



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ Γ. ΠΑΠΑΒΑΣΙΛΕΙΟΥ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΟΥ EGFR
ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

της βιολόγου

ΗΛΙΑΝΝΑΣ Α. ΖΩΗ

ΑΘΗΝΑ 2019



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Πρόγραμμα Χορήγησης Υποτροφιών για Μεταπτυχιακές Σπουδές Δευτέρου Κύκλου Σπουδών» (MIS-5003404), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής Αθηνών: Καθηγητής Πέτρος Π. Σφηκάκης

Ημερομηνία Αίτησης: 20-10-2014

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 26-11-2014

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Καθηγητής Αθανάσιος Γ. Παπαβασιλείου

Αναπληρωτής Καθηγητής Μιχαήλ Β. Καραμούζης

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Χριστίνα Πιπέρη

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 20-2-2015

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής: 12-11-2019

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Καθηγητής Αθανάσιος Γ. Παπαβασιλείου

Αναπληρωτής Καθηγητής Μιχαήλ Β. Καραμούζης

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Χριστίνα Πιπέρη

Καθηγήτρια Ευθυμία Κ. Μπάσδρα

Καθηγητής Σταμάτιος Θεοχάρης

Αναπληρωτής Καθηγητής Γεράσιμος Σιάσος

Αναπληρωτής Καθηγητής Δημήτριος Στραβοπόδης

Ημερομηνία υποστήριξης διδακτορικής διατριβής: 11-12-2019

Βαθμός: Άριστα

Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (νόμος 5343/1932, άρθρο 202, παράγραφος 2).

ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

"Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον Ιατρό και στον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην πανάκεια και σ' όλους τους Θεούς επικαλούμενος την μαρτυρία τους, να τηρήσω πιστά κατά τη δύναμη και την κρίση μου αυτό τον όρκο και το συμβόλαιό μου αυτό. Να θεωρώ αυτόν που μου δίδαξε αυτή την τέχνη ίσο με τους γονείς μου και να μοιραστώ μαζί μου τα υπάρχοντά μου και τα χρήματά μου αν έχει ανάγκη φροντίδας. Να θεωρώ τους απογόνους του ίσους με τ' αδέρφια μου και να τους διδάξω την τέχνη αυτή αν θέλουν να τη μάθουν, χωρίς αμοιβή και συμβόλαιο και να μεταδώσω με παραγγελίες, οδηγίες και συμβουλές όλη την υπόλοιπη γνώση μου και στα παιδιά μου και στα παιδιά εκείνου με δίδαξε και στους άλλους μαθητές που έχουν κάνει γραπτή συμφωνία μαζί μου και σ' αυτούς που έχουν ορκισθεί στον ιατρικό νόμο και σε κανέναν άλλο και να θεραπεύω τους πάσχοντες κατά τη δύναμή μου και την κρίση μου χωρίς ποτέ, εκουσίως, να τους βλάψω ή να τους αδικήσω. Και να μη δώσω ποτέ σε κανένα, έστω κι αν μου το ζητήσει, θανατηφόρο φάρμακο, ούτε να δώσω ποτέ τέτοια συμβουλή. Ομοίως να μη δώσω ποτέ σε γυναίκα φάρμακο για ν' αποβάλει. Να διατηρήσω δε τη ζωή μου και την τέχνη μου καθαρή και αγνή. Και να μη χειρουργήσω πάσχοντες από λίθους αλλά ν' αφήσω την πράξη αυτή για τους ειδικούς. Και σ' όποια σπίτια κι αν μπω, να μπω για την ωφέλεια των πασχόντων αποφεύγοντας κάθε εκούσια αδικία και βλάβη και κάθε γενετήσια πράξη και με γυναίκες και με άνδρες, ελεύθερους και δούλους. Και ό,τι δω ή ακούσω κατά την άσκηση του επαγγέλματός μου, ή κι εκτός, για τη ζωή των ανθρώπων, που δεν πρέπει ποτέ να κοινοποιηθεί, να σιωπήσω και να το τηρήσω μυστικό. Αν τον όρκο μου αυτό τηρήσω πιστά και δεν τον αθετήσω, είθε ν' απολαύσω για πάντα την εκτίμηση όλων των ανθρώπων για τη ζωή μου και για την τέχνη μου, αν όμως παραβώ και αθετήσω τον όρκο μου να υποστώ τα αντίθετα από αυτά".

