι ότι πολυμερίζεται στους μικροσωληνίσκους, ένα βασικό συστατικό του κυτταροσκελετού των ευκαρυωτικών κυττάρων που συμμετέχει σε διαδικασίες ζωτικής σημασίας, όπως η κυτταρική διαίρεση. Από την άλλη, τα πολυμερικά μικροϊνίδια της F-actin είναι απαραίτητα για πληθώρα κυτταρικών διαδικασιών συμπεριλαμβανομένων της κυτταρικής σηματοδότησης, της κινητικότητας, αλλά και τη διατήρηση του σχήματος και των κυτταρικών συνάψεων. Η καταστολή του ERβ στα κύτταρα αυτά συνοδεύτηκε από αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης χαρακτηριστικών δεικτών του ΕΜΤ, όπως η E-cadherin, η vimentin, η fibronectin και snail2/slug (Εικόνα 15B). Συγκεκριμένα, τα shERβ MDA-MB-231

κύτταρα παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης σε επίπεδο mRNA των μεσεγχυματικών δεικτών fibronectin (περ. 20%) και vimentin (περ. 25%), συγκριτικά με τα κύτταρα αναφοράς MDA-MB-231. Επιπλέον, τα συγκεκριμένα κύτταρα εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικά αυξημένα επίπεδα του επιθηλιακού δείκτη E-cadherin (περ. 30%), η αλληλεπίδραση του οποίου μεταξύ γειτονικών κυττάρων χαρακτηριστικές προσκολλητικές συνάψεις [265]. δημιουργεί τις Επίσης. παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα snail2/slug (περ. 35%), ο οποίος σχετίζεται άμεσα με τη διαδικασία ΕΜΤ. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η καταστολή της έκφρασης του ERβ στα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού οδηγεί σε έναν εν δυνάμει επαναπρογραμματισμό του ΕΜΤ, οδηγώντας στην αντίστροφη διαδικασία, ΜΕΤ.



Εικόνα 15 (η λεζάντα παρατίθεται στην επόμενη σελίδα).

**Εικόνα 15.** Η καταστολή του ERβ στα MDA-MB-231 κύτταρα, επάγει αλλαγές σε χαρακτηριστικούς δείκτες της διαδικασίας EMT. (A) Εικόνες ανοσοφθορισμού για τις πρωτεΐνες α-tubulin, E-cadherin και vimentin (μεγέθυνση 60x, μπάρα 20μm). (B) Ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των E-cadherin, vimentin, fibronectin, Snail2/Slug στα MDA-MB-231 ctrl και shERβ MDA-MB-231 κύτταρα. Με βέλη απεικονίζονται οι επαφές κυτταρου-κυττάρου. Οι αστερίσκοι (\*), (\*\*) υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές (p≤0.05 και p≤0.01, αντίστοιχα) σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Ανατύπωση με άδεια από την αναφορά [264]. Copyright 2016 Elsevier science & technology journals.

#### 2. Η καταστολή του ERβ στα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού οδηγεί σε διαφοροποιημένες κυτταρικές λειτουργείες

Οι παρατηρούμενες αλλαγές τόσο στη μορφολογία όσο και στην έκφραση των δεικτών ΕΜΤ γέννησαν το ερώτημα εάν οι λειτουργικές ιδιότητες των επιθετικών MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων επηρεάζονται από την καταστολή του ΕRβ. Προκειμένου να απαντήσουμε στο παραπάνω ερώτημα, μελετήθηκαν βασικές λειτουργικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, δυνατότητας εξάπλωσης, κυτταρικής μετανάστευσης, της της ικανότητας προσκόλλησης και τέλος της διηθητικής ικανότητας. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 16A, η καταστολή του ERβ μειώνει τα επίπεδα κυτταρικού πολλαπλασιασμού των MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων στο επίπεδο του 35% και 40% μετά το πέρας 24 και 48 ωρών, αντίστοιχα, συγκριτικά με τα κύτταρα αναφοράς. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η πιθανή διαφορά ανάμεσα στα shERβ MDA-MB-231 και στα MDA-MB-231 κύτταρα, σε σχέση με την ικανότητά τους να εξαπλώνονται στο χώρο. Έτσι, παρατηρήθηκε ότι τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα παρουσιάζουν κατά 30% μειωμένη ικανότητα εξάπλωσης (Εικόνα 16Β). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο και την ποσοτικοποίηση που ακολουθήθηκαν μπορεί να αναχθεί στη δυνατότητα εξάπλωσης των shERβ MDA-MB-231 κυττάρων. Η συγκεκριμένη παρατήρηση μπορεί να συσγετιστεί με τη σημαντικά μειωμένη μεταναστευτική ικανότητα των shERβ MDA-MB-231 κυττάρων. Συγκεκριμένα, τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα παρουσιάζουν κατά 60% μικρότερη ικανότητα μετανάστευσης (Εικόνα 16C).

Η πρόσδεση των καρκινικών κυττάρων στον ECM είναι κομβικής σημασίας για την ανάπτυξη και την επιβίωσή τους. Επιπλέον, ειδικά τα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα έχουν αυξημένη ικανότητα προσκόλλησης που συνεισφέρει στη μετανάστευσή τους και στην εγκαθίδρυση απομακρυσμένων όγκων. Επομένως, μελετήθηκε η ικανότητα των shERβ MDA-MB-231 κυττάρων να προσκολλώνται στον ECM, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με το κολλαγόνο τύπου Ι. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 16D**, αντικατοπτρίζουν την κατά 35% στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων προσκόλλησης που έχουν τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Επιπλέον εξετάστηκε το διηθητικό δυναμικό των MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού πριν και μετά την καταστολή του ERβ, καθώς η ιδιότητα αυτή αποτελεί το βασικό βήμα για την εδραίωση της μετάστασης. Σύμφωνα με προηγούμενη δημοσίευση [259], αιώρημα των shERβ MDA-MB-231 και MDA-MB-231 ctrl κυττάρων επιστρώθηκε σε gel κολλαγόνου τύπου Ι και μέσω επεξεργασίας των εικόνων που ελήφθησαν από κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση της διηθητικής τους ικανότητας. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 16E**, τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική μείωση, κατά 60%, στα επίπεδα διηθητικής ικανότητας (invasion index, invasion area), έπειτα από 24 ώρες επώασης σε gel κολλαγόνου τύπου Ι, συγκριτικά με τα MDA-MB-231 ctrl κύτταρα.



Εικόνα 16 (η λεζάντα παρατίθεται στην επόμενη σελίδα).

**Εικόνα 16.** Ο ΕRβ ρυθμίζει τις λειτουργικές ιδιότητες των MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού. Διαγράμματα: (A) κυτταρικού πολλαπλασιασμού έπειτα από 24 και 48 ώρες επώασης, (B) κυτταρικής εξάπλωσης έπειτα από 24 ώρες επώασης, (C) κυτταρικής μετανάστευσης έπειτα από 24 και 48 ώρες, (D) ικανότητας προσκόλλησης σε κολλαγόνο τύπου I και (E) κυτταρικής διήθησης έπειτα από 24 ώρες επώασης, στα MDA-MB-231 ctrl και shERβ MDA-MB-231 κύτταρα. Παρουσιάζονται οι φωτογραφίες ανάστροφης φάσης, οι διηθημένες κυτταρικές προεκβολές, καθώς και οι επεξεργασμένες εικόνες που προέκυψαν από την αφαίρεση των τεχνητών σφαλμάτων (π.χ. πυκνές ίνες κολλαγόνου και πυρήνες). Οι παραπάνω λειτουργικές ιδιότητες μελετήθηκαν από τις τεχνικές που περιγράφονται αναλυτικά στο πειραματικό μέρος. Οι μπάρες των διαγραμμάτων αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο  $\pm$  την τυπική απόκλιση από τρία πειράματα. Ο αστερίσκος (\*\*) υποδεικνύει τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές (p≤0.01) σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Ανατύπωση με άδεια από την αναφορά [264]. Copyright 2016 Elsevier science & technology journals.

### 3. Η καταστολή του ERβ επηρεάζει τα επίπεδα μεταγραφικής και πρωτεϊνικής έκφρασης σημαντικών ρυθμιστών του ECM

Όπως περιεγράφηκε παραπάνω, η καταστολή του ERβ στα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού επηρέασε σημαντικά βασικές λειτουργικές ιδιότητες των κυττάρων αυτών, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η προσκόλληση, η μετανάστευση και η διήθηση. Οι παρατηρούμενες αλλαγές μπορούν να συσχετιστούν με διαφοροποιημένα προφίλ έκφρασης των συστατικών του ECM, όπως ένζυμα αποικοδόμησης και συστατικά ενεργοποίησης του πλασμινογόνου, τα οποία δύνανται να οδηγήσουν στην αναδιαμόρφωση του ECM. Έτσι, μελετήθηκαν αρχικά τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των MMPs, των ενδογενών τους αναστολέων (TIMPs) και των συστατικών του συστήματος ενεργοποίησης του πλασμινογόνου (uPA, tPA, PAI-1). Τα δεδομένα που ελήφθησαν από την ανάλυση real-time PCR έδειξαν ότι τα shERβ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης των MMP1 (περ. 25%) και ΜΜΡ7 (περ. 30%), συγκριτικά με τα κύτταρα αναφοράς (Εικόνα 17Α). Επιπλέον, η καταστολή του ERβ στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα ελάττωσε κατά πολύ τα επίπεδα mRNA της MMP2 και της MT1-MMP, αλλά όχι στατιστικώς σημαντικά. Από την άλλη μεριά, τα επίπεδα mRNA της MMP9 παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική αύξηση (περ. 2.5-φορές), σε σχέση με τα MDA-MB-231 ctrl κύτταρα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 17B, τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα παρουσιάζουν σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης των ενδογενών αναστολέων των MMPs, TIMP1 (περ. 75%) και TIMP2 (περ. 50%).

Σε επόμενο επίπεδο, μελετήθηκε η επίδραση της καταστολής του ΕRβ στην έκφραση των συστατικών του συστήματος ενεργοποίησης του πλασμινογόνου, το οποίο εμπλέκεται στην αναδιοργάνωση του ECM και στη διήθηση των καρκινικών κυττάρων (**Εικόνα 17C**). Συγκεκριμένα, τα uPA, tPA και PAI-1 στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα εμφανίζουν σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης (περ. 30%, 25% και 10%, αντίστοιχα). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 17D**, το καζεϊνογράφημα επιβεβαίωσε τις αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, καθώς τα κύτταρα αυτά, σε απόκριση της καταστολής του ERβ, παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα ενζυμικής δραστικότητας του υψηλού μοριακού μεγέθους (HMW) uPA και tPA, συγκριτικά με τα κύτταρα αναφοράς, ενώ το χαμηλού μοριακού μεγέθους (LMW) uPA δεν κατέστη δυνατό να ποσοτικοποιηθεί. Τέλος, τα επίπεδα μεταγραφικής και πρωτεϊνικής έκφρασης του ενζύμου HPSE εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική μείωση στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, σε σχέση με τα MDA-MB-231 ctrl.



**Εικόνα 17.** Η καταστολή του ΕRβ επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση πολλών ρυθμιστών του ΕCM στα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού. (A) Ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των MMP1, MMP2, MMP7, MMP9 και MT1-MMP. (B) Ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των TIMP1 και TIMP2. (C) Ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων uPA, tPA και PAI-1. (D) Ενζυμική δραστικότητα των uPA/tPA με τη μέθοδο του καζεϊνογραφήματος. (E) Μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση της HPSE στα MDA-MB-231 ctrl και shERβ MDA-MB-231 κύτταρα. Οι αστερίσκοι (\*), (\*\*) υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές ( $p \le 0.05$  και  $p \le 0.01$ , αντίστοιχα) σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Aνατύπωση με άδεια από την αναφορά [264]. Copyright 2016 Elsevier science & technology journals.

#### 3.1 Ο ΕRβ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεογλυκανών και του υαλουρονικού οξέος

Είναι γνωστή η άποψη ότι αλλαγές που παρουσιάζονται στο μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων μπορεί να οδηγήσουν σε διαφοροποιήσεις στις ιδιότητες και στη συμπεριφορά τους εν γένει. Οι πρωτεογλυκάνες θειϊκής ηπαράνης (HSPGs) συμπεριλαμβάνονται στην τάξη των συστατικών του ΕCM που εντοπίζονται τόσο ενδοκυττάρια όσο και σε εξωκυτταρικό επίπεδο και επηρεάζουν τόσο σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η προσκόλληση, αλλά και τη σηματοδότηση και την εξέλιξη του καρκίνου, μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλα ρυθμιστικά μόρια του ECM. Οι συνδεκάνες συγκαταλέγονται ανάμεσα στα πιο αντιπροσωπευτικά μόρια των HSPGs. Στον καρκίνο του μαστού, η συνδεκάνη-2 σχετίζεται με την κυτταρική προσκόλληση, την αγγειογένεση και τη σηματοδότηση, η συνδεκάνη-4 κατέχει βασικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου, ενώ η συνδεκάνη-1 προάγει κυρίως την κινητικότητα των επιθηλιακών κυττάρων [80, 83]. Λαμβάνοντας υπόψιν το ρόλο των SDCs στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού, μελετήθηκε η επίδραση της καταστολής του ΕRβ στην έκφραση των μορίων αυτών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η καταστολή του ERβ στα MDA-MB-231 κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα τη στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA της συνδεκάνη-1 (περ. 20%), σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς (Εικόνα 18). Το γεγονός αυτό μπορεί να συσχετιστεί με τις ενδείξεις που ενισχύουν την άποψη ότι η καταστολή του ERβ στα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού οδηγεί στην αντιστροφή της διαδικασίας ΕΜΤ στα κύτταρα αυτά. Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε ότι τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη έκφραση της συνδεκάνη-4 (περ. 40%), συγκριτικά με τα MDA-MB-231 ctrl κύτταρα. Η χρώση των πρωτεϊνών συνδεκάνη-1 και συνδεκάνη-4 με ανοσοφθορισμό επιβεβαίωσαν τα παραπάνω αποτελέσματα (Εικόνα 18). Μια άλλη PG, η οποία τα τελευταία χρόνια έχει κερδίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για το ρόλο της στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού είναι η σεργλυκίνη (serglycin). Η συγκεκριμένη PG που είναι η μόνη ενδοκυττάρια PG, χαρακτηρίζεται από αυξημένη έκφραση σε επιθετικά καρκινικά κύτταρα μαστού και προάγει τα κακοήθη φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά [92, 94, 95]. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι το προφίλ έκφρασης της σεργλυκίνης επηρεάζεται σημαντικά από την καταστολή του ERβ στα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού. Συγκεκριμένα, τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης της σεργλυκίνης

(περ. 50%), γεγονός που επιβεβαιώθηκε από χρώση της συγκεκριμένης PG με ανοσοφθορισμό. Συμπερασματικά, διαπιστώθηκε ότι η καταστολή του γονιδίου του ERβ στα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού οδήγησε σε σημαντικές αλλαγές των επιπέδων έκφρασης διαφόρων PGs, σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο και αναδεικνύεται ο ρυθμιστικός ρόλος του ERβ στην αλληλεπίδραση των καρκινικών κυττάρων μαστού με τα συστατικά του ECM.



**Еіко́va 18.** Н катаотолі́ тов ЕКβ є та́уєї аддаує́ς отпу є́кфрабл тов овудекачо́в каї та́ обрудвкі́в ота MDA-MB-231 карківіка́ кв́ттара µаотов. (A) Еіко́веς авобофорібµов уіа та овудека́вчл-1, бивдека́вчл-4 каї берудвкі́в (µєує́ввиол 60х, µπа́ра 20µm). (B) Поботікі́р real-time PCR ава́двол уіа тов проблорібµо́ тов є піпе́дову mRNA тов овидекаво́в -1, -2, -4 каї та́ обрудвкі́вчліς ота MDA-MB-231 ctrl каї shERβ MDA-MB-231 кв́ттара. Ої абтері́бкої (\*), (\*\*) вподєїкивови тіς отатіотікю́ς биµавтікє́ς µетаβодє́ς (p≤0.05 каї p≤0.01, автібтоіха) бе бує́бли µє та кв́ттара авафора́ς. Аватв́повол µє а́деїа апо́ тав авабора́ [264]. Copyright 2016 Elsevier science & technology journals.

Επιπρόσθετα, εξετάστηκε η επίδραση της καταστολής του ΕRβ στη ρύθμιση του δικτύου HA/CD44/HASes/HYALs. Ο επιθετικός φαινότυπος πολλών τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού, συνδέεται με αυξημένη έκφραση του ΗΑ, μιας προ-αγγειογενετικής GAG [266]. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 19Α. τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, από τη χρώση της HABP (HA binding protein), παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένη σύνθεση του HA, συγκριτικά με τα MDA-MB-231 ctrl κύτταρα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης των ισομορφών v3, v6 και v9 του υποδοχέα του HA, CD44. Η μείωση στην παραγωγή HA συνοδεύτηκε από μειωμένα επίπεδα έκφρασης κυρίως της HAS2, του βασικού ενζύμου σύνθεσης του ΗΑ, της τάξης του 80%, καθώς και του AS1-HAS2 (περ. 40%). Το γονίδιο AS1-HAS2 ρυθμίζει την έκφραση της HAS2, επομένως δυνητικά θα μπορούσε να ελέγχει τη σύνθεση του ΗΑ και την επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων μαστού. Επιπρόσθετα, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι αλλαγές αυτές συνοδεύτηκαν από σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης των ενζύμων αποικοδόμησης του ΗΑ, HYAL1 (κατά 50%) και HYAL2 (κατά 60%) στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, συγκριτικά με τα MDA-MB-231 ctrl κύτταρα (Εικόνα 19B).



**Енко́va 19.** Н катаотол́ή тоυ ERβ επάγει алдаує́ς отпу πараушу́н HA кан отпу є́кфраоц тшу нооµорфών тоυ CD44 кан тшу ενζύµшу HASes кан HYALs, ота MDA-MB-231 каркника́ ки́ттара µаотой. (A) Енко́иеς аvооофдорноµии́ уна тпу HABP (µеує́дичоц 60x, µπа́ра 20µm). (B) Пооотнки́ real-time PCR aváλυση уна тоу прообнорноµи́ тшу єпляє́дшу mRNA тшу CD44s, v3, v6, v9, HAS1, 2, 3, AS1-HAS2, HYAL1, 2, ота MDA-MB-231 ctrl кан shERβ MDA-MB-231 ки́ттара. Он аотері́окон (\*), (\*\*) иподенкийоиу тну отатнотнкю́ς оµµаутнке́ς µетаβολές (p≤0.05 кан p≤0.01, аνті́отонуа) оє охе́оп µє та ки́ттара аvафора́с.

## 3.2 Ο ERβ επάγει αλλαγές στα προφίλ έκφρασης των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων και ρυθμίζει την ενεργοποίηση του ERK σηματοδοτικού μονοπατιού

Έχει πλέον καταστεί σαφές ότι οι ERs εκτός από τον πυρηνικό τους εντοπισμό δύνανται να μετακινηθούν στο κυτταρόπλασμα αλλά και στην κυτταρική μεμβράνη [267]. Με αυτόν τον τρόπο, οι ERs, μετά την ενεργοποίησή τους, έχουν τη δυνατότητα να πυροδοτήσουν ένα σηματοδοτικό καταρράκτη, ο οποίος περιλαμβάνει την παραγωγή MMPs που οδηγεί στην ενεργοποίηση του υποδοχέα EGFR μέσω της πρόσδεσης του EGF [268]. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση του EGFR προάγει τη μετανάστευση και τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων μαστού, ενώ η υπερέκφραση του υποδογέα HER2 αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού με επιθετικό φαινότυπο [269-272] Η διεπικοινωνία μεταξύ των EGFR και IGF-IR είναι κομβικής σημασίας για την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού και την ανθεκτικότητα που παρατηρείται σε ενδοκρινείς θεραπείες [40, 273]. Επομένως, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η μοριακή ανάλυση, σε επίπεδο mRNA, των υποδοχέων EGFR, IGF-IR και HER2, πριν και μετά την καταστολή του ERβ. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 20, η ανάλυση real-time PCR ανέδειξε τη σημαντική καταστολή της έκφρασης των υποδογέων EGFR και IGF-IR (περ. 50% και 40%, αντίστοιγα), σε επίπεδο mRNA, στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, συγκριτικά με τα MDA-MB-231 ctrl. Από την άλλη μεριά, η γονιδιακή έκφραση του HER2 δε φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από την καταστολή του ERβ στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς.

Το ERK σηματοδοτικό μονοπάτι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση πληθώρας κυτταρικών λειτουργιών όπως ο μεταβολισμός, η επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η μετανάστευση [274, 275]. Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση των ERK κινασών επηρεάζεται σημαντικά από την υπερέκφραση και την ενεργοποίηση του EGFR [276], ενώ είναι γνωστό ότι η υπερέκφραση του EGFR σχετίζεται με την αυξημένη μεταστατικότητα των καρκινικών κυττάρων μαστού μέσω της ενεργοποίησης του ERK σηματοδοτικού καταρράκτη [21]. Ως εκ τούτου, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η επίδραση της καταστολής του ERβ στην ενεργοποίηση του ERK σηματοδοτικού μονοπατιού, καθώς υποθέσαμε ότι η μείωση των επιπέδων έκφρασης του EGFR στα ERβ-κατεσταλμένα κύτταρα, μπορεί να συνοδεύεται από μειωμένα επίπεδα φωσφορυλίωσης του ERK1/2. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 20B**, τα shERβ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού χαρακτηρίζονται από σημαντικά μειωμένα επίπεδα φωσφορυλίωσης του ERK1/2, τα οποία ακολουθούν τη σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης του EGFR, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η ενεργοποίηση του MEK/ERK σηματοδοτικού μονοπατιού στα επιθετικά καρκινικά κύτταρα μαστού εξαρτάται από την παρουσία του ERβ, ενώ τόσο η μειωμένη φωσφορυλίωση του ERK1/2, όσο και η χαμηλή έκφραση του EGFR, βρίσκονται σε συμφωνία με τη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και της διήθησης στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα.



Εικόνα 20 (η λεζάντα παρατίθεται στην επόμενη σελίδα).

**Εικόνα 20.** Η καταστολή του ERβ επάγει EGFR/ERK-διαμεσολαβούμενες αλλαγές στα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού. (A) Ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των EGFR, IGF-IR και HER2 στα MDA-MB-231 ctrl και shERβ MDA-MB-231 κύτταρα. (B) Ανοσοαποτύπωση για τον p-ERK1/2, τον ERK1/2 και την α-tubulin, στα MDA-MB-231 ctrl και shERβ MDA-MB-231 κύτταρα και ποσοτικοποίηση της πυκνότητας των ζωνών. (C) Κυτταρική μετανάστευση πριν και μετά την κατεργασία με τους αναστολείς των EGFR (iEGFR, 1 μM) και IGF-IR (iIGFR-IR, 1 μM) για 24 ώρες. Οι αστερίσκοι (\*), (\*\*) υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές (p≤0.05 και p≤0.01, αντίστοιχα) σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Ανατύπωση με άδεια από την αναφορά [264]. Copyright 2016 Elsevier science & technology journals.

# 4. Ο ΕRβ ρυθμίζει την κυτταρική μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων μαστού μέσω της διεπικοινωνίας EGFR/IGF-IR και της ενεργοποίησης του JAK/STAT σηματοδοτικού μονοπατιού

Η αλληλεπίδραση πληθώρας καταρρακτών σηματοδότησης λειτουργεί ως ένα ρυθμιστικό δίκτυο της κυτταρικής συμπεριφοράς. Σημαντικό ρόλο στην παθολογία του καρκίνου του μαστού και στην έκφραση βασικών ρυθμιστών του ECM, διαδραματίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι EGFR/IGF-IR. Η διεπικοινωνία ανάμεσα στους ERs, τον EGFR ή/και τον IGF-IR είναι κομβικής σημασίας για την παρατηρούμενη ανθεκτικότητα σε ενδοκρινείς θεραπείες. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι το JAK-2/STAT σηματοδοτικό μονοπάτι δύναται να καθυστερεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε συμπαγείς όγκους. Η φωσφορυλίωση σε θέση τυροσίνης του JAK-2/STAT εμπλέκεται στην ογκογένεση, ενώ συμμετέχει στη σηματοδότηση καθοδικά του EGFR. Επομένως, πηγαίνοντας ένα βήμα παραπέρα, κρίθηκε σκόπιμο να μελετήσουμε την επίδραση της καταστολής του ERβ στην ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών EGFR, IGF-IR και JAK-2/STAT. Χρησιμοποιώντας αλλοστερικούς αναστολείς προκειμένου να αναστείλουμε καθοδικά αυτούς τους σηματοδοτικούς καταρράκτες, προσδιορίστηκαν οι επιδράσεις στην κυτταρική μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων μαστού, αλλά και ο ρόλος του ERβ στη ρύθμιση αυτή.

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 20C, η αναστολή του EGFR και του IGF-IR καθυστερεί τη μετανάστευση των MDA-MB-231 ctrl κυττάρων. Η αναστολή των υποδοχέων αυτών στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα επίσης αναστέλλει τη μεταναστευτική τους ικανότητα, αλλά σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Παρατηρήθηκε ότι η ταυτόχρονη αναστολή των υποδοχέων EGFR και IGF-

IR στα ΕRβ-κατεσταλμένα καρκινικά κύτταρα μαστού μειώνει σημαντικά το μεταναστευτικό δυναμικό των κυττάρων αυτών. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι η διεπικοινωνία ανάμεσα στον ERβ, τον EGFR και τον IGF-IR κατέχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταναστευτικής ικανότητας των MDA-MB-231 κυττάρων.

Επιπλέον, εξετάστηκε ο ρόλος του ΕRβ στη ρύθμιση της έκφρασης της IL-6 και των υποδοχέων της, καθώς συνεισφέρει στη σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού JAK-2/STAT, επηρεάζοντας τον αυτοκρινή βρόχο των καρκινικών κυττάρων. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 21A, η καταστολή του ΕRβ αναστέλλει σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης και δραστικότητας της ΙL-6, ενώ παράλληλα μειώνει την έκφραση των υποδοχέων της IL6R και sIL6R (διαλυτός υποδοχέας). Το JAK-2/STAT σηματοδοτικό μονοπάτι συνεισφέρει σημαντικά στην κινητικότητα των MDA-MB-231 ctrl κυττάρων και στην προσκόλληση σε κολλαγόνο τύπου Ι των shERβ MDA-MB-231 κυττάρων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 21Β. Το συγκεκριμένο μονοπάτι διατηρεί την ικανότητά του να ρυθμίζει την κυτταρική μετανάστευση των MDA-MB-231 κυττάρων ακόμα και μετά την καταστολή του ΕRβ. Η χορήγηση του εξειδικευμένου αλλοστερικού αναστολέα του JAK-2/STAT μονοπατιού (AG490) μειώνει σημαντικά τη μετανάστευση των shERβ MDA-MB-231 κυττάρων, παρά το γεγονός ότι το μέγεθος της αναστολής είναι κατά πολύ μικρότερο συγκριτικά με τα κύτταρα αναφοράς, MDA-MB-231 ctrl. Το ίδιο μοτίβο ρύθμισης ακολουθείται στη ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης των MDA-MB-231 ctrl κυττάρων, ενώ τα επίπεδα κυτταρικού πολλαπλασιασμού μένουν ανεπηρέαστα από την αναστολή του συγκεκριμένου σηματοδοτικού μονοπατιού. Αντίθετα, φαίνεται ότι το JAK-2/STAT μονοπάτι ελέγχει κυρίως την προσκόλληση σε κολλαγόνο τύπου Ι των shERβ MDA-MB-231 κυττάρων, καθώς παρατηρείται ότι μετά την αναστολή του τα επίπεδα προσκόλλησης των συγκεκριμένων κυττάρων παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική αύξηση. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι και το JAK-2/STAT σηματοδοτικό μονοπάτι συνεισφέρει στη ρύθμιση του μεταναστευτικού δυναμικού των MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού, μετά την καταστολή του ERβ.



**Еіко́va 21.** Н єпібрабу тоυ JAK/STAT буµатоботікой µоvолатіой оту µєтачабтертіку́ ікачо́тута тων каркічікών китта́рων µабтой. (A) Поботіку́ real-time PCR ача́дибу каі µє́вобоς ELISA (IL-6) уіа точ проббіорібµо́ тыч єпіле́бων mRNA тыч IL-6, IL6R каі sIL6R ота MDA-MB-231 ctrl каі shERβ MDA-MB-231 ки́ттара. (B) Διαγράµµата киттаріку́ς µєтача́бтероус, поддаядабіабµой каі пробко́ддубу тыч MDA-MB-231 ctrl каі shERβ MDA-MB-231 китта́рыч, пріч каі µєта́ туч катеруабіа µє точ ачабтодє́а AG490 (iJAK-2/STAT, 20 µM) уіа 24 ώρες. Η λευκή µπа́ра ота арібтера́ ачтібтоідє́і бе µía θєюрутіку́ тіµу́ ачафора́ς (100%). О абтерібкос (\*\*) каі то (+) υποδεικνύουν τις отатібтікю́с буµачтікє́с µєтаβολές (p≤0.01) бе бує́бу µє та ачтібтоіда ки́ттара ачафора́с. Ачати́пшо́у µє áδεia аπо́ туч ачафора́ [264] каї трополоі́убу аπо́ Zωή Пілері́укоυ. Copyright 2016 Elsevier science & technology journals.

## 5. Ο ΕRβ ρυθμίζει την έκφραση και τη δραστικότητα μακρομορίων του εξωκυττάριου χώρου ανεξαρτήτως της δράσης της E2 στα ERβκατεσταλμένα καρκινικά κύτταρα μαστού

Προκειμένου να εξετάσουμε εάν η οι γονιδιακές αλλαγές που επέφερε η καταστολή του ERβ στα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού είναι αναστρέψιμες, εξετάστηκε η επίδραση της E2 στη γονιδιακή έκφραση χαρακτηριστικών δεικτών EMT και σημαντικών τελεστών του ECM, παρουσία ή απουσία του ERβ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η E2 επηρεάζει την έκφραση ορισμένων εξ αυτών των μορίων μόνο στα ERβ-θετικά MDA-MB-231 ctrl κύτταρα αναφοράς. Πιο συγκεκριμένα, η δράση της E2 στα MDA-MB-231 κύτταρα αυξάνει τα επίπεδα mRNA της MMP7 κατά 25%, ενώ δεν επηρεάζει σημαντικά τις MMP2, MMP9, MT1-MMP και τους TIMP1 και TIMP2. Αντιθέτως, στα ΕRβ-κατεσταλμένα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, η Ε2 φαίνεται να επιδρά στη γονιδιακή έκφραση των MMP7, MMP9 και MT1-MMP (Εικόνα 22).



**Εικόνα 22.** Ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των MMP2, MMP7, MMP9, MT1-MMP, TIMP1 και TIMP2 στα MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, πριν και μετά την επώαση των κυττάρων με E2 (10 nM) για 16 ώρες. Ο αστερίσκος (\*) υποδεικνύει τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές μεταξύ των MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 κυττάρων ( $p \le 0.05$ ). Ο σταυρός (+) υποδεικνύει τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές μεταξύ E2-κατεργασμένων και μη shERβ MDA-MB-231 κυττάρων ( $p \le 0.05$ ).

Επιπλέον, το E2/ERβ σηματοδοτικό μονοπάτι φαίνεται να προκαλεί μείωση των επίπεδων mRNA της E-cadherin, κατά 50% και αύξηση στα επίπεδα της vimentin κατά 10% στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, ενώ η επίδραση της E2 στην έκφραση αυτών των μορίων δεν είναι αισθητή στα MDA-MB-231 κύτταρα (Εικόνα 23).



**Εικόνα 23.** Ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των Ecadherin, vimentin, fibronectin και Snail2/Slug στα MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, πριν και μετά την επώαση των κυττάρων με E2 (10 nM) για 16 ώρες. Ο αστερίσκος (\*) υποδεικνύει τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές μεταξύ των MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 κυττάρων (p $\leq$ 0.05). Ο σταυρός (+) υποδεικνύει τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές μεταξύ E2-κατεργασμένων και μη shERβ MDA-MB-231 κυττάρων (p $\leq$ 0.05).

Αναφορικά με την έκφραση των PGs, παρατηρήθηκε ότι η δράση της E2 στα MDA-MB-231 κύτταρα αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης της συνδεκάνης-2 και της γλυπικάνης-1, δεν επηρεάζει την έκφραση της συνδεκάνης-1 και -2, ενώ φαίνεται ότι τα επίπεδα mRNA των μορίων αυτών δεν επηρεάζονται στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι το κύριο ένζυμο αποικοδόμησης των συνδεκανών, ηπαρινάση, δεν επηρεάζεται από τη δράση της E2 στα καρκινικά κύτταρα μαστού (**Εικόνα 24**).



**Εικόνα 24.** Ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των συνδεκανών-1, -2, -4, της glypican-1 και της HPSE στα MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, πριν και μετά την επώαση των κυττάρων με E2 (10 nM) για 16 ώρες. Ο αστερίσκος (\*) υποδεικνύει τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές μεταξύ των MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 κωττάρων (p $\leq$ 0.05). Ο σταυρός (+) υποδεικνύει τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές μεταξύ Ε2-κατεργασμένων και μη shERβ MDA-MB-231 κυττάρων (p $\leq$ 0.05).

Τέλος, η παρουσία Ε2 στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα μειώνει τη γονιδιακή έκφραση των ERa και ERβ (κατά 15% και 35%, αντίστοιγα), αυξάνει την έκφραση του VEGFR2, ενώ δεν επιδρά στην έκφραση των EGFR, IGF-IR και HER2, στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα. Σημειώνεται ότι η έκφραση των παραπάνω μορίων στα MDA-MB-231 κύτταρα δεν επηρεάζεται από τη δράση της Ε2 (Εικόνα 25A). Τέλος δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα φωσφορυλίωσης του Erk1/2 στα MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, πριν και μετά την κατεργασία με Ε2, γεγονός που αποδεικνύει ότι η Ε2 από μόνη της δεν είναι ικανή να επαναφέρει τον p-Erk1/2 στα αρχικά επίπεδα φωσφορυλίωσης, καθώς η παρουσία του ERβ είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση αυτή (Εικόνα 25B). Συνοπτικά, από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται φανερό ότι η αποσιώπηση του ΕRβ αλλάζει δραματικά τα προφίλ έκφρασης και ενεργότητας κρίσιμων μορίων του πρωτεολυτικού δικτύου, του ΕΜΤ και κυτταρικών υποδογέων, ενώ η δράση της Ε2 δεν είναι ικανή να τα επαναφέρει στα αρχικά επίπεδα έκφρασης, γεγονός που πιθανότατα συμβάλει ενεργά στο μειωμένο μεταστατικό και διηθητικό δυναμικό των shERβ MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού.



**Εικόνα 25.** (A) Ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των ERa, ERβ, EGFR, IGF-IR και HER2 και (B) ανοσοαποτύπωση western για pErk1/2, tErk1/2 και α-tubulin στα MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, πριν και μετά την επώαση των κυττάρων με E2 (10 nM) για 16 ώρες. Ο αστερίσκος (\*) υποδεικνύει τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές μεταζύ των MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 κυττάρων (p $\leq$ 0.05). Ο σταυρός (+) υποδεικνύει τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές μεταζύ E2-κατεργασμένων και μη shERβ MDA-MB-231 κυττάρων (p $\leq$ 0.05).

## 6. Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός κυτταρικού κλώνου shERβ MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στον καρκίνο του μαστού, τα πιο κοινά αλληλόμορφα του ΕRβ είναι τα ERβ1, ERβ4 και ERβ5, τα οποία μπορούν να διμερίζονται προκειμένου να πυροδοτούν πολλές διαδικασίες κυτταρικής σηματοδότησης [28, 277-279]. Σύμφωνα με την εταιρία Santa Cruz Biotechnology, Inc., τα ιικά σωματίδια ERβ shRNA (h2) που χρησιμοποιήθηκαν για τις διαμολύνσεις των MDA-MB-231 κυττάρων αποτελούνται από τρία διαφορετικά πλασμίδια shRNA:

i. sc-44297-VA:

GATCCCTGCAGTCAATCCATCTTATTCAAGAGATAAGATGGATTGACT GCAGTTTTT

ii. sc-44297-VB:

#### GATCCGCATCGGGATATCACTATGTTCAAGAGACATAGTGATATCCCG ATGCTTTTT

iii. sc-44297-VC:

#### GATCCGGATGGAGGTGTTAATGATTTCAAGAGAATCATTAACACCTCC ATCCTTTTT

Οι ώριμες συμπληρωματικές αλυσίδες που κατασκευάστηκαν για την αποσιώπηση του γονιδίου του ERβ, στογεύουν τρεις περιογές στο γονιδίωμα του ERβ, τις 3'UTR, noncoding και ORF (open reading frame). Αυτές οι περιοχές είναι κοινές ανάμεσα στα αλληλόμορφα του ERβ. Επομένως, υποθέτουμε ότι η παρατηρούμενη καταστολή του ERβ στο επίπεδο του 70% συσχετίζεται με το γεγονός ότι μερικές ισομορφές του ERβ είναι ακόμα παρούσες, προσδίδοντας ετερογένεια στις κυτταρικές καλλιέργειες των shERβ MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε η πειραματική διαδικασία επιλογής κυτταρικών κλώνων από τις καλλιέργειες των shERβ MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού, ξεκινώντας από με την ανακαλλιέργεια ενός 1-4 κυττάρων σε πλάκα κυτταρικών καλλιεργειών 96 κελίων, παρουσία πουρομυκίνης, προκειμένου να εντοπιστούν τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα με το μέγιστο ποσοστό καταστολής του ΕRβ και να ανακαλλιεργηθούν προκειμένου οι κυτταρικές γενεές να χαρακτηρίζονται από ομοιογένεια ως προς την έκφραση του ΕRβ. Έτσι, επιλέχθηκαν 10 καλλιέργειες shERβ MDA-MB-231 κυττάρων από την παραπάνω πειραματική διαδικασία, καλλιεργήθηκαν συστηματικά ώστε να πολλαπλασιαστούν και χαρακτηρίστηκαν αρχικά ως προς τη γονιδιακή έκφραση του ERβ. Τελικά, επιλέχθηκε μία κυτταρική καλλιέργεια κλώνων shERβ MDA-MB-231 (clone shERβ) στην οποία το τελικό ποσοστό καταστολής της γονιδιακής έκφρασης του ERβ ήταν 85%, ενώ επιβεβαιώθηκε η καταστολή και σε πρωτεϊνικό επίπεδο (**Εικόνα 26**) και καλλιεργήθηκε συστηματικά για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό της. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί καλύτερη σύγκριση, στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον οι κυτταρικές σειρές των: MDA-MB-231 (ERβ+), τα οποία επιλέχθηκαν ως κύτταρα αναφοράς, MCF-7 (ERα+) και shERβ MDA-MB-231 (70% καταστολή του ERβ).



**Εικόνα 26.** Η επιλογή κλώνων shERβ MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού. Ποσοτική real-time PCR ανάλυση και ανοσοαποτύπωση για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA της πρωτεϊνικής έκφρασης του ERβ στις καρκινικές σειρές μαστού MDA-MB-231 (κύτταρα αναφοράς), MCF-7, shERβ MDA-MB-231 και clone shERβ. Οι αστερίσκοι (\*\*), (\*\*\*) υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές ( $p \le 0.01$  και  $p \le 0.001$ , αντίστοιχα) σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς.

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 27Α, από τη μικροσκοπική παρατήρηση της καλλιέργειας κλώνων shERβ MDA-MB-231, επιβεβαιώνεται ότι η καταστολή του ERβ σε μεγαλύτερο ποσοστό ευνοεί την ανάπτυξη κυτταρικών συσσωματωμάτων και την απόκτηση επιθηλιακής μορφολογίας. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνονται από τις εικόνες SEM των κυτταρικών κλώνων shERβ, όπου φαίνεται ότι σε αντίθεση με τα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα τα οποία έχουν επίμηκες σχήμα και μεγάλο αριθμό κυτταρικών προεκβολών, τα κύτταρα κλώνοι shERβ αποκτούν πλέον ωοειδή και πεπλατυσμένη γαρακτηριστικά στοιγεία μορφολογία, επιθηλιακών κυττάρων, αναπτύσσοντας παράλληλα στενές κυτταρικές διεπαφές και κυτταρικά συσσωματώματα (Εικόνα 27В).



Εικόνα 27. Έλεγχος των ΕRβ-εξαρτώμενων κυτταρικών χαρακτηριστικών. (Α) Μικροσκοπία ανάστροφης φάσης για τον έλεγχο της κυτταρικής μορφολογίας των MDA-MB-231 (κύτταρα αναφοράς), MCF-7, shERβ MDA-MB-231 και clone shERβ (μεγέθυνση 40×, μπάρα 10μm). (B) Οι εικόνες SEM αποκαλύπτουν ότι τα MDA-MB-231 κύτταρα (αριστερά) είναι επιμήκη και εμφανίζονται απομακρυσμένα το ένα από το άλλο (μπάρα 10μm), ενώ οι κλώνοι των shERβ MDA-MB-231 κυττάρων εμφανίζονται ως πεπλατυσμένα (βέλη) ή/και ωοειδή κύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν εμφανείς στενές επαφές κυττάρου-κυττάρου σχηματίζοντας κυτταρικά συσσωματώματα, ενώ φαίνεται να έχουν εξαφανιστεί οι κυτταρικές προεκβολές (μπάρα 0.1μm και 10μm).

Σε επόμενο επίπεδο, παρατηρήθηκε ότι η μεγαλύτερη καταστολή του ΕRβ στην καλλιέργεια κλώνων shERβ κυττάρων, αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης του επιθηλιακού δείκτη E-cadherin, γεγονός που αποτελεί ένα ακόμα στοιχείο της πλήρους παρεμπόδισης του προγράμματος ΕΜΤ σε αυτά τα κύτταρα,
αλλαγή η οποία συνοδεύεται από μεγαλύτερη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, όπως αυτή εντοπίζεται στο συμπιεσμένο δίκτυο F-actin (Εικόνα 28A).

Οι αλλαγές τόσο στην κυτταρική μορφολογία και στον κυτταροσκελετό, όσο και στον επαναπρογραμματισμό του ΕΜΤ δε θα μπορούσαν να μη συσχετίζονται με διαφοροποιημένα επίπεδα λειτουργικών ιδιοτήτων των κλώνων shERβ κυττάρων. Πράγματι, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 28B, τόσο τα επίπεδα κυτταρικού πολλαπλασιασμού όσο και αυτά της κυτταρικής μετανάστευσης των κυτταρικών κλώνων shERβ εμφανίζουν ακόμα μεγαλύτερη μείωση (περ. 55% και 70%, αντίστοιχα) από αυτήν που παρουσιάζουν τα shERβ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα, συγκριτικά

Καταλήγοντας, γίνεται σαφές ότι τα υψηλότερα επίπεδα καταστολής του ΕRβ αναστέλλουν ακόμα περισσότερο τη διαδικασία ΕΜΤ που έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στη μορφολογία και τις λειτουργικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων μαστού, γεγονός που υπογραμμίζει το σημαντικό ρόλο του ΕRβ στη ρύθμιση της κυτταρικής συμπεριφοράς των επιθετικών καρκινικών κυττάρων μαστού και την επιτακτική ανάγκη της φαρμακολογικής στόχευσής του στο συγκεκριμένο τύπο καρκίνου.



**Енко́va 28.** То пододто́ катадтоли́с тоυ ER $\beta$  епибра́ дточ киттародкелето́, точ EMT кан тис *λειτουрунке́с иби*о́титес точ каркичко́ч китта́роч µадтой. (A) Енко́чес ачодофоридио́ точ китта́роч MDA-MB-231, MCF-7, shER $\beta$  MDA-MB-231 кан clone shER $\beta$  уна тич E-cadherin (пра́дичи хро́ди) кан F-actin (ко́ккичи хро́ди) де µеуе́дичал 60х (µпа́ра ~20 µm). (B) *Δ*наура́µµата киттарикой поллапладиди кан киттарики́с µетача́дтеволус точ каркичко́ч китта́роч. Он µпа́рес точ бнаураµµа́точ ачтипродотево́ови то µе́до о́ро ± тич типики́ апо́клюл, та опо́на проки́птови апо́ тріа епачали́уµµа пенра́µата. Он адтерідкон (\*), (\*\*), (\*\*\*) ипобенкийови тіс дтатидико́с диµачтике́с µетаβоле́с (p≤0.05, p≤0.01 кан p≤0.001, ачтідтонуа) де ду́сли µе та ки́ттара ачафора́с.

### ΜΕΡΟΣ ΙΙ. Οι ERs ως επιγενετικοί ρυθμιστές των miR-10b, miR-145 και miR-200b στον καρκίνο του μαστού

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί εάν η διαφορετική έκφραση των ERs επηρεάζει την έκφραση συγκεκριμένων miRNAs και αντίστροφα, εάν η ER-διαμεσολαβούμενη ρύθμιση των miRNAs έχει αντίκτυπο στις λειτουργικές ιδιότητες, στο πρόγραμμα EMT, αλλά και στη σύνθεση του ECM των καρκινικών κυττάρων μαστού. Για το σκοπό αυτό, οι καρκινικές σειρές που μελετήθηκαν ήταν οι εξής:

- ΕRα-θετικά και χαμηλής επιθετικότητας καρκινικά κύτταρα μαστού, MCF-7
- ΕRα-αρνητικά, ΕRβ-θετικά και υψηλής επιθετικότητας καρκινικά κύτταρα μαστού, MDA-MB-231
- ΕRβ-κατεσταλμένα, shERβ MDA-MB-231

Αρχικά, κρίθηκε σκόπιμο να εξεταστεί η επίδραση που έχει το διαφορετικό προφίλ ERs στην έκφραση διαφόρων miRNAs που σχετίζονται με την πρόοδο του καρκίνου του μαστού και αντίστροφα, να μελετηθεί ο ρόλος των ER-ρυθμιζόμενων miRNAs στον προγραμματισμό του EMT και στις λειτουργικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων μαστού.

### 1. Ο ERa συνδέεται με διαφορετική μορφολογία, χαρακτηριστικά βλαστοκυττάρων και την έκφραση miRNAs στα καρκινικά κύτταρα μαστού

Όπως επιβεβαιώνουν οι εικόνες που ελήφθησαν έπειτα από μικροσκοπική ανάλυση SEM, τα MCF-7, ERα-θετικά καρκινικά κύτταρα μαστού εμφανίζουν στενές επαφές κυττάρου-κυττάρου (Εικόνα 29Α, πλαίσιο 1) και αναπτύσσονται σχηματίζοντας κυτταρικά συσσωματώματα. Αντίθετα, τα ERβ-θετικά MDA-MB-231 κύτταρα χαρακτηρίζονται από ατρακτοειδή μορφολογία, ενώ εμφανίζονται απομακρυσμένα το ένα από το άλλο (Εικόνα 29Α, πλαίσιο 2). Παρατηρήθηκε μάλιστα ότι όταν τα επιθετικά MDA-MB-231 κύτταρα επιστρώθηκαν σε millipore φίλτρο, μιμούμενο τον ECM, αποκτούν επίμηκες σχήμα με πολυάριθμες κυτταροπλασματικές προεκβολές προσδίδοντάς τους διηθητικές ικανότητες (Εικόνα 29Α, πλαίσιο 3). Τα παραπάνω δεδομένα επιβεβαιώνουν τη συμβολή του προφίλ ER στη μορφολογία, την ανάπτυξη και τη διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων μαστού.

Επιπρόσθετα, κρίθηκε σκόπιμο να εξεταστεί η επίδραση της έκφρασης των ERs στα χαρακτηριστικά βλαστοκυττάρων των καρκινικών κυττάρων μαστού, τα οποία χαρακτηρίζονται από αυτο-ανανέωση και απεριόριστη ικανότητα πολλαπλασιασμού, ενώ καθορίζουν την απόκριση των καρκινικών κυττάρων στη ραδιοθεραπεία και τη χημειοθεραπεία. Χαρακτηριστικούς βιοδείκτες αποτελούν οι υποδοχείς CD44 και CD24, βλαστοκύτταρα συνήθως ενώ τα καρκινικά μαστού εμφανίζουν CD44(+)/CD24(-) φαινότυπο. Έτσι, στη συγκεκριμένη προσέγγιση τα πρωτεϊνικά επίπεδα των CD44 και CD24 με τη χρήση πολυπαραγοντικής κυτταρομετρίας ροής. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 29Β, η παρουσία του ΕRβ αυξάνει σημαντικά τον CD44(+)/CD24(-) φαινότυπο από 1.58 (± 0.52%) που χαρακτηρίζει τα επιθηλιακά MCF-7 κύτταρα σε 98.94% (± 0.54%) στα MDA-MB-231 κύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο ΕRβ είναι στενά συνδεδεμένος με την ανάπτυξη καρκινικών βλαστοκυττάρων μαστού και ενισχύει περαιτέρω την ανάγκη στόχευσής του. Σημειώνεται επίσης ότι η καταστολή του ERβ στα MDA-MB-231 κύτταρα δεν επέφερε σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα των CD44 και CD24 στην κυτταρική επιφάνεια.

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των ΕRα/ERβ στην έκφραση miRNAs που σχετίζονται με την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού, πραγματοποιήθηκε real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των γονιδιακών επιπέδων των miR-10b, miR-21, let-7d, miR-145 και miR-200b, και η σύγκριση έγινε με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης στα MCF-7 κύτταρα (**Εικόνα 29C**). Από τα miRNAs που εξετάστηκαν, τα miR-10b και miR-200b εμφανίζουν τις μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις (99% μείωση και 30 φορές αύξηση για το miR-200b και miR-10b, αντίστοιχα) ανάμεσα στα MDA-MB-231 και τα MCF-7 κύτταρα, για το λόγο αυτό οι παρακάτω πειραματικές προσεγγίσεις εστιάστηκαν σε αυτά τα δύο miRNAs.



**Енко́va 29.** О ЕRβ алотедеі коµβіко́ µо́ріо уна түү каθιέρωση της µорфодоуіаς, тоυ фануоти́лоυ каркнунко́у βλаστοκυττάρων кан түү έкфраση miRNAs στα каркнунка́ ки́ттара µаσтои́. (A) Енко́уеς SEM των китта́рων MCF-7 (1), των китта́рων MDA-MB-231 (2) кан των китта́рων MDA-MB-231 поυ έχουν επιστρωθεί στην επιφάνεια matrix-coated millipore φίλτρου. Kλíµaka, 10µm (B) Киттароµетріа роής уна түү έкфраση των CD44 кан CD24 στην επιφάνεια των киркнунко́у китта́рων µаσтои́ MCF-7 кан MDA-MB-231 που έχουν μαστού MCF-7 кан MDA-MB-231 που επωάστηκαν με τα control IgG-PE кан -APC кан та CD24-PE кан CD44-APC. То ка́тω арнотера́ тетартиµо́рно аντιπροσωπεύεн το φινότυπο CD44(-)/CD24(-), το πάνω αριστερά το CD44(-)/CD24(+), το κάτω δεζιά το CD44(+)/CD24(+) φαινότυπο. Αντιπροσωπευτικά παραδείγµατα n≥3 πειραµάτων. (C) Ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισµό των επιπέδων mRNA των miR-10b, let-7d, miR-145 και miR-200b, στα MCF-7 кан MDA-MB-231 κύτταρα. Το κάθε miRNA κανονικοποιήθηκε με το αντίστοιχο miRNA στα MCF-7 κύτταρα. Οι αστερίσκοι (\*), (\*\*) υποδεικνύουν τις στατιστικώς σηµαντικές μεταβολές (p≤0.05 και p≤0.01, αντίστοιχα κύτταρα αναφοράς.

### 2. Το ελεύθερο οιστρογόνων μέσο καλλιέργειας επάγει αλλαγές στην έκφραση miRNAs και δεικτών ΕΜΤ, που καθορίζεται από την έκφραση ΕRa/ERβ

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των οιστρογόνων και του διαφορετικού ER στάτους στην έκφραση miRNAs που σχετίζονται με την παθοβιολογία του καρκίνου του μαστού, πραγματοποιήθηκε μακρογρόνια καλλιέργεια (3 εβδομάδων) των MCF-7 και MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού σε μέσο καλλιέργειας απαλλαγμένο από οιστρογόνα. Στη συνέχεια μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των miR-10b, miR-200b και miR-145 με ποσοτική real-time PCR ανάλυση. Όταν τα MCF-7 κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία οιστρογόνων, παρουσίασαν σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης του miR-10b και έντονη μείωση της έκφρασης των miR-200b και miR-145, σε σχέση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό (DMEM 10% FBS) (Εικόνα 30A). Οι αλλαγές αυτές συνοδεύτηκαν από μείωση του επιθηλιακού δείκτη E-cadherin (περ. 25%) και αύξηση των μεσεγχυματικών δεικτών fibronectin και snail2/slug (περ. 20% και 60%, αντίστοιχα), σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (Εικόνα 30B). Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την άποψη ότι η Ε2 που σηματοδοτεί μέσω του ERa στα MCF-7 καρκινικά κύτταρα μαστού αποτελεί τον κύριο τελεστή για τη διατήρηση των χαμηλών επιπέδων έκφρασης του miR-10b στα κύτταρα αυτά.

Από την άλλη μεριά, η ανάπτυξη των ΕRβ-θετικών καρκινικών κυττάρων μαστού σε μέσο καλλιέργειας απουσία οιστρογόνων, οδήγησε στη μείωση των επιπέδων έκφρασης του miR-10b, η οποία συνοδεύτηκε από την αυξημένη έκφραση των miR-200b και miR-145, συγκριτικά με τα MDA-MB-231 κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό μέσο (Εικόνα 30C). Επιπλέον, η μακροχρόνια καλλιέργεια στο συγκεκριμένο μέσο καλλιέργειας μειώνει σημαντικά τα επίπεδα mRNA των μεσεγχυματικών δεικτών fibronectin και snail2/slug (περ. 25% και 40%, αντίστοιχα), ενώ αυξάνει τα επίπεδα mRNA του επιθηλιακού δείκτη E-cadherin κατά 30%, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (Εικόνα 30D). Τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν ότι η E2 δρα με διαφορετικό τρόπο τόσο στη ρύθμιση του ΕΜΤ όσο και στην έκφραση των miR-10b, miR-200b και miR-145, σε εξάρτηση με τον τύπο του ER που εκφράζεται από τα καρκινικά κύτταρα μαστού.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, αποκαλύπτεται ότι ο ERβ ρυθμίζει την έκφραση των miR-10b και miR-145, καθώς η καταστολή του οδηγεί τις μεγαλύτερες αλλαγές

στα συγκεκριμένα miRNAs από εκείνα που εξετάστηκαν. Επομένως, περαιτέρω μελέτες που αφορούν στις επιγενετικές επιδράσεις των miRNAs στα MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα ως προς τις λειτουργικές ιδιότητες, την έκφραση τελεστών του ECM, καθώς και της διαδικασίας EMT, θα εστιαστούν στα miR-10b και miR-145.



Εικόνα 30 (η λεζάντα παρατίθεται στην επόμενη σελίδα).

Εικόνα 30. Η απουσία Ε2 από το μέσο καλλιέργειας των καρκινικών κυττάρων μαστού, MCF-7 και MDA-MB-231, επιδρά με διαφορετικό τρόπο στην επιθετικότητά τους, αναλόγως της έκφρασης του ER. (A) Ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των miR-10b, miR-200b και miR-145, μετά από μακρά περίοδο καλλιέργειας των MCF-7 κυττάρων (ERa-θετικά) σε θρεπτικό υλικό απουσία οιστρογόνων. (B) Ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των E-cadherin, fibronectin και Snail2/Slug, στα MCF-7 κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία οιστρογόνων. (C) Διαγράμματα των επιπέδων έκφρασης των miR-10b, miR-200b και miR-145 έπειτα από μακρά περίοδο καλλιέργειας των MDA-MB-231 κυττάρων (ΕRβ-θετικά) σε θρεπτικό υλικό απουσία οιστρογόνων. (D) Ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των E-cadherin, fibronectin και Snail2/Slug, στα MDA-MB-231 κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία οιστρογόνων. Η έκφραση των miRNAs κανονικοποιήθηκε με το γονίδιο 18S rRNA, ενώ αυτή των mRNAs των δεικτών ΕΜΤ, με το γονίδιο β-actin. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε με την αντίστοιχη γονιδιακή έκφραση σε φυσιολογικό μέσο καλλιέργειας, σε κάθε κυτταρική σειρά. Η παρασκευή του συγκεκριμένου μέσου καλλιέργειας περιγράφεται στο πειραματικό μέρος. Οι αστερίσκοι (\*), (\*\*) υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές ( $p \le 0.05$  και  $p \le 0.01$ , αντίστοιχα) σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα αναφοράς. Ανατύπωση με άδεια από την αναφορά [280]. Copyright 2017 Elsevier science & technology journals.

### 3. Το miR-10b ρυθμίζει τις λειτουργικές ιδιότητες, το πρόγραμμα ΕΜΤ και τη σύσταση του ECM των MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού

Πρόσφατα δείχθηκε ότι η έκφραση του miR-10b είναι σημαντικά αυξημένη σε κλινικά δείγματα μεταστατικού καρκίνου του μαστού [281]. Έτσι, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η επίδρασή του στα MCF-7 και MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού, διαφορετικού μεταστατικού δυναμικού. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα MDA-MB-231 κύτταρα εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του miR-10b, που συσχετίζεται με την αυξημένη επιθετικότητά τους. Η καταστολή της έκφρασης του διαμόλυνση των κυττάρων miR-10b έπειτα από με το αντινοηματικό ολιγονουκλεοτίδιο, anti-miR-10b (Εικόνα 31A), οδηγεί σε σημαντική μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυρίως της μεταναστευτικής και διηθητικής (περ. 75%) ικανότητας των MDA-MB-231 κυττάρων (Εικόνα 31B). Η μικροσκοπική ανάλυση SEM αποκάλυψε ότι το anti-miR-10b προκαλεί σημαντικές διαφοροποιήσεις στην κυτταρική μορφολογία και τον κυτταροσκελετό των MDA-MB-231 κυττάρων (Εικόνες 31C, D), οι οποίες εντοπίζονται στην παρεμπόδιση σχηματισμού φιλοποδίων (filopodia) και ψευδοποδίων που φυσιολογικά προσδίδουν στα κύτταρα αυξημένη κινητικότητα. Σημειώνεται ότι τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και οι λειτουργικές ιδιότητες των MCF-7 επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων δεν επηρεάζονται από την καταστολή του miR-10b.



Εικόνα 31 (η λεζάντα παρατίθεται στην επόμενη σελίδα).

Εικόνα 31. Η επίδραση του miR-10b στα MCF-7 και MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν ακολουθώντας διαμολύνσεις των καρκινικών κυττάρων με την αλληλουχία αναφοράς (control miR) και το anti-miR-10b. (A) Τα MCF-7 και MDA-MB-231 κύτταρα διαμολύνθηκαν με το control miR ή το anti-miR-10b και ο έλεγχος της καταστολής του miR-10b ελέγχθηκε με ποσοτική ανάλυση real-time PCR. Η γονιδιακή έκφραση κανονικοποιήθηκε με το γονίδιο 18S rRNA. (B) Διαγράμματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού, κυτταρικής μετανάστευσης και κυτταρικής διήθησης σε matrigel, έπειτα από 24 ώρες, στα MCF-7 και MDA-MB-231 κύτταρα, διαμολυσμένα με control miR και anti-miR-10b. (C) Η μορφολογία των καρκινικών κυττάρων ελέγχθηκε με τη λήψη φωτογραφιών SEM. Η παρουσία του anti-miR-10b στα MDA-MB-231 κύτταρα μειώνει τις κυτταροπλασματικές προεκβολές, ενώ τα επιθηλιακά χαρακτηριστικά των MCF-7 κυττάρων δεν επηρεάζονται. (D) Εικόνες ανοσοφθορισμού για την F-actin από συνεστιακό μικροσκόπιο, στα MCF-7 και MDA-MB-231 κύτταρα, διαμολυσμένων με control miR και anti-miR-10b (μπάρα 20μm). Τα πειράματα ακολούθησαν χρονικό διάστημα διαμόλυνσης 72 ωρών με τα control miR και anti-miR-10b. Οι αστερίσκοι (\*), (\*\*) υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές (p≤0.05 και p≤0.01, αντίστοιχα) σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα αναφοράς.

Οι παρατηρούμενες αλλαγές τόσο στο φαινότυπο όσο και στις λειτουργικές ιδιότητες των MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού γεννούν το ερώτημα αν το συγκεκριμένο miRNA ρυθμίζει επίσης το πρόγραμμα ΕΜΤ. Πράγματι, η ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων χαρακτηριστικών δεικτών ΕΜΤ που επιβεβαιώθηκαν μέσω ανοσοφθορισμού (Εικόνα 32), έδειξαν ότι το anti-miR-10b αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του επιθηλιακού δείκτη E-cadherin, με ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων των μεσεγχυματικών δεικτών fibronectin, ZEB2 (περ. 70%) και snail2/slug (περ. 45%).



**Еіко́va 32.** Н катаотоλή тоυ miR-10b обууєї оточ єтачатроураµµатіσµо́ тоυ EMT ота MDA-MB-231 ко́ттара. (A) Еіко́чες ачобофорібµоύ (µπάρα 20µm) каі (B) поботіку́ real-time PCR ача́λυση уіа точ троблорібµо́ тωч єтіпе́δων є́кфрабус тωч δεіктών EMT (E-cadherin, fibronectin, ZEB2, Snail2/Slug) ота MCF-7 каї MDA-MB-231 ко́ттара, διаµоλυбµє́ча µє control miR каι anti-miR-10b. Та πειράµата акоλоύθησαν χρονικό διάστηµα διаµόλυνσης 72 ωρών με τα control miR каι anti-miR-10b. Oi абтері́бкоі (\*), (\*\*) υποδεικνύουν τις στατιστικώς σηµαντικές µεταβολές (p≤0.05 каι p≤0.01, αντίστοιχα) σε σχέση µε τα αντίστοιχα κύτταρα αναφοράς.

Η διεπικοινωνία των IGF-IR και EGFR με τους ERs ρυθμίζει τις λειτουργικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων μαστού μέσω της έκφρασης τελεστών του ECM και σηματοδοτικών μορίων. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 33A**, η παρουσία του anti-miR-10b στα των MDA-MB-231 κύτταρα μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του EGFR (περ. 20%), ενώ αφήνει ανεπηρέαστους τους IGFR-IR και HER2. Παράλληλα, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του αγγειογενετικού VEGF στα MDA-MB-231 κύτταρα καταστέλλονται από το anti-miR-10b (περ. 90%), υποδηλώνοντας τον κομβικό ρόλο του συγκεκριμένου miRNA στην επαγωγή του επιθετικού χαρακτήρα στα MDA-MB-231 κύτταρα. Παράλληλα, η παρουσία του anti-miR-10b στα MDA-MB-231 κύτταρα μειώνει κατά πολύ τα επίπεδα έκφρασης των μορίων του πρωτεολυτικού δικτύου (MMP7 και MT1-MMP), ενώ από τις PGs που εξετάστηκαν, η καταστολή του miR-10b αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης της συνδεκάνης-1, τόσο σε μεταγραφικό (περ. 70%), όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο (Εικόνα 33Α). Ακόμη, το anti-miR-10b οδηγεί στη σημαντική μείωση των επιπέδων φωσφορυλίωσης του ERK1/2 (περ. 90%) που συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Εικόνα 33B).



Εικόνα 33 (η λεζάντα παρατίθεται στην επόμενη σελίδα).

**Εικόνα 33.** Η καταστολή του miR-10b οδηγεί σε αλλαγές της σύστασης του ECM στα MDA-MB-231 κύτταρα. (A) Ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των υποδοχέων EGFR, IGF-IR, HER2, του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF, της συνδεκάνης-1 και των MMP7 και MT1-MMP. Οι εικόνες ανοσοφθορισμού αποκαλύπτουν τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της συνδεκάνης-1 (μπάρα 20μm). Τα επίπεδα των mRNAs κανονικοποιήθηκαν με το γονίδιο β-actin. (B) Ανοσοαποτύπωση για τον p-ERK1/2, τον ERK1/2 και την α-tubulin, στα MCF-7 και MDA-MB-231 κύτταρα διαμολυσμένα με control miR και antimiR-10b και ποσοτικοποίηση της πυκνότητας των ζωνών. Τα πειράματα ακολούθησαν χρονικό διάστημα διαμόλυνσης 72 ωρών με τα control miR και anti-miR-10b. Οι αστερίσκοι (\*), (\*\*) υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές (p≤0.05 και p≤0.01, αντίστοιχα) σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα αναφοράς.

Συνολικά, τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν ότι το miR-10b εμπλέκεται ενεργά στη ρύθμιση των λειτουργικών ιδιοτήτων, του προγράμματος ΕΜΤ και της έκφρασης σηματοδοτικών μορίων, επηρεάζοντας τη σύσταση του ΕCM, την πρωτεολυτική συμπεριφορά και το μεταστατικό δυναμικό των MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού.

### 4. Το miR-200b επάγει σημαντικές αλλαγές στις λειτουργικές ιδιότητες, σε χαρακτηριστικούς δείκτες ΕΜΤ και στα συστατικά του ΕCM των MDA-MB-231 κυττάρων

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η παρουσία του ΕRβ στα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού συμβάλλει στην καταστολή των επιπέδων έκφρασης του miR-200b, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται άμεσα με την επαγωγή του ΕΜΤ στα κύτταρα αυτά. Προκειμένου να μελετήσουμε το ρόλο του συγκεκριμένου miRNA στη ρύθμιση της συμπεριφοράς των επιθετικών καρκινικών κυττάρων μαστού πραγματοποιήθηκαν διαμολύνσεις των MCF-7 και MDA-MB-231 κυττάρων με την πρόδρομη αλληλουχία του miR-200b που καλείται pre-miR-200b. Αρχικά παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση του miR-200b (Εικόνα 34A) οδηγεί στη μείωση των επιπέδων κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διήθησης των MDA-MB-231 κυττάρων, ενώ παράλληλα μειώνει δραματικά τη μεταναστευτική τους ικανότητα (Εικόνα 34B), και μάλιστα σε ακόμα μεγαλύτερη έκταση από την επίδραση που είχε το anti-miR-10b, γεγονός που υποδηλώνει την προστατευτική δράση του συγκεκριμένου miRNA στην επαγωγή του επιθετικού προφίλ των ΕRβ-θετικών καρκινικών κυττάρων μαστού. Επιπλέον, το pre-

miR-200b επηρεάζει τη μορφολογία των MDA-MB-231 κυττάρων, μειώνοντας τις κυτταρικές τους προεκβολές και μετατρέποντας το σχήμα τους σε ωοειδές, ενώ παρατηρείται ότι και ο κυτταροσκελετός των MDA-MB-231 κυττάρων επηρεάζεται από την υπερέκφραση του miR-200b, όπως φαίνεται από το συμπιεσμένο δίκτυο F-actin (Εικόνες 34C, D).

Μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση των μελών της οικογένειας miR-200 χάνεται σε μεσεγχυματικούς καρκινικούς υποτύπους και ότι τα αυξημένα ενδοκυτταρικά τους επίπεδα παρεμποδίζουν το EMT μέσω της αυξημένης έκφρασης της E-cadherin [282, 283]. Πράγματι, στη συγκεκριμένη μελέτη παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση του miR-200b στα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού επάγει την έκφραση της E-cadherin σε μεταγραφικό (περ. 60%) και πρωτεϊνικό επίπεδο, ενώ μειώνει σε μεγάλο ποσοστό την έκφραση των μεσεγχυματικών δεικτών vimentin, fibronectin, ZEB2 και snail2/slug (**Εικόνα 35A, B**). Μάλιστα, οι αλλαγές αυτές είναι εντονότερες από τις επιδράσεις της καταστολής του miR-10b στα καρκινικά κύτταρα μαστού.



Εικόνα 34 (η λεζάντα παρατίθεται στην επόμενη σελίδα).

Εικόνα 34. Η επίδραση του miR-200b στα MCF-7 και MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν ακολουθώντας διαμολύνσεις των καρκινικών κυττάρων με την αλληλουχία αναφοράς (control miR) και το pre-miR-200b. (A) Τα MCF-7 και MDA-MB-231 κύτταρα διαμολύνθηκαν με το control miR ή το pre-miR-200b και ο έλεγχος της υπερέκφρασης του miR-200b ελέγχθηκε με ποσοτική ανάλυση real-time PCR. Η γονιδιακή έκφραση κανονικοποιήθηκε με το γονίδιο 18S rRNA. (B) Διαγράμματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού, κυτταρικής μετανάστευσης και κυτταρικής διήθησης σε matrigel, έπειτα από 24 ώρες, στα MCF-7 και MDA-MB-231 κύτταρα, διαμολυσμένα με control miR και pre-miR-200b. (C) Η μορφολογία των καρκινικών κυττάρων ελέγχθηκε με τη λήψη φωτογραφιών SEM. Η παρουσία του anti-miR-10b στα MDA-MB-231 κύτταρα μειώνει τις κυτταροπλασματικές προεκβολές, ενώ τα επιθηλιακά χαρακτηριστικά των MCF-7 κυττάρων δεν επηρεάζονται. (D) Εικόνες ανοσοφθορισμού για την F-actin από συνεστιακό μικροσκόπιο, στα MCF-7 και MDA-MB-231 κύτταρα, διαμολυσμένων με control miR και pre-miR-200b (μπάρα 20μm). Τα πειράματα ακολούθησαν χρονικό διάστημα διαμόλυνσης 72 ωρών με τα control miR και pre-miR-200b. Οι αστερίσκοι (\*), (\*\*) υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές ( $p \le 0.05$  και  $p \le 0.01$ , αντίστοιχα) σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα αναφοράς.



**Еіко́va 35.** Н υπερέκφραση του miR-200b οδηγεί στον επαναπρογραμματισμό του EMT στα MDA-MB-231 κύτταρα. (A) Εικόνες ανοσοφθορισμού (μπάρα 20μm) και (B) ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των δεικτών EMT (E-cadherin, vimentin, fibronectin, ZEB2, Snail2/Slug) στα MCF-7 και MDA-MB-231 κύτταρα, διαμολυσμένα με control miR και pre-miR-200b. Τα πειράματα ακολούθησαν χρονικό διάστημα διαμόλυνσης 72 ωρών με τα control miR και pre-miR-200b. Οι αστερίσκοι (\*), (\*\*) υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές (p≤0.05 και p≤0.01, αντίστοιχα) σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα αναφοράς.

Προκειμένου να απαντήσουμε στο ερώτημα εάν οι παραπάνω αλλαγές επηρεάζουν τα συστατικά του ECM και κομβικά σηματοδοτικά μόρια, εξετάσαμε την επίδραση του pre-miR-200b σε αυτόν τον άξονα, στο παρόν κυτταρικό μοντέλο διαφορετικής έκφρασης ERs. Από τα μόρια που αναλύθηκαν, παρατηρήθηκε ότι η μεγαλύτερη επίδραση της υπερέκφρασης του miR-200b συναντάται στην επαγωγή της έκφρασης των υποδοχέων IGF-IR και HER2 που συνοδεύεται από μειωμένα επίπεδα του VEGF στα MDA-MB-231, ενώ στα MCF-7 κύτταρα οι εκφράσεις των μορίων του ECM δεν διαφοροποιούνται σε μεγάλο βαθμό (Εικόνα 36Α). Σημειώνεται ότι η υπερέκφραση των miR-200b στα MDA-MB-231 κύτταρα έχει ως άμεσο αποτέλεσμα τη μείωση των

επιπέδων φωσφορυλίωσης των κινασών ERK1/2 (**Εικόνα 36B**). Παράλληλα, η παρουσία του pre-miR-200b στα MDA-MB-231 κύτταρα αυξάνει τα γονιδιακά και πρωτεϊνικά επίπεδα της συνδεκάνης-1, ενώ μεγαλύτερες αλλαγές παρατηρούνται στα μόρια του πρωτεολυτικού καταρράκτη. Συγκεκριμένα, παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης των MMP2, MMP7 και MMP9 κατά 50%, 80% και 40%, αντίστοιχα.



Εικόνα 36 (η λεζάντα παρατίθεται στην επόμενη σελίδα).

**Εικόνα 36.** Η υπερέκφραση του miR-200b οδηγεί σε αλλαγές της σύστασης του ECM στα MDA-MB-231 κύτταρα. (A) Ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των υποδοχέων IGF-IR, HER2, του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF, της συνδεκάνης-1 και των MMP2, MMP7 και MT1-MMP. Οι εικόνες ανοσοφθορισμού αποκαλύπτουν τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της συνδεκάνης-1 (μπάρα 20μm). Τα επίπεδα των mRNAs κανονικοποιήθηκαν με το γονίδιο β-actin. (B) Ανοσοαποτύπωση western για τον p-ERK1/2, τον ERK1/2 και την α-tubulin, στα MCF-7 και MDA-MB-231 κύτταρα διαμολυσμένα με control miR και pre-miR-200b και ποσοτικοποίηση της πυκνότητας των ζωνών. Τα πειράματα ακολούθησαν χρονικό διάστημα διαμόλυνσης 72 ωρών με τα control miR και pre-miR-200b. Οι αστερίσκοι (\*), (\*\*) υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές (p≤0.05 και p≤0.01, αντίστοιχα) σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα αναφοράς.

Τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν ότι η παρουσία του miR-200b στα καρκινικά κύτταρα μαστού δρα ως καταστολέας του επιθετικού φαινοτύπου. Αυτό προκύπτει από τη σημαντική καταστολή της διαδικασίας ΕΜΤ και μείωσης της επιθετικής συμπεριφοράς των MDA-MB-231 κυττάρων, μέσω κρίσιμων αλλαγών στις ιδιότητές τους και στην έκφραση λειτουργικών συστατικών του ECM.

# 5. Ο ΕRβ ως επιγενετικός ρυθμιστής των miR-10b και miR-145 στον καρκίνο του μαστού

Τα δεδομένα που ελήφθησαν καταδεικνύουν ότι η καταστολή του ΕRβ στα επιθετικά κύτταρα μαστού συνοδεύεται από σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης miRNAs που συνδέονται με την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. Μάλιστα, τα επίπεδα αυτά παρουσιάζουν την τάση να ομοιάσουν με αυτά των ERα-θετικών MCF-7 καρκινικών κυττάρων μαστού. Από τα miRNAs που εξετάστηκαν, τα miR-10b και miR-145 επηρεάζονται περισσότερο από την καταστολή του ERβ και μάλιστα η ρύθμιση της έκφρασής τους γίνεται με αντίστροφο τρόπο. Επιπλέον, προκειμένου να εξεταστεί η δυνατότητα φαρμακολογικής στόχευσης του καρκίνου του μαστού στο επίπεδο αυτών των δύο miRNAs, τα καρκινικά κύτταρα μαστού διαμολύνθηκαν με την πρόδρομη (precursor) αλληλουχία (ενίσχυση της έκφρασης) και τη μη-νοηματική αλληλουχία (αναστολή της έκφρασης) των miR-10b και miR-145, αντίστοιχα. Ως κύτταρα αναφοράς θεωρήθηκαν εκείνα στα οποία πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση με την control miRNA αλληλουχία (control miR). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι πράγματι τα miR-10b και miR-145

κυττάρων, υπογραμμίζοντας τον καινοτόμο ρόλο του ΕRβ στην επιγενετική τροποποίηση συγκεκριμένων miRNAs στον καρκίνο του μαστού.

#### 5.1 Ο ERβ σχετίζεται με τα διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά και τα μοτίβα έκφρασης συγκεκριμένων miRNAs στον καρκίνο του μαστού

Όπως αναλύθηκε στο προηγούμενο μέρος των αποτελεσμάτων, η καταστολή του ΕRβ στα ΕRβ-θετικά MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού, μειώνει την επιθετικότητά τους, επηρεάζοντας τη διαδικασία ΕΜΤ και οδηγεί σε έντονες διαφοροποιήσεις των επιπέδων μεταγραφικής και πρωτεϊνικής έκφρασης πολλών τελεστών του ΕCM. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 37Α, από τις εικόνες ανοσοφθορισμού προκύπτει ότι η καταστολή του ERβ στα shERβ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα οδηγεί σε σημαντική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του συγκεκριμένου ER, σε σύγκριση με τα MDA-MB-231 κύτταρα αναφοράς. Στην Εικόνα 37B παρουσιάζεται η SEM ανάλυση των MDA-MB-231 κυττάρων, τα οποία χαρακτηρίζονται από σφαιρικό και ατρακτοειδές σχήμα, ενώ φαίνεται να αναπτύσσονται απομακρυσμένα το ένα από το άλλο (πλαίσιο B1). Όταν τα MDA-MB-231 κύτταρα επιστρώθηκαν σε matrix-coated (matrigel) millipore φίλτρο, προκειμένου να το διαπεράσουν-διηθήσουν, παρουσίασαν επίμηκες σχήμα με μεγάλο αριθμό κυτταροπλασματικών προεκβολών (πλαίσιο B2). Από την άλλη μεριά, τα ERα-θετικά MCF-7 καρκινικά κύτταρα μαστού εμφανίζουν τις χαρακτηριστικές διεπαφές κυττάρου-κυττάρου και αναπτύσσονται σχηματίζοντας συσσωματώματα (πλαίσιο B3), ενώ τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα εμφανίζονται πιο στρογγυλά, με λιγότερες κυτταροπλασματικές προεκβολές και την τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα (πλαίσιο B4). Αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώνουν τη σημαντική συμβολή του ΕRβ στη μορφολογία, την ανάπτυξη και τη διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων μαστού.

Είναι γνωστό ότι τα miRNAs ρυθμίζουν πληθώρα λειτουργιών των καρκινικών κυττάρων μαστού, καθώς και την έκφραση συστατικών του ECM, ωστόσο λίγα στοιχεία είναι γνωστά για την ER-διαμεσολαβούμενη ρύθμισή τους. Προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση του ERβ σε επιγενετικό επίπεδο, εξετάστηκε η έκφραση πολλών miRNAs που σχετίζονται με την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού, τα σημαντικότερα εκ των οποίων παρουσιάζονται στην **Εικόνα 37C**. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η καταστολή του ERβ οδήγησε στη στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης του προ-μεταστατικού miR-10b, ενώ αυξάνει την έκφραση του

ογκοκατασταλτικού miR-145 και των miR-200b και let-7d που συνδέονται με το μεταστατικό χαρακτήρα. Συγκεκριμένα, η καταστολή του ERβ οδήγησε στη 45% μείωση της έκφρασης του miR-10b και σε 11-φορές αύξηση της έκφρασης του miR-145, σε σχέση με τα MDA-MB-231 κύτταρα αναφοράς. Όσον αφορά στην ιδιοσυστατική έκφραση των miRNAs στα ERα-θετικά MCF-7 καρκινικά κύτταρα μαστού, τα συγκεκριμένα παρουσιάζουν 99% χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του miR-10b, ενώ παρουσιάζουν μεγαλύτερη έκφραση (14- και 34-φορές, αντίστοιχα) των miR-145 και miR-200b, συγκριτικά με τα MDA-MB-231 κύτταρα μαστού.



Εικόνα 37 (η λεζάντα παρατίθεται στην επόμενη σελίδα).

Εικόνα 37. Ο ΕRβ κατέχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της μορφολογίας και την έκφραση miRNAs σε καρκινικά κύτταρα μαστού. (Α) Εικόνες ανοσοφθορισμού για τον ERβ στα MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού (μπάρα 20μm). (B) Εικόνες SEM των κυττάρων MDA-MB-231 (1), των κυττάρων MDA-MB-231 που έχουν επιστρωθεί στην επιφάνεια matrixcoated millipore φίλτρου (2), των κυττάρων MCF-7 (3) και των κυττάρων shERβ MDA-MB-231 (4). Στην κάτω επιφάνεια του millipore φίλτρου παρουσιάζονται τα κύτταρα που κινούνται μέσω των τρυπών του φίλτρου αφού διηθήσουν τη μεμβράνη matrigel. Τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν στρογγυλό/σφαιρικό, αλλά και επίμηκες σχήμα με την παρουσία lamellipodia/invadopodia. Στην κυτταρική επιφάνεια εντοπίζονται επίσης κυτταροπλασματικά κυστίδια και filopodia, χαρακτηριστικά των έντονα κινούμενων κυττάρων. Στο φόντο φαίνεται το millipore φίλτρο και οι οπές αυτού. (μπάρα 10μm). (C) Ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των miR-10b, miR-let-7d, miR-145 και miR-200b, στα MDA-MB-231, MCF-7 και shER MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού. Το κάθε miRNA κανονικοποιήθηκε με το αντίστοιγο miRNA στα MDA-MB-231 κύτταρα. Οι αστερίσκοι (\*), (\*\*) υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές ( $p \le 0.05$  και  $p \le 0.01$ , αντίστοιχα) σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα αναφοράς. Ανατύπωση με άδεια από την αναφορά [280]. Copyright 2017 Elsevier science & technology journals.