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ Ο ΚΩΟΣ (460-370 π.Χ)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	9
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	11
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	16
ABSTRACT	18
 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	20
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο	21
Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	21
1.1 Επιδημιολογικά Δεδομένα.....	21
1.2 Ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού	23
1.3 Υποδοχέας οιστρογόνου και προγεστρόνης.....	25
1.4 Ο HER-2 υποδοχέας.....	26
1.5 Η Ki-67 πρωτεΐνη	28
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο	29
Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ EGFR	29
2.1 EGFR πρωτεϊνικές κινάσες	30
2.2 Οι συνδέτες της οικογένειας υποδοχέων EGFR.....	34
2.3 Ενεργοποίηση των EGFR υποδοχέων	35
2.4 Η EGFR σηματοδότη	39
2.5 Σηματοδότηση της οικογένειας EGFR στον πυρήνα	44
2.6 Ο ρόλος του HER2 στην καρκινογένεση του μαστού.....	45
2.7 Θεραπευτικές προσεγγίσεις για τον HER2+ καρκίνο του μαστού.....	47
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο	49
RANKL/ RANK ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ	49
3.1 RANKL/RANK/OPG.....	50
3.2 Η RANK σηματοδότηση στα οστά	51
3.3 Η RANK σηματοδότηση στο ανοσοποιητικό σύστημα	52
3.4 Η RANK σηματοδότηση στο μαστό	54

3.5 Ρύθμιση της RANK σηματοδότησης	56
3.6 Η RANK σηματοδότηση στον καρκίνο	57
3.7 Η RANK σηματοδότηση στον καρκίνο του μαστού	61
3.8 Η εμπλοκή του RANK μονοπατιού στα HER2 θετικά καρκινώματα μαστού	64
3.9 Θεραπευτικές προσεγγίσεις έναντι της RANK σηματοδότησης στον καρκίνο του μαστού	67
ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	69
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο	71
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	71
1.1 Καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων	71
1.2 Απομόνωση ολικού RNA από καρκινικά κύτταρα	72
1.3 RT-PCR (Reverse Transcription-PCR)	72
1.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	74
1.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	74
1.6 Απομόνωση πρωτεϊνών από καρκινικά κύτταρα	75
1.7 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	76
1.8 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-PAGE	76
1.9 Ανοσοαποτύπωση Western (Western blot)	78
1.10 Δοκιμασία XTT	79
1.11 Βιοδοκιμή προσομοίωσης τραύματος δι' αμυχής (Scratch-Wound Healing Assay)	80
1.12 Μέθοδος κλωνογενούς ικανότητας (Clonogenic Assay)	80
1.13 Κυτταρομετρία Ροής	81
1.14 Ανοσοφθορισμός	82
1.15 Duolink (PLA, Proximity Ligation Assay)	83
1.16 Στατιστική ανάλυση	84
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο	86
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	86
2.1 Ανίχνευση της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης των RANK και RANKL σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού	86
2.2 Κυτταρικός εντοπισμός των RANK και RANKL στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού	87

2.3 Μελέτη της φυσικής αλληλεπίδρασης των RANK και EGFR μελών στα κύτταρα καρκίνου του μαστού	88
2.4 Διερεύνηση της εμπλοκής του RANK/ HER2 διμερούς στο καθοδικό NF-κΒ μονοπάτι του RANK.....	93
2.5 Επίδραση της αναστολής των RANKL και HER2 στις ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων του μαστού.....	96
2.6 Η επίδραση της διπλής αναστολής του HER2 στη δραστικότητα του denosumab στα HER2+ κύτταρα καρκίνου του μαστού.....	100
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο	105
ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	105
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	111

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πολλά πράγματα σου έρχονται στο μυαλό την στιγμή που επιλέγεις να εκπονήσεις τη διδακτορική σου διατριβή, μεταξύ των οποίων η χαρά για την αναγνώριση της αξίας και του συνολικού σου προφίλ ως υποψηφίου, αλλά ταυτόχρονα και η συνειδητοποίηση της ευθύνης που αναλαμβάνεις για το επόμενο χρονικό διάστημα, όντας μέλος ενός εργαστηρίου. Αυτή την ευθύνη θεώρησα πως οφείλω να αναλάβω, όχι μόνο τυπικά, για την πραγματοποίηση της εργασίας μου, αλλά και ουσιαστικά, για την εισαγωγή μου στην νοοτροπία δουλειάς μέσα σε ένα εργαστήριο καθώς και στο κλίμα συνεργασίας που υπάρχει σε αυτό.