## 5.2 Το miR-10b ρυθμίζει τις λειτουργικές ιδιότητες και το πρόγραμμα ΕΜΤ στα shERβ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η έκφραση του miR-10b αυξάνεται σε κλινικά δείγματα μεταστατικού καρκίνου του μαστού [281]. Επιπλέον, η αποσιώπηση του miR-10b αναστέλλει τη μετάσταση του καρκίνου του μαστού *in vivo*, σε πειραματικό μοντέλο ποντικών [284]. Οι συγκεκριμένες παρατηρήσεις μας οδήγησαν να εξετάσουμε περαιτέρω το ρόλο του συγκεκριμένου miRNA στο δικό μας πειραματικό μοντέλο. Παρατηρήσαμε ότι η καταστολή του ERβ οδήγησε στη στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης του miR-10b, κατά 50%, σε σύγκριση με τα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού (Eικόνα 38A). Σε επόμενο βήμα, εξετάστηκε ο ρυθμιστικός ρόλος του miR-10b στις βασικές λειτουργικές ιδιότητες (πολλαπλασιασμός, μετανάστευση, διήθηση) των καρκινικών κυττάρων μαστού, τα οποία διαμολύνθηκαν με την πρόδρομη (precursor) αλληλουχία του συγκεκριμένου miR-10b. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 38A, η υπερέκφραση του miR-10b στα shERβ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα

κυττάρων αυτών (Εικόνα 38B). Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερέκφραση του miR-10b οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων κυτταρικού πολλαπλασιασμού των shERβ MDA-MB-231 κυττάρων (περ. 20%), συγκριτικά με τα control miR shERβ MDA-MB-231 κύτταρα. Επιπλέον, η υπερέκφραση του miR-10b στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα φαίνεται να πυροδοτεί τη διηθητική τους ικανότητα, καθώς παρατηρείται 85% αύξηση συγκριτικά με τα control miR shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, ενώ παρατηρείται αξιοσημείωτη αύξηση της κινητικότητάς τους.

Οι εικόνες SEM που ελήφθησαν πριν και μετά τη διαμόλυνση με το pre-miR-10b έδειξαν ότι η ενίσχυση της έκφρασης του συγκεκριμένου miRNA οδηγούν σε αισθητές μορφολογικές αλλαγές των shERβ MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων, ενώ η μεσεγχυματική μορφολογία των ERβ-θετικών MDA-MB-231 κυττάρων δε φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά (**Εικόνα 38C**). Συγκεκριμένα, τα διαμολυσμένα με το pre-miR-10b shERβ MDA-MB-231 κύτταρα αποκτούν χαρακτηριστικά έντονα κινητικών κυττάρων, καθώς ο σχηματισμός των χαρακτηριστικών ψευδοποδίων και φιλοποδίων είναι εντονότερος σε σχέση με τα control miR κύτταρα. Οι παρατηρήσεις αυτές συνοδεύονται από ξεκάθαρες αλλαγές στον κυτταροσκελετό των shERβ MDA-MB-231 κύτταρα του pre-miR-10b, όπως αυτό αποτυπώνεται έπειτα από χρώση της πρωτεΐνης F-actin (**Εικόνα 38D**). Οι εικόνες ανοσοφθορισού της F-actin επιβεβαιώνουν τα χαρακτηριστικά με το χαρακτηριστικό κυτταροσκελετό που παρουσιάζουν τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα.



Εικόνα 38 (η λεζάντα παρατίθεται στην επόμενη σελίδα).

Εικόνα 38. Η επίδραση του miR-10b στα MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν ακολουθώντας διαμολύνσεις των καρκινικών κυττάρων με την αλληλουγία αναφοράς (control miR) και την πρόδρομη αλληλουγία του miR-10b (pre-miR-10b). (A) Τα MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 κύτταρα διαμολύνθηκαν με το control miR ή το pre-miR-10b και ο έλεγχος της υπερέκφρασης του miR-10b ελέγχθηκε με ποσοτική ανάλυση real-time PCR. Η γονιδιακή έκφραση κανονικοποιήθηκε με το γονίδιο 18S rRNA. (B) Διαγράμματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού, κυτταρικής μετανάστευσης και κυτταρικής διήθησης σε matrigel, έπειτα από 24 ώρες, στα MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231, διαμολυσμένα με control miR και pre-miR-10b, κύτταρα. (C) Η μορφολογία των καρκινικών κυττάρων ελέγχθηκε με τη λήψη φωτογραφιών SEM. Η παρουσία του pre-miR-10b στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα οδηγεί στην παραγωγή περισσότερων κυτταροπλασματικών προεκβολών (βέλη), ενώ τα μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά των MDA-MB-231 κύτταρα δεν επηρεάζονται σημαντικά. (D) Εικόνες ανοσοφθορισμού για την F-actin από συνεστιακό μικροσκόπιο, στα MDA-MB-231 και shER $\beta$  MDA-MB-231 κύτταρα, διαμολυσμένα με control miR και pre-miR-10b (μπάρα 20μm). Τα πειράματα ακολούθησαν χρονικό διάστημα διαμόλυνσης 72 ωρών με τα control miR και pre-miR-10b. Οι αστερίσκοι (\*), (\*\*) υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές ( $p \le 0.05$  και  $p \le 0.01$ , αντίστοιχα) σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα αναφοράς. Ανατύπωση με άδεια από την αναφορά [280]. Copyright 2017 Elsevier science & technology journals.

Οι παρατηρούμενες αλλαγές που προκαλεί η παρουσία του pre-miR-10b τόσο στο φαινότυπο των shERβ MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού, όσο και στις λειτουργικές τους ιδιότητες, γέννησε το ερώτημα κατά πόσο το συγκεκριμένο miRNA μπορεί να ρυθμίσει τη διαδικασία EMT. Πράγματι, από τις εικόνες ανοσοφθορισμού από συνεστιακό μικροσκόπιο προκύπτει ότι τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα που υπερεκφράζουν το miR-10b εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης του μεσεγχυματικού δείκτη vimentin ενώ τα πρωτεϊνικά επίπεδα του επιθηλιακού δείκτη Ecadherin μειώνονται (**Εικόνα 39A**). Επιπλέον, η υπερέκφραση του miR-10b στα κύτταρα αυτά επηρεάζει και τη γονιδιακή έκφραση άλλων χαρακτηριστικών δεικτών EMT. Συγκεκριμένα, στα διαμολυσμένα με το pre-miR-10b shERβ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού, παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης της E-cadherin, κατά 40%, ενώ τα επίπεδα mRNA των μεσεγχυματικών δεικτών vimentin, fibronectin και snail2/slug μειώνονται κατά 50%, 40% και 20%, αντίστοιχα, σε σχέση με τα control miR κύτταρα (**Εικόνα 39B**). Οι υποδοχείς κινασών τυροσίνης, EGFR και IGF-IR, αποτελούν δυναμικά μόρια τόσο για τη διεπικοινωνία με τους ERs όσο και για τη ρύθμιση των λειτουργικών ιδιοτήτων των καρκινικών κυττάρων μαστού [13, 21, 40, 126, 264]. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 39C**, η παρουσία του pre-miR-10b αυξάνει τα χαμηλά επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των IGF-IR και HER2, στα οποία οδήγησε η καταστολή του ERβ, στα shERβ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού. Αντίθετα, η τα επίπεδα έκφρασης του EGFR στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα δε φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από το pre-miR-10b. Αξίζει να σημειωθεί ότι η διαμόλυνση με το pre-miR-10b αυξάνει σημαντικά τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του αγγειογενετικού αυξητικού παράγοντα VEGF στα ERβκατεσταλμένα κύτταρα, ενισχύοντας το ρόλο του miR-10b στην επαγωγή του αγγειογενετικού και επιθετικού δυναμικού των shERβ MDA-MB-231 κυττάρων.

Μακρομόρια του ECM, όπως συνδεκάνες και MMPs, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-ECM, στην κυτταρική σηματοδότηση, καθώς και στις διαδικασίες προσκόλλησης/μετανάστευσης στα καρκινικά κύτταρα μαστού [64, 71, 80]. Αναφορικά με την επίδραση του pre-miR-10b στις PGs κυτταρικής επιφάνειας, η υπερέκφραση του miR-10b στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα οδηγεί στην έντονη μείωση των επιπέδων μεταγραφικής και πρωτεϊνικής έκφρασης της συνδεκάνης-1, όπως προκύπτει από ποσοτική real-time PCR ανάλυση και ανοσοφθορισμό (Εικόνα 39C). Επίσης, όσον αφορά στη ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεολυτικών ενζύμων από το miR-10b, τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης mRNA των MMP2, MMP7 και MMP9 (περ. 100%, 75% και 120%, αντίστοιχα). Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 39D, η διαμόλυνση των shERβ MDA-MB-231 κυττάρων οδηγεί στη στατιστικώς σημαντική αύξηση των φωσφορυλιωμένων μορφών του ERK1/2, κατά 285%, στα συγκεκριμένα κύτταρα. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι η παρουσία του miR-10b εμπλέκεται σε μεγάλο βαθμό στη ρύθμιση των λειτουργικών ιδιοτήτων, των μορφολογικών χαρακτηριστικών και του κυτταροσκελετού, του ΕΜΤ και της σηματοδότησης στα shERβ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα, επηρεάζοντας έτσι τη σύνθεση του ECM, την πρωτεολυτική συμπεριφορά και συνεπακόλουθα το μεταστατικό δυναμικό αυτών των κυττάρων.



Εικόνα 39 (η λεζάντα παρατίθεται στην επόμενη σελίδα).

Εικόνα 39. Η υπερέκφραση του miR-10b οδηγεί στον επαναπρογραμματισμό του ΕΜΤ και σε σημαντικές αλλαγές στην έκφραση μακρομορίων του ΕCM. (Α) Εικόνες ανοσοφθορισμού (μπάρα 20μm) και (B) ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των δεικτών EMT (E-cadherin, vimentin, fibronectin, ZEB2, Snail2/Slug) στα MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, διαμολυσμένα με control miR και pre-miR-10b. (C) Ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των υποδοχέων EGFR, IGF-IR, HER2, του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF, της συνδεκάνης-1 και των MMP2, MMP7, ΜΜΡ9. Οι εικόνες ανοσοφθορισμού αποκαλύπτουν τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της συνδεκάνης-1 (μπάρα 20μm). Τα επίπεδα των mRNAs κανονικοποιήθηκαν με το γονίδιο β-actin. (D) Ανοσοαποτύπωση για τον p-ERK1/2, τον ERK1/2 και την α-tubulin, στα MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 κύτταρα διαμολυσμένα με control miR και pre-miR-10b και ποσοτικοποίηση της πυκνότητας των ζωνών. Τα πειράματα ακολούθησαν χρονικό διάστημα διαμόλυνσης 72 ωρών με τα control miR και pre-miR-10b. Οι αστερίσκοι (\*), (\*\*) υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές (p≤0.05 και p≤0.01, αντίστοιγα) σε σχέση με τα αντίστοιγα κύτταρα αναφοράς. Ανατύπωση με άδεια από την αναφορά [280]. Copyright 2017 Elsevier science & technology journals.

### 5.3 Η καταστολή του miR-145 επάγει σημαντικές αλλαγές στις λειτουργικές ιδιότητες και τους δείκτες ΕΜΤ των shERβ MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η καταστολή του ΕRβ στα επιθετικά καρκινικά κύτταρα μαστού, οδήγησε στην αξιοσημείωτη αύξηση της έκφρασης του miR-145, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς, MDA-MB-231 (**Εικόνα 37C**). Επομένως, θεωρήθηκε εύλογο να μελετηθεί ο ρόλος του συγκεκριμένου miRNA στο δικό μας *in vitro* μοντέλο καρκινικών κυττάρων μαστού. Για το λόγο αυτό, τα MDA-MB-231 και τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα διαμολύνθηκαν με το μη-νοηματικό ολιγονουκλεοτίδιο, το οποίο καταστέλλει την έκφραση του miR-145 και ονομάζουμε anti-miR-145 (**Εικόνα 40A**). Η καταστολή του miR-145 στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα οδήγησε στην αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η οποία συνοδεύτηκε από αξιοσημείωτη επαγωγή τόσο της μεταναστευτικής όσο και της διηθητικής τους ικανότητας, υποδεικνύοντας τον προστατευτικό ρόλο που κατέχουν τόσο ο ERβ όσο και το miR-145 προκειμένου να εδραιωθεί ο επιθετικός φαινότυπος των MDA-MB-231 κυττάρων μαστού. Ο ρόλος του ΕRβ στη ρύθμιση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι η

καταστολή της έκφρασης του miR-145 δεν επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τις λειτουργικές ιδιότητες των MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 40B).

Οι εικόνες SEM (Εικόνα 40C) των MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού περιγράφουν ξεκάθαρα ότι η απουσία του miR-145 στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, μετά τη διαμόλυνσή τους με το anti-miR-145, έχει επίδραση στα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, είναι εμφανής η αύξηση των κυτταροπλασματικών προεκβολών στα κύτταρα αυτά (Εικόνα 40C, πλαίσιο κάτω δεξιά), ενώ η μεσεγχυματική μορφολογία των MDA-MB-231 κυττάρων δεν επηρεάζεται από το anti-miR-145 (Εικόνα 40C, πλαίσιο πάνω δεξιά), σε σχέση με τα control miR MDA-MB-231 κύτταρα. Επιπλέον, οι εικόνες ανοσοφθορισμού από συνεστιακό μικροσκόπιο (Εικόνα 40D) αποκαλύπτουν την επίδραση που έχει το anti-miR-145 στον κυτταροσκελετό των shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, σε σχέση με τα αντίστοιχα control miR κύτταρα.



Εικόνα 40 (η λεζάντα παρατίθεται στην επόμενη σελίδα).

Εικόνα 40. Η καταστολή του miR-145 αυζάνει την επιθετικότητα των shERβ MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν ακολούθησαν τις διαμολύνσεις των καρκινικών κυττάρων με τα control miR και anti-miR-145. (A) Η καταστολή του miR-145 στα MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 κύτταρα ελέγχθηκε με ποσοτική realtime PCR ανάλυση. Η έκφραση κανονικοποιήθηκε βάσει της έκφρασης του γονιδίου 18S rRNA. (B) Διαγράμματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού, κυτταρικής μετανάστευσης και κυτταρικής διήθησης σε matrigel, έπειτα από 24 ώρες, στα MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, διαμολυσμένα με control miR και anti-miR-145. (C) Η μορφολογία των καρκινικών κυττάρων ελέγχθηκε με τη λήψη φωτογραφιών SEM. Η παρουσία του anti-miR-145 στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα οδηγεί στην παραγωγή περισσότερων κυτταροπλασματικών προεκβολών (βέλη), ενώ τα μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά των MDA-MB-231 κύτταρα δεν επηρεάζονται σημαντικά. (D) Εικόνες ανοσοφθορισμού για την F-actin από συνεστιακό μικροσκόπιο, στα MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, διαμολυσμένων με control miR και anti-miR-145 (μπάρα 20μm). Τα πειράματα ακολούθησαν χρονικό διάστημα διαμόλυνσης 72 ωρών με τα control miR και antimiR-145. Οι αστερίσκοι (\*), (\*\*) υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές (p≤0.05 και ρ≤0.01, αντίστοιχα) σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα αναφοράς. Ανατύπωση με άδεια από την αναφορά [280]. Copyright 2017 Elsevier science & technology journals.

Μελέτες έχουν δείξει ότι το miR-145 καταστέλλει τη μετανάστευση και την ανάπτυξη σε κλινικά δείγματα καρκινικών κυττάρων μαστού συγκριτικά με φυσιολογικούς ιστούς και ότι η υπερέκφραση του συγκεκριμένου miRNA παρεμποδίζει το EMT [285, 286]. Στη βάση αυτή, με τη βοήθεια συνεστιακού μικροσκοπίου παρατηρήθηκε ότι η καταστολή της έκφρασης του miR-145 στα shERβ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα, οδηγεί στη μείωση του επιθηλιακού δείκτη E-cadherin και στη συνεπακόλουθη αύξηση του μεσεγχυματικού δείκτη vimentin, σε πρωτεϊνικό επίπεδο (**Εικόνα 41A**). Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώθηκαν και σε μεταγραφικό επίπεδο, από την ποσοτική ανάλυση real-time PCR (**Εικόνα 41B**). Επίσης, το anti-miR-145 μειώνει σημαντικά τα επίπεδα mRNA των μεσεγχυματικών δεικτών fibronectin, snail2/slug στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, τα επίπεδα των μεταγραφικών και πρωτεϊνικών επιπέδων των E-cadherin και vimentin δεν επηρεάζονται μετά τη διαμόλυνση με το anti-miR-145, ενώ αντίθετα αυξήθηκαν τα επίπεδα mRNA των fibronectin και snail2/slug, ενισχύοντας τον επιθετικό φαινότυπο των κυττάρων αυτών.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η επίδραση της καταστολής της έκφρασης του miR-145 στην έκφραση σημαντικών τελεστών του ECM. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην Εικόνα **41C**, παρατηρήθηκε ότι τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το anti-miR-145 χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα του υποδοχέα HER2, κατά 30%, σε σχέση με τα αντίστοιχα control miR κύτταρα, ενώ τα mRNAs των EGFR και IGF-IR παραμένουν αναλλοίωτα. Επίσης, η καταστολή της έκφρασης του miR-145 μειώνει τη γονιδιακή έκφραση των EGFR, IGF-IR και HER2 (περ. 25%, 15% και 40%, αντίστοιχα), σε επίπεδο mRNA, στα MDA-MB-231 κύτταρα, συγκριτικά με τα control miR. Όσον αφορά στην επίδραση του anti-miR-145 στα συστατικά του πρωτεολυτικού καταρράκτη, η διαμόλυνση των shERβ MDA-MB-231 κυττάρων με το anti-miR-145 οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA των MMP2, MMP7 και MMP9, ενώ τα MDA-MB-231 κύτταρα παραμένουν ανεπηρέαστα. Τέλος, η καταταστολή του miR-145 είχε ως αποτέλεσμα την έντονη αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης του Erk1/2 κατά περίπου 150% σε σχέση με τα αντίστοιχα control miR κύτταρα (**Εικόνα 41D**), γεγονός που σχετίζεται με την αύξηση της επιθετικότητας που επιδεικνύουν τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, παρουσία του anti-miR-145.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι το miR-145 δρα ως ένας προστατευτικός παράγοντας της χαμηλής επιθετικότητας των καρκινικών κυττάρων μαστού, καθώς η καταστολή της έκφρασής του οδηγεί στην επαγωγή του φαινομένου EMT με τη συνεπακόλουθη αύξηση της επιθετικής τους συμπεριφοράς, μέσω σημαντικών αλλαγών στις λειτουργικές τους ιδιότητες και στην έκφραση βασικών ρυθμιστικών μακρομορίων του ECM, στα shERβ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα.



Εικόνα 41 (η λεζάντα παρατίθεται στην επόμενη σελίδα).

**Εικόνα 41.** Η καταστολή του miR-145 στα shERβ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα οδηγεί σε σημαντικές αλλαγές των δεικτών EMT και των συστατικών του ECM. (A) Εικόνες ανοσοφθορισμού (μπάρα 20μm) για την ανάλυση των πρωτεϊνών E-cadherin και vimentin και (B) ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των δεικτών EMT (E-cadherin, vimentin, fibronectin και Snail2/Slug) στα MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, διαμολυσμένα με control miR και anti-miR-145. (C) Ποσοτική real-time PCR ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των υποδοχέων EGFR, IGF-IR, HER2 και των MMP2, MMP7, MMP9. Τα επίπεδα των mRNAs κανονικοποιήθηκαν με το γονίδιο β-actin. (D) Ανοσοαποτύπωση για τον p-ERK1/2, τον ERK1/2 και την α-tubulin, στα MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231 κύτταρα διαμολυσμένα με control miR και anti-miR-145 και ποσοτικοποίηση της πυκνότητας των ζωνών. Τα πειράματα ακολούθησαν χρονικό διάστημα διαμόλυσης 72 ωρών με τα control miR και pre-miR-10b. Oι αστερίσκοι (\*), (\*\*) υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές (p≤0.05 και p≤0.01, αντίστοιχα) σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα αναφοράς. Ανατύπωση με άδεια από την αναφορά [280]. Copyright 2017 Elsevier science & technology journals.

### 6. Η διεπικοινωνία των σηματοδοτικών μονοπατιών EGFR/IGF-IR καθορίζει την έκφραση των miR-10b και miR-200b στα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού

Στο πρώτο μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης εξετάστηκε ο ρόλος του ERβ στην ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών EGFR και IGF-IR και της διεπικοινωνίας τους στη ρύθμιση της κυτταρικής μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων μαστού MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η διεπικοινωνία μεταξύ των ERβ, EGFR και IGF-IR κατέχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταναστευτικής ικανότητας κυρίως των MDA-MB-231 κυττάρων, όπου ο ERβ είναι παρών.

Σε αυτό το στάδιο κρίθηκε σκόπιμο να αξιολογηθεί ο ρόλος του ΕRβ και της συνεργατικής σηματοδότησης των EGFR/IGF-IR στη ρύθμιση της έκφρασης των δύο miRNAs που όπως αποδείξαμε εμπλέκονται στη ρύθμιση της συμπεριφοράς των καρκινικών κυττάρων, τα miR-10b και miR-200b. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση του miR-10b και η καταστολή της έκφρασης του miR-200b συνδέονται με το μεταστατικό δυναμικό των MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού. Για το λόγο αυτό, τα ERβ-θετικά καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB-231 καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες

απουσίας ορού με τους εξειδικευμένους καθοδικούς αναστολείς των υποδοχέων EGFR (AG1478, 1μM) και IGF-IR (AG1024, 1μM) παρουσία και απουσία E2 για 16 ώρες.

Όπως παρατηρείται στην Εικόνα 42 (αριστερό πλαίσιο), ο αναστολέας του EGFR επάγει την έκφραση του miR-10b (περ. 30%), ενώ ο αναστολέας του IGF-IR δεν επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης. Αντίθετα, η ταυτόχρονη αναστολή και των δύο υποδοχέων επαναφέρει τα επίπεδα έκφρασης του miR-10b στα επίπεδα έκφρασης των κυττάρων αναφοράς. Η παρουσία Ε2 στο μέσο καλλιέργειας φαίνεται να έχει διεγερτική επίδραση στην έκφραση του miR-10b, η οποία ελαττώνεται σημαντικά αναστέλλοντας είτε τους δύο υποδοχείς ξεχωριστά είτε και τους δύο μαζί. Σημειώνεται ότι η αναστολή του IGF-IR παρουσία Ε2 επάγει την έκφραση του miR-10b, γεγονός που υποδεικνύει το ρόλο της σηματοδότησης της E2 μέσω του ERβ και του IGF-IR για τη ρύθμιση της έκφρασης του συγκεκριμένου miRNA. Ως εκ τούτου, φαίνεται ότι ο υποδοχέας IGF-IR κατέχει προστατευτικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης του miR-10b, ενώ η E2-διαμεσολαβούμενη επαγωγή της έκφρασης του συγκεκριμένου miRNA είναι μεν υπαρκτή αλλά εξαφανίζεται όταν αναστέλλονται και οι δύο υποδογείς, αποδεικνύοντας ότι η Ε2 ακολουθεί έναν ανεξάρτητο τρόπο σηματοδότησης, χωρίς να εμπλέκονται σε αυτόν οι δύο βασικοί υποδοχείς EGFR και IGFR. Από την άλλη μεριά, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 42 (δεξί πλαίσιο), παρόλο που η καταστολή του EGFR επάγει σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης του miR-200b (~2 φορές), τόσο η καταστολή του IGF-IR όσο και των δύο υποδοχέων δεν επηρεάζουν σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης. Η Ε2-διαμεσολαβούμενη αύξηση της έκφρασης του συγκεκριμένου miRNA εξαφανίζεται με την καταστολή και των δύο υποδογέων. Ωστόσο, σημειώνεται ότι η καταστολή του EGFR παρουσία E2 εξαφανίζει την επαγωγική επίδραση που είχε η καταστολή του απουσία της E2, ενώ παρατηρούμε ότι η καταστολή του IGF-IR παρουσία E2 μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του miR-200b.


**Εικόνα 42.** Ο ρόλος των E2–ERβ, EGFR και IGF-IR στην έκφραση των miR-10b και miR-200b στα MDA-MB-231 κύτταρα. Ποσοτική real-time PCR ανάλυση των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης των miR-10b και miR-200b στα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού. Η έκφραση των miRNAs κανονικοποιήθηκε βάσει της έκφρασης του γονιδίου 18S rRNA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD τριών ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Τα σύμβολα (\*), (\*\*), (+), (++), (#) και (##) υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές μεταβολές (p≤0.05, p≤0.01, p≤0.05, p≤0.01, p≤0.05, p≤0.01, αντίστοιχα) σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς, την E2 και τον κάθε αναστολέα, αντίστοιχα.

## Συζήτηση Συμπεράσματα

Η παθοφυσιολογία του καρκίνου του μαστού είναι στενά συνδεδεμένη με τις δράσεις των στεροειδών ορμονών και συγκεκριμένα των οιστρογόνων. Τα οιστρογόνα ρυθμίζουν την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού, μέσω της πρόσδεσής τους στους ERs, καθώς και της αλληλεπίδρασής τους με GFs και τα λειτουργικά μακρομόρια του ECM. Οι βιολογικές δράσεις τους ρυθμίζονται από τους υψηλής-συγγένειας ERs, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Οι ERs έχουν την ικανότητα να πυροδοτούν τη γονιδιακή έκφραση είτε μέσω της πρόσδεσής τους σε συγκεκριμένες ERE περιοχές, είτε δρώντας οι ίδιοι ως συν-ενεργοποιητές μεταγραφικών παραγόντων (γενομικός μηγανισμός δράσης). Επιπλέον, οι επιδράσεις των ERs σε κυτταρικό επίπεδο επηρεάζονται από τις μεμβρανικές και κυτταροπλασματικές αποκρίσεις (μηγενομικός μηχανισμός δράσης) [287, 288]. Το μεγάλο εύρος βιολογικών δράσεων των ERs εξηγεί το λόγο για τον οποίο συμπεριλαμβάνονται στους βιοδείκτες που θα καθορίσουν την απόφαση των κλινικών ιατρών για το θεραπευτικό πρωτόκολλο που θα ακολουθηθεί σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Συγκεκριμένα, το επονομαζόμενο ER-στάτους κατηγοριοποιεί τους καρκινικούς όγκους μαστού στις εξής ομάδες: ERaθετικοί και HER2-αρνητικοί, με χαμηλό ή μέτριο βαθμό διαφοροποίησης (luminal A); ΕRα-θετικοί και HER2-αρνητικοί, με υψηλό βαθμό διαφοροποίησης (luminal B); επιθετικού τύπου, τριπλά αρνητικοί (ERa-, PR- και HER2-αρνητικοί) [9]. Είναι πολλά τα στοιχεία που υποστηρίζουν ότι η παρουσία του ΕRβ σε καρκινικούς όγκους μαστού σχετίζεται με την εμφάνιση επιθετικού φαινοτύπου [289, 290], επιβεβαιώνοντας την προγνωστική αξία που έχει η έκφρασή του [291-293]. Επίσης, πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν ότι οι ισομορφές του ERβ ρυθμίζουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που διαμεσολαβούν στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης [294]. Έτσι, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές προσπάθειες για το σχεδιασμό βιολογικών εργαλείων προκειμένου να εκτιμηθεί ο ρόλος του ΕRβ στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων μαστού, ώστε να προβλεφθεί η δυνατότητα χρήσης του ως διαγνωστικό μέσο [295]. Ωστόσο, ακόμα παραμένει πρόκληση ο προσδιορισμός τόσο των βιολογικών δράσεων όσο και της προγνωστικής αξίας του ΕRβ στον επιθετικό τύπο καρκίνου του μαστού. Η μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφρασή του στα τριπλά αρνητικά καρκινικά κύτταρα μαστού, MDA-MB-231, βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα, ενώ παράλληλα είναι και λειτουργικός, όπως έχει προηγούμενα δειχθεί από την ερευνητική μας ομάδα [40, 106, 296].

## Ο ΕRβ διαμεσολαβεί στην επαγωγή του ΕΜΤ, επηρεάζοντας τις ιδιότητες και τη σύσταση του ΕCM των επιθετικών καρκινικών κυττάρων μαστού

Στην παρούσα μελέτη, αποδείξαμε τον κομβικό ρόλο που κατέχει ο ERβ στη ρύθμιση της κυτταρικής συμπεριφοράς, τις ιδιότητες και τη σύσταση του ECM των επιθετικών καρκινικών κυττάρων μαστού, MDA-MB-231. Για το σκοπό αυτό δημιουργήσαμε τη σταθερά διαμολυσμένη καρκινική κυτταρική σειρά (shERβ MDA-MB-231), στην οποία πραγματοποιήθηκε η αποσιώπηση του ERβ χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα shRNAs σχεδιασμένα έναντι του ανθρώπινου ERβ, στα ERβ-θετικά MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού. Η διαδικασία αυτή είχε ως αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση των επιπέδων mRNA του ERβ, η οποία μετά από κάποιες κυτταρικές γενεές σταθεροποιήθηκε στο επίπεδο του 70% συγκριτικά με τα MDA-MB-231 ctrl κύτταρα αναφοράς. Επιπλέον, η καταστολή του ΕRβ είχε ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση του ΕΜΤ, η οποία συσχετίστηκε με την παρατηρούμενη μείωση της επιθετικής κυτταρικής συμπεριφοράς (μειωμένα ποσοστά πολλαπλασιασμού, κινητικότητας, προσκόλλησης και διήθησης), καθώς και με τις σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης πολλών συστατικών του ECM, τα οποία εντοπίζονται τόσο στην κυτταρική επιφάνεια όσο και στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Συγκεκριμένα, η καταστολή του ΕRβ οδήγησε στη μείωση των επιπέδων έκφρασης των μεσεγχυματικών δεικτών fibronectin και vimentin και του EMT-σχετιζόμενου μεταγραφικού παράγοντα snail2/slug, ενώ αυξήθηκαν τα επίπεδα του επιθηλιακού δείκτη E-cadherin και οι κυτταρικές διεπαφές. Επίσης, παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση των HSPGs, syndecan-2/-4 και της σεργλυκίνης, αρκετών MMPs (κυρίως στις MMP1, MMP7 και MMP9), των ενδογενών αναστολέων τους, TIMP1 και TIMP2, καθώς και των συστατικών του συστήματος ενεργοποίησης του πλασμινογόνου (uPA, tPA και PAI-1). Τα μειωμένα επίπεδα του ERβ οδηγούν στην καταστολή του ERK σηματοδοτικού μονοπατιού, γεγονός που μπορεί να συσχετιστεί με τη χαμηλή επιθετικότητα που χαρακτηρίζει τα κύτταρα αυτά. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η καταστολή του ΕRβ μειώνει την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων μαστού, μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών EGFR/IGF-IR kai JAK-2/STAT.

Η κύρια επίπτωση της καταστολής του ΕRβ είναι η μείωση της επιθετικής συμπεριφοράς των τριπλά αρνητικών καρκινικών κυττάρων μαστού, μέσω αλλαγών στα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά και της συνεπακόλουθης παρεμπόδισης του προγράμματος ΕΜΤ. Τα ΕRβ-θετικά MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού διαθέτουν ατρακτοειδές σχήμα και αναπτύσσονται ως επιμήκη ανεξάρτητα κύτταρα,

γεγονός που βοηθά στη διατήρηση του υψηλού διηθητικού δυναμικού που τα χαρακτηρίζει. Από τα δεδομένα της παρούσας μελέτης προέκυψε ότι τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα χαρακτηρίζονται από την τάση να ανακτήσουν έναν επιθηλιακό φαινότυπο, καθώς η καταστολή του ERβ προσδίδει στα κύτταρα αυτά ένα ωοειδές σχήμα και τη δυνατότητα σχηματισμού κυτταρικών συσσωματωμάτων μέσω της ανάπτυξης διακυτταρικής προσκόλησης, η οποία συνοδεύεται από επαγωγή των επιπέδων μεταγραφικής και πρωτεϊνικής έκφρασης της E- cadherin. Επιπρόσθετα, μεγάλης σημασίας είναι η παρατήρηση ότι τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις στην οργάνωση του κυτταροσκελετού, όπως αποκάλυψαν τα δίκτυα α-tubulin και F-actin. Ο ρόλος των ERs στη ρύθμιση του EMT έχει τεθεί υπό μελέτη, προκειμένου να δοθούν απαντήσεις σχετικά με τη ρύθμιση της συμπεριφοράς των καρκινικών κυττάρων μαστού [297]. Η έκφραση του επιθηλιακού E-cadherin ρυθμίζεται από πληθώρα μεταγραφικών καταστολέων, δείκτη συμπεριλαμβανομένων των snail1, snail2/slug, ZEB1, ZEB2 και twist [298-300]. Από την άλλη πλευρά, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της vimentin σχετίζονται άμεσα με την αυξημένη κυτταρική μετανάστευση, διήθηση και την επαγωγή του ΕΜΤ σε διάφορες κυτταρικές καρκινικές σειρές μαστού [301]. Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η παρατηρούμενη παρεμπόδιση της κινητικότητας, προσκόλλησης και διήθησης σε μήτρα κολλαγόνου τύπου Ι δύνανται να απορρέει από την επαγωγή της διακυτταρικής προσκόλλησης που σχετίζεται με διαφοροποιήσεις στα προφίλ έκφρασης των χαρακτηριστικών δεικτών ΕΜΤ. Επίσης, τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης του ΕΜΤ-σχετιζόμενου μεταγραφικού παράγοντα snail2/slug που ακολουθούν την επαγωγή της E-cadherin, βρίσκονται σε συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα που μαρτυρούν ότι η αυξημένη έκφραση του συγκεκριμένου παράγοντα παρεμποδίζει την έκφραση της E-cadherin [302].

Τα πειραματικά δεδομένα που αφορούν στη ρύθμιση των λειτουργικών ιδιοτήτων των καρκινικών κυττάρων μαστού έδειξαν ότι η καταστολή του ERβ οδηγεί σε μείωση των επιπέδων ανάπτυξης των shERβ MDA-MB-231 κυττάρων, κατά 25% και 40% συγκριτικά με τα κύτταρα αναφοράς, έπειτα από 24 και 48 ώρες. Επιπλέον, η καταστολή του ERβ είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας εξάπλωσης (κατά 30%), μετανάστευσης (κατά 60%), προσκόλλησης (κατά 35%) και διήθησης (κατά 60%) των shERβ MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων, συγκριτικά με τα κύτταρα συμπεριφορά των MDA-MB-231 κυττάρων μπορεί να συσχετιστεί με την ενίσχυση των παραπάνω ιδιοτήτων. Ως εκ τούτου, καθίσταται

σαφής η συνεισφορά του ΕRβ στην απόκτηση του επιθετικού φαινοτύπου των καρκινικών κυττάρων μαστού, MDA-MB-231.

Στο επίπεδο του ECM, τα δεδομένα της παρούσας διατριβής έδειξαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στα επίπεδα μεταγραφικής και πρωτεϊνικής έκφρασης συγκεκριμένων PGs (συνδεκάνες, σεργλυκίνη), και ενζύμων αποικοδόμησής τους (ηπαρινάση), πολλών MMPs και των ενδοκυττάριων αναστολέων τους (TIMP1, TIMP2), καθώς και των συστατικών ενεργοποίησης του πλασμινογόνου (uPA, tPA, PAI-1), ως αποτέλεσμα της καταστολής του ERβ στα MDA-MB-231 κύτταρα. Επιπλέον, η καταστολή του ERβ μειώνει τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (EGFR, IGF-IR), γεγονός που συνοδεύεται από μειωμένη ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού ERK1/2.

Πρόσφατες μελέτες αποκαλύπτουν ότι η ενεργοποίηση του ERK σηματοδοτικού μονοπατιού που συνοδεύεται από την υπερέκφραση του EGFR προάγει την κυτταρική μετανάστευση και διήθηση στα MDA-MB-231 κύτταρα, οδηγώντας στην κακή πρόγνωση του καρκίνου [303]. Ο EGFR έχει μελετηθεί εκτενώς ως πολλά υποσχόμενος στόχος σε φαρμακολογικές προσεγγίσεις του καρκίνου. Στη συγκεκριμένη μελέτη παρατηρήθηκε ότι η καταστολή του ERβ οδηγεί στη μείωση των επιπέδων έκφρασης του EGFR καθώς και στη μερική αναστολή του μονοπατιού ERK1/2. Το γεγονός αυτό αποκαλύπτει ότι ο ERβ κατέχει σημαντικό ρόλο τόσο στην ενεργοποίηση του EGFR, αντικατοπτρίζοντας τη βαρύτητα της σηματοδότησης των GFs στη συμπεριφορά των shERβ MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού.

Οι MMPs αποτελούν σημαντικούς τελεστές της ανάπτυξης του όγκου μέσω της αποικοδόμησης και της αναδιοργάνωσης του ECM, ρυθμίζοντας πληθώρα κυτταρικών διεργασιών, όπως η διήθηση και η μετάσταση [64]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έδειξε το γεγονός ότι η καταστολή του ERβ οδήγησε στη μείωση των επιπέδων έκφρασης των MMP1 και MMP7, καθώς και των TIMP1 και TIMP2, δεδομένα που μπορεί να σχετίζονται με τη μειωμένη επιθετικότητα που εμφανίζουν τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα.

Αν και παραδοσιακά οι MMPs συνδέονται με την αναδιαμόρφωση του ECM, οι ρόλοι τους έχουν επεκταθεί σε ορισμένους που είναι ανεξάρτητοι της πρωτεόλυσης. Για παράδειγμα, πολλές μελέτες αναφέρουν την MMP9 ως επιθηλιακό δείκτη, ενώ άλλες αναφορές υποδεικνύουν ότι είναι ικανή να καταστείλει την αγγειογένεση μέσω της δημιουργίας ενδογενών αναστολέων, όπως η αγγειοστατίνη, με ισχυρές αντιαγγειογενετικές και ογκοκατασταλτικές δράσεις [71]. Έτσι, μπορούμε να υποθέσουμε ότι τα αυξημένα επίπεδα της ΜΜΡ9 που εμφανίζουν τα shERβ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού σχετίζονται με μειωμένη επιθετικότητα και ικανότητα αγγειογένεσης.

Πολλές MMPs και αναστολείς τους είναι ικανές να προσδένονται σε θειωμένες GAGs του ECM ρυθμίζοντας τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Δεδομένα που αφορούν στην έκφραση της ματριλυσίνης, MMP7, υποδεικνύουν ότι η καταστολή του ERβ οδηγεί σε μείωση της συγκεκριμένης MMP, κατά 40%. Το συγκεκριμένο ένζυμο αποικοδομεί την κυτταρική επιφάνεια και τις περικυτταρικές πρωτεΐνες, μέσω της πρόσδεσής του σε συγκεκριμένα θειωμένα υποστρώματα, όπως έντονα θειωμένες GAGs, προάγοντας την αποικοδόμηση του ECM και την καρκινική κυτταρική προσκόλληση [304].

Επιπρόσθετα, η έκφραση της MMP1 παρατηρείται μειωμένη (κατά 20%) έπειτα από την καταστολή του ERβ. Υψηλά επίπεδα έκφρασης της συγκεκριμένης MMP έχουν συσχετιστεί με την εξέλιξη του όγκου και την κακή πρόγνωση πολλών καρκινικών τύπων, μεταξύ αυτών και ο καρκίνος του μαστού. Αντίθετα, η καταστολή της MMP1 σε καρκινικά κύτταρα μαστού οδηγεί σε μείωση του μεγέθους του όγκου [305].

Παρά το γεγονός ότι οι TIMPs δρουν γενικά ως καταστολείς της διαδικασίας αποικοδόμησης του ECM, εμπλέκονται σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών. Παραδείγματος χάριν, ο TIMP1 προάγει την κυτταρική ανάπτυξη σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, έχει προστατευτικό ρόλο ενάντια στην απόπτωση και επάγει τη διαφοροποίηση [306]. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι τα μεταγραφικά επίπεδα των TIMP1 και TIMP2 εμφανίζονται σημαντικά μειωμένα στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, συγκριτικά με τα κύτταρα αναφοράς, γεγονός που συσχετίζεται με τη μείωση της επιθετικής συμπεριφοράς των καρκινικών κυττάρων.

Οι διαδικασίες της διήθησης και της μετάστασης ρυθμίζονται σε μεγάλο βαθμό από το σύστημα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου και κυρίως του uPA, του οποίου η υπερέκφραση έχει συσχετιστεί με την επαγωγή του ΕΜΤ και τη μετάσταση σε πολλά καρκινικά κύτταρα. Το uPA καταλύει την παραγωγή της ενεργούς πλασμίνης, η οποία ενεργοποιεί τις MMPs και αποικοδομεί πολλές εξωκυττάριες πρωτεΐνες. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η καταστολή του ΕRβ είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης των uPA, tPA και PAI-1, τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Παρόλα αυτά, το uPA και ο υποδοχέας του μπορούν να επάγουν τον ΕΜΤ σε πολλά καρκινικά κύτταρα, ωστόσο άλλοι υποδοχείς, όπως ιντεγκρίνες και RTKs, δρουν σε συνεργασία, ενεργοποιώντας πολλά

σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν την δραστικότητα της E-cadherin και κατ' επέκταση τη διαδικασία EMT.

Ένα ακόμα ενδιαφέρον εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν η σημαντική μείωση των μεταγραφικών και πρωτεϊνικών επιπέδων του ενζύμου ηπαρινάση, της οποίας ο ρόλος εστιάζεται στην αποικοδόμηση των αλυσίδων HS ρυθμίζοντας τη διαθεσιμότητά τους ή/και τις λειτουργίες τους τόσο στην κυτταρική μεμβράνη όσο και στον ECM. Υψηλά επίπεδα έκφρασης της ηπαρινάσης σχετίζονται με τον επιθετικό φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων μαστού [190].

Πρόσφατα αναδείξαμε το ρυθμιστικό ρόλο της διεπικοινωνίας των ERs με τους EGFR και IGF-IR στην έκφραση των συστατικών του ECM, συμπεριλαμβανομένων και των HSPGs που είναι γνωστοί ρυθμιστές της συμπεριφοράς των καρκινικών κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, δρώντας ως συν-υποδοχείς GFs [40, 81]. Τα δεδομένα μας αποκάλυψαν ότι η καταστολή του ERβ συνεπάγεται αυξημένα επίπεδα έκφρασης των συνδεκανών -1, -2 και -4, καθώς και τη μείωση των επιπέδων της ενδοκυττάριας σεργλυκίνης. Η έκφραση της συνδεκάνης-1 αποτελεί κατά κύριο λόγο επιθηλιακό δείκτη, ενώ η συνδεκάνη-2 εντοπίζεται κυρίως σε μεσεγχυματικούς ιστούς και εμπλέκεται στην κυτταρική προσκόλληση. Από την άλλη μεριά, η συνδεκάνη-4 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, δρώντας ως αντι-μεταναστευτικός και αντιδιηθητικός υποδοχέας στα καρκινικά κύτταρα. Ο ρόλος της σεργλυκίνης εντοπίζεται στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης στο μικροπεριβάλλον του όγκου, ενώ πρόσφατα δεδομένα συνδέουν την προώθηση του επιθετικού φαινοτύπου των καρκινικών κυττάρων μαστού [92, 97].

Τα καινοτόμα αποτελέσματα του πρώτου μέρους της παρούσας διατριβής αναδεικνύουν τη σκοπιμότητα της στόχευσης του ERβ στα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού και ενισχύονται από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν έπειτα από τη διαδικασία επιλογής κλώνων που απέδειξε ότι τα υψηλότερα επίπεδα καταστολής του ERβ καταστέλλουν ακόμα περισσότερο την επιθετικότητα και το μεταστατικό φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων μαστού MDA-MB-231. Τα δεδομένα μας υποστηρίζουν τη σταθερή μετάπτωση των επιθετικών ERβ-θετικών MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού σε μία λιγότερο επιθετική κατάσταση μέσω της καταστολής του ERβ. Η συγκεκριμένη καταστολή έχει ως αποτέλεσμα δυναμικές αλλαγές τόσο στις λειτουργικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων όσο και στη σύσταση του ECM, οδηγώντας στον επαναπρογραμματισμό της διαδικασίας EMT, γεγονός που έχει άμεσο αντίκτυπο στο μεταστατικό δυναμικό των κυττάρων αυτών (**Εικόνα 44**).

190



Εικόνα 43 (η λεζάντα παρατίθεται στην επόμενη σελίδα).

Εικόνα 43. Σχηματική αναπαράσταση του ρυθμιστικού ρόλου του ΕRβ στα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού. Παρουσιάζεται επίσης η μηχανιστική προσέγγιση των ΕRβδιαμεσολαβούμενων αλλαγών τόσο στη μορφολογία των επιθετικών καρκινικών κυττάρων μαστού όσο και στην έκφραση/δραστικότητα κρίσιμων τελεστών του ΕCM, συμπεριλαμβανομένων των PGs και των MMPs, αλλά και χαρακτηριστικών δεικτών του EMT. Η μεγάλη καταστολή του ERβ οδηγεί σε μείζονες αλλαγές στις λειτουργικές ιδιότητες και στα συστατικά του ECM των επιθετικών καρκινικών κυττάρων μαστού, υποθέτοντας έτσι τη συνεισφορά του ΕRβ στην επαγωγή ενός επιθετικού φαινοτύπου. Η μετανάστευση των MDA-MB-231 ctrl κυττάρων επηρεάζεται σημαντικά από τη διεπικοινωνία ανάμεσα στον EGFR και τον IGF-IR, ενώ το JAK/STAT σηματοδοτικό μονοπάτι κατέχει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση αυτής της ιδιότητας (αριστερό πλαίσιο). Από την άλλη μεριά, η ταυτόχρονη αναστολή των EGFR και IGF-IR στα shERβ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μειώνει σημαντικά τη μετανάστευσή τους, ενώ το JAK/STAT σηματοδοτικό μονοπάτι διατηρεί την ικανότητά του να ρυθμίζει την κυτταρική μετανάστευση και μετά την καταστολή του ERβ (δεξί πλαίσιο). Η διεπικοινωνία ERβ/EGFR/IGF-ΙR καθώς και το JAK/STAT σηματοδοτικό μονοπάτι κατέχουν βασικό ρόλο στη ρύθμιση της μετανάστευσης των MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού. Ανατύπωση με άδεια από την αναφορά [264]. Copyright 2016 Elsevier science & technology journals.

## Οι ERs αποτελούν επιγενετικούς ρυθμιστές των miR-10b, miR-145 και miR-200b στον καρκίνο του μαστού

Τα miRNAs αποτελούν πλέον δυναμικούς διαμεσολαβητές της ανάπτυξης, της μετάστασης και της εξέλιξης του καρκίνου του μαστού, επομένως η μελέτη του ρόλου τους είναι μεγάλης κλινικής σημασίας και μπορεί να οδηγήσει στην εύρεση νέων στόχων για τις θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση της συγκεκριμένης νόσου [178, 307]. Ένας μεγάλος αριθμός miRNAs έχουν χαρακτηριστεί ως ρυθμιστές των ιδιοτήτων των καρκινικών κυττάρων μαστού [172, 308]. Μολονότι κάποια miRNAs δρουν ως ογκοκαταστολείς, άλλα δρουν ως ογκογονίδια, αναλόγως του μοριακού τους στόχου. Το miR-10b αναφέρεται ως προμεταστατικό miRNA καθώς η παρουσία του ευνοεί την κυτταρική μετανάστευση και τη διήθηση του όγκου *in vivo* [181, 309]. Επιπλέον, η έκφραση του miR-10b είναι αυξημένη σε μεταστατικούς καρκίνους μαστού, ενώ ανάμεσα στους στόχους του βρίσκονται τα mRNAs των ERα και ERβ [159]. Από την άλλη μεριά η παρουσία του miR-200b σχετίζεται με το μεσεγχυματικό φαινότυπο στα καρκινικά

κύτταρα μαστού, καθώς το συγκεκριμένο miRNA συγκαταλέγεται ανάμεσα στους αρνητικούς ρυθμιστές της διαδικασίας EMT, της διήθησης και της μετάστασης [310]. Χαμηλά επίπεδα έκφρασης του miR-200b εντοπίζονται σε μεταστατικούς τύπους καρκίνου και σε καρκινικά κύτταρα μαστού με ιδιότητες βλαστοκυττάρων [311]. Επιπλέον έχει δειχθεί ότι μέλη της οικογένειας του miR-200 στοχεύουν άμεσα τους ERa και ERβ [234]. Όσον αφορά στους βιολογικούς ρόλους του miR-145 στον καρκίνο του μαστού, τα μέχρι στιγμής στοιχεία είναι αμφιλεγόμενα. Ωστόσο, μεγάλος αριθμός μελετών αποκαλύπτει ότι το miR-145 είναι υπεύθυνο για αυξημένη απόπτωση και χαμηλά επίπεδα πολλαπλασιασμού στα καρκινικά κύτταρα, γεγονός που του προσδίδει πιθανές ογκοκατασταλτικές δράσεις [195, 212, 312]. Ωστόσο, η περιγραφή της ρύθμισης των miRNAs από τους ERs αποτελεί ακόμα μία πρόκληση.

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε συσχέτιση του ρόλου των miRNAs στη ρύθμιση της διαδικασίας ΕΜΤ και των λειτουργικών ιδιοτήτων των καρκινικών κυττάρων MCF-7, MDA-MB-231 και shERβ MDA-MB-231, με το διαφορετικό προφίλ των ERs. Αρχικά διαπιστώθηκε ότι ανάμεσα στα miRNAs που εξετάστηκαν, τα επίπεδα έκφρασης των miR-10b και miR-145 είναι εκείνα που επηρεάζονται περισσότερο από την καταστολή του ERβ στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, ενώ το miR-200b που αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της μετάστασης, είναι σημαντικά αυξημένο στα MDA-MB-231 κύτταρα, σε σχέση με τα MCF-7 και shERβ MDA-MB-231. Τα συγκεκριμένα miRNAs είναι στενά συνδεδεμένα με το πρόγραμμα ΕΜΤ και συνεισφέρουν στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-ΕCM, επηρεάζοντας σημαντικές λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων μαστού [313]. Τα δεδομένα που ελήφθησαν έδειξαν ότι η έκφραση του miR-10b, το οποίο υπερεκφράζεται στο μεταστατικό καρκίνο μαστού, είναι σημαντικά μειωμένη στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, σε σχέση με τα MDA-MB-231 κύτταρα στα οποία η έκφρασή του είναι σε υψηλά επίπεδα. Αντιθέτως, τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα εκφράζουν σε μεγάλο βαθμό το ογκο-κατασταλτικό miR-145.

Σε επόμενο επίπεδο παρατηρήθηκε ότι η E2 διαθέτει θετικό ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση του miR-10b στα MCF-7, ERα-θετικά καρκινικά κύτταρα μαστού. Η απουσία οιστρογόνων από το μέσο καλλιέργειας των MCF-7 κυττάρων οδηγεί στη μείωση των επιπέδων έκφρασης των miR-145 και miR-200b, ενώ παράλληλα παρατηρείται αυξημένη έκφραση μεσεγχυματικών δεικτών. Από την άλλη μεριά, όταν τα MDA-MB-231 κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία οιστρογόνων, παρουσίασαν αύξηση στα επίπεδα έκφρασης των miR-145 και miR-200b, καθώς και μείωση της επιθετικότητάς τους. Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν ότι κυρίως το miR-200b και ο άξονας E2-ERa ευνοούν τη διατήρηση ενός γενικότερου επιθηλιακού φαινοτύπου από τα καρκινικά κύτταρα μαστού. Μάλιστα η έκφρασή τους διαμεσολαβείται από τη διεπικοινωνία των σηματοδοτικών μονοπατιών EGFR/IGF-IR με την E2.

Σε πρώτο επίπεδο, εξετάστηκε ο ρυθμιστικός ρόλος των miR-10b και miR-200b στα MCF7 και MDA-MB-231, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η παρουσία του ERa εμπλέκεται στη ρύθμιση των συγκεκριμένων miRNAs. Λειτουργική ανάλυση του ρόλου του anti-miR-10b που καταστέλλει την ενδογενή έκφραση του miR-10b, στα επιθετικά MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού, αποκάλυψε ότι η απουσία του miR-10b οδηγεί σε σημαντική μείωση της επιθετικότητας των καρκινικών κυττάρων. Το μειωμένο μεταστατικό δυναμικό των MDA-MB-231 κυττάρων χαρακτηρίζεται από σημαντικές μορφολογικές αλλαγές, οι οποίες συνοδεύτηκαν από την αύξηση των επιθηλιακών δεικτών EMT (π.χ. E-cadherin), καθώς και διαφοροποιήσεις στα επίπεδα έκφρασης των μακρομορίων του ECM, κυρίως των MMPs και της συνδεκάνης-1, και σηματοδοτικών μορίων, κυρίως του ERK1/2.

Αντίστοιχα, το miR-200b που ρυθμίζει τη διαδικασία ΕΜΤ μέσω των μεταγραφικών παραγόντων ZEB1 και ZEB2, βρέθηκε να είναι σημαντικά χαμηλότερο σε επίπεδο έκφρασης στα ERβ-θετικά καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB-231, συγκριτικά με τα MCF-7. Η υπερέκφραση του συγκεκριμένου miRNA, έπειτα από διαμολύνσεις με το pre-miR-200b, μείωσε σημαντικά την επιθετικότητα των MDA-MB-231 κυττάρων ως προς τον κυτταρικό τους πολλαπλασιασμό, την κινητικότητα και τη διήθηση, επάγοντας αλλαγές στη μορφολογία τους, οι οποίες συνοδεύτηκαν από μείωση μεσεγχυματικών δεικτών EMT (ZEB2, fibronectin, snail2/slug) και διαφοροποιημένα επίπεδα έκφρασης σημαντικών βιομορίων του ECM (κυρίως MMPs) και σηματοδοτικών μορίων (ERK1/2). Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν τη συσχέτιση του miR-10b με το μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων, υπογραμμίζοντας ότι οι συνθήκες παρουσίας του miR-200b μαζί με τον ERα καθίστανται ευνοϊκές για την επικράτηση λιγότερο επιθετικών χαρακτηριστικών στα καρκινικά κύτταρα μαστού.

Εν συνεχεία, διαπιστώθηκε ότι η επαγωγή της έκφρασης του miR-10b στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα, έπειτα από τη διαμόλυνση των καρκινικών κυττάρων με το pre-miR-10b, οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων κυτταρικού πολλαπλασιασμού, κυτταρικής μετανάστευσης και διήθησης των κυττάρων αυτών. Επιπλέον, η υπερέκφραση του miR-10b συνέβαλε σε σημαντικές μορφολογικές αλλαγές, στην επαγωγή των μεσεγχυματικών δεικτών ΕΜΤ, καθώς και σε

διαφοροποιήσεις σημαντικών βιομορίων του ECM, όπως μείωση της συνδεκάνης-1 που αποτελεί άμεσο στόχο του miR-10b, και αύξηση των επιπέδων των πρωτεολυτικών ενζύμων MMP2, MMP7 και MMP9. Οι συγκεκριμένες αλλαγές συνοδεύτηκαν από την έντονη αύξηση των φωσφορυλιωμένων επιπέδων των κινασών ERK1/2 που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων μαστού, υπογραμμίζοντας τον κρίσιμο ρόλο του miR-10b στο συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι. Τα συγκεκριμένα δεδομένα αποκαλύπτουν ότι τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του miR-10b που ακολουθούν την καταστολή του ERβ φαίνεται να είναι ευνοϊκά για τη διατήρηση ενός περισσότερο επιθηλιακού φαινοτύπου από τα καρκινικά κύτταρα μαστού.

Συνεχίζοντας, η λειτουργική ανάλυση του ρόλου του miR-145 έδειξε ότι η καταστολή του συγκεκριμένου miRNA, έπειτα από διαμόλυνση των καρκινικών κυττάρων με το anti-miR-145, συμβάλλει στην έντονη επαγωγή της επιθετικότητας των shERβ MDA-MB-231 κύτταρων. Η ρύθμιση αυτή επιτυγχάνεται μέσω έντονων αλλαγών στα μορφολογικά χαρακτηριστικά, στις βασικές λειτουργικές ιδιότητες και τα επίπεδα έκφρασης χαρακτηριστικών δεικτών του EMT και τελεστών του ECM, κυρίως στα ένζυμα αποικοδόμησής του. Η παρουσία του anti-miR-145 επάγει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του ERK1/2, επιβεβαιώνοντας τον επιθετικό φαινότυπο που αποκτούν τα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα ως αποτέλεσμα της καταστολής του miR-145. Συνολικά, υπογραμμίζεται ότι η διαμεσολαβούμενη από οιστρογόνα έκφραση και δράση του miR-145 συνδέεται μηχανιστικά με τις κομβικές φαινοτυπικές αλλαγές που παρατηρούνται στα ΕRβ-κατεσταλμένα καρκινικά κύτταρα μαστού.

Συμπερασματικά, τα δεδομένα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι οι ERs και ιδιαίτερα ο ERβ σε συνέργεια με τα miR-10b miR-145, αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές για την επαγωγή της επιθετικότητας στα καρκινικά κύτταρα μαστού. Συγκεκριμένα, για πρώτη φορά υπογραμμίστηκε ότι ο ERβ ρυθμίζει αντίστροφα τα δύο αυτά miRNAs που ελέγχουν τις λειτουργικές ιδιότητες, το πρόγραμμα EMT, τη σύνθεση του ECM και κατ' επέκταση τη γενικότερη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων μαστού (**Εικόνα** 44).





Εικόνα 44 (η λεζάντα παρατίθεται στην επόμενη σελίδα).

Εικόνα 44. Ο ΕΠβ αποτελεί ρυθμιστικό μόριο της επιθετικότητας των καρκινικών κυττάρων μαστού, μέσω της ρύθμισης της έκφρασης των miRNAs. (A) Η μακροχρόνια καλλιέργεια των MCF-7 κυττάρων (ERa-θετικά) με θρεπτικό υλικό απουσία οιστρογόνων αυξάνει την επιθετικότητά τους μέσω της αύζησης των επιπέδων έκφρασης των miR-10b και μείωσης των miR-200b και miR-145, σε σχέση με την έκφραση σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. Τα MDA-MB-231 κύτταρα (ERβ-θετικά) που καλλιεργήθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα με θρεπτικό υλικό απουσία οιστρογόνων, παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης του miR-10b ενώ η έκφραση των miR-200b και miR-145 μειώνεται, συγκριτικά με την έκφραση σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. (B) Ο ERβ ρυθμίζει αντίστροφα την έκφραση των miR-10b και miR-145. Η καταστολή του ERβ στα MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού επάγει την έκφραση του miR-145, ενώ μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του miR-10b. Η επαγόμενη υπερέκφραση του miR-10b (pre-miR-10b) στα shERβ MDA-MB-231 κύτταρα αυζάνει την επιθετικότητά τους μέσω αζιοσημείωτων αλλαγών στα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης χαρακτηριστικών δεικτών EMT (E-cadherin, vimentin, fibronectin, ZEB2, Snail2/Slug), μακρομορίων του ECM (EGFR, IGF-IR, HER2, syndecan-1, MMP2, MMP7, MMP9, VEGF) και σηματοδοτικών μορίων (Erk1/2). Αντίστοιχα, καταστολή του miR-145 οδηγεί σε αύζηση του μεταστατικού δυναμικού των shERβ MDA-MB-231 κυττάρων, επηρεάζοντας το φαινόμενο ΕΜΤ, τις λειτουργικές τους ιδιότητες, την έκφραση πολλών ρυθμιστών του ECM (HER2, MMP2, MMP7, MMP9) και σηματοδοτικών μορίων (Erk1/2). Τα γονίδια των οποίων η έκφραση μειώνεται παρουσιάζονται με κόκκινο χρώμα, ενώ εκείνα που εμφανίζουν αυζημένη έκφραση εμφανίζονται με μπλε χρώμα. Ανατύπωση με άδεια από την αναφορά [280]. Copyright 2017 Elsevier science & technology journals.

Καταλήγοντας, οδηγούμαστε στο βασικό συμπέρασμα της παρούσας μελέτης που υποστηρίζει τον κομβικό ρόλο του ERβ στη ρύθμιση της γενικότερης συμπεριφοράς των επιθετικών, τριπλά αρνητικών καρκινικών κυττάρων μαστού, αναδεικνύοντας την ανάγκη της φαρμακολογικής του στόχευσης. Επιπλέον, αποδείξαμε ότι οι επιγενετικές τροποποιήσεις στο επίπεδο των miRNAs αντιπροσωπεύουν έναν κώδικα που εμπλέκεται καθοριστικά στη γονιδιακή ρύθμιση. Η διαφοροποιημένη γονιδιακή έκφραση δεν επηρεάζει αποκλειστικά το καρκινικό κύτταρο, αλλά και την κυτταρική συμπεριφορά μέσω αλλαγών στη σύσταση του ECM και του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Σε αυτό το πλαίσιο, τα miRNAs λειτουργούν ως προγνωστικοί βιοδείκτες, αποτελώντας παράλληλα θεραπευτικούς στόχους για τον καρκίνο του μαστού. Περαιτέρω μελέτες στην επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης ανοίγουν ένα

μηχανισμούς που ελέγχουν τόσο φυσιολογικές όσο και παθολογικές καταστάσεις. Αυτή η νέα γνώση δύναται να λειτουργήσει ως θεμέλιο για τη μελλοντικό σχεδιασμό και την ανάπτυξη καινοτόμων φαρμακευτικών προσεγγίσεων για την καταστολή της ογκογενετικής σηματοδότησης και τη βελτίωση της πρόγνωσης του επιθετικού καρκίνου του μαστού.

Βιβλιογραφία

1. McGuire, S. (2016) World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015, *Advances in nutrition*. **7**, 418-9.

2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer, Cell. 100, 57-70.

3. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell.* **144**, 646-74.

4. DeSantis, C., Ma, J., Bryan, L. & Jemal, A. (2014) Breast cancer statistics, 2013, *CA: a cancer journal for clinicians*. **64**, 52-62.

5. Bray, F., Ren, J. S., Masuyer, E. & Ferlay, J. (2013) Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008, *Int J Cancer.* **132**, 1133-45.

6. Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W., Comber, H., Forman, D. & Bray, F. (2013) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012, *European journal of cancer*. **49**, 1374-403.

7. Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A. L., Brown, P. O. & Botstein, D. (2000) Molecular portraits of human breast tumours, *Nature*. **406**, 747-52.

8. DeSantis, C., Siegel, R., Bandi, P. & Jemal, A. (2011) Breast cancer statistics, 2011, *CA: a cancer journal for clinicians.* **61**, 409-18.

9. Allred, D. C. (2010) Issues and updates: evaluating estrogen receptor-alpha, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer, *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* **23 Suppl 2**, S52-9.

10. Dai, X., Cheng, H., Bai, Z. & Li, J. (2017) Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping, *Journal of Cancer.* **8**, 3131-3141.

11. Dai, X., Chen, A. & Bai, Z. (2014) Integrative investigation on breast cancer in ER, PR and HER2-defined subgroups using mRNA and miRNA expression profiling, *Scientific reports.* **4**, 6566.

12. Hanstein, B., Djahansouzi, S., Dall, P., Beckmann, M. W. & Bender, H. G. (2004) Insights into the molecular biology of the estrogen receptor define novel therapeutic targets for breast cancer, *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. **150**, 243-55.

13. Skandalis, S. S., Afratis, N., Smirlaki, G., Nikitovic, D., Theocharis, A. D., Tzanakakis, G. N. & Karamanos, N. K. (2014) Cross-talk between estradiol receptor and EGFR/IGF-IR signaling pathways in estrogen-responsive breast cancers: focus on the role and impact of proteoglycans, *Matrix Biol.* **35**, 182-93.

14. Lu, J., Steeg, P. S., Price, J. E., Krishnamurthy, S., Mani, S. A., Reuben, J., Cristofanilli, M., Dontu, G., Bidaut, L., Valero, V., Hortobagyi, G. N. & Yu, D. (2009) Breast cancer metastasis: challenges and opportunities, *Cancer research.* **69**, 4951-3.

15. Kalluri, R. & Neilson, E. G. (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis, *The Journal of clinical investigation*. **112**, 1776-84.

16. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition, *The Journal of clinical investigation*. **119**, 1420-8.

17. Zeisberg, M. & Neilson, E. G. (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions, *The Journal of clinical investigation*. **119**, 1429-37.

18. <u>www.rndsystems.com/research-area/epithelial-to-mesenchymal-transition</u>.

19. Thiery, J. P. (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression, *Nature reviews Cancer.* **2**, 442-54.

20. Guttilla, I. K., Adams, B. D. & White, B. A. (2012) ERalpha, microRNAs, and the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM.* **23**, 73-82.

21. Bouris, P., Skandalis, S. S., Piperigkou, Z., Afratis, N., Karamanou, K., Aletras, A. J., Moustakas, A., Theocharis, A. D. & Karamanos, N. K. (2015) Estrogen receptor alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of specific matrix effectors and functional properties of breast cancer cells, *Matrix Biol.* **43**, 42-60.

22. Zhao, C., Dahlman-Wright, K. & Gustafsson, J. A. (2010) Estrogen signaling via estrogen receptor {beta}, *The Journal of biological chemistry*. **285**, 39575-9.

23. McDonnell, D. P. & Norris, J. D. (2002) Connections and regulation of the human estrogen receptor, *Science*. **296**, 1642-4.

24. Yasar, P., Ayaz, G., User, S. D., Gupur, G. & Muyan, M. (2017) Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling, *Reproductive medicine and biology*. **16**, 4-20.

25. Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C. & Huber, J. C. (2002) Production and actions of estrogens, *The New England journal of medicine*. **346**, 340-52.

26. Levin, E. R. (2005) Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen, *Molecular endocrinology*. **19**, 1951-9.

27. Kuiper, G. G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S. & Gustafsson, J. A. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93**, 5925-30.

28. Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y. & Muramatsu, M. (1998) The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro, *Biochemical and biophysical research communications*. **243**, 122-6.

29. Ponglikitmongkol, M., Green, S. & Chambon, P. (1988) Genomic organization of the human oestrogen receptor gene, *The EMBO journal.* **7**, 3385-8.

30. Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjold, M. & Gustafsson, J. A. (1997) Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* **82**, 4258-65.

31. Muramatsu, M. & Inoue, S. (2000) Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions?, *Biochemical and biophysical research communications*. **270**, 1-10.

32. Ruff, M., Gangloff, M., Wurtz, J. M. & Moras, D. (2000) Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors, *Breast Cancer Res.* **2**, 353-9.

33. Levin, E. R. (2002) Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors, *Steroids*. **67**, 471-5.

34. Gourdy, P., Guillaume, M., Fontaine, C., Adlanmerini, M., Montagner, A., Laurell, H., Lenfant, F. & Arnal, J. F. (2018) Estrogen receptor subcellular localization and cardiometabolism, *Molecular metabolism*. In Press. doi: 10.1016/j.molmet.2018.05.009.

35. Le Romancer, M., Poulard, C., Cohen, P., Sentis, S., Renoir, J. M. & Corbo, L. (2011) Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors, *Endocrine reviews.* **32**, 597-622.

36. Bjornstrom, L. & Sjoberg, M. (2005) Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes, *Molecular endocrinology*. **19**, 833-42.

37. McDevitt, M. A., Glidewell-Kenney, C., Weiss, J., Chambon, P., Jameson, J. L. & Levine, J. E. (2007) Estrogen response element-independent estrogen receptor (ER)-alpha signaling does not rescue sexual behavior but restores normal testosterone secretion in male ERalpha knockout mice, *Endocrinology*. **148**, 5288-94.

38. Yang, J. Z., O'Flatharta, C., Harvey, B. J. & Thomas, W. (2008) Membrane ERalphadependent activation of PKCalpha in endometrial cancer cells by estradiol, *Steroids*. **73**, 1110-22.

39. Martin, L. A., Farmer, I., Johnston, S. R., Ali, S. & Dowsett, M. (2005) Elevated ERK1/ERK2/estrogen receptor cross-talk enhances estrogen-mediated signaling during long-term estrogen deprivation, *Endocrine-related cancer*. **12 Suppl 1**, S75-84.

40. Tsonis, A. I., Afratis, N., Gialeli, C., Ellina, M. I., Piperigkou, Z., Skandalis, S. S., Theocharis, A. D., Tzanakakis, G. N. & Karamanos, N. K. (2013) Evaluation of the coordinated actions of estrogen receptors with epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor in the expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans and cell motility in breast cancer cells, *FEBS J.* **280**, 2248-59.

41. Zhang, Z., Kumar, R., Santen, R. J. & Song, R. X. (2004) The role of adapter protein Shc in estrogen non-genomic action, *Steroids*. **69**, 523-9.

42. Simoncini, T., Mannella, P., Fornari, L., Caruso, A., Varone, G. & Genazzani, A. R. (2004) Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells, *Steroids*. **69**, 537-42.

43. Prossnitz, E. R., Arterburn, J. B. & Sklar, L. A. (2007) GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen, *Molecular and cellular endocrinology*. **265-266**, 138-42.

44. Prossnitz, E. R. & Maggiolini, M. (2009) Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30, *Molecular and cellular endocrinology*. **308**, 32-8.

45. Simoncini, T., Rabkin, E. & Liao, J. K. (2003) Molecular basis of cell membrane estrogen receptor interaction with phosphatidylinositol 3-kinase in endothelial cells, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* **23**, 198-203.

46. www.qiagen.com/ch/shop/genes-and-pathways/pathway-details/?pwid=166.

47. Speirs, V., Skliris, G. P., Burdall, S. E. & Carder, P. J. (2002) Distinct expression patterns of ER alpha and ER beta in normal human mammary gland, *Journal of clinical pathology*. **55**, 371-4.

48. Allred, D. C. & Mohsin, S. K. (2000) Biological features of premalignant disease in the human breast, *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. **5**, 351-64.

49. O'Regan, R. M., Cisneros, A., England, G. M., MacGregor, J. I., Muenzner, H. D., Assikis, V. J., Bilimoria, M. M., Piette, M., Dragan, Y. P., Pitot, H. C., Chatterton, R. & Jordan, V. C. (1998) Effects of the antiestrogens tamoxifen, toremifene, and ICI 182,780 on endometrial cancer growth, *Journal of the National Cancer Institute*. **90**, 1552-8.

50. Geisler, J., Helle, H., Ekse, D., Duong, N. K., Evans, D. B., Nordbo, Y., Aas, T. & Lonning, P. E. (2008) Letrozole is superior to anastrozole in suppressing breast cancer tissue and plasma estrogen levels, *Clin Cancer Res.* **14**, 6330-5.

51. Smith, I. E. & Dowsett, M. (2003) Aromatase inhibitors in breast cancer, *The New England journal of medicine*. **348**, 2431-42.

52. Nemati Shafaee, M. & Ellis, M. J. (2018) Fulvestrant in management of hormone receptorpositive metastatic breast cancer, *Future oncology*. In Press. doi: 10.2217/fon-2017-0489.

53. Cristofanilli, M., Turner, N. C., Bondarenko, I., Ro, J., Im, S. A., Masuda, N., Colleoni, M., DeMichele, A., Loi, S., Verma, S., Iwata, H., Harbeck, N., Zhang, K., Theall, K. P., Jiang, Y., Bartlett, C. H., Koehler, M. & Slamon, D. (2016) Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the

multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial, *The Lancet Oncology*. **17**, 425-439.

54. Ye, Y., Xiao, Y., Wang, W., Yearsley, K., Gao, J. X. & Barsky, S. H. (2008) ERalpha suppresses slug expression directly by transcriptional repression, *The Biochemical journal*. **416**, 179-87.

55. Ye, Y., Xiao, Y., Wang, W., Yearsley, K., Gao, J. X., Shetuni, B. & Barsky, S. H. (2010) ERalpha signaling through slug regulates E-cadherin and EMT, *Oncogene*. **29**, 1451-62.

56. Lazennec, G., Bresson, D., Lucas, A., Chauveau, C. & Vignon, F. (2001) ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells, *Endocrinology*. **142**, 4120-30.

57. Fox, E. M., Davis, R. J. & Shupnik, M. A. (2008) ERbeta in breast cancer--onlooker, passive player, or active protector?, *Steroids*. **73**, 1039-51.

58. Krege, J. H., Hodgin, J. B., Couse, J. F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J. F., Sar, M., Korach, K. S., Gustafsson, J. A. & Smithies, O. (1998) Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **95**, 15677-82.

59. Speirs, V., Malone, C., Walton, D. S., Kerin, M. J. & Atkin, S. L. (1999) Increased expression of estrogen receptor beta mRNA in tamoxifen-resistant breast cancer patients, *Cancer research.* **59**, 5421-4.

60. Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., Gong, Z., Zhang, S., Zhou, J., Cao, K., Li, X., Xiong, W., Li, G., Zeng, Z. & Guo, C. (2017) Role of tumor microenvironment in tumorigenesis, *Journal of Cancer.* **8**, 761-773.

61. Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C. & Karamanos, N. K. (2016) Extracellular matrix structure, *Adv Drug Deliv Rev.* **97**, 4-27.

62. Werb, Z. & Lu, P. (2015) The Role of Stroma in Tumor Development, *Cancer journal.* **21**, 250-3.

63. Wight, T. N. (2017) Provisional matrix: A role for versican and hyaluronan, *Matrix Biol.* **60-61**, 38-56.

64. Gialeli, C., Theocharis, A. D. & Karamanos, N. K. (2011) Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting, *FEBS J.* **278**, 16-27.

65. Kessenbrock, K., Plaks, V. & Werb, Z. (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment, *Cell.* **141**, 52-67.

66. Karamanos, N. K., Piperigkou, Z., Theocharis, A.D., Hideto, W., Franchi, M., Baud, S., Brezillon, S., Götte, M., Passi, A., Vigetti, D., Ricard-Blum, S., Sanderson, R., Neil, T., Iozzo, R.V. (2018) Proteoglycans: from chemical structure diversity to multifunctional cell regulation and therapeutics, *Chemical reviews*. To be submitted.

67. Afratis, N., Gialeli, C., Nikitovic, D., Tsegenidis, T., Karousou, E., Theocharis, A. D., Pavao, M. S., Tzanakakis, G. N. & Karamanos, N. K. (2012) Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment, *FEBS J.* **279**, 1177-97.

68. Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Tzanakakis, G. N. & Karamanos, N. K. (2010) Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting, *FEBS J.* **277**, 3904-23.

69. Theocharis, A. D. & Karamanos, N. K. (2017) Proteoglycans remodeling in cancer: Underlying molecular mechanisms, *Matrix Biol*. In Press. doi: 10.1016/j.matbio.2017.10.008.

70. Iozzo, R. V. & Schaefer, L. (2015) Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans, *Matrix Biol.* **42**, 11-55.

71. Theocharis, A. D., Gialeli, C., Bouris, P., Giannopoulou, E., Skandalis, S. S., Aletras, A. J., Iozzo, R. V. & Karamanos, N. K. (2014) Cell-matrix interactions: focus on proteoglycanproteinase interplay and pharmacological targeting in cancer, *FEBS J.* **281**, 5023-42.

72. Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Neill, T., Multhaupt, H. A., Hubo, M., Frey, H., Gopal, S., Gomes, A., Afratis, N., Lim, H. C., Couchman, J. R., Filmus, J., Sanderson, R. D., Schaefer, L., Iozzo, R. V. & Karamanos, N. K. (2015) Insights into the key roles of proteoglycans in breast cancer biology and translational medicine, *Biochim Biophys Acta*. **1855**, 276-300.

73. Vigetti, D., Viola, M., Karousou, E., Deleonibus, S., Karamanou, K., De Luca, G. & Passi, A. (2014) Epigenetics in extracellular matrix remodeling and hyaluronan metabolism, *FEBS J.* **281**, 4980-92.

74. Piperigkou, Z., Gotte, M., Theocharis, A. D. & Karamanos, N. K. (2017) Insights into the key roles of epigenetics in matrix macromolecules-associated wound healing, *Adv Drug Deliv Rev.* **129**, 16-36.

75. Salanti, A., Clausen, T. M., Agerbaek, M. O., Al Nakouzi, N., Dahlback, M., Oo, H. Z., Lee, S., Gustavsson, T., Rich, J. R., Hedberg, B. J., Mao, Y., Barington, L., Pereira, M. A., LoBello, J., Endo, M., Fazli, L., Soden, J., Wang, C. K., Sander, A. F., Dagil, R., Thrane, S., Holst, P. J., Meng, L., Favero, F., Weiss, G. J., Nielsen, M. A., Freeth, J., Nielsen, T. O., Zaia, J., Tran, N. L., Trent, J., Babcook, J. S., Theander, T. G., Sorensen, P. H. & Daugaard, M. (2015) Targeting Human Cancer by a Glycosaminoglycan Binding Malaria Protein, *Cancer cell.* **28**, 500-514.

 Schaefer, L., Tredup, C., Gubbiotti, M. A. & Iozzo, R. V. (2017) Proteoglycan neofunctions: regulation of inflammation and autophagy in cancer biology, *FEBS J.* 284, 10-26.
Couchman, J. R., Multhaupt, H. & Sanderson, R. D. (2016) Recent Insights into Cell Surface Heparan Sulphate Proteoglycans and Cancer, *F1000Research.* 5.

78. Gopal, S., Multhaupt, H. A. B., Pocock, R. & Couchman, J. R. (2017) Cell-extracellular matrix and cell-cell adhesion are linked by syndecan-4, *Matrix Biol.* **60-61**, 57-69.

79. Gopal, S., Sogaard, P., Multhaupt, H. A., Pataki, C., Okina, E., Xian, X., Pedersen, M. E., Stevens, T., Griesbeck, O., Park, P. W., Pocock, R. & Couchman, J. R. (2015) Transmembrane proteoglycans control stretch-activated channels to set cytosolic calcium levels, *The Journal of cell biology*. **210**, 1199-211.

80. Barbouri, D., Afratis, N., Gialeli, C., Vynios, D. H., Theocharis, A. D. & Karamanos, N. K. (2014) Syndecans as modulators and potential pharmacological targets in cancer progression, *Front Oncol.* **4**, 4.

81. Piperigkou, Z., Mohr, B., Karamanos, N. & Gotte, M. (2016) Shed proteoglycans in tumor stroma, *Cell Tissue Res.* **365(3)**, 643-55.

82. Yoneda, A. & Couchman, J. R. (2003) Regulation of cytoskeletal organization by syndecan transmembrane proteoglycans, *Matrix Biol.* **22**, 25-33.

83. Afratis, N. A., Nikitovic, D., Multhaupt, H. A., Theocharis, A. D., Couchman, J. R. & Karamanos, N. K. (2016) Syndecans: key regulators of cell signaling and biological functions, *FEBS J.* **284(1)**, 27-41.

84. Akl, M. R., Nagpal, P., Ayoub, N. M., Prabhu, S. A., Gliksman, M., Tai, B., Hatipoglu, A., Goy, A. & Suh, K. S. (2015) Molecular and clinical profiles of syndecan-1 in solid and hematological cancer for prognosis and precision medicine, *Oncotarget.* **6**, 28693-715.

85. Lendorf, M. E., Manon-Jensen, T., Kronqvist, P., Multhaupt, H. A. & Couchman, J. R. (2011) Syndecan-1 and syndecan-4 are independent indicators in breast carcinoma, *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society.* **59**, 615-29.

86. Li, Q., Park, P. W., Wilson, C. L. & Parks, W. C. (2002) Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury, *Cell.* **111**, 635-46.

87. Ramani, V. C., Vlodavsky, I., Ng, M., Zhang, Y., Barbieri, P., Noseda, A. & Sanderson, R. D. (2016) Chemotherapy induces expression and release of heparanase leading to changes associated with an aggressive tumor phenotype, *Matrix Biol.* **55**, 22-34.

88. Alexander, C. M., Reichsman, F., Hinkes, M. T., Lincecum, J., Becker, K. A., Cumberledge, S. & Bernfield, M. (2000) Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice, *Nature genetics.* **25**, 329-32.

89. Wu, X., Kan, M., Wang, F., Jin, C., Yu, C. & McKeehan, W. L. (2001) A rare premalignant prostate tumor epithelial cell syndecan-1 forms a fibroblast growth factor-binding complex with progression-promoting ectopic fibroblast growth factor receptor 1, *Cancer research.* **61**, 5295-302.

90. Yang, N. & Friedl, A. (2016) Syndecan-1-Induced ECM Fiber Alignment Requires Integrin alphavbeta3 and Syndecan-1 Ectodomain and Heparan Sulfate Chains, *PLoS One.* **11**, e0150132.

91. Beauvais, D. M. & Rapraeger, A. C. (2010) Syndecan-1 couples the insulin-like growth factor-1 receptor to inside-out integrin activation, *J Cell Sci.* **123**, 3796-807.