Ύστερα από τέσσερα ακαδημαϊκά έτη στους χώρους του εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών μπορώ να πω πλέον με σιγουριά, πως αυτά που αποκόμισα, τόσο σε επίπεδο γνώσεων, εμπειριών, οργάνωσης και δεξιοτήτων όσο και σε επίπεδο συναναστροφής με άτομα καταξιωμένα στο χώρο της επιστήμης της Βιολογίας, θα σταθούν σημαντικά εφόδια στην σταδιοδρομία μου. Θα αποτελούν μία ευχάριστη ανάμνηση, που δεν θα ξεχάσω ποτέ, αλλά και ένα μάθημα ζωής, το οποίο πάντα θα εκτιμώ απεριόριστα.

Με την ευκαιρία ολοκλήρωσης της διδακτορικής μου εργασίας λοιπόν, θα ήθελα να αναφέρω και να ευχαριστήσω θερμά ορισμένους ανθρώπους, που στάθηκαν αρωγοί δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια πραγματοποίησής της. Πρώτα από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή μου κ. Αθανάσιο Γ. Παπαβασιλείου και επιβλέποντα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την συγκεκριμένη διδακτορική εργασία. Τις θερμές μου ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω, επίσης στον Αν. Καθηγητή κ. Μιχάλη Καραμούζη και στην Αν. Καθηγήτρια Χριστίνα Πιπέρη, μέλη της Συμβουλευτικής μου Επιτροπής. Μου έδωσαν την ευκαιρία να αποτελέσω κομμάτι των ερευνητικών τους αναζητήσεων, κατάφεραν να με κάνουν να νιώσω οικεία, ώστε να μπορέσω εύκολα να συνηθίσω τους καινούργιους ρυθμούς και να αποδώσω στο μέγιστο δυνατό βαθμό, ελπίζοντας πως στάθηκα αντάξια.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στους Χρήστο Αδαμόπουλο και Αντώνη Γαργαλιώνη, Μεταδιδακτορικοί Συνεργάτες, οι οποίοι ανέλαβαν να μου υποδείξουν και να μου εξηγήσουν τις τεχνικές του εργαστηρίου, ήταν δίπλα μου οποιαδήποτε στιγμή χρειαζόμουν τη συμβουλή τους και με βοηθούσαν άμεσα, σε διάφορα πρακτικά ζητήματα που προέκυπταν καθημερινά, ανεξαρτήτως του φόρτου εργασίας τους. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, αλλά πρωτίστως φίλους, τον Άρη Ανέστη, την Μάιρα Κατσιάνου, τη Φορούλα Γριβάκη, οι οποίοι με καλωσόρισαν με χαρά στην οικογένεια του εργαστηρίου και ήταν πάντα πρόθυμοι να μου προσφέρουν έμπρακτα τη βοήθειά αλλά και τις γνώσεις τους.

Τέλος, ίσως το μεγαλύτερο ευχαριστώ θα ήθελα να το εκφράσω στους δικούς μου ανθρώπους, την οικογένεια και τους φίλους, για την υπομονή και τη στήριξη που μου έδειξαν, ο καθένας με το δικό του τρόπο, καθ' όλη τη διάρκεια αυτού του χρόνου. Ενός χρόνου με ιδιαίτερες απαιτήσεις που όμως πάντα θα θυμάμαι με τις ωραιότερες αναμνήσεις...

Ευχαριστώ,

H. Ζώη

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Ζώη Ηλιάννα

Διεύθυνση:

Τηλέφωνα επικοινωνίας:

Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο:

Ημερομηνία γέννησης:

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

- 2008–2014 Πτυχίο Βιολογίας

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Αθήνα (Ελλάδα)

Θέμα Πτυχιακής: "Αναζητώντας το ρόλο των flotillin- like πρωτεϊνών στον νηματοειδή μύκητα *Aspergillus nidulans*"

Βαθμός Πτυχίου: 7,15

- 2014–2015 Μεταπτυχιακές σπουδές στη Μοριακή Ιατρική, Κατεύθυνση

Λειτουργική Γονιδιωματική και Πρωτεωμική

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Αθήνα (Ελλάδα)

Θέμα Διπλωματικής: "Μελέτη των γονιδίων- στόχων του μονοπατιού της Πολυκυστίνης-1 μετά από μηχανοδιέγερση"

Βαθμός Πτυχίου: 9,32

- 2014–2019 Υποψήφια Διδάκτωρ στη Βιολογική Χημεία

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Αθήνα (Ελλάδα)

Θέμα Διδακτορικής Διατριβής: "Μελέτη της επίδρασης της οικογένειας του EGFR στον καρκίνο του μαστού"

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

- 09/2012–09/2013 Πτυχιακή Εργασία

Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Μικροοργανισμών, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Εθνικό Κέντρο Ερευνών Φυσικών Επιστημών, Δημόκριτος, Αθήνα (Ελλάδα)

Υπεύθυνη Καθ.: Βίκυ Σοφianoπούλου

- 02/2014–06/2014 MSc Rotation-Επιστημονικός συνεργάτης

Εργαστήριο Νευροφυσιολογίας, Κέντρο Βασικής Έρευνας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών, Αθήνα (Ελλάδα)

Υπεύθυνη Καθ.: Ειρήνη Σκαλιόρα

- 06/2014–09/2014 MSc Rotation-Επιστημονικός συνεργάτης

Εργαστήριο Βιοπληροφορικής και Ιατρικής Πληροφορικής, Κέντρο Βιολογίας Συστημάτων, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών, Αθήνα (Ελλάδα)

Υπεύθυνη Καθ.: Σοφία Κοσσίδα

- 10/2014–08/2015 Πτυχιακή Εργασία (MSc)

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα (Ελλάδα)

Υπεύθυνος Καθ.: Αθανάσιος Γ. Παπαβασιλείου, MD, PhD

- 11/2014–2019 Επιστημονικός συνεργάτης-Υποψήφια διδάκτωρ

Εργαστήριο Μοριακής Ογκολογίας, Τομέας Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα (Ελλάδα)

Υπεύθυνος Καθ.: Αθανάσιος Γ. Παπαβασιλείου, MD, PhD

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Μητρική γλώσσα: Ελληνικά

Ξένες γλώσσες: Αγγλικά

First Certificate in English, University of Cambridge

TOEIC, Hellenic American Union

Επαγγελματικές δεξιότητες:

- Συγγραφή επιστημονικών προγραμμάτων και άρθρων
- Εκπαίδευση φοιτητών
- Γνώση τεχνικών μοριακής βιολογίας, μικροβιολογίας και βιοχημείας

Ψηφιακές δεξιότητες:

- MOE 2010 (Molecular Operating Environment)
- MEGA Version 6.0. (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)
- Adobe Photoshop, Adobe Illustrator CC
- Image J, Fiji
- GraphPad Prism
- LAS AF Lite
- Ethovision XT
- EndNote
- Microsoft Office

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΕΣ

- Zoi I, Karamouzis MV, Adamopoulos C, Papavassiliou AG. "RANKL Signaling and ErbB Receptors in Breast Carcinogenesis" Trends Mol Med. 2016 Oct;22(10):839-850.

- Dalagiorgou G, Piperi C, Adamopoulos C, Georgopoulou U, Gargalionis AN, Spyropoulou A, Zoi I, Nokhbehshaim M, Damanaki A, Deschner J, Basdra EK, Papavassiliou AG. "Mechanosensor polycystin-1 potentiates differentiation of human osteoblastic cells by upregulating Runx2 expression via induction of JAK2/STAT3 signaling axis" Cell Mol Life Sci. 2017 Mar;74(5):921-936.

- Anestis A, Zoi I, Karamouzis MV. "Current advances of targeting HGF/c-Met pathway in gastric cancer" Ann Transl Med. 2018 Jun;6(12):247.

- Giannopoulou AF, Konstantakou EG, Velentzas AD, Avgeris SN, Avgeris M, Papandreou NC, Zoi I, Filippa V, Katarachia S, Lampidonis AD, Prombona A, Syntichaki P, Piperi C, Basdra EK, Iconomidou V, Papadavid E, Anastasiadou E, Papassideri IS, Papavassiliou AG, Voutsinas GE, Scorilas A, Stravopodis DJ. "Gene-Specific Intron Retention Serves as Molecular Signature that Distinguishes Melanoma from Non-Melanoma Cancer Cells in Greek Patients" Int J Mol Sci. 2019 Feb 21;20(4)

- Anestis A, Sarantis P, Theocharis S, Zoi I, Tryfonopoulos D, Korogiannos A, Koumarianou A, Xingi E, Thomaidou D, Kontos M, Papavassiliou AG, Karamouzis MV. "Estrogen receptor beta increases sensitivity to enzalutamide in androgen receptor-positive triple-negative breast cancer" J Cancer Res Clin Oncol. 2019 May;145(5):1221-1233.