92. Korpetinou, A., Skandalis, S. S., Labropoulou, V. T., Smirlaki, G., Noulas, A., Karamanos, N. K. & Theocharis, A. D. (2014) Serglycin: at the crossroad of inflammation and malignancy, *Front Oncol.* **3**, 327.

93. Kolset, S. O. & Pejler, G. (2011) Serglycin: a structural and functional chameleon with wide impact on immune cells, *Journal of immunology*. **187**, 4927-33.

94. Korpetinou, A., Papachristou, D. J., Lampropoulou, A., Bouris, P., Labropoulou, V. T., Noulas, A., Karamanos, N. K. & Theocharis, A. D. (2015) Increased Expression of Serglycin in Specific Carcinomas and Aggressive Cancer Cell Lines, *BioMed research international.* **2015**, 690721.

95. Korpetinou, A., Skandalis, S. S., Moustakas, A., Happonen, K. E., Tveit, H., Prydz, K., Labropoulou, V. T., Giannopoulou, E., Kalofonos, H. P., Blom, A. M., Karamanos, N. K. & Theocharis, A. D. (2013) Serglycin is implicated in the promotion of aggressive phenotype of breast cancer cells, *PLoS One.* **8**, e78157.

96. Roy, A., Femel, J., Huijbers, E. J., Spillmann, D., Larsson, E., Ringvall, M., Olsson, A. K. & Abrink, M. (2016) Targeting Serglycin Prevents Metastasis in Murine Mammary Carcinoma, *PLoS One.* **11**, e0156151.

97. Bouris, P. M., D.; Sopaki-Valalaki, N.; Kolokotroni, A.; Moustakas, A.; Kapoor, A.; Iozzo, R. V.; Karamanos, N. K.; Theocharis, A. D. (2018) Serglycin promotes breast cancer cell aggressiveness: Induction of epithelial to mesenchymal transition, proteolytic activity and IL-8 signaling, *Matrix Biology*. In Press. doi: 10.1016/j.matbio.2018.05.011.

98. Misra, S., Heldin, P., Hascall, V. C., Karamanos, N. K., Skandalis, S. S., Markwald, R. R. & Ghatak, S. (2011) Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy, *FEBS J.* **278**, 1429-43.

99. Karousou, E., Misra, S., Ghatak, S., Dobra, K., Gotte, M., Vigetti, D., Passi, A., Karamanos, N. K. & Skandalis, S. S. (2016) Roles and targeting of the HAS/hyaluronan/CD44 molecular system in cancer, *Matrix Biol.* **59**, 3-22.

100. Bourguignon, L. Y., Wong, G., Earle, C., Krueger, K. & Spevak, C. C. (2010) Hyaluronan-CD44 interaction promotes c-Src-mediated twist signaling, microRNA-10b expression, and RhoA/RhoC up-regulation, leading to Rho-kinase-associated cytoskeleton activation and breast tumor cell invasion, *The Journal of biological chemistry*. **285**, 36721-35. 101. Hadler-Olsen, E., Fadnes, B., Sylte, I., Uhlin-Hansen, L. & Winberg, J. O. (2011) Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease, *FEBS J.* **278**, 28-45.

102. Stamenkovic, I. (2003) Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases, *J Pathol.* **200**, 448-64.

103. Pang, L., Li, Q., Li, S., He, J., Cao, W., Lan, J., Sun, B., Zou, H., Wang, C., Liu, R., Wei, C., Wei, Y., Qi, Y., Hu, J., Liang, W., Zhang, W. J., Wan, M. & Li, F. (2016) Membrane type 1matrix metalloproteinase induces epithelial-to-mesenchymal transition in esophageal squamous cell carcinoma: Observations from clinical and in vitro analyses, *Scientific reports.* **6**, 22179.

104. Benson, C. S., Babu, S. D., Radhakrishna, S., Selvamurugan, N. & Ravi Sankar, B. (2013) Expression of matrix metalloproteinases in human breast cancer tissues, *Disease markers*. **34**, 395-405.

105. Vandooren, J., Born, B., Solomonov, I., Zajac, E., Saldova, R., Senske, M., Ugarte-Berzal, E., Martens, E., Van den Steen, P. E., Van Damme, J., Garcia-Pardo, A., Froeyen, M., Deryugina, E. I., Quigley, J. P., Moestrup, S. K., Rudd, P. M., Sagi, I. & Opdenakker, G. (2015) Circular trimers of gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 constitute a distinct population of functional enzyme molecules differentially regulated by tissue inhibitor of metalloproteinases-1, *The Biochemical journal.* **465**, 259-70.

106. Kousidou, O., Berdiaki, A., Kletsas, D., Zafiropoulos, A., Theocharis, A. D., Tzanakakis, G. N. & Karamanos, N. K. (2008) Estradiol-estrogen receptor: a key interplay of the expression of syndecan-2 and metalloproteinase-9 in breast cancer cells, *Molecular oncology.* **2**, 223-32.

107. Kim, S., Choi, J. H., Lim, H. I., Lee, S. K., Kim, W. W., Cho, S., Kim, J. S., Kim, J. H., Choe, J. H., Nam, S. J., Lee, J. E. & Yang, J. H. (2009) EGF-induced MMP-9 expression is mediated by the JAK3/ERK pathway, but not by the JAK3/STAT-3 pathway in a SKBR3 breast cancer cell line, *Cellular signalling*. **21**, 892-8.

108. Walsh, L. A. & Damjanovski, S. (2011) IGF-1 increases invasive potential of MCF 7 breast cancer cells and induces activation of latent TGF-beta1 resulting in epithelial to mesenchymal transition, *Cell communication and signaling : CCS.* **9**, 10.

109. Foekens, J. A., Peters, H. A., Look, M. P., Portengen, H., Schmitt, M., Kramer, M. D., Brunner, N., Janicke, F., Meijer-van Gelder, M. E., Henzen-Logmans, S. C., van Putten, W. L. & Klijn, J. G. (2000) The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients, *Cancer research.* **60**, 636-43.

110. Rao, J. S. (2003) Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases, *Nature reviews Cancer.* **3**, 489-501.

111. Waugh, D. J. & Wilson, C. (2008) The interleukin-8 pathway in cancer, *Clin Cancer Res.* **14**, 6735-41.

112. Freund, A., Chauveau, C., Brouillet, J. P., Lucas, A., Lacroix, M., Licznar, A., Vignon, F. & Lazennec, G. (2003) IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptornegative status of breast cancer cells, *Oncogene*. **22**, 256-65.

113. Yao, C., Lin, Y., Chua, M. S., Ye, C. S., Bi, J., Li, W., Zhu, Y. F. & Wang, S. M. (2007) Interleukin-8 modulates growth and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer cells, *Int J Cancer.* **121**, 1949-57.

114. Rose-John, S., Scheller, J., Elson, G. & Jones, S. A. (2006) Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer, *Journal of leukocyte biology*. **80**, 227-36.

115. Freund, A., Jolivel, V., Durand, S., Kersual, N., Chalbos, D., Chavey, C., Vignon, F. & Lazennec, G. (2004) Mechanisms underlying differential expression of interleukin-8 in breast cancer cells, *Oncogene*. **23**, 6105-14.

116. Sullivan, N. J., Sasser, A. K., Axel, A. E., Vesuna, F., Raman, V., Ramirez, N., Oberyszyn, T. M. & Hall, B. M. (2009) Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells, *Oncogene*. **28**, 2940-7.

117. Speirs, V., Kerin, M. J., Walton, D. S., Newton, C. J., Desai, S. B. & Atkin, S. L. (2000) Direct activation of oestrogen receptor-alpha by interleukin-6 in primary cultures of breast cancer epithelial cells, *British journal of cancer*. **82**, 1312-6.

118. Schillace, R. V., Skinner, A. M., Pommier, R. F., O'Neill, S., Muller, P. J., Naik, A. M., Hansen, J. E. & Pommier, S. J. (2014) Estrogen receptor, progesterone receptor, interleukin-6 and interleukin-8 are variable in breast cancer and benign stem/progenitor cell populations, *BMC cancer.* **14**, 733.

119. van Agthoven, T., Timmermans, M., Foekens, J. A., Dorssers, L. C. & Henzen-Logmans, S. C. (1994) Differential expression of estrogen, progesterone, and epidermal growth factor receptors in normal, benign, and malignant human breast tissues using dual staining immunohistochemistry, *The American journal of pathology*. **144**, 1238-46.

120. Wu, M., Rivkin, A. & Pham, T. (2008) Panitumumab: human monoclonal antibody against epidermal growth factor receptors for the treatment of metastatic colorectal cancer, *Clinical therapeutics.* **30**, 14-30.

121. Miller, T. W., Hennessy, B. T., Gonzalez-Angulo, A. M., Fox, E. M., Mills, G. B., Chen, H., Higham, C., Garcia-Echeverria, C., Shyr, Y. & Arteaga, C. L. (2010) Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast cancer, *The Journal of clinical investigation*. **120**, 2406-13.

122. Girgert, R., Emons, G. & Grundker, C. (2017) 17beta-estradiol-induced growth of triplenegative breast cancer cells is prevented by the reduction of GPER expression after treatment with gefitinib, *Oncology reports.* **37**, 1212-1218.

123. Ankrapp, D. P., Bennett, J. M. & Haslam, S. Z. (1998) Role of epidermal growth factor in the acquisition of ovarian steroid hormone responsiveness in the normal mouse mammary gland, *Journal of cellular physiology*. **174**, 251-60.

124. Azios, N. G. & Dharmawardhane, S. F. (2005) Resveratrol and estradiol exert disparate effects on cell migration, cell surface actin structures, and focal adhesion assembly in MDA-MB-231 human breast cancer cells, *Neoplasia*. **7**, 128-40.

125. Paruthiyil, S., Parmar, H., Kerekatte, V., Cunha, G. R., Firestone, G. L. & Leitman, D. C. (2004) Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest, *Cancer research.* **64**, 423-8.

126. Voudouri, K., Nikitovic, D., Berdiaki, A., Kletsas, D., Karamanos, N. K. & Tzanakakis, G. N. (2016) IGF-I/EGF and E2 signaling crosstalk through IGF-IR conduit point affects breast cancer cell adhesion, *Matrix Biol.* **56**, 95-113.

127. Moustakas, A. & Heldin, C. H. (2009) The regulation of TGFbeta signal transduction, *Development.* **136**, 3699-714.

128. Gordon, K. J. & Blobe, G. C. (2008) Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease, *Biochim Biophys Acta*. **1782**, 197-228.

129. Moustakas, A. & Heldin, P. (2014) TGFbeta and matrix-regulated epithelial to mesenchymal transition, *Biochim Biophys Acta*. **1840**, 2621-34.

130. Heldin, C. H., Vanlandewijck, M. & Moustakas, A. (2012) Regulation of EMT by TGFbeta in cancer, *FEBS letters*. **586**, 1959-70.

131. Band, A. M. & Laiho, M. (2011) Crosstalk of TGF-beta and estrogen receptor signaling in breast cancer, *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. **16**, 109-15.

132. Ren, Y., Wu, L., Frost, A. R., Grizzle, W., Cao, X. & Wan, M. (2009) Dual effects of TGF-beta on ERalpha-mediated estrogenic transcriptional activity in breast cancer, *Molecular cancer*. **8**, 111.

133. Tallquist, M. & Kazlauskas, A. (2004) PDGF signaling in cells and mice, *Cytokine & growth factor reviews.* **15**, 205-13.

134. Heldin, C. H. & Westermark, B. (1999) Mechanism of action and in vivo role of plateletderived growth factor, *Physiological reviews*. **79**, 1283-316.

135. Paulsson, J., Sjoblom, T., Micke, P., Ponten, F., Landberg, G., Heldin, C. H., Bergh, J., Brennan, D. J., Jirstrom, K. & Ostman, A. (2009) Prognostic significance of stromal plateletderived growth factor beta-receptor expression in human breast cancer, *The American journal of pathology*. **175**, 334-41.

136. van Agthoven, T., Sieuwerts, A. M., Meijer, D., Meijer-van Gelder, M. E., van Agthoven, T. L., Sarwari, R., Sleijfer, S., Foekens, J. A. & Dorssers, L. C. (2010) Selective recruitment of breast cancer anti-estrogen resistance genes and relevance for breast cancer progression and tamoxifen therapy response, *Endocrine-related cancer*. **17**, 215-30.

137. Weigel, M. T., Ghazoui, Z., Dunbier, A., Pancholi, S., Dowsett, M. & Martin, L. A. (2012) Preclinical and clinical studies of estrogen deprivation support the PDGF/Abl pathway as a novel therapeutic target for overcoming endocrine resistance in breast cancer, *Breast Cancer Res.* 14, R78.

138. Axelrod, H. & Pienta, K. J. (2014) Axl as a mediator of cellular growth and survival, *Oncotarget.* **5**, 8818-52.

139. Mudduluru, G., Ceppi, P., Kumarswamy, R., Scagliotti, G. V., Papotti, M. & Allgayer, H. (2011) Regulation of Axl receptor tyrosine kinase expression by miR-34a and miR-199a/b in solid cancer, *Oncogene*. **30**, 2888-99.

140. Gjerdrum, C., Tiron, C., Hoiby, T., Stefansson, I., Haugen, H., Sandal, T., Collett, K., Li, S., McCormack, E., Gjertsen, B. T., Micklem, D. R., Akslen, L. A., Glackin, C. & Lorens, J. B. (2010) Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **107**, 1124-9.

141. Vuoriluoto, K., Haugen, H., Kiviluoto, S., Mpindi, J. P., Nevo, J., Gjerdrum, C., Tiron, C., Lorens, J. B. & Ivaska, J. (2011) Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer, *Oncogene*. **30**, 1436-48.

142. Asiedu, M. K., Beauchamp-Perez, F. D., Ingle, J. N., Behrens, M. D., Radisky, D. C. & Knutson, K. L. (2014) AXL induces epithelial-to-mesenchymal transition and regulates the function of breast cancer stem cells, *Oncogene*. **33**, 1316-24.

143. Clevers, H. & Nusse, R. (2012) Wnt/beta-catenin signaling and disease, *Cell.* 149, 1192-205.

144. MacDonald, B. T., Tamai, K. & He, X. (2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases, *Dev Cell.* **17**, 9-26.

145. Shinjo, K. & Kondo, Y. (2015) Targeting cancer epigenetics: Linking basic biology to clinical medicine, *Adv Drug Deliv Rev.* **95**, 56-64.

146. Zeybel, M., Mann, D. A. & Mann, J. (2013) Epigenetic modifications as new targets for liver disease therapies, *Journal of hepatology*. **59**, 1349-53.

147. Bannister, A. J. & Kouzarides, T. (2011) Regulation of chromatin by histone modifications, *Cell research.* **21**, 381-95.

148. Lewis, C. J., Mardaryev, A. N., Sharov, A. A., Fessing, M. Y. & Botchkarev, V. A. (2014) The Epigenetic Regulation of Wound Healing, *Advances in wound care.* **3**, 468-475.

149. Mann, J. & Mann, D. A. (2013) Epigenetic regulation of wound healing and fibrosis, *Current opinion in rheumatology*. **25**, 101-7.

150. Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function, Cell. 128, 693-705.

151. Bergmann, C. & Distler, J. H. (2017) Epigenetic factors as drivers of fibrosis in systemic sclerosis, *Epigenomics*. **9**, 463-477.

152. Moran-Salvador, E. & Mann, J. (2017) Epigenetics and Liver Fibrosis, *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*. **4**, 125-134.

153. Shaw, T. & Martin, P. (2009) Epigenetic reprogramming during wound healing: loss of polycomb-mediated silencing may enable upregulation of repair genes, *EMBO reports*. **10**, 881-6.

154. Peng, B., Chen, Y. & Leong, K. W. (2015) MicroRNA delivery for regenerative medicine, *Adv Drug Deliv Rev.* 88, 108-22.

155. Bartel, D. P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*. **116**, 281-97.

156. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. & Diederichs, S. (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation, *Nat Cell Biol.* **11**, 228-34.

157. Eulalio, A., Huntzinger, E. & Izaurralde, E. (2008) Getting to the root of miRNAmediated gene silencing, *Cell.* **132**, 9-14.

158. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. & Sonenberg, N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?, *Nature reviews Genetics*. **9**, 102-14.

159. Marsico, A., Huska, M. R., Lasserre, J., Hu, H., Vucicevic, D., Musahl, A., Orom, U. & Vingron, M. (2013) PROmiRNA: a new miRNA promoter recognition method uncovers the complex regulation of intronic miRNAs, *Genome biology*. **14**, R84.

160. Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G. (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans, *Cell.* **75**, 855-62.

161. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. (1993) The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14, *Cell.* **75**, 843-54.

162. Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H. & Kim, V. N. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II, *The EMBO journal.* 23, 4051-60.

163. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. & Cullen, B. R. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs, *Genes & development.* **17**, 3011-6.

164. Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E. & Kutay, U. (2004) Nuclear export of microRNA precursors, *Science*. **303**, 95-8.

165. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S. & Kim, V. N. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing, *Nature*. **425**, 415-9.

166. Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P. & Bartel, D. P. (2008) The impact of microRNAs on protein output, *Nature*. **455**, 64-71.

167. Ibrahim, S. A., Hassan, H. & Gotte, M. (2014) MicroRNA-dependent targeting of the extracellular matrix as a mechanism of regulating cell behavior, *Biochim Biophys Acta*. **1840**, 2609-20.

168. Tsai, N. P., Lin, Y. L. & Wei, L. N. (2009) MicroRNA mir-346 targets the 5'-untranslated region of receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression, *The Biochemical journal.* **424**, 411-8.

169. Vasudevan, S., Tong, Y. & Steitz, J. A. (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation, *Science*. **318**, 1931-4.

170. Su, N., Wang, Y., Qian, M. & Deng, M. (2010) Combinatorial regulation of transcription factors and microRNAs, *BMC systems biology*. **4**, 150.

171. Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S. J. & Shimizu, K. (2011) MicroRNAs and epigenetics, *FEBS J.* **278**, 1598-609.

172. Ibrahim, S. A., Hassan, H. & Gotte, M. (2014) MicroRNA regulation of proteoglycan function in cancer, *FEBS J.* **281**, 5009-22.

173. Lin, V. C., Huang, S. P., Ting, H. J., Ma, W. L., Yu, C. C., Huang, C. Y., Yin, H. L., Huang, T. Y., Lee, C. H., Chang, T. Y., Lu, T. L. & Bao, B. Y. (2017) Vitamin D receptorbinding site variants affect prostate cancer progression, *Oncotarget*. **8**, 74119-74128.

174. Omura, T., Shimada, Y., Nagata, T., Okumura, T., Fukuoka, J., Yamagishi, F., Tajika, S., Nakajima, S., Kawabe, A. & Tsukada, K. (2014) Relapse-associated microRNA in gastric cancer patients after S-1 adjuvant chemotherapy, *Oncology reports.* **31**, 613-8.

175. Bollschweiler, E., Holscher, A. H., Schmidt, M. & Warnecke-Eberz, U. (2015) Neoadjuvant treatment for advanced esophageal cancer: response assessment before surgery and how to predict response to chemoradiation before starting treatment, *Chinese journal of cancer research* = *Chung-kuo yen cheng yen chiu.* **27**, 221-30.

176. Heneghan, H. M., Miller, N., Kelly, R., Newell, J. & Kerin, M. J. (2010) Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease, *The oncologist.* **15**, 673-82.

177. Hao, J., Zhang, Y., Deng, M., Ye, R., Zhao, S., Wang, Y., Li, J. & Zhao, Z. (2014) MicroRNA control of epithelial-mesenchymal transition in cancer stem cells, *Int J Cancer*. **135**, 1019-27.

178. Rutnam, Z. J., Wight, T. N. & Yang, B. B. (2013) miRNAs regulate expression and function of extracellular matrix molecules, *Matrix Biol.* **32**, 74-85.

179. Ibrahim, S. A., Yip, G. W., Stock, C., Pan, J. W., Neubauer, C., Poeter, M., Pupjalis, D., Koo, C. Y., Kelsch, R., Schule, R., Rescher, U., Kiesel, L. & Gotte, M. (2012) Targeting of syndecan-1 by microRNA miR-10b promotes breast cancer cell motility and invasiveness via a Rho-GTPase- and E-cadherin-dependent mechanism, *Int J Cancer.* **131**, E884-96.

180. Schneider, C., Kassens, N., Greve, B., Hassan, H., Schuring, A. N., Starzinski-Powitz, A., Kiesel, L., Seidler, D. G. & Gotte, M. (2013) Targeting of syndecan-1 by micro-ribonucleic acid miR-10b modulates invasiveness of endometriotic cells via dysregulation of the proteolytic milieu and interleukin-6 secretion, *Fertility and sterility*. **99**, 871-881 e1.

181. Ma, L. (2010) Role of miR-10b in breast cancer metastasis, Breast Cancer Res. 12, 210.

182. Fujii, T., Shimada, K., Tatsumi, Y., Hatakeyama, K., Obayashi, C., Fujimoto, K. & Konishi, N. (2015) microRNA-145 promotes differentiation in human urothelial carcinoma through down-regulation of syndecan-1, *BMC cancer.* **15**, 818.

183. Guo, T., Yu, W., Lv, S., Zhang, C. & Tian, Y. (2015) MiR-302a inhibits the tumorigenicity of ovarian cancer cells by suppression of SDC1, *International journal of clinical and experimental pathology*. **8**, 4869-80.

184. Echtermeyer, F., Streit, M., Wilcox-Adelman, S., Saoncella, S., Denhez, F., Detmar, M. & Goetinck, P. (2001) Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4, *The Journal of clinical investigation*. **107**, R9-R14.

185. Xiao, J., Meng, X. M., Huang, X. R., Chung, A. C., Feng, Y. L., Hui, D. S., Yu, C. M., Sung, J. J. & Lan, H. Y. (2012) miR-29 inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy.* **20**, 1251-60.

186. Yuan, C. T., Li, X. X., Cheng, Q. J., Wang, Y. H., Wang, J. H. & Liu, C. L. (2015) MiR-30a regulates the atrial fibrillation-induced myocardial fibrosis by targeting snail 1, *International journal of clinical and experimental pathology*. **8**, 15527-36. 187. Fujii, T., Shimada, K., Tatsumi, Y., Tanaka, N., Fujimoto, K. & Konishi, N. (2016) Syndecan-1 up-regulates microRNA-331-3p and mediates epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer, *Molecular carcinogenesis.* **55**, 1378-86.

188. Fujii, T., Shimada, K., Tatsumi, Y., Fujimoto, K. & Konishi, N. (2015) Syndecan-1 responsive microRNA-126 and 149 regulate cell proliferation in prostate cancer, *Biochemical and biophysical research communications*. **456**, 183-9.

189. Asuthkar, S., Velpula, K. K., Nalla, A. K., Gogineni, V. R., Gondi, C. S. & Rao, J. S. (2014) Irradiation-induced angiogenesis is associated with an MMP-9-miR-494-syndecan-1 regulatory loop in medulloblastoma cells, *Oncogene*. **33**, 1922-33.

190. Thompson, C. A., Purushothaman, A., Ramani, V. C., Vlodavsky, I. & Sanderson, R. D. (2013) Heparanase regulates secretion, composition, and function of tumor cell-derived exosomes, *The Journal of biological chemistry*. **288**, 10093-9.

191. Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P. & David, G. (2012) Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes, *Nat Cell Biol.* **14**, 677-85.

192. Castoldi, G., Di Gioia, C. R., Bombardi, C., Catalucci, D., Corradi, B., Gualazzi, M. G., Leopizzi, M., Mancini, M., Zerbini, G., Condorelli, G. & Stella, A. (2012) MiR-133a regulates collagen 1A1: potential role of miR-133a in myocardial fibrosis in angiotensin II-dependent hypertension, *Journal of cellular physiology*. **227**, 850-6.

193. Ji, J., Zhao, L., Budhu, A., Forgues, M., Jia, H. L., Qin, L. X., Ye, Q. H., Yu, J., Shi, X., Tang, Z. Y. & Wang, X. W. (2010) Let-7g targets collagen type I alpha2 and inhibits cell migration in hepatocellular carcinoma, *Journal of hepatology*. **52**, 690-7.

194. Kinoshita, T., Nohata, N., Hanazawa, T., Kikkawa, N., Yamamoto, N., Yoshino, H., Itesako, T., Enokida, H., Nakagawa, M., Okamoto, Y. & Seki, N. (2013) Tumour-suppressive microRNA-29s inhibit cancer cell migration and invasion by targeting laminin-integrin signalling in head and neck squamous cell carcinoma, *British journal of cancer*. **109**, 2636-45.

195. Gotte, M., Mohr, C., Koo, C. Y., Stock, C., Vaske, A. K., Viola, M., Ibrahim, S. A., Peddibhotla, S., Teng, Y. H., Low, J. Y., Ebnet, K., Kiesel, L. & Yip, G. W. (2010) miR-145dependent targeting of junctional adhesion molecule A and modulation of fascin expression are associated with reduced breast cancer cell motility and invasiveness, *Oncogene*. **29**, 6569-80.

196. Yang, X., Rutnam, Z. J., Jiao, C., Wei, D., Xie, Y., Du, J., Zhong, L. & Yang, B. B. (2012) An anti-let-7 sponge decoys and decays endogenous let-7 functions, *Cell cycle*. **11**, 3097-108.

197. Sun, X., Xu, C., Tang, S. C., Wang, J., Wang, H., Wang, P., Du, N., Qin, S., Li, G., Xu, S., Tao, Z., Liu, D. & Ren, H. (2016) Let-7c blocks estrogen-activated Wnt signaling in induction of self-renewal of breast cancer stem cells, *Cancer gene therapy*. **23**, 83-9.

198. Henry, J. C., Park, J. K., Jiang, J., Kim, J. H., Nagorney, D. M., Roberts, L. R., Banerjee, S. & Schmittgen, T. D. (2010) miR-199a-3p targets CD44 and reduces proliferation of CD44 positive hepatocellular carcinoma cell lines, *Biochemical and biophysical research communications*. **403**, 120-5.

199. Wang, C. H., Lee, D. Y., Deng, Z., Jeyapalan, Z., Lee, S. C., Kahai, S., Lu, W. Y., Zhang, Y. & Yang, B. B. (2008) MicroRNA miR-328 regulates zonation morphogenesis by targeting CD44 expression, *PLoS One.* **3**, e2420.

200. Bourguignon, L. Y., Wong, G., Earle, C. & Chen, L. (2012) Hyaluronan-CD44v3 interaction with Oct4-Sox2-Nanog promotes miR-302 expression leading to self-renewal, clonal formation, and cisplatin resistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma, *The Journal of biological chemistry.* **287**, 32800-24.

201. Chen, L. & Bourguignon, L. Y. (2014) Hyaluronan-CD44 interaction promotes c-Jun signaling and miRNA21 expression leading to Bcl-2 expression and chemoresistance in breast cancer cells, *Molecular cancer.* **13**, 52.

202. Wang, Q., Cai, J., Wang, J., Xiong, C. & Zhao, J. (2014) MiR-143 inhibits EGFRsignaling-dependent osteosarcoma invasion, *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.* **35**, 12743-8.

203. Tang, D., Zhang, Q., Zhao, S., Wang, J., Lu, K., Song, Y., Zhao, L., Kang, X., Wang, J., Xu, S. & Tian, L. (2013) The expression and clinical significance of microRNA-1258 and heparanase in human breast cancer, *Clinical biochemistry*. **46**, 926-32.

204. Liu, H., Chen, X., Gao, W. & Jiang, G. (2012) The expression of heparanase and microRNA-1258 in human non-small cell lung cancer, *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.* **33**, 1327-34.

205. Xu, B., Li, Y. Y., Ma, J. & Pei, F. X. (2016) Roles of microRNA and signaling pathway in osteoarthritis pathogenesis, *Journal of Zhejiang University Science B.* **17**, 200-8.

206. Li, L. & Li, H. (2013) Role of microRNA-mediated MMP regulation in the treatment and diagnosis of malignant tumors, *Cancer biology & therapy*. **14**, 796-805.

207. Costa, P. M., Cardoso, A. L., Custodia, C., Cunha, P., Pereira de Almeida, L. & Pedroso de Lima, M. C. (2015) MiRNA-21 silencing mediated by tumor-targeted nanoparticles combined with sunitinib: A new multimodal gene therapy approach for glioblastoma, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society.* **207**, 31-9.

208. Gabriely, G., Wurdinger, T., Kesari, S., Esau, C. C., Burchard, J., Linsley, P. S. & Krichevsky, A. M. (2008) MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators, *Molecular and cellular biology*. **28**, 5369-80.

209. Liu, Y., Wu, C., Wang, Y., Wen, S., Wang, J., Chen, Z., He, Q. & Feng, D. (2014) MicroRNA-145 inhibits cell proliferation by directly targeting ADAM17 in hepatocellular carcinoma, *Oncology reports.* **32**, 1923-30.

210. Adammek, M., Greve, B., Kassens, N., Schneider, C., Bruggemann, K., Schuring, A. N., Starzinski-Powitz, A., Kiesel, L. & Gotte, M. (2013) MicroRNA miR-145 inhibits proliferation, invasiveness, and stem cell phenotype of an in vitro endometriosis model by targeting multiple cytoskeletal elements and pluripotency factors, *Fertility and sterility*. **99**, 1346-1355 e5.

211. Martinez-Sanchez, A., Dudek, K. A. & Murphy, C. L. (2012) Regulation of human chondrocyte function through direct inhibition of cartilage master regulator SOX9 by microRNA-145 (miRNA-145), *The Journal of biological chemistry*. **287**, 916-24.

212. Zhang, J., Guo, H., Zhang, H., Wang, H., Qian, G., Fan, X., Hoffman, A. R., Hu, J. F. & Ge, S. (2011) Putative tumor suppressor miR-145 inhibits colon cancer cell growth by targeting oncogene Friend leukemia virus integration 1 gene, *Cancer.* **117**, 86-95.

213. Sachdeva, M., Zhu, S., Wu, F., Wu, H., Walia, V., Kumar, S., Elble, R., Watabe, K. & Mo, Y. Y. (2009) p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **106**, 3207-12.

214. Hwang, S. J., Seol, H. J., Park, Y. M., Kim, K. H., Gorospe, M., Nam, D. H. & Kim, H. H. (2012) MicroRNA-146a suppresses metastatic activity in brain metastasis, *Molecules and cells*. **34**, 329-34.

215. Hu, Y., Ou, Y., Wu, K., Chen, Y. & Sun, W. (2012) miR-143 inhibits the metastasis of pancreatic cancer and an associated signaling pathway, *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.* **33**, 1863-70.

216. Osaki, M., Takeshita, F., Sugimoto, Y., Kosaka, N., Yamamoto, Y., Yoshioka, Y., Kobayashi, E., Yamada, T., Kawai, A., Inoue, T., Ito, H., Oshimura, M. & Ochiya, T. (2011)

MicroRNA-143 regulates human osteosarcoma metastasis by regulating matrix metalloprotease-13 expression, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy.* **19**, 1123-30.

217. Alpini, G., Glaser, S. S., Zhang, J. P., Francis, H., Han, Y., Gong, J., Stokes, A., Francis, T., Hughart, N., Hubble, L., Zhuang, S. M. & Meng, F. (2011) Regulation of placenta growth factor by microRNA-125b in hepatocellular cancer, *Journal of hepatology*. **55**, 1339-45.

218. Chen, K. C., Wang, Y. S., Hu, C. Y., Chang, W. C., Liao, Y. C., Dai, C. Y. & Juo, S. H. (2011) OxLDL up-regulates microRNA-29b, leading to epigenetic modifications of MMP-2/MMP-9 genes: a novel mechanism for cardiovascular diseases, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* **25**, 1718-28.

219. Bai, J. X., Yan, B., Zhao, Z. N., Xiao, X., Qin, W. W., Zhang, R., Jia, L. T., Meng, Y. L., Jin, B. Q., Fan, D. M., Wang, T. & Yang, A. G. (2013) Tamoxifen represses miR-200 microRNAs and promotes epithelial-to-mesenchymal transition by up-regulating c-Myc in endometrial carcinoma cell lines, *Endocrinology*. **154**, 635-45.

220. Ma, L., Teruya-Feldstein, J. & Weinberg, R. A. (2007) Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer, *Nature*. **449**, 682-8.

221. Liu, Y. N., Yin, J. J., Abou-Kheir, W., Hynes, P. G., Casey, O. M., Fang, L., Yi, M., Stephens, R. M., Seng, V., Sheppard-Tillman, H., Martin, P. & Kelly, K. (2013) MiR-1 and miR-200 inhibit EMT via Slug-dependent and tumorigenesis via Slug-independent mechanisms, *Oncogene*. **32**, 296-306.

222. Xu, F., He, H., Huang, W., Lin, Y., Luo, S., Du, Q. & Duan, R. (2016) Decreased expression of MicroRNA-200 family in human breast cancer is associated with lymph node metastasis, *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico.* **18**, 283-8.

223. Hahne, J. C., Okuducu, A. F., Fuchs, T., Florin, A. & Wernert, N. (2011) Identification of ETS-1 target genes in human fibroblasts, *Int J Oncol.* **38**, 1645-52.

224. Chan, Y. C., Khanna, S., Roy, S. & Sen, C. K. (2011) miR-200b targets Ets-1 and is down-regulated by hypoxia to induce angiogenic response of endothelial cells, *The Journal of biological chemistry*. **286**, 2047-56.

225. Tang, O., Chen, X. M., Shen, S., Hahn, M. & Pollock, C. A. (2013) MiRNA-200b represses transforming growth factor-beta1-induced EMT and fibronectin expression in kidney proximal tubular cells, *American journal of physiology Renal physiology*. **304**, F1266-73.

226. Li, P., He, Q. Y. & Luo, C. Q. (2014) Overexpression of miR-200b inhibits the cell proliferation and promotes apoptosis of human hypertrophic scar fibroblasts in vitro, *The Journal of dermatology*. **41**, 903-11.

227. Miller, T. E., Ghoshal, K., Ramaswamy, B., Roy, S., Datta, J., Shapiro, C. L., Jacob, S. & Majumder, S. (2008) MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1, *The Journal of biological chemistry*. **283**, 29897-903.

228. Zhao, J. J., Lin, J., Yang, H., Kong, W., He, L., Ma, X., Coppola, D. & Cheng, J. Q. (2008) MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer, *The Journal of biological chemistry*. **283**, 31079-86.

229. Klinge, C. M. (2009) Estrogen Regulation of MicroRNA Expression, *Current genomics*. **10**, 169-83.

230. Castellano, L., Giamas, G., Jacob, J., Coombes, R. C., Lucchesi, W., Thiruchelvam, P., Barton, G., Jiao, L. R., Wait, R., Waxman, J., Hannon, G. J. & Stebbing, J. (2009) The estrogen receptor-alpha-induced microRNA signature regulates itself and its transcriptional response, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **106**, 15732-7.

231. Adams, B. D., Furneaux, H. & White, B. A. (2007) The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines, *Molecular endocrinology*. **21**, 1132-47.

232. Kondo, N., Toyama, T., Sugiura, H., Fujii, Y. & Yamashita, H. (2008) miR-206 Expression is down-regulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer, *Cancer research.* **68**, 5004-8.

233. Spizzo, R., Nicoloso, M. S., Lupini, L., Lu, Y., Fogarty, J., Rossi, S., Zagatti, B., Fabbri, M., Veronese, A., Liu, X., Davuluri, R., Croce, C. M., Mills, G., Negrini, M. & Calin, G. A. (2010) miR-145 participates with TP53 in a death-promoting regulatory loop and targets estrogen receptor-alpha in human breast cancer cells, *Cell Death Differ.* **17**, 246-54.

234. Thomson, D. W., Bracken, C. P., Szubert, J. M. & Goodall, G. J. (2013) On measuring miRNAs after transient transfection of mimics or antisense inhibitors, *PLoS One.* **8**, e55214.

235. Cochrane, D. R., Cittelly, D. M., Howe, E. N., Spoelstra, N. S., McKinsey, E. L., LaPara, K., Elias, A., Yee, D. & Richer, J. K. (2010) MicroRNAs link estrogen receptor alpha status and Dicer levels in breast cancer, *Hormones & cancer.* **1**, 306-19.

236. Cheng, C., Fu, X., Alves, P. & Gerstein, M. (2009) mRNA expression profiles show differential regulatory effects of microRNAs between estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative breast cancer, *Genome biology*. **10**, R90.

237. Adams, B. D., Claffey, K. P. & White, B. A. (2009) Argonaute-2 expression is regulated by epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase signaling and correlates with a transformed phenotype in breast cancer cells, *Endocrinology*. **150**, 14-23.

238. Piperigkou, Z., Karamanou, K., Engin, A. B., Gialeli, C., Docea, A. O., Vynios, D. H., Pavao, M. S., Golokhvast, K. S., Shtilman, M. I., Argiris, A., Shishatskaya, E. & Tsatsakis, A. M. (2016) Emerging aspects of nanotoxicology in health and disease: From agriculture and food sector to cancer therapeutics, *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association.* **91**, 42-57.

239. Nel, A., Xia, T., Madler, L. & Li, N. (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel, *Science*. **311**, 622-7.

240. Piperigkou, Z., Karamanou, K., Afratis, N. A., Bouris, P., Gialeli, C., Belmiro, C. L., Pavao, M. S., Vynios, D. H. & Tsatsakis, A. M. (2016) Biochemical and toxicological evaluation of nano-heparins in cell functional properties, proteasome activation and expression of key matrix molecules, *Toxicology letters*. **240**, 32-42.

241. Afratis, N. A., Karamanou, K., Piperigkou, Z., Vynios, D. H. & Theocharis, A. D. (2016) The role of heparins and nano-heparins as therapeutic tool in breast cancer, *Glycoconjugate journal*. **34**(**3**), 299-307.

242. Banerjee, J., Hanson, A. J., Gadam, B., Elegbede, A. I., Tobwala, S., Ganguly, B., Wagh, A. V., Muhonen, W. W., Law, B., Shabb, J. B., Srivastava, D. K. & Mallik, S. (2009) Release of liposomal contents by cell-secreted matrix metalloproteinase-9, *Bioconjugate chemistry*. **20**, 1332-9.

243. Fernandez-Pineiro, I., Badiola, I. & Sanchez, A. (2017) Nanocarriers for microRNA delivery in cancer medicine, *Biotechnology advances*. **35**, 350-360.

244. Wang, H., Jiang, Y., Peng, H., Chen, Y., Zhu, P. & Huang, Y. (2015) Recent progress in microRNA delivery for cancer therapy by non-viral synthetic vectors, *Adv Drug Deliv Rev.* **81**, 142-60.

245. Chen, Y., Gao, D. Y. & Huang, L. (2015) In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: challenges and strategies, *Adv Drug Deliv Rev.* **81**, 128-41.

246. Wang, H., Chiu, M., Xie, Z., Chiu, M., Liu, Z., Chen, P., Liu, S., Byrd, J. C., Muthusamy, N., Garzon, R., Croce, C. M., Marcucci, G. & Chan, K. K. (2012) Synthetic microRNA cassette dosing: pharmacokinetics, tissue distribution and bioactivity, *Molecular pharmaceutics*. **9**, 1638-44.

247. Nayerossadat, N., Maedeh, T. & Ali, P. A. (2012) Viral and nonviral delivery systems for gene delivery, *Advanced biomedical research*. **1**, 27.

248. Chakraborty, C., Wen, Z. H., Agoramoorthy, G. & Lin, C. S. (2016) Therapeutic microRNA Delivery Strategies with Special Emphasis on Cancer Therapy and Tumorigenesis: Current Trends and Future Challenges, *Current drug metabolism.* **17**, 469-77.

249. Santos-Carballal, B., Aaldering, L. J., Ritzefeld, M., Pereira, S., Sewald, N., Moerschbacher, B. M., Gotte, M. & Goycoolea, F. M. (2015) Physicochemical and biological characterization of chitosan-microRNA nanocomplexes for gene delivery to MCF-7 breast cancer cells, *Scientific reports*. **5**, 13567.

250. Bikram, M., Lee, M., Chang, C. W., Janat-Amsbury, M. M., Kern, S. E. & Kim, S. W. (2005) Long-circulating DNA-complexed biodegradable multiblock copolymers for gene delivery: degradation profiles and evidence of dysopsonization, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society.* **103**, 221-33.

251. Devulapally, R., Sekar, N. M., Sekar, T. V., Foygel, K., Massoud, T. F., Willmann, J. K. & Paulmurugan, R. (2015) Polymer nanoparticles mediated codelivery of antimiR-10b and antimiR-21 for achieving triple negative breast cancer therapy, *ACS nano.* **9**, 2290-302.

252. Zhang, X., Li, Y., Chen, Y. E., Chen, J. & Ma, P. X. (2016) Cell-free 3D scaffold with two-stage delivery of miRNA-26a to regenerate critical-sized bone defects, *Nature communications*. **7**, 10376.

253. Liang, G., Zhu, Y., Jing, A., Wang, J., Hu, F., Feng, W., Xiao, Z. & Chen, B. (2016) Cationic microRNA-delivering nanocarriers for efficient treatment of colon carcinoma in xenograft model, *Gene therapy.* **23**, 829-838.

254. Takeda, Y. S. & Xu, Q. (2015) Synthetic and nature-derived lipid nanoparticles for neural regeneration, *Neural regeneration research*. **10**, 689-90.

255. Endo-Takahashi, Y., Negishi, Y., Nakamura, A., Ukai, S., Ooaku, K., Oda, Y., Sugimoto, K., Moriyasu, F., Takagi, N., Suzuki, R., Maruyama, K. & Aramaki, Y. (2014) Systemic delivery of miR-126 by miRNA-loaded Bubble liposomes for the treatment of hindlimb ischemia, *Scientific reports.* **4**, 3883.

256. Yang, N. (2015) An overview of viral and nonviral delivery systems for microRNA, *International journal of pharmaceutical investigation*. **5**, 179-81.

257. Pan, T., Song, W., Gao, H., Li, T., Cao, X., Zhong, S. & Wang, Y. (2016) miR-29b-Loaded Gold Nanoparticles Targeting to the Endoplasmic Reticulum for Synergistic Promotion of Osteogenic Differentiation, *ACS applied materials & interfaces*. **8**, 19217-27.

258. <u>www.clinicaltrials.gov</u>

259. De Wever, O., Hendrix, A., De Boeck, A., Westbroek, W., Braems, G., Emami, S., Sabbah, M., Gespach, C. & Bracke, M. (2010) Modeling and quantification of cancer cell invasion through collagen type I matrices, *The International journal of developmental biology*. **54**, 887-96.

260. Mobley, J. L. & Shimizu, Y. (2001) Measurement of cellular adhesion under static conditions, *Current protocols in immunology*. **Chapter 7**, Unit 7 28.

261. Ibrahim, S. A., Hassan, H., Vilardo, L., Kumar, S. K., Kumar, A. V., Kelsch, R., Schneider, C., Kiesel, L., Eich, H. T., Zucchi, I., Reinbold, R., Greve, B. & Gotte, M. (2013) Syndecan-1 (CD138) modulates triple-negative breast cancer stem cell properties via regulation of LRP-6 and IL-6-mediated STAT3 signaling, *PLoS One.* **8**, e85737.
262. Pietraszek, K., Chatron-Colliet, A., Brezillon, S., Perreau, C., Jakubiak-Augustyn, A., Krotkiewski, H., Maquart, F. X. & Wegrowski, Y. (2014) Lumican: a new inhibitor of matrix metalloproteinase-14 activity, *FEBS letters*. **588**, 4319-24.

263. Vuillermoz, B., Khoruzhenko, A., D'Onofrio, M. F., Ramont, L., Venteo, L., Perreau, C., Antonicelli, F., Maquart, F. X. & Wegrowski, Y. (2004) The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression, *Experimental cell research*. **296**, 294-306.

264. Piperigkou, Z., Bouris, P., Onisto, M., Franchi, M., Kletsas, D., Theocharis, A. D. & Karamanos, N. K. (2016) Estrogen receptor beta modulates breast cancer cells functional properties, signaling and expression of matrix molecules, *Matrix Biol.* **56**, 4-23.

265. Gumbiner, B. M. (2005) Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis, *Nature reviews Molecular cell biology*. **6**, 622-34.

266. Karalis, T. T., Heldin, P., Vynios, D. H., Neill, T., Buraschi, S., Iozzo, R. V., Karamanos, N. K. & Skandalis, S. S. (2018) Tumor-suppressive functions of 4-MU on breast cancer cells of different ER status: Regulation of hyaluronan/HAS2/CD44 and specific matrix effectors, *Matrix Biol.* In Press. doi: 10.1016/j.matbio.2018.04.007.

267. Huang, B., Warner, M. & Gustafsson, J. A. (2015) Estrogen receptors in breast carcinogenesis and endocrine therapy, *Molecular and cellular endocrinology*. **418** Pt **3**, 240-4.

268. Song, R. X., Zhang, Z., Chen, Y., Bao, Y. & Santen, R. J. (2007) Estrogen signaling via a linear pathway involving insulin-like growth factor I receptor, matrix metalloproteinases, and epidermal growth factor receptor to activate mitogen-activated protein kinase in MCF-7 breast cancer cells, *Endocrinology*. **148**, 4091-101.

269. Ellina, M. I., Bouris, P., Aletras, A. J., Theocharis, A. D., Kletsas, D. & Karamanos, N. K. (2014) EGFR and HER2 exert distinct roles on colon cancer cell functional properties and expression of matrix macromolecules, *Biochim Biophys Acta*. **1840**, 2651-61.

270. Loibl, S., von Minckwitz, G., Schneeweiss, A., Paepke, S., Lehmann, A., Rezai, M., Zahm, D. M., Sinn, P., Khandan, F., Eidtmann, H., Dohnal, K., Heinrichs, C., Huober, J., Pfitzner, B., Fasching, P. A., Andre, F., Lindner, J. L., Sotiriou, C., Dykgers, A., Guo, S., Gade, S., Nekljudova, V., Loi, S., Untch, M. & Denkert, C. (2014) PIK3CA mutations are associated with lower rates of pathologic complete response to anti-human epidermal growth factor receptor 2 (her2) therapy in primary HER2-overexpressing breast cancer, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* **32**, 3212-20.

271. Rouanet, P., Roger, P., Rousseau, E., Thibault, S., Romieu, G., Mathieu, A., Cretin, J., Barneon, G., Granier, M., Maran-Gonzalez, A., Daures, J. P., Boissiere, F. & Bibeau, F. (2014) HER2 overexpression a major risk factor for recurrence in pT1a-bN0M0 breast cancer: results from a French regional cohort, *Cancer medicine*. **3**, 134-42.

272. Castagnoli, L., Ghedini, G. C., Koschorke, A., Triulzi, T., Dugo, M., Gasparini, P., Casalini, P., Palladini, A., Iezzi, M., Lamolinara, A., Lollini, P. L., Nanni, P., Chiodoni, C., Tagliabue, E. & Pupa, S. M. (2017) Pathobiological implications of the d16HER2 splice variant for stemness and aggressiveness of HER2-positive breast cancer, *Oncogene.* **36**, 1721-1732.

273. Song, R. X., Chen, Y., Zhang, Z., Bao, Y., Yue, W., Wang, J. P., Fan, P. & Santen, R. J. (2010) Estrogen utilization of IGF-1-R and EGF-R to signal in breast cancer cells, *J Steroid Biochem Mol Biol.* **118**, 219-30.

274. Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., Akslen, L. A., Ragaz, J., Gown, A. M., Gilks, C. B., van de Rijn, M. & Perou, C. M. (2004) Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma, *Clin Cancer Res.* **10**, 5367-74.

275. Kohno, M. & Pouyssegur, J. (2006) Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy, *Annals of medicine*. **38**, 200-11.

276. Ramos, J. W. (2008) The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells, *The international journal of biochemistry & cell biology*. **40**, 2707-19.

277. Leung, Y. K., Mak, P., Hassan, S. & Ho, S. M. (2006) Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**, 13162-7.

278. Moore, J. T., McKee, D. D., Slentz-Kesler, K., Moore, L. B., Jones, S. A., Horne, E. L., Su, J. L., Kliewer, S. A., Lehmann, J. M. & Willson, T. M. (1998) Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms, *Biochem Biophys Res Commun.* **247**, 75-8.

279. Ogawa, S., Goto, W., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., Muramatsu, M. & Inoue, S. (1998) Molecular cloning of a novel RING finger-B box-coiled coil (RBCC) protein, terf, expressed in the testis, *Biochem Biophys Res Commun.* **251**, 515-9.

280. Piperigkou, Z., Franchi, M., Gotte, M. & Karamanos, N. K. (2017) Estrogen receptor beta as epigenetic mediator of miR-10b and miR-145 in mammary cancer, *Matrix Biol.* **64**, 94-111.

281. Baffa, R., Fassan, M., Volinia, S., O'Hara, B., Liu, C. G., Palazzo, J. P., Gardiman, M., Rugge, M., Gomella, L. G., Croce, C. M. & Rosenberg, A. (2009) MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets, *J Pathol.* **219**, 214-21.

282. Rhodes, L. V., Martin, E. C., Segar, H. C., Miller, D. F., Buechlein, A., Rusch, D. B., Nephew, K. P., Burow, M. E. & Collins-Burow, B. M. (2015) Dual regulation by microRNA-200b-3p and microRNA-200b-5p in the inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition in triple-negative breast cancer, *Oncotarget*. **6**, 16638-52.

283. Gregory, P. A., Bert, A. G., Paterson, E. L., Barry, S. C., Tsykin, A., Farshid, G., Vadas, M. A., Khew-Goodall, Y. & Goodall, G. J. (2008) The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1, *Nat Cell Biol.* **10**, 593-601.

284. Ma, L., Reinhardt, F., Pan, E., Soutschek, J., Bhat, B., Marcusson, E. G., Teruya-Feldstein, J., Bell, G. W. & Weinberg, R. A. (2010) Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model, *Nat Biotechnol.* **28**, 341-7.

285. Zheng, M., Sun, X., Li, Y. & Zuo, W. (2016) MicroRNA-145 inhibits growth and migration of breast cancer cells through targeting oncoprotein ROCK1, *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.* **37**, 8189-96.

286. Zhao, H., Kang, X., Xia, X., Wo, L., Gu, X., Hu, Y., Xie, X., Chang, H., Lou, L. & Shen, X. (2016) miR-145 suppresses breast cancer cell migration by targeting FSCN-1 and inhibiting epithelial-mesenchymal transition, *American journal of translational research*. **8**, 3106-14.

287. Barzi, A., Lenz, A. M., Labonte, M. J. & Lenz, H. J. (2013) Molecular pathways: Estrogen pathway in colorectal cancer, *Clin Cancer Res.* **19**, 5842-8.

288. Manavathi, B. & Kumar, R. (2006) Steering estrogen signals from the plasma membrane to the nucleus: two sides of the coin, *Journal of cellular physiology*. **207**, 594-604.

289. Marotti, J. D., Collins, L. C., Hu, R. & Tamimi, R. M. (2010) Estrogen receptor-beta expression in invasive breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study, *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 23, 197-204.

290. Skliris, G. P., Leygue, E., Curtis-Snell, L., Watson, P. H. & Murphy, L. C. (2006) Expression of oestrogen receptor-beta in oestrogen receptor-alpha negative human breast tumours, *British journal of cancer.* **95**, 616-26.

291. Guo, L., Zhu, Q., Yilamu, D., Jakulin, A., Liu, S. & Liang, T. (2014) Expression and prognostic value of estrogen receptor beta in breast cancer patients, *International journal of clinical and experimental medicine*. **7**, 3730-6.

292. Novelli, F., Milella, M., Melucci, E., Di Benedetto, A., Sperduti, I., Perrone-Donnorso, R., Perracchio, L., Venturo, I., Nistico, C., Fabi, A., Buglioni, S., Natali, P. G. & Mottolese, M. (2008) A divergent role for estrogen receptor-beta in node-positive and node-negative breast cancer classified according to molecular subtypes: an observational prospective study, *Breast Cancer Res.* **10**, R74.

293. Chantzi, N. I., Tiniakos, D. G., Palaiologou, M., Goutas, N., Filippidis, T., Vassilaros, S. D., Dhimolea, E., Mitsiou, D. J. & Alexis, M. N. (2013) Estrogen receptor beta 2 is associated with poor prognosis in estrogen receptor alpha-negative breast carcinoma, *Journal of cancer research and clinical oncology*. **139**, 1489-98.

294. Chang, E. C., Frasor, J., Komm, B. & Katzenellenbogen, B. S. (2006) Impact of estrogen receptor beta on gene networks regulated by estrogen receptor alpha in breast cancer cells, *Endocrinology*. **147**, 4831-42.

295. Haldosen, L. A., Zhao, C. & Dahlman-Wright, K. (2014) Estrogen receptor beta in breast cancer, *Molecular and cellular endocrinology*. **382**, 665-72.

296. Fox, E. M., Andrade, J. & Shupnik, M. A. (2009) Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways, *Steroids*. **74**, 622-7.

297. Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R. & Thompson, E. W. (2006) The epithelialmesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease, *The Journal of cell biology*. **172**, 973-81.

298. Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A. & Weinberg, R. A. (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis, *Cell*. **117**, 927-39.

299. Berx, G. & van Roy, F. (2009) Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. **1**, a003129.

300. Bolos, V., Peinado, H., Perez-Moreno, M. A., Fraga, M. F., Esteller, M. & Cano, A. (2003) The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors, *J Cell Sci.* **116**, 499-511.

301. Gilles, C., Polette, M., Mestdagt, M., Nawrocki-Raby, B., Ruggeri, P., Birembaut, P. & Foidart, J. M. (2003) Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells, *Cancer research.* **63**, 2658-64.

302. Galvan, J. A., Zlobec, I., Wartenberg, M., Lugli, A., Gloor, B., Perren, A. & Karamitopoulou, E. (2015) Expression of E-cadherin repressors SNAIL, ZEB1 and ZEB2 by tumour and stromal cells influences tumour-budding phenotype and suggests heterogeneity of stromal cells in pancreatic cancer, *British journal of cancer*. **112**, 1944-50.

303. Wee, P. & Wang, Z. (2017) Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways, *Cancers.* **9** (5), 52.

304. Shay, G., Lynch, C. C. & Fingleton, B. (2015) Moving targets: Emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis, *Matrix Biol.* **44-46**, 200-6.

305. Bostrom, P., Soderstrom, M., Vahlberg, T., Soderstrom, K. O., Roberts, P. J., Carpen, O. & Hirsimaki, P. (2011) MMP-1 expression has an independent prognostic value in breast cancer, *BMC cancer.* **11**, 348.

306. Arpino, V., Brock, M. & Gill, S. E. (2015) The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis, *Matrix Biol.* **44-46**, 247-54.

307. Kurozumi, S., Yamaguchi, Y., Kurosumi, M., Ohira, M., Matsumoto, H. & Horiguchi, J. (2017) Recent trends in microRNA research into breast cancer with particular focus on the associations between microRNAs and intrinsic subtypes, *Journal of human genetics*. **62**, 15-24.

308. Du, F., Yuan, P., Zhao, Z. T., Yang, Z., Wang, T., Zhao, J. D., Luo, Y., Ma, F., Wang, J. Y., Fan, Y., Cai, R. G., Zhang, P., Li, Q., Song, Y. M. & Xu, B. H. (2016) A miRNA-based

signature predicts development of disease recurrence in HER2 positive breast cancer after adjuvant trastuzumab-based treatment, *Scientific reports.* **6**, 33825.

309. Liu, Y., Zhang, J., Sun, X. & Li, M. (2016) EMMPRIN Down-regulating miR-106a/b Modifies Breast Cancer Stem-like Cell Properties via Interaction with Fibroblasts Through STAT3 and HIF-1alpha, *Scientific reports*. **6**, 28329.

310. Tryndyak, V. P., Beland, F. A. & Pogribny, I. P. (2010) E-cadherin transcriptional downregulation by epigenetic and microRNA-200 family alterations is related to mesenchymal and drug-resistant phenotypes in human breast cancer cells, *Int J Cancer.* **126**, 2575-83.

311. Eggers, J. C., Martino, V., Reinbold, R., Schafer, S. D., Kiesel, L., Starzinski-Powitz, A., Schuring, A. N., Kemper, B., Greve, B. & Gotte, M. (2016) microRNA miR-200b affects proliferation, invasiveness and stemness of endometriotic cells by targeting ZEB1, ZEB2 and KLF4, *Reprod Biomed Online*. **32**, 434-45.

312. Noh, J. H., Chang, Y. G., Kim, M. G., Jung, K. H., Kim, J. K., Bae, H. J., Eun, J. W., Shen, Q., Kim, S. J., Kwon, S. H., Park, W. S., Lee, J. Y. & Nam, S. W. (2013) MiR-145 functions as a tumor suppressor by directly targeting histone deacetylase 2 in liver cancer, *Cancer letters*. **335**, 455-62.

313. Mlcochova, H., Machackova, T., Rabien, A., Radova, L., Fabian, P., Iliev, R., Slaba, K., Poprach, A., Kilic, E., Stanik, M., Redova-Lojova, M., Svoboda, M., Dolezel, J., Vyzula, R., Jung, K. & Slaby, O. (2016) Epithelial-mesenchymal transition-associated microRNA/mRNA signature is linked to metastasis and prognosis in clear-cell renal cell carcinoma, *Scientific reports*. **6**, 31852.

# ПАРАРТНМА І

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ ΤΗΣ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ

## ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ



## Πιπερίγκου Ζωή

- የ Παξών 4, 26223 Πάτρα (Ελλάδα)
- 🖹 (+30)2610005381 🔒 (+30)6981277945
- 🔀 zoipip@upatras.gr

https://www.researchgate.net/profile/Zoi\_Piperigkou https://www.linkedin.com/profile/public-profile-settings?trk=prof-edit-edit-public\_profile https://scholar.google.gr/citations?user=11hs3-0AAAJ&hl=en

Skype zoi.pip

Φύλο Θήλυ | Ημερομηνία γέννησης 16/07/1989 | Εθνικότητα Ελληνική

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ Υποψήφια Διδάκτορας 2014-2018 ΕΠΠ επίπεδο 8 Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα (Ελλάδα) www.upatras.gr Τίτλος Διδακτορικής Διατριβής «Μελέτη ρυθμιστικών μηχανισμών, έκφρασης βιομορίων, λειτουργικών ιδιοτήτων και μορφολογικών χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων μαστού» 2016, 2017 Ερευνήτρια - Επιστημονική Συνεργάτης του προγράμματος GLYCANC "Matrix glycans as multifunctional pathogenesis factors and therapeutic targets in cancer", στα πλαίσια της δράσης EU H2020 MSCA RISE-2014, Project ID: 645756 Eταιρία: Serend-ip GmbH, Münster, Germany Heisenbergstraße 11, 48149 Münster (Γερμανία) www.serend-ip.de Εκπαίδευση σε τοπομετρικές αναλύσεις μικροκλίμακας (nAnostic<sup>™</sup>) Αναλύσεις με τη χρήση ατομικής μικροσκοττίας (Atomic force microscopy, AFM) 2016 Συμμετοχή στο πρόγραμμα Erasmus+ exchange studies University of Münster, Medicine Department, University Medical Center, Münster, Germany www.uni-muenster.de/de/ Θέμα ερευνητικής εργασίας (μέρος της Διδακτορικής Διατριβής) "MicroRNA targeting as a regulatory mechanism of breast cancer cells with different estrogen receptor status" 2011-2013 Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, «Εφαρμοσμένη Βιοχημεία: ΕΠΠ επίπεδο 7 Κλινική Χημεία, Βιοτεχνολογία και Αξιολόγηση Φαρμακευτικών Προϊόντων», Βαθμός: Άριστα 9,72 Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα (Ελλάδα) Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας: «Ο ρόλος της ηπαρίνης και των νανο-παραγώγων ηπαρίνης στις λειτουργικές ιδιότητες και τη ρύθμιση της δραστικότητας του πρωτεασώματος σε κύτταρα καρκίνου μαστού» 2007-2011 Πτυχίο Χημείας, Βαθμός: Λίαν Καλώς 8,14 ΕΠΠ επίπεδο 6 Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα (Ελλάδα) Τίτλος Πτυχιακής Εργασίας : «Μελέτη της μεταγάστευσης των καρκινικών κυττάρων στον ΕRα(+) και ERβ(+) καρκίνο του μαστού και της εξάρτησης από τη σηματοδότηση των EGF-R και IGF-R»

#### ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ 2011-2018

Διδασκαλία προπτυχιακών φοιτητών του Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών Διδασκαλία και Συμμετοχή στα πλαίσια παροχής επικουρικού έργου στην προετοιμασία και διεξαγωγή εργαστηριακών ασκήσεων Βιοχημείας, Ιατρικής Χημείας, Βιολογίας και Μικροβιολογίας του προπτυχιακού προγράμματος σπουδών του Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών

## ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Μητρική(ές) γλώσσα(ες) Ελληνικά

Λοιπές γλώσ

ς γλώσσες	ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ		OM	ГРАФН			
	Προφορική	Γραπτή (ανάγνωση)	Επικοινωνία	Προφορική έκφραση			
Αγγλικά	C2	C2	C2	C2	C2		
		Certificate of excelle	ent knowledge, Univers	sity of Michigan			
Γερμανικά	B1	B1	B1	B1	B1		
	Certificate of good knowledge, Goethe Institut						

Επίπεδα: Α1 και Α2: Βασικός χρήστης - Β1 και Β2: Ανεξάρτητος χρήστης - C1 και C2: Έμπειρος χρήστης Κοινό Ευρωπαϊκό Πλαίσιο Αναφοράς για Γλώσσες

Επικοινωνιακές δεξιότητες

- Εξαιρετικές επικοινωνιακές δεξιότητες που αποκτήθηκαν από την ακαδημαϊκή εμπειρία
  - Διδασκαλία σε προπτυχιακούς φοιτητές του Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Πατρών, στα πλαίσια των εργαστηριακών ασκήσεων των μαθημάτων Βιοχημείας, Ιατρικής Χημείας, Βιολογίας και Μικροβιολογίας του προπτυχιακού προγράμματος σπουδών
- Οργανωτικές / διαχειριστικές δεξιότητες
  - . Ηγετικές ικανότητες (επί του παρόντος συν-υπεύθυνη οργανωτικου και εργαστηριακου πειραματικού σχεδιασμου και βασικής βιοχημικής εργασητριακής εκπαίδευσης 12μελούς ερευνητικής ομάδας: Βιοχημείας, Βιοχημικής Ανάλυσης και Παθοβιολογίας του Εξωκυττάριου Χώρου του Εργαστηρίου Βιοχημείας, Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Πατρών)
    - Οργανωτικές δεξιότητες: Μέλος της οργανωτικής επιτροπής και Πρόεδρος της Οργανωτικής Επιτροπής Νέων Επιστημόνων (Young Scientists' Committee) του Διεθνούς Συνεδρίου FEBS Advanced Lecture Course on Extracellular Matrix: Cell Regulation, Epigenetics and Modeling, 2018, Πάτρα, Ελλάδα
    - Οργανωτικές δεξιότητες: Μέλος της Οργανωτικής Επιτροπής Νέων Επιστημόνων (Young Scientists' Committee) του Διεθνούς Επιστημονικού Συνεδρίου 6<sup>th</sup> FEBS Advanced Lecture Course on Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets, 2017, Σπέτσες, Ελλάδα
    - Οργανωτικές ικανότητες: Μέλος της Οργανωτικής Επιτροπής του 3ου Συνεδρίου Νέων επιστημόνων της Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 2015, Αθήνα, Ελλάδα

Ψηφιακή δεξιότητα	ΑΥΤΟΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ				
	Επεξεργασία δεδομένων	Επικοινωνία	Δημιουργία Περιεχομένου	Ασφάλεια	Επίλυση προβλημάτων
	Έμπειρος χρήστης	Έμπειρος χρήστης	Έμπειρος χρήστης	Ανεξάρτητος χρήστης	Βασικός χρήστης

Ψηφιακές δεξιότητες - Πίνακας αυτοαξιολόγησης

Εξαιρετικός χειρισμός των εργαλείων Microsoft Office™ και των προγραμμάτων-λογισμικών Microcal Origin, GraphPad Prism και Xara Photo & Graphic Designer που αποκτήθηκε κατά τη διάρκεια των σπουδών

Δίπλωμα οδήγησης В Μουσικές σπουδές στην κιθάρα και το ακκορντεόν, μέλος χορωδιών (Πανεπιστήμιο Πατρών, Ελλάδα) Αθλητισμός: κολύμβηση, τεχνική κολύμβηση, καλαθοσφαίριση, ποδόσφαιρο, χειροσφαίριση

### Άλλες δεξιότητες

## ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Επιστημονικές Δημοσιεύσεις

- Karamanos N.K., Piperigkou Z., Theocharis A.D., Hideto W., Franchi M., Baud S., Brezillon S., Götte M., Passi A., Vigetti D., Ricard-Blum S., Sanderson R., Neil T., Iozzo R.V., 2018. Proteoglycans: from chemical structure diversity to multifunctional cell regulation and therapeutics. Chemical Reviews (ACS Publications). To be submitted. Impact factor (IF): 47.93
  - Götte M., Spyrou A., **Piperigkou Z.**, Karamanos N.K., Forsberg-Nilsson K., 2018. Proteoglycans and Glycosaminoglycans – multifunctional regulators of cancer progression. Cancer Cell. To be submitted. IF: 23,21
  - Kyriakopoulou K., Kefali E., Piperigkou Z., Karamanos N.K., 2018. Advances in targeting epidermal growth factor receptor signaling pathway in mammary cancer: implications of estrogen receptors, epigenetics and extracellular matrix effectors. Cellular Signalling. To be submitted. IF: 3.94
  - Piperigkou Z., Theocharis A.D., Karamanos N.K. 2017. Insights into the key roles of epigenetics in matrix macromolecules-associated wound healing. Advanced Drug Delivery Reviews, 129:16-36. IF: 11.76
  - Piperigkou Z., Manou D., Karamanou K., Theocharis A.D., 2018. Strategies to Target Matrix Metalloproteinases as Therapeutic Approach in Cancer. In: Cal S., Obaya A. (eds) Proteases and Cancer. Methods in Molecular Biology, vol 1731. Humana Press, New York, NY
  - Piperigkou Z., Franchi M., Götte M., Karamanos N.K., 2017. Estrogen receptor beta as epigenetic mediator of miR-10b and miR-145 in mammary cancer. Matrix Biology J, 64:94-111, [Impact factor (IF): 8.14, Featured in Faculty 1000 (F1000Prime) https://f1000.com/prime/726362790]
  - Karamanou, K., Franchi, M., **Piperigkou, Z.,** Perreau, C., Maquart, F.X., Vynios, D.H., Brézillon, S., 2017. Lumican effectively regulates the estrogen receptors-associated functional properties of breast cancer cells, expression of matrix effectors and epithelial-tomesenchymal transition. Nature Scientific Reports, 23;7:45138, IF: 5.23
  - Afratis, N., Karamanou, K., **Piperigkou, Z**., Karamanos, N.K. 2017. The role of heparins and nano-heparins as therapeutic tool in breast cancer. Glycoconjugate Journal. In Press, IF: 1.83
  - Neagu, M., **Piperigkou, Z.,** Karamanou, K., Engin, A.B., Docea, A.O., Constantin, C., Negrei, C., Tsatsakis, A., 2017. Protein bio-corona: critical issue in immune nanotoxicology. Archives of Toxicology, 91(3):1031-1048, IF: 5.98
  - Piperigkou, Z., Karamanou, K., Bouris, P., Skandalis, S.S., Kletsas, D., Theocharis, A.D., Karamanos, N.K., 2016. Estrogen receptor beta as a key player in mediation of functional properties of aggressive breast cancer cells. Matrix Biology J, 56:4-23, Impact factor: 8.14
  - Piperigkou, Z., Mohr, B., Karamanos, N.K., Goette, M. 2016. Shed proteoglycans in the tumor stroma. Cell and Tissue Research, 365:643–655, IF: 3.68
  - Piperigkou, Z., Karamanou, K., Engin, A.B., Gialeli, G., Nikitovic, D., Vynios, D.H., Pavao, M.S.G., Golokhvast, K.S., Shtilman, M.I., Argiris, A., Tsatsakis, A. 2016. Emerging aspects of nanotoxicology in health and disease: from agriculture and food sector to cancer therapeutics. Food and Chemical Toxicology, 91. 42-57, IF: 3.58
  - Magoulas, G., Rigopoulos, A., Piperigkou, Z., Gialeli, C., Karamanos, N.K., Takis, P.G., Troganis, A.N., Chrysanthopoulos, A., Maroulis, G., Papaioannou, D., 2016. Synthesis and antiproliferative activity of two diastereomeric lignanamides serving as dimeric caffeic acid-L-DOPA hybrids. Bioorganic Chemistry, 66; 132–144, IF: 2.42
  - Piperigkou, Z., Karamanou, K., Afratis, N., Bouris, P., Gialeli, C., Belmiro, C., Pavao, M., Vynios, D., 2015. Biochemical and toxicological evaluation of nano-heparins in cell functional properties, proteasome activation and expression of key matrix molecules. Toxicology Letters, 240, 32-42, IF: 3.52
  - Bouris, P., Skandalis, S.S., **Piperigkou, Z.**, Afratis, N., Karamanou, K., Aletras, A.J., Moustakas, A., Theocharis, A.D., Karamanos, N.K., 2015. Estrogen receptor alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of specific matrix effectors and functional properties of breast cancer cells. Matrix Biology J 43, 42-60, IF: 8.14
  - Tsonis, A.I., Afratis, N., Gialeli, C., Ellina, M.I., Piperigkou, Z., Skandalis, S.S., Theocharis, A.D., Tzanakakis, G.N., Karamanos, N.K., 2013. Evaluation of the coordinated actions of estrogen receptors with epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor in the expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans and cell motility in breast cancer cells. FEBS J 280, 2248-2259, IF: 4.25

	H-index = 8 (Scholar Google)
Διεθνή και Εθνικά Ερευνητικά Προγράμματα	<ul> <li>«Προηγμένες Ερευνητικές Δραστηριότητες στη Βιοϊατρική Τεχνολογία &amp; Αγροδιατροφή», Υποέργο «Προηγμένες Ερευνητικές Δραστηριότητες στη Βιοϊατρική Τεχνολογία &amp; Αγροδιατροφή- Δυτική Ελλάδα» - [ΒΙΤΑΔ-ΔΕ], Ε.Π. «Ανταγωνιστικότητα Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία 2014-2020», Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ινστιτούτο Επιστημών Χημικής Μηχανικής (ITE-IEXMH, FORTH/ICE-HT), 2018</li> </ul>
	<ul> <li>Πράξη «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών για μεταπτυχιακές σπουδές δεύτερου κύκλου σπουδών» του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», του ΕΣΠΑ 2014-2020 με τη συγχρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου, 2018</li> </ul>
	<ul> <li>Horizon 2020 Action "Marie Skłodowska-Curie Research and Innovation Staff Exchange (RISE)", Project acronym: GLYCANC, "Matrix glycans as multifunctional pathogenesis factors and therapeutic targets in cancer", 2016-2017</li> </ul>
	<ul> <li>Short-term research grant from the German Academic Exchange Service (DAAD), 2016</li> </ul>
	<ul> <li>Δράση ERASMUS+ κινητικότητα για σπουδές του ακαδημαϊκού έτους 2015-2016</li> </ul>
	<ul> <li>THALES project. Investing in knowledge society through the European Social Fund (NSRF 2007-2013), Project acronym: BioCancerTalk "Intracellular crosstalk between ERα/β, EGF and IGF receptors in development and progression of breast cancer", 2014-2016</li> </ul>
	<ul> <li>Seventh Framework Program (FP7), Project acronym: NanoBarrier, "Extended self-life biopolymers for sustainable and multifunctional food packaging solutions", ITE-IEXMH, FORTH/ICE-HT, 2014- 2015</li> </ul>
Ανακοινώσεις σε διεθνή	Ποοφορικές ανακοινώσεις
και εθνικά συνέδρια	<ul> <li>MicroRNA targeting as a regulatory mechanism of breast cancer cells with different estrogen receptor status, 6<sup>th</sup> FEBS-MPST, Spetses, Greece, 2017</li> </ul>
	<ul> <li>Epigenetic alterations regulate the functional properties of breast cancer cells with different estrogen receptor status. 67<sup>th</sup> Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology Conference, Ioannina, Greece, 2016</li> </ul>
	<ul> <li>MicroRNA targeting as a regulatory mechanism of breast cancer cells with different estrogen receptor status. 2<sup>nd</sup> Matrix Biology Europe Conference, Athens, Greece, 2016</li> </ul>
	<ul> <li>The role of ERβ in regulation of functional properties and gene expression of matrix macromolecules in aggressive breast cancer cells. FEBS Advanced Lecture Course: Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular targets 5<sup>th</sup> FEBS-MPST, Rhodes, Greece, 2015</li> </ul>
	<ul> <li>ERβ as a modulator of functional properties and gene expression of key matrix macromolecules in triple negative breast cancer cells. 3<sup>rd</sup> National Young Scientists Forum of Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, Athens, Greece, 2015</li> </ul>
	<ul> <li>Novel roles of nano-heparins in functional properties, proteasome activation and modulation of matrix macromolecules in cancer, Synthetic &amp; Medicinal Chemistry Symposium, Department of Pharmacy, University of Patras, Greece, 2014</li> </ul>
	<u>Αναρτημένες παρουσιάσεις</u> : 20
Συνέδρια-Σεμινάρια	<ul> <li>3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup>,5<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> FEBS Advanced Lecture Course: Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular targets, 2011, 2013, 2015, 2017, Greece</li> </ul>
	<ul> <li>2<sup>nd</sup> Matrix Biology Europe (MBE) Conference, 2016, Athens, Greece</li> </ul>
	<ul> <li>Internal Retreat conference of Stem Cell Network North Rhine Westphalia, 2016, Akademie Mont- Cenis, Herne, Germany</li> </ul>
	<ul> <li>62<sup>nd</sup>, 63<sup>rd</sup>, 64<sup>th</sup>, 65<sup>th</sup>, 66<sup>th</sup>, 67<sup>th</sup> National Conference of Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, 2011-2016, Greece</li> </ul>
	<ul> <li>Practical Course: Advanced Imaging, Fluorescence &amp; Confocal Microscopy, www.biotargeting.upatras.gr 2015, Patras, Greece</li> </ul>
	<ul> <li>1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> Patras Innovation Quest (IQ), 2014, 2015, Patras Greece</li> </ul>
	· Interdepartmental, Lifelong Learning Program PEGA- Diagnostic and therapeutic approaches of

Αναφορές

citations = 251 (Scholar Google)

	the 21 <sup>st</sup> century, Medical School, University of Crete, Laboratory of Anatomy-Histology-Embryology, Toxicology and Ophthalmology, University of Patras and the Democritus University of Thrace, 2015, Patras, Greece
	<ul> <li>1<sup>st</sup> International Congress of Controlled Release Society (CRS)- Greek local chapter, Aigli Zappeiou, 2015, Athens, Greece</li> </ul>
	<ul> <li>Practical Course: Modern techniques of biochemical analysis, Capillary electrophoresis &amp; FACE analysis, <u>www.biotargeting.upatras.gr</u>, 2015, Patras, Greece</li> </ul>
	<ul> <li>1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> National Young Scientists Forum of Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB), 2013-2015, Greece</li> </ul>
	<ul> <li>16<sup>th</sup> Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry (HSMC), 2015, Patras, Greece</li> </ul>
	<ul> <li>Synthetic &amp; Medicinal Chemistry Symposium, 2014, Department of Pharmacy, University of Patras, Greece</li> </ul>
	<ul> <li>1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> Scientific Meeting of Research Network "Biomedical and Biotechnological Applications focusing on pharmacological targeting of diseases and on applications of biocompatible substances in Medicine", 2010- 2011, Patras- Greece</li> </ul>
	<ul> <li>1<sup>st</sup> Scientific Meeting of Research Network "Osteonet": Osteoarthritis: Challenges and Modern Approaches, 2012, Patras, Greece</li> </ul>
	<ul> <li>9<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, 11<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup> conferences: "Medicinal Chemistry: Design and Development Of Pharmaceutical Products", 2008- 2011, Patras, Greece</li> </ul>
Τιμητικές διακρίσεις και βραβεία	<ul> <li>Poster Prize Award in the 6<sup>th</sup> FEBS-MPST Advanced Lecture Course, Spetses Island, 2017, sponsored by the Matrix Biology Ireland, for the presentation "MicroRNA targeting as a regulatory mechanism of breast can cer cellswith different estrogen receptor status"</li> </ul>
	<ul> <li>Recognized Reviewer Status for reviewing for the journal Food and Chemical Toxicology, 2016</li> </ul>
	<ul> <li>Βραβείο Αριστείας, Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών, ακαδημαϊκά έτη 2007-2008 και 2008-2009</li> </ul>
Υποτροφίες	<ul> <li>Υποτροφία στα πλαίσια προγράμματος GLYCANC "Matrix glycans as multifunctional pathogenesis factors and therapeutic targets in cancer", δράση EU H2020 MSCA RISE-2014, Project ID: 645756, 2016-2017</li> </ul>
	<ul> <li>Υποτροφία του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (FORTH/ ICE-HT) στα πλαίσια συμμετοχής στα διεθνή ερευνητικά προγράμματα NanoBarrier και ΒΙΤΑΔ-ΔΕ, 2011-2015, 2018</li> </ul>
	<ul> <li>Υποτροφία συμμετοχής στο πρόγραμμα ERASMUS+ Exchange Program, 2016</li> </ul>
	<ul> <li>Υποτροφία short-term research grant από το German academic exchange service (DAAD), Host institute: University of Muenster, Germany, 2016</li> </ul>
	<ul> <li>Υποτροφία συμμετοχής στο Διεθνές Συνέδριο 6<sup>th</sup> FEBS Advanced Lecture Course on Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets (6<sup>th</sup> FEBS-MPST), Spetses, Greece, 2017, από την Ελληνική Εταιρία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ)</li> </ul>
	<ul> <li>Υποτροφία μετακίνησης για συμμετοχή στα Πανελλήνια Συνέδρια 64°, 65°, 66°, 67° της Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ), 2014-2017</li> </ul>
Συνδρομές	<ul> <li>Ελληνική Εταιρία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ), 2011-παρόν</li> </ul>
	<ul> <li>Διεθνής Εταιρία Βιολογίας του Εξωκυττάριου Χώρου (ISMB), 2016-παρόν</li> </ul>
	<ul> <li>Γερμανική Εταιρία Βιολογίας του Εξωκυττάριου Χώρου, 2016-παρόν</li> </ul>
	<ul> <li>Ένωση Ελλήνων Χημικών (ΕΕΧ), 2011-παρόν</li> </ul>
Χρήσιμοι Σύνδεσμοι	https://scholar.google.gr/citations?user=11hs3-0AAAAJ&hl=en https://www.linkedin.com/profile/public-profile-settings?trk=prof-edit-edit-public_profile https://www.researchgate.net/profile/Zoi_Piperigkou

## **CURRICULUM VITAE OF THE AUTHOR**

## PERSONAL INFORMATION

EDUCATION AND TRAINING



## Zoi Piperigkou

- 4, Paxon, 26223 Patras
- +306981277945

## 🔀 zoipip@upatras.gr

https://www.researchgate.net/profile/Zoi\_Piperigkou
 https://www.linkedin.com/profile/public-profile-settings?trk=prof-edit-edit-public\_profile
 https://scholar.google.gr/citations?user=11hs3-0AAAJ&hl=en
 Skype zoi.pip

Sex Female | Date of birth 16/07/1989 | Nationality Greek

2014–2018	PhD Degree Department of Chemistry, University of Patras, Patras (Greece)	EQF level 8
	Thesis: "Evaluation of the regulatory mechanisms governing biomolecules expression, function properties and morphological characteristics of breast cancer cells"	onal
2016–2017	Research fellow in EU H2020 MSCA RISE-2014 project GLYCANC "Matrix glycans as multifunctional pathogenesis factors and therapeutic targets in cancer"	
	Serend-ip GmbH (Centre for Nanotechnology) 11, Heisenbergstraße, 48149 Münster (Germany) <u>www.serend-ip.de</u>	
	Training & Practice in nanoscale topometry analyses (nAnostic™) and atomic force microsco	ppy (AFM)
2016	Erasmus+ European Exchange Program	
	University of Münster, Medicine Department, University Medical Center, Münster (Germany) www.uni-muenster.de	
	Part of PhD Thesis: "MicroRNA targeting as a regulatory mechanism of breast cancer cells w different estrogen receptor status"	ith
2011-2013	Master of Science	EQF level 7
	Department of Chemistry, University of Patras, Patras (Greece)	
	Grade A+, 9.72 to 10	
	Thesis: "The role of heparin and nano-heparin derivatives in functional properties and proteas activity in breast cancer cells"	some
2007-2011	Chemistry Degree (4-year undergraduate program)	EQF level 6
	Department of Chemistry, University of Patras, Patras (Greece)	
	Grade A-, 8.14 to 10	
	Thesis: "Evaluation of EGFR- and IGFR- dependent migration of ER $\alpha$ (+) and ER $\beta$ (+) breast cells"	cancer
WORK EXPERIENCE		
0044-0040	Observice	
2011–2018		
	University of Patras, Patras (Greece)	

## 229

- Teaching Biochemistry to undergraduate students of the Department of Chemistry, University of Patras, Greece
  - Participation in preparation & conducting laboratory practice on Biochemistry, Medicinal chemistry, Biology and Microbiology subjects of the undergraduate studies program, Department of Chemistry, University of Patras, Greece