- Papavassiliou K, Zoi I, Gargalionis A, Koutsilieris M. "Polycystin-1 affects cancer cell behavior and interacts with mTOR and Jak signaling pathways in cancer cell lines" J Cell Mol Med.

- Zoi I, Karamouzis MV, Xingi E, Sarantis P, Thomaidou D, Lembessis P, Theocharis S, Papavassiliou AG. "Combining RANK/RANKL and ERBB-2 targeting as a novel strategy in ERBB-2-positive breast carcinomas" Breast Cancer Res.

ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ

- Αδαμόπουλος Χ, Γαργαλιώνης Α, Ζώη Η, Ανέστης Α, Μαλάκου Λ, Αγρογιάννης Γ, Κορκολοπούλου Π, Πιπέρη Χ. "Διερεύνηση του ογκοκατασταλτικού ρόλου των Πολυκυστινών-1 και -2 και σε νεοπλασματικά κύτταρα οστεοσαρκώματος" Σκελετική Υγεία 2017

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 27- 29 Απριλίου 2017, 23^ο Ελληνικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα
- 9-12 Μαΐου 2018, 45^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας, Μεταβολισμού και Σακχαρώδη Διαβήτη, Θεσσαλονίκη
- 14-16 Δεκεμβρίου 2018, 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παιδιατρικών Λοιμώξεων, Αθήνα
- 18- 20 Απριλίου 2019, 23^ο Ελληνικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα
- 2-4 Μαΐου 2019, ESMO Breast Cancer, Βερολίνο, Γερμανία
- 15-18 Μαΐου 2019, 45^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα

ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ-ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- 6/2017-6/2019, «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών για μεταπτυχιακές σπουδές δεύτερου κύκλου σπουδών» του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευσης και Δια Βίου Μάθησης», του ΕΣΠΑ 2014-2020 με τη συγχρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου
- Πρώτο Βραβείο, "Μελέτη του ρόλου ανοσοκυρίαρχων Β-λεμφοκυτταρικών επιτόπων εντός πρωτεϊνών της επιφάνειας του πνευμονιόκοκκου στην προσκόλληση του βακτηρίου στο ανθρώπινο αναπνευστικό επιθήλιο", 14-16 Δεκεμβρίου 2018, 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παιδιατρικών Λοιμώξεων, Αθήνα
- Βραβείο Γ. Τόλη, "Mechanosensor polycystin-1 potentiates differentiation of human osteoblastic cells by upregulating Runx2 expression via induction of JAK2/STAT3 signaling axis", 9-12 Μαΐου 2018, 45^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας, Μεταβολισμού και Σακχαρώδη Διαβήτη, Θεσσαλονίκη
- Βραβείο Καλύτερης αναρτημένης εργασίας, "Συσχέτιση του μονοπατιού RANKL/RANK και των υποδοχέων της οικογένειας EGFR στην καρκινογένεση του μαστού", 18-20 Απριλίου 2019, 25^ο Ελληνικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Ο human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) υπερεκφράζεται στο 20-30% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού (KM) και σχετίζεται με κακή πρόγνωση. Σηματοδοτικά μονοπάτια καθοδικά του υποδοχέα receptor activator of nuclear factor-κB (RANK) παίζουν κεντρικό ρόλο στον KM. Το σηματοδοτικό μονοπάτι RANKL/RANK εμπλέκεται στον HER-2(+) KM. Ο μοριακός μηχανισμός της συμμετοχής του στην καρκινογένεση παραμένει αδιερεύνητος.

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η διερεύνηση της εμπλοκής του RANK υποδοχέα, και του σηματοδοτικού μονοπατιού του NF-κB στην ογκογένεση των HER-2(+) καρκινωμάτων μαστού (KM). Επιπλέον στόχος είναι η αποσαφήνιση του μοριακού μηχανισμού ρύθμισης της RANKL/RANK σηματοδότησης από μέλη της οικογένειας EGFR μέσω πιθανής φυσικής αλληλεπίδρασης, επηρεάζοντας βασικές κυτταρικές ιδιότητες. Τελικός στόχος της μελέτης αποτελεί η *in vitro* αξιολόγηση της συνδυαστικής αναστολής των RANK και EGFR υποδοχέων στην εξέλιξη των καρκινικών κυττάρων γεγονός που συμβάλει σε νέες πιθανές θεραπευτικές προτάσεις.

Υλικά και Μέθοδοι: Χρησιμοποιήθηκαν οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές KM, SKBR3, BT474, MCF7, MDA-MB-453. Μελετήθηκε η έκφραση των RANK και RANKL, μέσω RT-PCR, Western-Blot και τεχνικές ανοσοφθορισμού. Η αλληλεπίδραση του RANK με τον HER-2 ανιχνεύθηκε μέσω της μεθόδου Proximity Ligation Assay (PLA), η οποία επιτρέπει την οπτικοποίηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Η ενεργοποίηση του NF-κB μονοπατιού μελετήθηκε μέσω Western-Blot. Χρησιμοποιήθηκαν οι αναστολείς trastuzumab (T), pertuzumab (P), denosumab (D) των δύο μελετώμενων μονοπατιών. Εφαρμόστηκαν λειτουργικές δοκιμασίες μετανάστευσης, απόπτωσης και πολλαπλασιασμού. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μελετήθηκε εκτιμώντας τη βιωσιμότητα των κυττάρων με τη δοκιμασία XTT και του clonogenic assay, το μεταναστευτικό δυναμικό με τη βιοδοκιμή προσομοίωσης τραύματος δι' αμυχής (Scratch-Wound Healing Assay), ενώ η απόπτωση μέσω FACS έπειτα από χρώση των κυττάρων με ανεξίνη V.

Αποτελέσματα: Η πρωτεϊνική έκφραση του υποδοχέα RANK και του συνδέτη του RANKL εντοπίστηκε σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Ο υποδοχέας RANK βρέθηκε ότι διμερίζεται με τα μέλη της οικογένειας EGFR. Ο αριθμός των διμερών RANK/ HER-2 ανά κύτταρο φαίνεται να εξαρτάται από την έκφραση του HER-2 (SKBR3:5.4,BT474:8.2,MCF7:0.7,MDA-MB-453:0.3). Τα διμερή RANK/ HER-2 μειώνονται παρουσία των αναστολέων Denosumab (D), Trastuzumab (T) και Pertuzumab (P), ενώ αυξάνονται παρουσία του RANKL (R) στα κύτταρα SKBR3 (m:5.4, D:1.2, T:1.9, DT:0.6, TP:1, DTP:0.4, R:11.8) και BT474 (m:8.2, D:3.1, T:4.3, DT:0.7, TP:3.4, DTP:3.2, R:11.6). Η συνδυαστική επώαση των κυττάρων SKBR3 με τους αναστολείς μειώνει περαιτέρω την ενεργοποίηση του μονοπατιού NF-κΒ σε σχέση με τη μονή στόχευση. Η αναστολή των RANKL και HER-2 στη κυτταρική σειρά SKBR3 έχει ως αποτέλεσμα τον μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αυξημένη απόπτωση και χαμηλότερο μεταναστευτικό δυναμικό συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου (m) ενώ αντίθετες τιμές παρατηρήθηκαν παρουσία RANKL. Η συνδυαστική επώαση των κυττάρων SKBR3 με D, T και P πλεονεκτεί έναντι της μονής στόχευσης στις λειτουργικές δοκιμασίες. Το denosumab κατέστειλε την NF-κΒ σηματοδότηση και ελάττωσε το ρυθμό πολλαπλασιασμού στα καρκινικά κύτταρα MDA-MB-453. Η κυτταρική σειρά MCF7 δεν ανταποκρίθηκε στους αναστολείς.

Συμπεράσματα: Τα αποτελέσματα μας καταδεικνύουν μια νέα φυσική και μοριακή συσχέτιση μεταξύ των HER-2 και RANK μονοπατιών, η οποία επηρεάζει την εξέλιξη των HER-2(+) ΚΜ. Επιπλέον, παρουσιάζονται ενδείξεις που καθιστούν τη συνδυαστική στόχευση των RANKL, HER-2 ως ωφέλιμη θεραπευτική στρατηγική, η οποία θα πρέπει να ελεγχθεί περαιτέρω σε συγκεκριμένους ασθενείς με ΚΜ.