PERSONAL SKILLS					
Mother tongue(s)	Greek				
Other language(s)	UNDERSTANDING		SPEAKING		WRITING
	Listening	Reading	Spoken interaction	Spoken production	
English	C2	C2	C2	C2	C2
		Certificate of excelle	ent knowledge, Univer	sity of Michigan	
German	B1	B1	B1	B1	B1
	Certificate of good knowledge, Goethe Institut				
	Levels: A1 and A2: Basic user - B1 and B2: Independent user - C1 and C2: Proficient user Common European Framework of Reference for Languages				
Communication skills	Excellent commune teaching to under Patras, Greece	nication and organizat graduate students dui	ion skills gained from ing the laboratory p	m academic experie ractice, Chemistry I	ence and from Dept. University of
Organisational / managerial skills	<ul> <li>Leadership (currently co-head in organizing and laboratory experimental design and basic biochemical laboratory training of Biochemistry, Biochemical Analysis &amp; Matrix Pathobiology Research Group (12 members of undergraduate, postgraduate and Ph.D. students), Laboratory of Biochemistry, Department of Chemistry, University of Patras</li> </ul>				
	<ul> <li>Head of the You Advanced Lectu Modeling, 2018,</li> </ul>	ung Scientists' Comr ire Course (ALC) c Patras, Greece, https	nittee and Member on Extracellular Ma ://extracellularmatrix	of the Organizing atrix: Cell Regulati .febsevents.org/	Committee in FEBS on, Epigenetics and
<ul> <li>Member of the Young Scientists Committee in 6<sup>th</sup> FEBS ALC on Matrix Pathobiology, S Molecular Targets, 2017, Spetses, Greece, http://www.febs-mpst2017.upatras.gr/</li> </ul>				biology, Signaling and .gr/	
	<ul> <li>Member of the Organizing Committee in 3<sup>rd</sup> conference of New Scientists of the Hellenic Soci Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB), 2015, Athens, Greece</li> </ul>				he Hellenic Society of
Digital skills	SELF-ASSESSMENT				
	Information processing	Communication	Content creation	Safety	Problem solving

Digital skills - Self-assessment grid

Proficient user

Proficient user

Excellent handling of Microsoft Office™ tools and Microcal Origin, GraphPad Prism και Xara Photo & Graphic Designer software

Proficient user

Independent user

Driving licence B

Basic user

#### ADDITIONAL INFORMATION

**Publications** 

- Karamanos N.K., Piperigkou Z., Theocharis A.D., Hideto W., Franchi M., Baud S., Brezillon S., Götte M., Passi A., Vigetti D., Ricard-Blum S., Sanderson R., Neil T., Iozzo R.V., 2018. Proteoglycans: from chemical structure diversity to multifunctional cell regulation and therapeutics. Chemical Reviews (ACS Publications). To be submitted. Impact factor (IF): 47.93
  - Götte M., Spyrou A., **Piperigkou Z.**, Karamanos N.K., Forsberg-Nilsson K., 2018. Proteoglycans and Glycosaminoglycans – multifunctional regulators of cancer progression. Cancer Cell. To be submitted. IF: 23,21
  - Kyriakopoulou K., Kefali E., Piperigkou Z., Karamanos N.K., 2018. Advances in targeting epidermal growth factor receptor signaling pathway in mammary cancer: implications of estrogen receptors, epigenetics and extracellular matrix effectors. Cellular Signalling. To be submitted. IF: 3.94
  - Piperigkou Z., Theocharis A.D., Karamanos N.K. 2017. Insights into the key roles of epigenetics in matrix macromolecules-associated wound healing. Advanced Drug Delivery Reviews, 129:16-36. IF: 11.76
  - Piperigkou Z., Manou D., Karamanou K., Theocharis A.D., 2018. Strategies to Target Matrix Metalloproteinases as Therapeutic Approach in Cancer. In: Cal S., Obaya A. (eds) Proteases and Cancer. Methods in Molecular Biology, vol 1731. Humana Press, New York, NY
  - Piperigkou Z., Franchi M., Götte M., Karamanos N.K., 2017. Estrogen receptor beta as epigenetic mediator of miR-10b and miR-145 in mammary cancer. Matrix Biology J, 64:94-111, [Impact factor (IF): 8.14, Featured in Faculty 1000 (F1000Prime) https://f1000.com/prime/726362790]
  - Karamanou, K., Franchi, M., Piperigkou, Z., Perreau, C., Maquart, F.X., Vynios, D.H., Brézillon, S., 2017. Lumican effectively regulates the estrogen receptors-associated functional properties of breast cancer cells, expression of matrix effectors and epithelial-tomesenchymal transition. Nature Scientific Reports, 23;7:45138, IF: 5.23
  - Afratis, N., Karamanou, K., Piperigkou, Z., Karamanos, N.K. 2017. The role of heparins and nano-heparins as therapeutic tool in breast cancer. Glycoconjugate Journal. In Press, IF: 1.83
  - Neagu, M., **Piperigkou, Z.,** Karamanou, K., Engin, A.B., Docea, A.O., Constantin, C., Negrei, C., Tsatsakis, A., 2017. Protein bio-corona: critical issue in immune nanotoxicology. Archives of Toxicology, 91(3):1031-1048, IF: 5.98
  - Piperigkou, Z., Karamanou, K., Bouris, P., Skandalis, S.S., Kletsas, D., Theocharis, A.D., Karamanos, N.K., 2016. Estrogen receptor beta as a key player in mediation of functional properties of aggressive breast cancer cells. Matrix Biology J, 56:4-23, Impact factor: 8.14
  - Piperigkou, Z., Mohr, B., Karamanos, N.K., Goette, M. 2016. Shed proteoglycans in the tumor stroma. Cell and Tissue Research, 365:643–655, IF: 3.68
  - Piperigkou, Z., Karamanou, K., Engin, A.B., Gialeli, G., Nikitovic, D., Vynios, D.H., Pavao, M.S.G., Golokhvast, K.S., Shtilman, M.I., Argiris, A., Tsatsakis, A. 2016. Emerging aspects of nanotoxicology in health and disease: from agriculture and food sector to cancer therapeutics. Food and Chemical Toxicology, 91. 42-57, IF: 3.58
  - Magoulas, G., Rigopoulos, A., Piperigkou, Z., Gialeli, C., Karamanos, N.K., Takis, P.G., Troganis, A.N., Chrysanthopoulos, A., Maroulis, G., Papaioannou, D., 2016. Synthesis and antiproliferative activity of two diastereomeric lignanamides serving as dimeric caffeic acid-L-DOPA hybrids. Bioorganic Chemistry, 66; 132–144, IF: 2.42
  - Piperigkou, Z., Karamanou, K., Afratis, N., Bouris, P., Gialeli, C., Belmiro, C., Pavao, M., Vynios, D., 2015. Biochemical and toxicological evaluation of nano-heparins in cell functional properties, proteasome activation and expression of key matrix molecules. Toxicology Letters, 240, 32-42, IF: 3.52
  - Bouris, P., Skandalis, S.S., **Piperigkou, Z.**, Afratis, N., Karamanou, K., Aletras, A.J., Moustakas, A., Theocharis, A.D., Karamanos, N.K., 2015. Estrogen receptor alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of specific matrix effectors and functional properties of breast cancer cells. Matrix Biology J 43, 42-60, IF: 8.14
  - Tsonis, A.I., Afratis, N., Gialeli, C., Ellina, M.I., Piperigkou, Z., Skandalis, S.S., Theocharis, A.D., Tzanakakis, G.N., Karamanos, N.K., 2013. Evaluation of the coordinated actions of estrogen receptors with epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor in the expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans and cell motility in breast cancer cells. FEBS J 280, 2248-2259, IF: 4.25

Citations

citations = 251 (Scholar Google) H-index = 8 (Scholar Google)

European and National Research Projects	•	Project "Advanced Research Activities in Biomedical and Agro alimentary Technologies" implemented under the "Action for the Strategic Development on the Research and Technological Sector", funded by the Operational Programme "Competitiveness, Entrepreneurship and Innovation" (NSRF 2014-2020) and co-financed by Greece and the European Union (European Regional Development Fund), Foundation of Research and Technology-Hellas, Institute of Chemical Engineering Sciences (FORTH/ICE-HT), 2018
	•	Action "SCHOLARSHIPS PROGRAM FOR SECOND CYCLE POSTGRADUATE STUDIES" of the Operational Program "Human Resources Development, Education and Lifelong Learning", of NSRF 2014-2020 by the co-funding of the European Social Fund
		Horizon 2020 Action "Marie Skłodowska-Curie Research and Innovation Staff Exchange (RISE)", Project acronym: GLYCANC, "Matrix glycans as multifunctional pathogenesis factors and therapeutic targets in cancer", 2016-2017
	•	Short-term research grant from the German Academic Exchange Service (DAAD), 2016
	•	Δράση ERASMUS+ κινητικότητα για σπουδές του ακαδημαϊκού έτους 2015-2016
	•	THALES project. Investing in knowledge society through the European Social Fund (NSRF 2007-2013), Project acronym: BioCancerTalk "Intracellular crosstalk between ER $\alpha/\beta$ , EGF and IGF receptors in development and progression of breast cancer", 2014-2016
	•	Seventh Framework Program (FP7), Project acronym: NanoBarrier, "Extended self-life biopolymers for sustainable and multifunctional food packaging solutions", ITE-IEXMH, FORTH/ICE-HT, 2014-2015
Honors and awards	•	Poster Prize Award in the 6 <sup>th</sup> FEBS-MPST Advanced Lecture Course, Spetses Island, 2017, sponsored by the Matrix Biology Ireland, for the presentation "MicroRNA targeting as a regulatory mechanism of breast cancer cellswith different estrogen receptor status"
	•	Recognized Reviewer Status for reviewing for the Food and Chemical Toxicology journal, 2016
	·	Excellent award, State Scholarships Foundation, academic years 2007-2008 και 2008-2009
Conferences/ Seminars/ Courses		3 <sup>rd</sup> , 4 <sup>th</sup> ,5 <sup>th</sup> , 6 <sup>th</sup> FEBS Advanced Lecture Course: Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular targets, 2011, 2013, 2015, 2017, Greece
	•	2 <sup>nd</sup> Matrix Biology Europe (MBE) Conference, 2016, Athens, Greece
	·	Internal Retreat conference of Stem Cell Network North Rhine Westphalia, 2016, Akademie Mont-Cenis, Herne, Germany
	·	$62^{nd},\ 63^{rd},\ 64^{th},\ 65^{th},\ 66^{th},\ 67^{th}$ National Conference of Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, 2011-2016, Greece
	·	Practical Course: Advanced Imaging, Fluorescence & Confocal Microscopy, www.biotargeting.upatras.gr 2015, Patras, Greece
	•	1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> Patras Innovation Quest (IQ), 2014, 2015, Patras Greece
	•	Interdepartmental, Lifelong Learning Program PEGA- Diagnostic and therapeutic approaches of the 21 <sup>st</sup> century, Medical School, University of Crete, Laboratory of Anatomy-Histology-Embryology, Toxicology and Ophthalmology, University of Patras and the Democritus University of Thrace, 2015, Patras, Greece
	·	1 <sup>st</sup> International Congress of Controlled Release Society (CRS)- Greek local chapter, Aigli Zappeiou, 2015, Athens, Greece
	·	Practical Course: Modern techniques of biochemical analysis, Capillary electrophoresis & FACE analysis, www.biotargeting.upatras.gr, 2015, Patras, Greece
	•	1 <sup>st</sup> , 2 <sup>nd</sup> , 3 <sup>rd</sup> National Young Scientists Forum of Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB), 2013-2015, Greece
	•	16th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry (HSMC), 2015, Patras, Greece
	·	Synthetic & Medicinal Chemistry Symposium, 2014, Department of Pharmacy, University of Patras, Greece
	•	1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> Scientific Meeting of Research Network "Biomedical and Biotechnological Applications focusing on pharmacological targeting of diseases and on applications of biocompatible substances in Medicine", 2010- 2011, Patras- Greece
	·	1 <sup>st</sup> Scientific Meeting of Research Network "Osteonet": Osteoarthritis: Challenges and Modern Approaches, 2012, Patras, Greece

• 9th, 10th, 11th, 12th conferences: "Medicinal Chemistry: Design and Development Of Pharmaceutical Products", 2008- 2011, Patras, Greece

Presentations in National and International Conferences Oral Presentations

 MicroRNA targeting as a regulatory mechanism of breast cancer cells with different estrogen receptor status, 6<sup>th</sup> FEBS-MPST, Spetses, Greece, 2017

Epigenetic alterations regulate the functional properties of breast cancer cells with different estrogen receptor status. 67<sup>th</sup> Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology Conference, Ioannina, Greece, 2016

• MicroRNA targeting as a regulatory mechanism of breast cancer cells with different estrogen receptor status. 2<sup>nd</sup> Matrix Biology Europe Conference, Athens, Greece, 2016

• The role of ER $\beta$  in regulation of functional properties and gene expression of matrix macromolecules in aggressive breast cancer cells. FEBS Advanced Lecture Course: Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular targets 5<sup>th</sup> FEBS-MPST, Rhodes, Greece, 2015

• ER $\beta$  as a modulator of functional properties and gene expression of key matrix macromolecules in triple negative breast cancer cells. 3<sup>rd</sup> National Young Scientists Forum of Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, Athens, Greece, 2015

 Novel roles of nano-heparins in functional properties, proteasome activation and modulation of matrix macromolecules in cancer, Synthetic & Medicinal Chemistry Symposium, Department of Pharmacy, University of Patras, Greece, 2014

Poster Presentations: 20

- Scholarships Scholarship during the project GLYCANC "Matrix glycans as multifunctional pathogenesis factors and therapeutic targets in cancer", action EU H2020 MSCA RISE-2014, Project ID: 645756, 2016-2017
  - Scholarships from FORTH/ICE-HT during international research projects NanoBarrier and BITAD-DE, 2011-2015, 2018
  - Scholarship for participation in ERASMUS+ Exchange Program, 2016
  - Short-term research grant from German academic exchange service (DAAD), Host institute: University of Muenster, Germany, 2016
  - Travel grants for participation in the international conference 6<sup>th</sup> FEBS Advanced Lecture Course on Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets, Spetses, Greece, 2017, from Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB)
  - Travel grants for participation in Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB) Conferences (64<sup>th</sup>, 65<sup>th</sup>, 66<sup>th</sup>, 67<sup>th</sup>), 2014-2017

#### **Memberships**

- Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2011-present
  - German Society for Matrix Biology, 2016-present
  - International Society for Matrix Biology, 2016-present
  - Association of Greek Chemists, 2011-present

## Useful links • https://scholar.google.gr/citations?user=11hs3-0AAAJ&hl=en

- https://www.linkedin.com/profile/public-profile-settings?trk=prof-edit-edit-public\_profile
- https://www.researchgate.net/profile/Zoi\_Piperigkou

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ



## SCHOOL OF NATURAL SCIENCES

## DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Section of Organic Chemistry, Biochemistry and Natural Products

# EXTENDED ABSTRACT OF THE DOCTORAL DISSERTATION

## Evaluation of the regulatory mechanisms governing biomolecules expression, functional properties and morphological characteristics of breast cancer cells

Zoi Piperigkou

Chemist MSc

Supervisor – Nikos K. Karamanos

Patras, 2018

University of Patras, Department of Chemistry

[Zoi Piperigkou]

© [2018] – All rights reserved

PhD Thesis has been co-financed by the Action "SCHOLARSHIPS PROGRAM FOR SECOND CYCLE POSTGRADUATE STUDIES" of the Operational Program "Human Resources Development, Education and Lifelong Learning", of NSRF 2014-2020 by the co-funding of the European Social Fund.



This PhD Thesis has been conducted in the research Laboratory of Biochemistry, the Biochemistry, Biochemical Analysis and Matrix Pathobiology Research Group, Section of Organic Chemistry, Biochemistry and Natural Products, Department of Chemistry, University of Patras.

Part of this PhD Thesis has been conducted in the research Laboratory of Professor PD Dr. rer. nat. Martin Götte, University Medical Centre of Münster, University of Münster, Germany, during the ERASMUS+ studies exchange program (2016-2017).

## The Advisory Committee

NIKOLAOS K. KARAMANOS, Professor (Supervisor)
 Department of Chemistry, University of Patras
 ACHILLEAS D. THEOCHARIS, Associate Professor
 Department of Chemistry, University of Patras
 DIMITRIOS KLETSAS, Director
 Institute of Biosciences and Applications (IBA), NCSR "Demokritos", Athens

## **PhD Examination Committee**

NIKOLAOS K. KARAMANOS, Professor (Supervisor)
 Department of Chemistry, University of Patras
 ACHILLEAS D. THEOCHARIS, Associate Professor
 Department of Chemistry, University of Patras
 DIMITRIS KLETSAS, Director
 Institute of Biosciences and Applications (IBA), NCSR "Demokritos", Athens
 MARTIN GÖTTE, Professor Dr. rer. nat.
 University of Münster, University Medical Center of Münster, Germany
 DEMITRIOS H. VYNIOS, Professor
 Department of Chemistry, University of Patras
 EVANGELIA PAPADIMITRIOY, Professor
 Department of Pharmacy, University of Patras
 SYRIDON S. SKANDALIS, Assistant Professor
 Department of Chemistry, University of Patras

Part of the results of this doctoral dissertation have been published in international scientific peer-reviewed journals and have been presented as oral or/and poster presentations in national and international scientific conferences.

## **Publications in peer-reviewed journals**

- III. Piperigkou, Z., Franchi, M., Götte, M., Karamanos, N.K., 2017. Estrogen receptor beta as epigenetic mediator of miR-10b and miR-145 in mammary cancer. *Matrix Biology J*, 64:94-111, [Impact factor (IF): 8.14, Featured in Faculty 1000 (F1000Prime) - https://f1000.com/prime/726362790]
- IV. Piperigkou, Z., Karamanou, K., Bouris, P., Skandalis, S.S., Kletsas, D., Theocharis, A.D., Karamanos, N.K., 2016. Estrogen receptor beta as a key player in mediation of functional properties of aggressive breast cancer cells. *Matrix Biology J*, 56:4-23, (*IF:* 8.14)

## Oral presentations in scientific conferences

- MicroRNA targeting as a regulatory mechanism of breast cancer cells with different estrogen receptor status. 6<sup>th</sup> FEBS Advanced Lecture Course: Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular targets (FEBS-MPST), Spetses, Greece, 2017
- Epigenetic alterations regulate the functional properties of breast cancer cells with different estrogen receptor status. 67<sup>th</sup> Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB) Conference, Ioannina, Greece, 2016
- MicroRNA targeting as a regulatory mechanism of breast cancer cells with different estrogen receptor status. 2<sup>nd</sup> Matrix Biology Europe (MBE) Conference, Athens, Greece, 2016
- The role of ER $\beta$  in regulation of functional properties and gene expression of matrix macromolecules in aggressive breast cancer cells. 5<sup>th</sup> FEBS-MPST, Rhodes, Greece, 2015
- ERβ as a modulator of functional properties and gene expression of key matrix macromolecules in triple negative breast cancer cells. 3<sup>rd</sup> National Young Scientists Forum of HSBMB, Athens, Greece, 2015

Additional publications in peer-reviewed journals and book chapters during the doctoral dissertation

- Karamanos N.K., Piperigkou Z., Theocharis A.D., Hideto W., Franchi M., Baud S., Brezillon S., Götte M., Passi A., Vigetti D., Ricard-Blum S., Sanderson R., Neil T., Iozzo R.V. (2018) Proteoglycans: from chemical structure diversity to multifunctional cell regulation and therapeutics. *Chemical Reviews*. To be submitted. (*IF: 47.93*)
- Götte M., Spyrou A., Piperigkou Z., Karamanos N.K., Forsberg-Nilsson K. (2018) Proteoglycans and Glycosaminoglycans – multifunctional regulators of cancer progression. *Cancer Cell*. To be submitted. (*IF: 23.21*)
- Kyriakopoulou K., Kefali E., Piperigkou Z., Karamanos N.K. (2018) Advances in targeting epidermal growth factor receptor signaling pathway in mammary cancer: implications of estrogen receptors, epigenetics and extracellular matrix effectors. *Cellular Signalling*. To be submitted. (*IF: 3.94*)
- Piperigkou Z., Manou D., Karamanou K., Theocharis A.D. (2018) Strategies to Target Matrix Metalloproteinases as Therapeutic Approach in Cancer. In: Cal S., Obaya A. (eds) Proteases and Cancer. *Methods in Molecular Biology*, vol 1731. Humana Press, New York, NY
- Piperigkou Z., Theocharis A.D., Karamanos N.K. (2017) Insights into the key roles of epigenetics in matrix macromolecules-associated wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 129:16-36. (*IF: 11.76*)
- Karamanou K., Franchi M., Piperigkou Z., Perreau C., Maquart F.X., Vynios D.H., Brézillon S. (2017) Lumican effectively regulates the estrogen receptors-associated functional properties of breast cancer cells, expression of matrix effectors and epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature Scientific Reports*, 23(7):45138. (*IF: 5.23*)
- Afratis N., Karamanou K., Piperigkou Z., Vynios D.H., Theocharis A.D. (2017) The role of heparins and nano-heparins as therapeutic tool in breast cancer. *Glycoconjugate Journal*. 34(3):299-307. (*IF: 1.83*)
- Neagu M., Piperigkou Z., Karamanou K., Engin A.B., Docea A.O., Constantin C., Negrei C., Tsatsakis A. (2017) Protein bio-corona: critical issue in immune nanotoxicology. *Archives of Toxicology*, 91(3):1031-1048. (*IF:* 5.98)

- Piperigkou Z., Mohr B., Karamanos N.K., Götte M. (2016) Shed proteoglycans in the tumor stroma. *Cell and Tissue Research*, 365:643–655. (*IF: 3.68*)
- Piperigkou Z., Karamanou K., Engin A.B., Gialeli G., Nikitovic D., Vynios D.H., Pavao M.S.G., Golokhvast K.S., Shtilman M.I., Argiris A., Tsatsakis A. (2016) Emerging aspects of nanotoxicology in health and disease: from agriculture and food sector to cancer therapeutics. *Food and Chemical Toxicology*, 91:42-57. (*IF: 3.58*)
- Magoulas G., Rigopoulos A., Piperigkou Z., Gialeli C., Karamanos N.K., Takis P.G., Troganis A.N., Chrissanthopoulos A., Maroulis G., Papaioannou D. (2016) Synthesis and antiproliferative activity of two diastereomeric lignanamides serving as dimeric caffeic acid-L-DOPA hybrids. *Bioorganic Chemistry*, 66:132–144. (*IF: 2.42*)
- Piperigkou Z., Karamanou K., Afratis N., Bouris P., Gialeli C., Belmiro C., Pavao M.S.G., Vynios D.H. (2015) Biochemical and toxicological evaluation of nano-heparins in cell functional properties, proteasome activation and expression of key matrix molecules. *Toxicology Letters*, 240:32-42. (*IF: 3.52*)
- Bouris P., Skandalis S.S., Piperigkou Z., Afratis N., Karamanou K., Aletras A.J., Moustakas A., Theocharis A.D., Karamanos N.K. (2015) Estrogen receptor alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of specific matrix effectors and functional properties of breast cancer cells. *Matrix Biology J*, 43:42-60. (*IF*: 8.14)

## Awards – Scholarships

- Poster Prize Award in the 6<sup>th</sup> FEBS-MPST Advanced Lecture Course, Spetses Greece, Sponsored by the Matrix Biology Ireland, 2017
- Recognized Reviewer Status for reviewing for the *Food and Chemical Toxicology Journal*, 2016
- Travel grant for participation in the international conference 6<sup>th</sup> FEBS-MPST Advanced Lecture Course, Spetses, Greece, from HSBMB, 2017
- Travel grant for participation in the international conference 2<sup>nd</sup> Matrix Biology Europe (MBE) Conference, Athens, Greece, from German Society of Molecular Biology (DGMB), 2016

• Travel grants for participation in the international conferences of HSBMB, 2014-2017

# Participation in national and international research programs, during the doctoral dissertation

- "Advanced Research Activities in Biomedical and Agro alimentary Technologies" (MIS 5002469) which is implemented under the "Action for the Strategic Development on the Research and Technological Sector", funded by the Operational Programme "Competitiveness, Entrepreneurship and Innovation" (NSRF 2014-2020) and co-financed by Greece and the European Union (European Regional Development Fund), Foundation for Research and Technology, Hellas, Institute of Chemical Engineering Sciences (FORTH/ICE-HT), 2018
- Action "Scholarships program for second cycle postgraduate studies" of the Operational Program "Human Resources Development, Education and Lifelong Learning", of NSRF 2014-2020 by the co-funding of the European Social Fund, 2018
- Horizon 2020 Action "Marie Skłodowska-Curie Research and Innovation Staff Exchange (RISE)", Project acronym: GLYCANC, "Matrix glycans as multifunctional pathogenesis factors and therapeutic targets in cancer", 2016-2017
- Short-term research grant from the German Academic Exchange Service (DAAD), 2016
- Action ERASMUS+ exchange program for studies, academic year, 2015-2016
- THALES project. Investing in knowledge society through the European Social Fund (NSRF 2007-2013), Project acronym: BioCancerTalk "Intracellular crosstalk between ERα/β, EGF and IGF receptors in development and progression of breast cancer", 2014-2016
- Seventh Framework Program (FP7), Project acronym: NanoBarrier, "Extended self-life biopolymers for sustainable and multifunctional food packaging solutions", ITE-IEXMH, FORTH/ICE-HT, 2014-2015

Abstract – Estrogen receptors (ERs) have pivotal roles in breast cancer growth and progression. Even though the contribution of  $ER\alpha$  in the modulation of breast cancer cells' behavior is thoroughly studied, the biological functions of its isoform,  $ER\beta$ , are less elucidated. In the present doctoral thesis, we demonstrated that ER $\beta$  suppression in the highly aggressive, ERβ-positive MDA-MB-231 breast cancer cells (shERβ MDA-MB-231) resulted in profound phenotypic changes, inhibition of EMT process and major changes in the properties as well as in gene and protein expression levels of certain functional matrix components of breast cancer cells in a 17-β-estradiol (E2)independent manner. As observed by scanning electron microscopy, ERß suppression strongly affects the morphology of shER $\beta$  MDA-MB-231 cells, which is followed by downregulated expression levels of the mesenchymal markers fibronectin and vimentin, whereas it increases the expression levels of epithelial marker E-cadherin and cell-cell junctions. These alterations are followed by reduced levels of cell functional properties that promote the aggressiveness of these cells, such as proliferation, migration, spreading capacity, invasion and adhesion. Notably, ERB suppression reduces the migration of MDA-MB-231 breast cancer cells via EGFR/IGF-IR and JAK/STAT signaling pathways. Moreover, our findings revealed that  $ER\beta$  has a crucial role in modulation of gene and protein expression of several matrix mediators, including the transmembrane PGs syndecan-1/-2/-4 and intracellular serglycin, several MMPs, plasminogen activation system components and receptor tyrosine kinases. These data clearly demonstrate that ER $\beta$  plays a crucial role in mediating cell behavior and ECM composition of the highly aggressive MDA-MB-231 cells and it opens a new area of research to further understand its role and to improve pharmaceutical targeting of the non-hormone-dependent breast cancer.

The epigenetic alterations are responsible for the ability of the tumor cells to metastasize. In the present study, we demonstrated that ER status is associated with distinct miRNA expression profiles in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells, and that mainly miR-10b (oncogenic miRNA) and miR-200b (EMT inducer) are the key regulators of MDA-MB-231 cell behavior. Notably, the expression profiles of these miRNAs are mediated through EGFR/IGF-IR crosstalk with E2. Moreover, growing ER $\alpha$ -positive, MCF-7, and ER $\beta$ -positive, MDA-MB-231, cells in estrogen-free medium resulted in a diverse impact on miRNA expression and the behavior of these cells, suggesting the specific effect of E2 on the miRNAs expression profile, depending on the ER status of breast cancer cells. Specifically, ER $\beta$  suppression in MDA-MB-231

breast cancer cells results in significant changes in the expression profiles of specific miRNAs that regulate breast cancer progression, including miR-10b, miR-200b and miR-145 (tumor-suppressive miRNA). Enhanced miR-10b expression or miR-145 silencing in shER<sup>β</sup> MDA-MB-231 cells revealed that these miRNAs can regulate the functional properties, EMT program and expression of major ECM components known as modulators of breast cancer aggressiveness. Our data pinpointed that miR-10b is strongly implicated in the regulation of functional properties, expression of EMT markers and ERK1/2 signaling in shER $\beta$  MDA-MB-231 cells, thus affecting ECM composition and subsequently increasing the aggressiveness of these cells. Syndecan-1 and the proteolytic milieu macromolecules, especially MMP2, MMP7 and MMP9, are the most affected among ECM macromolecules. Accordingly, the inhibition of miR-145 expression significantly increased the aggressiveness of shERβ MDA-MB-231 cells and induced EMT. Furthermore, miR-145 silencing resulted in striking changes in gene and protein expression of major ECM mediators, such as HER2 and several MMPs, whereas it significantly increased the phosphorylated levels of ERK1/2 kinases in these cells, suggesting the crucial role of miR-145 in this signaling pathway.

In conclusion, these novel data suggest that the alterations in cell behavior and in ECM composition caused by ER $\beta$  suppression in MDA-MB-231 cells are closely related to certain epigenetic miRNA-induced alterations. Targeting the ER $\alpha/\beta$ -regulated miR-10b, miR-200b and miR-145 serves as a promising tool for early diagnosis and pharmaceutical targeting in aggressive, non-hormone-dependent breast cancer.

*Keywords* – Breast cancer; Estrogen receptors; Estrogen receptor beta; microRNAs; Epithelial-to-mesenchymal-transition; Extracellular matrix; Cellular signaling; Matrix metalloproteinases; Proteoglycans

## Introduction

The importance of ERs in breast cancer progression and matrix compositionmolecular and cellular aspects: Breast cancer is a complex and heterogeneous malignancy accounting for the second leading cause of cancer death among women [1, 2]. Estrogens have pivotal roles in the growth, development and progression of breast cancer. There are two genetically distinct and functional estrogen receptors, ERa and ERβ, belonging to the superfamily of nuclear receptors for steroid/thyroid hormones. The structural differences between the two ERs indicate that they serve distinct actions (Fig. 3) [3]. ERs are capable to trigger gene transcription by binding to specific estrogen response elements (ERE) or acting themselves as coactivators of transcription factors (i.e. genomic mechanism). It should be noted that the cellular effects of estrogens are also influenced by membrane- or cytoplasm-initiated responses (i.e. non-genomic mechanism) (Fig. 4). ERs are among the markers driving treatment decisions. ER status categorizes breast tumors in the following groups: ERa-positive and HER2-negative with a low or intermediate differentiation grade (luminal A); ERa-positive and HER2negative with a high differentiation grade (luminal B); aggressive type of HER2positive and triple-negative breast cancer (ERa-, PR- and HER2-negative) [4]. ERs can be modified by extracellular signals, such as growth factors and chemokines, acting independently from estrogens. The precise biological role of ER $\alpha$  in breast cancer is well characterized and its presence is of great significance for the classification, prognosis and therapeutic approaches in this malignancy. The progression of the disease is slower in patients with ERa-positive tumors, whereas ERa-negative tumors are more likely to metastasize [5]. Moreover, it is well established that interactions among cancer cells and tumor microenvironment are in a dynamic interplay and are regulated by extracellular matrix (ECM).

ECM is a dynamic scaffold (Fig. 5), consisting of a variety of functional components, such as proteoglycans (PGs) and glycosaminoglycans (GAGs) (Fig. 6), glycoproteins and proteinases (Fig. 8) [6, 7]. This network provides structural stability, but could also mediate tumor development and progression through interactions between its macromolecules [8]. To note, alterations in the expression of matrix components result in the reorganization of ECM, thus affecting its ability to regulate several important functions of cancer cells, such as proliferation, migration, adhesion and invasion (Fig. 7) [9-11]. Furthermore, the expression of matrix macromolecules and membrane

receptors is affected by ERs (i.e. crosstalk with EGFR/IGF-IR, Fig. 9), suggesting a critical role of endocrine regulation for the tumor microenvironment and consequently the functional properties of breast cancer cells [12-14].

Cancer progression involves different stages, including tumor growth, invasion, metastasis and angiogenesis. During breast cancer progression, cells become generally more aggressive and are characterized by cytoskeleton rearrangement, changes in cell shape and organization, loss of cell-cell adhesion junctions and by the appearance of mesenchymal characteristics [15]. These changes lead to increased invasion ability, migratory capacity and resistance to apoptosis and as a result cells undergo epithelial-to-mesenchymal-transition (EMT) [16]. Under certain conditions, it is possible for differentiated cancer cells to regain polarity and establish more cell-cell adhesion contacts. This transition is characterized by the down-regulation of mesenchymal markers and transcriptional factors, such as vimentin and Snail, followed by the up-regulation of epithelial markers, such as E-cadherin [17, 18].

ERs can be modified by extracellular signals, such as growth factors, acting also independently from estrogens. Studies have shown that ER $\alpha$  signaling can directly regulate the EMT program [19], while the majority of ER $\alpha$ -positive breast tumors develop gradually resistance to anti-estrogenic treatments [20]. We have recently demonstrated that the induced loss of ER $\alpha$  in MCF-7 epithelial breast cancer cells with low metastatic potential results in EMT, striking changes in functional breast cancer cells' properties as well as in expression patterns of certain ECM effectors [21]. On the other hand, ER $\beta$  isoforms regulate expression of specific genes that are implicated in the modulation of cell proliferation and apoptosis [22]. Several attempts have been made for development of biological tools in order to address the impact of ER $\beta$  in breast cancer cells development, in order to validate its diagnostic potential [23]. However, the precise biological functions of ER $\beta$  and its predictive importance in aggressive breast cancer still remains a challenge.

*The relationship of ERs with certain miRNAs, ECM and functional cancer cell properties:* The ability of cancer cells to metastasize depends on the genetic and epigenetic modifications that they undergo. Of particular interest in the understanding of cancer cell behavior is the field of microRNAs (miRNAs), which have an important role in post-transcriptional regulation of a wide range of numerous cellular processes. They are endogenous noncoding RNA molecules, which have an important role in post-

transcriptional regulation of a wide range of numerous cellular processes. They are endogenous small ncRNAs molecules, 17-25 nucleotides long, which have an important role in post-transcriptional regulation of a wide range of cellular processes [24]. Interestingly, more than 60% of protein-coding mRNAs may be targets of miRNAs as indicated by bioinformatics predictions, thus participating in various signal transduction pathways both in physiological and pathological conditions [25, 26]. The miRNA processing pathway has long been viewed as linear and universal to all mammalian miRNAs. This canonical maturation cascade includes the production of the 70nucleotide primary miRNA (pri-miRNA) transcript, its cleavage to the precursor hairpin (pre-miRNA), transfer to the cytoplasm and finally the cleavage of the pre-miRNA to its mature length. The functional strand of the mature miRNA is loaded together with Argonaute proteins into the RNA-induced silencing complex (RISC), where it guides RISC to target mRNAs [27-30]. Depending on the complementarity, miRNAs could induce mRNA degradation via the RNA-induced silencing complex, translational repression, or total inhibition of mRNA translation (Fig. 10) [31, 32].

Differentiated miRNA expression is associated with cell proliferation, resistance to apoptosis, differentiation, immune response and cancer progression. Moreover, miRNAs are responsible for the direct regulation EMT and the expression of ECM components and ERs (Fig. 11) [33]. In breast cancer, overexpression of the transmembrane heparan sulfate proteoglycan syndecan-1, a predicted target of miR-10b, correlates with poor clinical outcome [34, 35]. Therefore, miRNA-dependent modulation of the ECM and its cellular receptors has emerged as a novel mechanism of regulating numerous matrix-dependent processes and have been proposed as a promising target for the development of novel therapeutic approaches for several diseases, including cancer [36, 37]. During the covalent

conjugation of miRNAs with their carrier, the cargo is released in the target cell through hydrolysis or reduction. The greatest advantage of miRNA therapy is the high biological half-lives of miRNA mimics or anti-miRs inside the cells, providing their functions even when they are absent from the plasma. miRNA therapy has been introduced as the future challenge for clinical applications. Viral vehicles show improved transfection efficiency of incorporating miRNAs; however, they are characterized by increased cytotoxicity and immune response. On the other hand, non-viral miRNA delivery systems are characterized by lower toxicity and immunogenicity, increased cellular uptake, water solubility, resistance to endonucleases, and phagocytosis. Several non-viral delivery systems have been designed and are widely used in targeting approaches and clinical trials, including: *i*) liposomes [i.e. Lipofectamine (Invitrogen), DharmaFECT (Dharmacon), RNAi-MAX (Invitrogen), SilentFECT (Bio-Rad) and SiPORT (Invitrogen)], *ii*) polymers (i.e. poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA), poly-amidoamine (PAMAM), poly-ethylenimine (PEI) and chitosan) and *iii*) inorganic miRNA vesicles [i.e. Au nanoparticles (NPs), SiO<sub>2</sub>-NPs and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs]. Nanosystems designed and used to transfer miRNAs and the consequent ECM regulation, are a major challenge for the development of innovative therapeutic approaches to develop and improve safe and efficient miRNA vehicles for diagnosis and treatmentof several pathologies, including cancer.

## **Main Goals and Objectives**

The complex cellular interplay within the tumor microenvironment is a significant factor for the matrix re-organization, cancer cell growth, migration and invasion. Estrogens and their receptors (ERs) have pivotal role in the development and progression of breast cancer, the second leading cause of cancer death among women. Even though the contribution of ER $\alpha$  in the modulation of breast cancer cells' properties and matrix composition is thoroughly studied, the biological functions of its isoform, ER $\beta$ , are less elucidated. In earlier studies, we demonstrated the molecular basis under re-organization of ECM that seems to be influenced by the action of estrogens and their receptors in breast cancer [10, 38]. Moreover, we have recently demonstrated that the induced loss of ER $\alpha$  in MCF-7 epithelial breast cancer cells results in EMT, striking changes in functional breast cancer cells' properties as well as in expression patterns of certain ECM effectors [21]. Therefore, the main goal of this study is to evaluate the role of ER $\beta$ , which is an integral component of the highly aggressive breast cancer cells MDA-MB-231, on functional cell properties and expression of signaling mediators and major ECM components that implicated in cancer progression.

The ability of cancer cells to disseminate and metastasize strongly depends on genetic and epigenetic alterations following the extracellular signals that they receive. Differentiated miRNA expression has been correlated with alterations in cell proliferation, resistance to apoptosis, differentiation, inflammation and cancer progression. Furthermore, miRNAs may directly regulate the expression profiles of major ECM components, EMT program as well as ERs expression. Nonetheless, little is known regarding the regulatory role of ERs in miRNAs expression. The next goal of this study is therefore to evaluate the role of miRNAs in the regulation of morphological characteristics, functional properties, expression of signaling molecules and ECM composition, in breast cancer cells with distinct ER $\alpha$ /ER $\beta$  expression and aggressiveness. More specifically, the *in vitro* models of *i*) MCF-7 (low metastatic potential, ER $\alpha$ -positive) and *ii*) MDA-MB-231 (high metastatic potentials, ER $\beta$ -positive), before and after ER $\beta$  suppression, were examined. Finally, the impact of crosstalk between EGFR/IGF-IR, ER $\beta$  and E2 on miR-10b and miR-200b expression was evaluated.

## Materials and methods

*Cell cultures*- In the present thesis parental breast cancer cell lines (MCF-7, ER $\alpha$ -positive, epithelial, low metastatic potential and MDA-MB-231, ER $\beta$ -positive, mesenchymal, high metastatic potential) and transfected breast cancer cells with lentiviral particles containing shRNAs against human ER $\beta$  (shER $\beta$  MDA-MB-231) or certain miRNA ologonucletotides, were routinely cultured in DMEM medium 10% FBS supplemented with antibiotic agents.

*Electronic microscopy*- The morphology of breast cancer cells during each experimental protocol was monitored by phase contrast microscopy and the images were processed by ImageJ software. Breast cancer cell morphology was also monitored through scanning electron microscopy (SEM).

*Functional properties*- Breast cancer cell proliferation was assessed via WST-1 and MTT assays. Cell spreading capacity was evaluated following calculation of cell areas. Cell motility was evaluated through the wound healing assay, following cytarabine treating. The invasion capacity was examined using two approaches: *i*) the BD Biocoat Matrigel Invasion Chambers (BD Biosciences) and *ii*) by assessing the ability of cells to invade into collagen type I gels. Cell adhesion was monitored by evaluating the ability of cells to adhere to collagen type I gels.

*Gene expression*- Gene expression was evaluated following total RNA isolation and real-time polymerase chain reaction (PCR) reaction, utilizing specific primer pairs.