Λέξεις κλειδιά: Καρκίνος του Μαστού, RANK, RANKL, EGFR οικογένεια, HER-2, διμερή, denosumab, trastuzumab, pertuzumab

ABSTRACT

Introduction: HER-2 is overexpressed in 20–30% of breast cancer (BC), indicating poor prognosis. RANK downstream signaling pathways play a central role in BC. RANKL/RANK signaling pathway is implicated in HER-2(+) BC. The molecular mechanism of this implication remains to be elucidated.

Aim: The aim of the dissertation is to investigate the implication of RANK receptor and NF- κ B signaling pathway in the tumorigenesis of HER-2 (+) breast cancer (BC). Also, we tried to elucidate the molecular mechanisms underlying the regulation of RANKL/ RANK signaling by members of the EGFR family through putative physical interaction, affecting basic cellular properties. Finally, we examined the *in vitro* impact of the combined inhibition of RANK and HER-2 receptors in cancer cell development, which introduces new therapeutic strategies.

Material and Methods: Human BC cell lines SKBR3, BT474, MCF7, MDA-MB-453 were used. The expression of RANK and RANKL was evaluated using RT-PCR, Western-Blot and immunofluorescence. The interaction between RANK and HER-2 was detected using Proximity Ligation Assay (PLA) which enables the visualization of interacting proteins. NF- κ B pathway activation was studied using Western-Blot. The inhibitors trastuzumab (T), pertuzumab (P) and denosumab (D) of both pathways were used. The functional assays to study migration, apoptosis and proliferation were applied. Proliferation was evaluated using XTT and clonogenic assay, migration capacity via Scratch-Wound Healing Assay and apoptosis using flow cytometry analysis of annexin V and Propidium Iodide (PI) cell staining.

Results: Cell lines express RANK and RANKL. RANK receptor dimerizes with EGFR family members. RANK / HER-2 dimer number was found associated with HER-2 expression (SKBR3: 5.4, BT-474: 8.2, MCF7: 0.7, MDA-MB-453: 0.3). RANK / HER-2 dimers were decreased in the presence of the inhibitors D, T and P, while they were increased after RANKL (R) treatment in SKBR3 cells (m:5.4, D:1.2, T:1.9, DT:0.6, TP:1, DTP:0.4, R:11.8,) and BT-474 (m:8.2, D:3.1, T:4.3, DT:0.7, TP:3.4, DTP:3.2, R:11.6). Combination targeting of SKBR3 cells further decreased

NF- κ B pathway activation compared to single targeting experiments. In SKBR3, RANKL and HER-2 blockage resulted in reduced cell proliferation, increased apoptosis and lower metastatic potential compared to mock cells (m) and reversed values upon RANKL presence. The combination treatment of SKBR3 cells with D, T and P had an advantage in functional traits compared to single targeting. Denosumab suppressed NF- κ B signaling and diminished proliferation rate in MDA-MB-453 cells. MCF7 did not correspond to inhibitors.

Conclusions: The results indicate a novel physical and molecular association between HER-2 and RANK pathways that affects HER-2 (+) BC growth. Our data suggest that the combination of anti-HER-2 agents and RANKL inhibitors have a potential direct anti-tumor effect and should be further tested in certain BC patients.

Keywords: Breast Cancer, RANK, RANKL, EGFR family, HER-2, dimers, denosumab, trastuzumab, pertuzumab

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

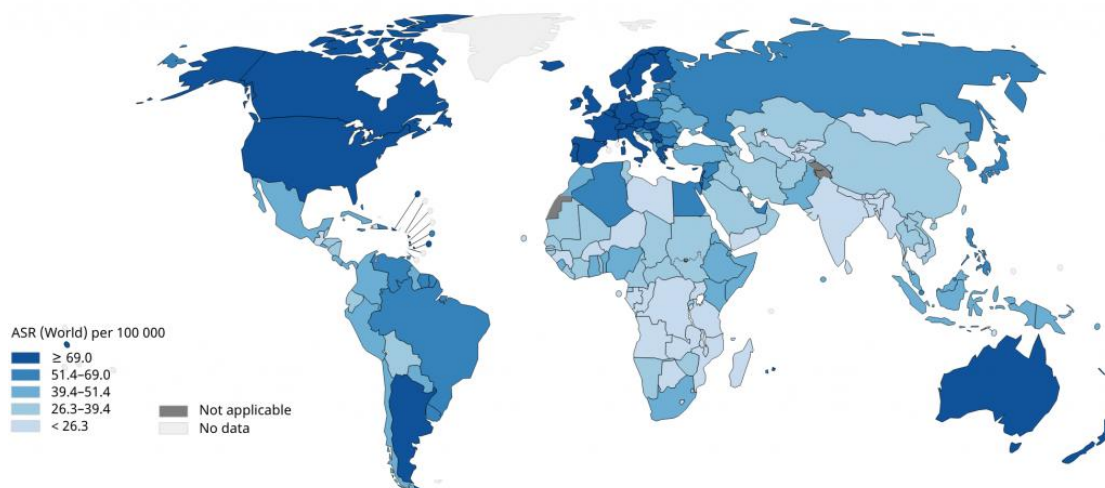
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