*Protein expression*- Protein expression was studied by western blot, fluorescenceactivated cell sorting (FACS) and immunofluorescence analyses and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The enzymatic activity of MMPs and plasminogen activation system components was evaluated by gelatin and casein zymography, respectively, following the total protein calculation by Bradford assay.

Statistical analysis and image design- Reported values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of experiments in triplicate. Statistically significant differences were evaluated using the unpaired two-tailed T-test and were considered statistically significant at the level of at least p  $\leq$  0.05. GraphPad Prism 5, Xara Photo and Graphic Designer 2013 and ChemDraw Ultra 12 were utilized for graphs and figures design.

Further detailed information regarding the experimental protocols is addressed in the publications of this thesis, [39] and [40].

## Results

# $ER\beta$ is a critical mediator of functional properties, cellular signaling and matrix composition in aggressive breast cancer cells

Transfections of MDA-MB-231 cells with shRNA against human ERβ were performed in order to accomplish the stable knockdown of ER $\beta$ . For the establishment of stable clones, 0.8 µg/mL puromycin dihydrochloride was added to culture medium. Following several cell passages after cell infection, we noticed that a gradual downregulation of ER $\beta$  mRNA level was obtained. Transfection of ER $\beta$  shRNA was followed by a final decrease in ER $\beta$  mRNA expression at the level (ca. 70%), as compared to the control lentiviral particles transfected cells, MDA-MB-231 ctrl (Fig. 13A). It is well known that MDA-MB-231 breast cancer cells have the typical mesenchymal, aggressive phenotype and they are grown as elongated individual cells with a spindle-like morphology (Fig. 13B). However, ER $\beta$  suppression resulted in increased cell-cell junctions and shER $\beta$ MDA-MB-231 resemble an epithelial-like phenotype (Fig. 13B). SEM analysis revealed that MDA-MB-231 spindle-like cells are grown as individual cells (Fig. 14 A-D); however, shER $\beta$  MDA-MB-231 cells appeared grouped and showed cell-cell contacts, an ovoidal shape and a regular rounded outline (Fig. 14E-H). They are flattened cells, with a small and flattened nucleus and sometimes a very large cytoplasm. Only a few globular cytoplasmic protrusions could be observed mainly distributed at the periphery of each cell and few small thin filiform/filopodia cytoplasmic protrusions were also visible (Fig. 14-H).

To further confirm these observations, we evaluated cell cytoskeleton and expression profiles of typical EMT markers (Fig. 15). Notably, shERβMDA-MB-231 cells
exhibited alterations in cytoskeleton organization as shown by  $\alpha$ -tubulin and F-actin staining (Fig. 15A), which is followed by alterations in characteristic EMT markers, such as E-cadherin (*ca* 40% increase), vimentin (ca 25% decrease), fibronectin (ca 20% decrease) and snail2/slug (*ca* 35% decrease) (Fig. 15B). These data suggest that ER $\beta$ gene suppression in MDA-MB-231 mesenchymal cells results in a potent EMT reprogramming.

The basal functional properties of MDA-MB-231 were also affected following ERβ suppression. ERβ suppression decreases growth rates of MDA-MB-231 cells (ca 25% and 35% after 24 and 48 h, respectively) (Fig. 16A). Moreover, we observed that the shERβMDA-MB-231 cells exhibit a significant decrease (30%) of cell spread capacity (Fig. 16B). This result may be correlated with the significantly decreased migratory profile of shERBMDA-MB-231 cells. Notably, shERBMDA-MB-231 cells exhibit 60% lower migration capacity (Fig. 16C). The binding of cancer cells to matrix is essential for the growth and survival of cells. Cancer cells, especially the metastatic ones, have enhanced adhesion ability that facilitates their migration and the establishment of distant tumors. Therefore, we evaluated the ability of shERBMDA-MB-231 cancer cells to adhere through interaction with collagen type I gel. Our data depicted (Fig. 16D) a statistically significant decrease of these cells' adhesion levels compared to control cells. Moreover, we evaluated the invasive potential of shERβMDA-MB-231 cells, because this step is crucial for the cancer metastasis. As shown in Fig. 16E, shERβMDA-MB-231 breast cancer cells exhibited significantly reduced invasion index and invasion area (ca 60% decrease following 24 h incubation).

Another interesting finding of this study was that the suppression of ER $\beta$  affects the mRNA levels and activity profiles of critical ECM mediators. More specifically, ER $\beta$  suppression results in decreased mRNA levels of MMP1 (*ca* 25%) and MMP7 (*ca* 30%) compared to control cells (Fig. 17A). Moreover, the suppression of ER $\beta$  slightly decreased the mRNA levels of MMP2 and MT1-MMP. On the other hand, MMP9 mRNA level was remarkably higher, with a statistically significant increase (*ca* 2.5-fold) as compared to MDA-MB-231 ctrl cells. Furthermore, shER $\beta$ MDA-MB-231 cells exhibited strong decrease of the mRNA levels for the endogenous MMPs inhibitors TIMP1 (*ca* 75%) and TIMP2 (*ca* 50%) (Fig. 17B). Moreover, shER $\beta$  MDA-MB-231 cells exhibited decreased expression and activity levels of the plasminogen activation system components, mainly uPA, tPA, as compared to MDA-MB-231 ctrl cells (Fig. 17C). Finally, ER $\beta$  suppression resulted in decreased gene and protein levels of the

enzyme heparanase (HPSE) that is implicated in ECM re-organization affecting tumor microenvironment (Fig. 17E).

Changes in the cancer cells microenvironment may lead to changes in their properties and behavior. Cell surface heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) are included in the class of ECM components that are located both at cellular and extracellular levels and influence cell adhesion, signaling and cancer progression through interactions with other matrix effectors. Syndecans are among the principal representatives of cell membrane HSPGs. In breast cancer, syndecan-2 is implicated in cell adhesion, angiogenesis and signaling, syndecan-4 has crucial role in cancer promotion, whereas syndecan-1 promotes epithelial cell migration [10, 41]. The obtained results showed that ERβ suppression in MDA-MB-231 breast cancer cells induced a statistically significant up-regulation of syndecan-1 expression mRNA levels (ca 15%) compared to control cells (Fig. 18). Data concerning the expression profile of syndecan-4 showed that shERβMDA-MB-231 cells exhibited increased expression levels of this PG (ca 40%) compared to MDA-MB-231 ctrl cells, also through immunofluorescence analysis. Moreover, as for syndecan-2, shERBMDA-MB-231 breast cancer cells exhibited statistically significant upregulated mRNA levels of this HSPG (ca 25%) (Fig. 18B). The intracellular serglycin has an established role in interaction of cancer cells, modulating immune response in tumor microenvironment [42]. Our data demonstrated that shERβMDA-MB-231 breast cancer cells exhibited a statistically significant decrease in serglycin expression (ca 50%) (Fig. 18B). The above data were confirmed through immunofluorescence analysis (Fig. 18A).

Moreover, we evaluated the regulatory role of ER $\beta$  in hyaluronan (HA) expression and localization as well as in its receptor (CD44), synthetic enzymes (HAS1-3) and degrading enzymes, hyaluronidases (HYAL1-2). The obtained data revealed that ER $\beta$  suppression results in significant HA synthesis, as shown by immunofluorescence staining of HA binding protein (HABP) (Fig. 19A). In addition, shER $\beta$  MDA-MB-231 breast cancer cells demonstrated significant upregulation of CD44 standard form and the main synthase, HAS2, whereas these cells exhibited significant increase in the expression levels of HYAL1 and HYAL2 (Fig. 19B). These data provided strong evidence that ER $\beta$  suppression in MDA-MB-231 breast cancer cells mediates the interplay between ECM and cancer cells.

It is well established that ERs apart from their nuclear localization may be moved in the cytoplasm and cell membrane. In that way ERs induce interactions with matrix

biomolecules activating several signaling pathways through activation of cell surface growth factor receptors [43]. ERs after their activation are capable to induce a signaling cascade that involves the MMPs production resulting in the activation of EGFR through EGF binding [44]. Moreover, it is known that overexpression of EGFR promotes breast cancer migration and invasion whereas the overexpression of HER2 is a characteristic marker in breast cancers with an aggressive phenotype [4, 45, 46]. Our data revealed that shER $\beta$  MDA-MB-231 demonstrate significant decrease in EGFR (*ca* 50%) and IGF-IR (*ca* 40%) expression levels as compared to the control cells (Fig. 20A). Interestingly, our results showed that shER $\beta$ MDA-MB-231 breast cancer cells are characterized by a remarkable downregulation in ERK1/2 phosphorylated levels (Fig. 20B); following the strong suppression of EGFR in mRNA level as compared to the control MDA-MB-231 breast cancer cells.

Crosstalk between ERs, EGFR and/or insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) is critical for the observed resistance to endocrine therapies [47]. It is reported that the JAK/STAT signaling pathway may oppose malignant proliferation in solid tumors. Tyrosine phosphorylation of JAK/STAT is generally involved in oncogenesis, including signaling downstream of the EGFR [48, 49]. Therefore, going a step further, we examined the activation of EGFR, IGF-IR and JAK/STAT signaling pathways. Utilizing specific allosteric inhibitors we determined the effects on breast cancer cell migration and the role of ER $\beta$  in this regulation. The inhibition of EGFR and IGF-IR in MDA-MB-231 breast cancer cells delayed their migratory capacity. Interestingly, the inhibition of these tyrosine kinase receptors in shER $\beta$ MDA-MB-231 also inhibited cancer cells migration but more intensely as compared to control cells. Notably, the simultaneous inhibition of EGFR and IGF-IR in the ER $\beta$  suppressed breast cancer cells significantly reduced their migration. Therefore, it is suggested that the crosstalk between ER $\beta$ , EGFR and IGF-IR plays an important role in MDA-MB-231 migration (Fig. 20C).

Of note, JAK/STAT pathway significantly contributes to cell migration in control cells. It is worth noticing that the JAK/STAT pathway maintains its ability to regulate cell migration after the loss of ER $\beta$  the subsequent reduce in autocrine loop (Fig. 21A) in these cells. Treatment with JAK/STAT inhibitor significantly decreased cell migration of shER $\beta$ MDA-MB-231 cells, although the extent of inhibition was much lower compared to that of control cells (Fig. 21B). Therefore, we suggest that also the

JAK/STAT cascade contributes in the regulation of alternated cell properties, such as migration, in shERβMDA-MB-231 cells.

Notably, the expression profiles of major ECM macromolecules (i.e. MMPs, EMT markers, PGs and cell receptors) were not significantly affected following E2 treatment in shER $\beta$  MDA-MB-231 breast cancer cells (Figs. 22-25).

At a next level, we performed clone selection experiments in shER $\beta$  MDA-MB-231 breast cancer cells in order to achieve higher levels of ER $\beta$  suppression. The obtained data revealed a 85% decrease in ER $\beta$  mRNA expression and a strong reduction in the receptor protein levels (Fig. 26). Moreover, phase contrast microscopy and SEM analysis revealed that clone shER $\beta$ MDA-MB-231 breast cancer cells exhibited tight cell-cell junctions, very few cytoplasmic protrusions and an ovoidal shape (Fig. 27) followed by EMT arrest and significantly decreased proliferation and migration levels (Fig. 28).

## ERs as epigenetic mediators of miR-10b, miR-145 and miR-200b in mammary cancer

ERs are key players in the modulation of breast cancer cells' morphological characteristics. As shown in Fig. 29A, MCF-7 cells (panel 1) demonstrate the typical epithelial morphology, while the spindle-like morphology of MDA-MB-231 cells (panel 2) boosts their invasive capacity (panel 3). Breast cancer cell phenotype and ERs have been correlated with cancer stem cell characteristics, as shown in Fig 29C, ER $\beta$  presence significantly increases CD44(+)/CD24(-) phenotype from 1.58 (± 0.52%) in MCF-7 cells to 98.94% (± 0.54%) in MDA-MB-231 cells, which demonstrates that ER $\beta$  is closely related to breast cancer stem cells development and forces the necessity of its targeting.

In order to evaluate the effects of ER $\alpha/\beta$  on the expression of miRNAs involved in breast cancer progression (miR-10b, miR-21, let-7d, miR-145, miR-200b) we utilized three breast cancer cell lines with different ER status; MCF-7 (ER $\alpha$ -positive) and MDA-MB-231 (ER $\beta$ -positive), before and after ER $\beta$  suppression. We demonstrated that ER $\beta$ presence in MDA-MB-231 breast cancer cells lead to striking changes in the expression profile of specific microRNAs, including miR-200b (99% decrease) and miR-10b (30fold increase), that have been correlated with the initiation of metastasis as well as the induction of the EMT process (Fig. 29C). Moreover, we highlighted the distinct role of E2 in the regulation of EMT and miRNA expression, depending on the ER status. Notably, when MCF-7 breast cancer cells were treated with estrogen-free medium, the expression levels of miR-10b were significantly upregulated, whereas miR-200b and miR-145 expression levels were strongly downregulated, as compared to the control cells (Fig. 30A), following the strong induction of EMT markers (Fig. 30B). On the other hand, growth in estrogen-free medium of ER $\beta$ -positive MDA-MB-231 breast cancer cells resulted in the reduced miR-10b expression levels, followed by the strong induction of miR-200b and miR-145 levels (Fig. 30C) and downregulated levels of EMT markers (Fig. 30D).

At a next level, we unraveled the regulatory roles of miR-10b and miR-200b in the aggressive ERβ-positive MDA-MB-231 breast cancer cells. The inhibition of miR-10b following transfections of breast cancer cells with the antisense oligonucleotide antimiR-10b, significantly decreased the aggressiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells, as it was depicted by significantly reduced migration and invasion levels, loss of cytoplasmic protrusions and condensed cytoskeleton (Fig. 31). These striking changes were accompanied by a strong decrease in the expression levels of mesenchymal markers fibronectin, ZEB2 and snail2/slug as well as the induction of epithelial marker E-cadherin of MDA-MB-231 cells transfected with anti-miR-10b (Fig. 32). The inhibition of miR-10b also affected ECM composition in MDA-MB-231 cells, mainly the proteolytic milieu (MMP7, MT1-MMP), the angiogenic VEGF, syndecan-1 and ERK1/2 phosphorylation (Fig. 33). Interestingly, the behavior of MCF-7 breast cancer cells was not affected by miR-10b inhibition. Accordingly, the overexpression of miR-200b with pre-miR-200b induced striking changes in cell morphology and cytoskeleton, affecting the functional properties of MDA-MB-231 cells, mainly migration and invasion (Fig. 34). Moreover, pre-miR-200b induced the induction of E-cadherin and the profound downregulation of the mesenchymal markers fibronectin, ZEB2 and snail2/slug (Fig. 35). The expression levels of HER2 receptor, VEGF, MMP2, MMP7, MT1-MMP and syndecan-1 were also affected by pre-miR-200b in MDA-MB-231 cells. These changes were followed by the decrease in ERK1/2 phosphorylated levels (ca 25%) in MDA-MB-231 cells with miR-200b overexpression. Notably, the behavior of MCF-7 breast cancer cells was not affected by miR-200b overexpression. These data suggest the critical roles of miR-10b and miR-200b in the regulation of functional properties, morphology, EMT program and ECM composition of the aggressive MDA-MB-231 breast cancer cells.

On the other hand, the loss of  $\text{ER}\beta$  in sh $\text{ER}\beta$  MDA-MB-231 breast cancer cells resulted in elevated levels of miR-145 and downregulated levels of miR-10b, among the miRNAs tested, as compared to MDA-MB-231 cells (Fig. 37). Our data revealed that miR-10b is strongly implicated in the regulation of functional properties (by increasing the invasive potential of shER $\beta$  MDA-MB-231 cells) and cell morphology (Fig. 38), EMT program and ERK1/2 signaling in shER $\beta$  MDA-MB-231 cells, thus affecting ECM composition, including syndecan-1, proteolytic behavior, especially MMP2, MMP7 and MMP9 expression (Fig. 39) and subsequently the aggressiveness of these cells. Accordingly, the inhibition of miR-145 expression significantly increased the aggressiveness of shER $\beta$  MDA-MB-231 cells (Fig. 40) and induced EMT. Moreover, miR-145 inhibition resulted in important changes in the gene and protein levels of ECM mediators, such as HER2 and several MMPs, whereas it significantly increased the phosphorylated levels of ERK1/2 kinases in these cells (Fig. 41), suggesting the crucial role of miR-145 in this signaling pathway. Enhanced mir-10b expression or silencing of miR-145 clearly revealed that these miRNAs can regulate the functional properties, EMT program and the expression of major matrix components known to be implicated in breast cancer aggressiveness.

Going a step further, we evaluated the role of  $ER\beta$  and the coordinated signaling of EGFR/IGF-IR in the regulation of the miRNAs that we demonstrated to be involved in breast cancer cell behavior, miR-10b and miR-200b. Our data revealed that the downstream allosteric EGFR inhibitor (AG1478) induced miR-10b expression (ca 30%), while the downstream IGF-IR inhibitor (AG1024) did not affect miR-10b levels. The simultaneous inhibition of the receptors restored miR-10b expression in the control expression levels. The presence of E2 in culture medium induced miR-10b expression, which is significantly reduced by the receptors inhibition. E2-mediated IGF-IR inhibition increased miR-10b levels, which demonstrates the ER<sub>β</sub>- and IGF-IR-mediated E2 signaling that regulates the expression of this oncogenic miRNA (Fig. 42, left panel). On the other hand, even though EGFR inhibition significantly induced miR-200b expression (2-fold), the inhibition of IGF-IR alone or with EGFR did not significantly affect miR-200b expression levels. The E2-mediated increase in miR-200b expression diminished by the inhibition of both receptors. However, EGFR inhibition in the presence of E2 reduced the enhanced miR-200b levels caused by EGFR inhibition without E2. The E2mediated IGF-IR inhibition decreased miR-200b levels (Fig. 42, right panel).

Together, these novel results suggest that the alterations in cell behavior and in ECM composition caused by the suppression of ER $\beta$  in MDA-MB-231 cells are closely related to certain epigenetic miRNA-induced alterations. Targeting the ER $\beta$ -regulated miR-10b and miR-145 is a promising tool for diagnosis and pharmaceutical targeting in breast cancer.

## **Conclusions and perspectives**

Breast cancer is closely related to steroid hormones, such as estrogens which mediate breast cancer progression through binding to high-affinity ERs, while being in a dynamic interplay with growth factors and functional ECM macromolecules. ER-status categorizes breast tumors and guides clinical decisions for each personalized therapeutic protocol. The evidence suggesting that ER $\beta$  presence has been correlated with breast cancer aggressiveness confirms the prognostic value of its expression [50, 51]. ER $\beta$  gene and protein overexpression in triple negative MDA-MB-231 breast cancer cells as well as the receptor functionality has been demonstrated from our research group in earlier studies [10, 38, 52]. Therefore, many attempts have been conducted in order to reveal the regulatory role of ER $\beta$  and its necessity as diagnostic agent of aggressive breast cancer.

In the present study we demonstrated that  $ER\beta$  mediates EMT induction by affecting the properties and ECM composition of aggressive breast cancer cells, MDA-MB-231. Using the ER $\beta$ -suppressed shER $\beta$  MDA-MB-231 breast cancer cells we showed that ER $\beta$  suppression

Using the ER $\alpha$ -negative and ER $\beta$ -positive, highly invasive MDA-MB-231 breast cancer cells, we established that the suppression of ER $\beta$  in MDA-MB-231 breast cancer cells (shERβ MDA-MB-231 cells) evokes striking changes in functional properties as well as gene and protein expression levels of significant ECM components, EMT markers and signaling molecules, in a E2-independent manner. ERß suppression affected major ECM mediators, such as transmembrane PGs (syndecan-1,-2,-4) and intracellular PGs (serglycin), matrix degrading enzymes, among them several metalloproteinases (MMPs and TIMPs), plasminogen activation system components (i.e. uPA, tPA, PAI-1), as well as cell surface receptors (i.e. EGFR, IGF-IR) and signaling molecules (ERK1/2), which in turn mediate the behavior of breast cancer cells. In addition, the suppression of  $ER\beta$  in these cells inhibits EMT, a critical process for the initiation of metastasis, through the upregulation of epithelial markers (i.e. E-cadherin), increase in cell-cell junctions and the downregulation of mesenchymal markers (i.e. vimentin, fibronectin, snail2/slug and ZEB2). All these led to a less aggressive phenotype with decreased cell proliferation, spreading, migration, adhesion and invasion potential. In addition, ER<sup>β</sup> suppression reduces MDA-MB-231 breast cancer cell motility through EGFR/IGF-IR and JAK/STAT signaling pathways. These novel data highlight the feasibility of ER $\beta$ targeting in MDA-MB-231 breast cancer cells and are boosted from the obtained results

following clone selection experiments in shER $\beta$  MDA-MB-231 cells, which were performed in order to achieve higher ER $\beta$  suppression levels. Our data revealed that the stable transformation of MDA-MB-231 breast cancer cells to a less aggressive state through ER $\beta$  suppression results in striking changes in functional properties and ECM composition, thus leading to EMT re-programming which in turn affects the metastatic potential of these cells. This information is illustratively depicted in Fig. 43.



**Figure 43.** Schematic representation of ER $\beta$ -mediated changes in MDA-MB-231 breast cancer cell morphology and expression/activity of major ECM mediators. ER $\beta$  suppression inhibits EMT and results in striking changes in functional properties and ECM composition. The EGFR/IGF-IR crosstalk and JAK/STAT signaling pathway mediate MDA-MB-231 cell migration (left panel). On the other hand, the inhibition of EGFR and IGF-IR in shER $\beta$  MDA-MB-231 breast cancer cells decreases cell migration, while JAK/STAT pathway regulates cell migration following ER $\beta$  suppression (right panel). The ER $\beta$ /EGFR/IGF-IR crosstalk and JAK/STAT signaling pathway critically regulate MDA-MB-231 breast cancer cell migration.

At a next level, we evaluated whether ER status could have a major impact on the expression of certain miRNAs implicated to breast cancer progression and on the other hand to examine the role of ER-related miRNAs in the regulation of EMT process and functional properties of MCF-7, MDA-MB-231 and shER $\beta$  MDA-MB-231breast cancer cells. Our data revealed that miR-10b and miR-145 were the most significantly affected miRNAs following ER $\beta$  suppression, while miR-200b which is a negative regulator of metastasis, is significantly upregulated in ER $\beta$ -positive MDA-MB-231 compared to ER $\alpha$ -positive MCF-7 breast cancer cells. These miRNAs are closely linked to the EMT program and could contribute to cell-cell and/or cell-ECM interactions, affecting crucial breast cancer cells properties. Our data depicted that miR-10b is strongly downregulated in shER $\beta$  MDA-MB-231 cells, as compared to MDA-MB-231 cells. On the other hand, shER $\beta$  MDA-MB-231 breast cancer cells exhibit higher expression levels of the tumor-suppressor miR-145.

Furthermore, we revealed the positive role of E2 in miR-10b expression of ER $\alpha$ -positive, MCF-7 breast cancer cells. The absence of estrogens from the culture medium of MCF-7 cells is followed by decreased miR-145 and miR-200b expression levels and increased levels if mesenchymal markers. On the other hand, growth of MDA-MB-231 breast cancer cells n estrogen-free medium resulted in increased levels of miR-145 and miR-200b followed by reduced aggressiveness. These data suggest that mainly miR-200b and E2-ER $\alpha$  axis favour the maintenance of the epithelial phenotype of breast cancer cells. Notably, their expression is mediated by the crosstalk of EGFR/IGF-IR signaling pathways with E2.

We first evaluated the regulatory role of miR-10b and miR-200b in MCF7 and MDA-MB-231 breast cancer cells in order to investigate the implication of ER $\alpha$  in the regulation of these miRNAs. Functional analysis of anti-miR-10b, which inhibits miR-10b endogenous expression, in MDA-MB-231 cells, revealed that the absence of miR-10b results in the strong reduction of the aggressiveness in these cells. miR-10b inhibition induced striking changes in their morphology and cytoskeleton, affecting basal functional properties, EMT program (by inducing E-cadherin), the expression profiles of major ECM modulators (mainly MMPs and syndecan-1) and signaling molecules, such as ERK1/2. Accordingly, miR-200b that modulates tumor invasion and metastasis through its targeting of ZEB1 and ZEB2, has been found to be significantly downregulated in the aggressive MDA-MB-231 breast cancer cells. Interestingly, the induction of its expression by transfecting MDA-MB-231 cells with pre-miR-200b

resulted in the significant decrease in proliferation, migration and invasion rates of these cells. These alterations were accompanied by important changes in cell morphology, reduction of mesenchymal EMT markers (ZEB2, fibronectin, snail2/slug), cell signaling, as well as expression of cell surface receptors and ECM components (mainly MMPs). These data highlight the correlation of miR-10b with the metastatic potential of aggressive breast cancer cells, revealing that miR-200b presence together with ERα is beneficial for the conservation of a less aggressive phenotype in breast cancer cells.

In addition, we observed that the induction of miR-10b in shER<sup>β</sup> MDA-MB-231 following transfections with pre-miR-10b, resulted in the strong increase of their functional properties related to aggressiveness (i.e. proliferation, migration and invasion). Moreover, miR-10b overexpression induced important morphological alterations, increased expression levels of mesenchymal EMT markers, differentiated expression levels of major ECM mediators (i.e. syndecan-1, MMP2, MMP7, MMP9) and significant increase in ERK1/2 phosphorylated levels. These data suggest that the reduced miR-10b levels, following ER $\beta$  suppression, seem to be favourable for the epithelial-like phenotype of breast cancer cells. Furthermore, functional analysis of miR-145 regulatory role demonstrated that the suppression of this miRNA following transfections with anti-miR-145, resulted in the strong induction of shER<sup>β</sup> MDA-MB-231 aggressiveness. This regulation is achieved through striking changes in phenotype, functional properties, EMT markers and ECM mediators, mainly in remodelling enzymes. Anti-miR-145 presence induced ERK1/2 phosphorylated levels, confirming the acquired aggressive phenotype of shER<sup>β</sup> MDA-MB-231 breast cancer cells as a result of miR-145 inhibition. Estrogen-mediated miR-145 expression and function is mechanistically related to the crucial phenotypic changes observed in ER<sub>β</sub>-suppressed breast cancer cells.

The results if this study demonstrated that ERs and mainly ER $\beta$  in collaboration with miR-10b and miR-145, are significant mediators of the aggressiveness induction in breast cancer cells. It was highlighted for the first time that ER $\beta$  inversely regulates these miRNAs that control functional properties, EMT program, ECM composition and consequently the behaviour of breast cancer cells (Fig. 44).



**Figure 44.**  $ER\beta$  is a key regulator of breast cancer cell aggressiveness and miRNA expression. (A) Estrogen-free medium upregulates the aggressiveness of MCF-7 cells, increases oncogenic miR-10b levels, while decreasing tumor-suppressor, miR-145, and EMT inducer, miR-200b expression levels. The opposite effects were observed in MDA-MB-231 breast cancer cells. (B) The inhibition of miR-145 (anti-miR-145) and the overexpression of miR-10b (pre-miR-10b) increased the aggressiveness of these cells through striking changes in the morphology, functional properties, EMT markers and major ECM mediators. Downregulated genes are depicted in red, whereas upregulated genes are depicted in blue.

In conclusion, during this in-depth study, we highlighted the crucial role of  $ER\beta$  in the regulation of morphology, matrix components and properties of the aggressive, triple negative breast cancer cells. Moreover, we demonstrated that the epigenetic modifications in miRNA level represent a code that is critically involved in gene expression. The differentiated gene expression does not only affect the cancer cell itself, but the general tumor behaviour through changes in ECM composition and the tumor microenvironment, highlighting the prognostic and therapeutic value of miRNAs. Further studies in epigenetic regulation of gene expression open a new research area that will give light to the underlying molecular mechanisms governing normal and pathological conditions. This new knowledge will act as a groundwork for the future design and development of novel pharmaceutical approaches for the inhibition of oncogenic signaling and the improvement of prognosis of the aggressive breast cancer.

## Acknowledgements

I wish to thank Prof. Nikos K. Karamanos (University of Patras, Greece) for having the supervision of this doctoral dissertation. I appreciate the guidance, fruitful discussions, wisdom, time and patience from the beginning until the very end of this work.

To Prof. Martin Götte (University of Münster, Germany) for the opportunity to conduct huge part of this work in his lab, the great collaboration and the willingness to help anytime.

To Associate Prof. Achilleas Theocharis for the advisory discussions that often gave me light in the dark tunnel and the great collaboration during these years.

To esteemed members of the PhD examination committee (Dr D. Kletsas, Ass. Prof. S. S. Skandalis, Prof. D. H. Vynios, Prof. E. Papadimitriou).

To Prof. Burkhard Greve (University of Münster, Germany), Prof. Marco Franchi (University of Bologna, Italy) and Dr. Christoph Riethmüller (Serend-ip, Münster, Germany) for the excellent collaboration and the contribution in part of the results of this thesis.

To lab members (Universities of Patras and Münster), family and friends.

## References

1. Mook, S., Van 't Veer, L. J., Rutgers, E. J., Ravdin, P. M., van de Velde, A. O., van Leeuwen, F. E., Visser, O. & Schmidt, M. K. (2011) Independent prognostic value of screen detection in invasive breast cancer, *Journal of the National Cancer Institute*. **103**, 585-97.

Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A. L., Brown, P. O. & Botstein, D. (2000) Molecular portraits of human breast tumours, *Nature*. 406, 747-52.

3. McDonnell, D. P. & Norris, J. D. (2002) Connections and regulation of the human estrogen receptor, *Science*. **296**, 1642-4.

4. Allred, R. P., Cappellini, C. H. & Jones, T. A. (2010) The "good" limb makes the "bad" limb worse: experience-dependent interhemispheric disruption of functional outcome after cortical infarcts in rats, *Behav Neurosci.* **124**, 124-32.

5. Allred, D. C. (2010) Issues and updates: evaluating estrogen receptor-alpha, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer, *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* **23 Suppl 2**, S52-9.

6. Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C. & Karamanos, N. K. (2016) Extracellular matrix structure, *Adv Drug Deliv Rev.* 97, 4-27.

7. Theocharis, A. D., Gialeli, C., Bouris, P., Giannopoulou, E., Skandalis, S. S., Aletras, A. J., Iozzo, R. V. & Karamanos, N. K. (2014) Cell-matrix interactions: focus on proteoglycanproteinase interplay and pharmacological targeting in cancer, *FEBS J.* **281**, 5023-42.

8. Theocharis, A. D. & Karamanos, N. K. (2017) Proteoglycans remodeling in cancer: Underlying molecular mechanisms, *Matrix Biol*.

9. Gotte, M. & Kovalszky, I. (2018) Extracellular matrix functions in lung cancer, Matrix Biol.

10. Tsonis, A. I., Afratis, N., Gialeli, C., Ellina, M. I., Piperigkou, Z., Skandalis, S. S., Theocharis, A. D., Tzanakakis, G. N. & Karamanos, N. K. (2013) Evaluation of the coordinated actions of estrogen receptors with epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor in the expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans and cell motility in breast cancer cells, *FEBS J.* **280**, 2248-59.

11. Afratis, N. A., Nikitovic, D., Multhaupt, H. A., Theocharis, A. D., Couchman, J. R. & Karamanos, N. K. (2016) Syndecans: key regulators of cell signaling and biological functions, *FEBS J*.

12. Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Neill, T., Multhaupt, H. A., Hubo, M., Frey, H., Gopal, S., Gomes, A., Afratis, N., Lim, H. C., Couchman, J. R., Filmus, J., Sanderson, R. D., Schaefer, L., Iozzo, R. V. & Karamanos, N. K. (2015) Insights into the key roles of proteoglycans in breast cancer biology and translational medicine, *Biochim Biophys Acta*. **1855**, 276-300.

13. Karalis, T. T., Heldin, P., Vynios, D. H., Neill, T., Buraschi, S., Iozzo, R. V., Karamanos, N. K. & Skandalis, S. S. (2018) Tumor-suppressive functions of 4-MU on breast cancer cells of different ER status: Regulation of hyaluronan/HAS2/CD44 and specific matrix effectors, *Matrix Biol*.

14. Piperigkou, Z., Manou, D., Karamanou, K. & Theocharis, A. D. (2018) Strategies to Target Matrix Metalloproteinases as Therapeutic Approach in Cancer, *Methods in molecular biology*. **1731**, 325-348.

15. Gialeli, C., Theocharis, A. D. & Karamanos, N. K. (2011) Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting, *FEBS J.* **278**, 16-27.

16. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition, *The Journal of clinical investigation*. **119**, 1420-8.

17. Chen, Y., Lu, B., Yang, Q., Fearns, C., Yates, J. R., 3rd & Lee, J. D. (2009) Combined integrin phosphoproteomic analyses and small interfering RNA--based functional screening identify key regulators for cancer cell adhesion and migration, *Cancer research*. **69**, 3713-20.

18. Thiery, J. P. (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression, *Nature reviews Cancer.* **2**, 442-54.

19. Al Saleh, S., Al Mulla, F. & Luqmani, Y. A. (2011) Estrogen receptor silencing induces epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer cells, *PLoS One.* **6**, e20610.

20. Cristofanilli, M., Turner, N. C., Bondarenko, I., Ro, J., Im, S. A., Masuda, N., Colleoni, M., DeMichele, A., Loi, S., Verma, S., Iwata, H., Harbeck, N., Zhang, K., Theall, K. P., Jiang, Y., Bartlett, C. H., Koehler, M. & Slamon, D. (2016) Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial, *The Lancet Oncology*. **17**, 425-439.

21. Bouris, P., Skandalis, S. S., Piperigkou, Z., Afratis, N., Karamanou, K., Aletras, A. J., Moustakas, A., Theocharis, A. D. & Karamanos, N. K. (2015) Estrogen receptor alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of specific matrix effectors and functional properties of breast cancer cells, *Matrix Biol.* **43**, 42-60.

22. Chang, E. C., Frasor, J., Komm, B. & Katzenellenbogen, B. S. (2006) Impact of estrogen receptor beta on gene networks regulated by estrogen receptor alpha in breast cancer cells, *Endocrinology*. **147**, 4831-42.

23. Haldosen, L. A., Zhao, C. & Dahlman-Wright, K. (2014) Estrogen receptor beta in breast cancer, *Molecular and cellular endocrinology*. **382**, 665-72.

24. Bartel, D. P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*. **116**, 281-97.

25. Leonardo, T. R., Schultheisz, H. L., Loring, J. F. & Laurent, L. C. (2012) The functions of microRNAs in pluripotency and reprogramming, *Nat Cell Biol.* **14**, 1114-21.

26. Rodriguez, A., Vigorito, E., Clare, S., Warren, M. V., Couttet, P., Soond, D. R., van Dongen, S., Grocock, R. J., Das, P. P., Miska, E. A., Vetrie, D., Okkenhaug, K., Enright, A. J., Dougan, G., Turner, M. & Bradley, A. (2007) Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function, *Science.* **316**, 608-11.

27. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. & Cullen, B. R. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs, *Genes & development.* **17**, 3011-6.

28. Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E. & Kutay, U. (2004) Nuclear export of microRNA precursors, *Science*. **303**, 95-8.

29. Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S. & Bartel, D. P. (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels, *Nature*. **466**, 835-40.

30. Velu, V. K., Ramesh, R. & Srinivasan, A. R. (2012) Circulating MicroRNAs as Biomarkers in Health and Disease, *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR.* **6**, 1791-5.

31. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. & Diederichs, S. (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation, *Nat Cell Biol.* **11**, 228-34.

32. Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P. & Bartel, D. P. (2008) The impact of microRNAs on protein output, *Nature*. **455**, 64-71.

33. Piperigkou, Z., Gotte, M., Theocharis, A. D. & Karamanos, N. K. (2017) Insights into the key roles of epigenetics in matrix macromolecules-associated wound healing, *Adv Drug Deliv Rev*.

34. Ibrahim, S. A., Yip, G. W., Stock, C., Pan, J. W., Neubauer, C., Poeter, M., Pupjalis, D., Koo, C. Y., Kelsch, R., Schule, R., Rescher, U., Kiesel, L. & Gotte, M. (2012) Targeting of syndecan-1 by microRNA miR-10b promotes breast cancer cell motility and invasiveness via a Rho-GTPase- and E-cadherin-dependent mechanism, *Int J Cancer.* **131**, E884-96.

35. Gotte, M., Kersting, C., Ruggiero, M., Tio, J., Tulusan, A. H., Kiesel, L. & Wulfing, P. (2006) Predictive value of syndecan-1 expression for the response to neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer, *Anticancer research.* **26**, 621-7.

36. Ibrahim, S. A., Hassan, H. & Gotte, M. (2014) MicroRNA regulation of proteoglycan function in cancer, *FEBS J.* **281**, 5009-22.

37. Ibrahim, S. A., Hassan, H. & Gotte, M. (2014) MicroRNA-dependent targeting of the extracellular matrix as a mechanism of regulating cell behavior, *Biochim Biophys Acta*. **1840**, 2609-20.

38. Kousidou, O., Berdiaki, A., Kletsas, D., Zafiropoulos, A., Theocharis, A. D., Tzanakakis, G. N. & Karamanos, N. K. (2008) Estradiol-estrogen receptor: a key interplay of the expression of syndecan-2 and metalloproteinase-9 in breast cancer cells, *Molecular oncology.* **2**, 223-32.

39. Piperigkou, Z., Bouris, P., Onisto, M., Franchi, M., Kletsas, D., Theocharis, A. D. & Karamanos, N. K. (2016) Estrogen receptor beta modulates breast cancer cells functional properties, signaling and expression of matrix molecules, *Matrix Biol*.

40. Piperigkou, Z., Franchi, M., Gotte, M. & Karamanos, N. K. (2017) Estrogen receptor beta as epigenetic mediator of miR-10b and miR-145 in mammary cancer, *Matrix Biol*.

41. Barbouri, D., Afratis, N., Gialeli, C., Vynios, D. H., Theocharis, A. D. & Karamanos, N. K. (2014) Syndecans as modulators and potential pharmacological targets in cancer progression, *Front Oncol.* **4**, 4.

42. Korpetinou, A., Skandalis, S. S., Labropoulou, V. T., Smirlaki, G., Noulas, A., Karamanos, N. K. & Theocharis, A. D. (2014) Serglycin: at the crossroad of inflammation and malignancy, *Front Oncol.* **3**, 327.

43. Levin, E. R. (2002) Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors, *Steroids*. **67**, 471-5.

44. Song, R. X., Zhang, Z., Chen, Y., Bao, Y. & Santen, R. J. (2007) Estrogen signaling via a linear pathway involving insulin-like growth factor I receptor, matrix metalloproteinases, and epidermal growth factor receptor to activate mitogen-activated protein kinase in MCF-7 breast cancer cells, *Endocrinology*. **148**, 4091-101.

45. Hirsch, D. S., Shen, Y. & Wu, W. J. (2006) Growth and motility inhibition of breast cancer cells by epidermal growth factor receptor degradation is correlated with inactivation of Cdc42, *Cancer Res.* **66**, 3523-30.

46. Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., Akslen, L. A., Ragaz, J., Gown, A. M., Gilks, C. B., van de Rijn, M. & Perou, C. M. (2004) Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma, *Clin Cancer Res.* **10**, 5367-74.

47. Song, R. X., Chen, Y., Zhang, Z., Bao, Y., Yue, W., Wang, J. P., Fan, P. & Santen, R. J. (2010) Estrogen utilization of IGF-1-R and EGF-R to signal in breast cancer cells, *J Steroid Biochem Mol Biol.* **118**, 219-30.

48. Peck, A. R., Witkiewicz, A. K., Liu, C., Stringer, G. A., Klimowicz, A. C., Pequignot, E., Freydin, B., Tran, T. H., Yang, N., Rosenberg, A. L., Hooke, J. A., Kovatich, A. J., Nevalainen, M. T., Shriver, C. D., Hyslop, T., Sauter, G., Rimm, D. L., Magliocco, A. M. & Rui, H. (2011) Loss of nuclear localized and tyrosine phosphorylated Stat5 in breast cancer predicts poor clinical outcome and increased risk of antiestrogen therapy failure, *J Clin Oncol.* **29**, 2448-58.

49. Thomas, S. J., Snowden, J. A., Zeidler, M. P. & Danson, S. J. (2015) The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours, *Br J Cancer.* **113**, 365-71.

50. Marotti, J. D., Collins, L. C., Hu, R. & Tamimi, R. M. (2010) Estrogen receptor-beta expression in invasive breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study, *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 23, 197-204.

51. Skliris, G. P., Leygue, E., Curtis-Snell, L., Watson, P. H. & Murphy, L. C. (2006) Expression of oestrogen receptor-beta in oestrogen receptor-alpha negative human breast tumours, *British journal of cancer.* **95**, 616-26.

52. Fox, E. M., Andrade, J. & Shupnik, M. A. (2009) Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways, *Steroids*. **74**, 622-7.