1.1 Επιδημιολογικά Δεδομένα

Ο καρκίνος του μαστού (ΚΜ) είναι η πιο συχνή κακοήθεια στο γυναικείο πληθυσμό παγκοσμίως. Η συχνότητα εμφάνισης του παρουσιάζει μεγάλες γεωγραφικές διακυμάνσεις καθώς τα μισά περίπου περιστατικά εμφάνισης της νόσου και το 60% των θανάτων εμφανίζονται στις αναπτυσσόμενες χώρες. Μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες αντιπροσωπεύει σχεδόν έναν στους τέσσερις καρκίνους που έχουν διαγνωσθεί σε γυναίκες και είναι η δεύτερη κύρια αιτία θνησιμότητας από καρκίνο σε αυτή την ομάδα (Herbst et al., 2006). Σύμφωνα με την Αμερικανική Αντικαρκινική Εταιρεία (ACS), εκτιμάται ότι 200.000 νέες περιπτώσεις διηθητικού καρκίνου του μαστού ο καρκίνος διαγνώσθηκαν το 2009, καθώς και περίπου 63.000 περιπτώσεις πορογενούς *in-situ* καρκίνου του μαστού (DCIS). Επιπλέον, πάνω από 40.000 γυναίκες πέθαναν από καρκίνο του μαστού το 2009, καθιστώντας την ασθένεια αυτή κρίσιμο στόχο για περαιτέρω έρευνα.

Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018, breast, females, all ages



Εικόνα 1: Στον χάρτη αποτυπώνονται οι εκτιμώμενες ηλικιακά τυποποιημένες συχνότητες των περιστατικών καρκίνου του μαστού στις γυναίκες όλων των ηλικιών. (GLOBOCAN 2018 Graph production: IARC (<http://gco.iarc.fr/today>) World Health Organization)

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί ποικίλες θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού, συμπεριλαμβανομένων της χημειοθεραπείας, ακτινοβολιών, ορμονοθεραπείας, ανοσοθεραπείας. Μετά από κατάλληλη θεραπεία, σχεδόν όλοι οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού είναι κλινικά απαλλαγμένοι από ασθένεια. Δυστυχώς, ένα ποσοστό αυτών των αρχικά θεραπευμένων ασθενών θα υποτροπιάσει μέσα σε μια διάρκεια 5-10 ετών, αντιπροσωπεύοντας ένα ποσοστό της τάξης του 5% έως 50%. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς που διαγιγνώσκονται εγκαίρως έχουν 100% πιθανότητα πενταετούς επιβίωσης, ενώ το ποσοστό μειώνεται κατακόρυφα στο 15% για τις γυναίκες οι οποίες έχουν εμφανίσει μετάσταση σε κάποιο άλλο ιστό (Cancer Research UK).

Η χειρουργική επέμβαση προτείνεται σε ασθενείς με πρωτογενή καρκίνο του μαστού ως πρώτη επιλογή (Matsen et al., 2013). Συνήθως επιλέγεται χειρουργική επέμβαση, ακολουθούμενη από ακτινοθεραπεία (Fisher et al., 2002). Αυτή η θεραπεία είναι αποτελεσματική για μια μεγάλη ομάδα ασθενών με καρκίνο του μαστού (Sacks et al., 1993). Σε παγκόσμιο επίπεδο, η ανάγκη για μαστεκτομή (αφαίρεση ολόκληρου του μαστού) έχει μειωθεί σημαντικά λόγω προγραμμάτων διαγνωστικού ελέγχου (μαστογραφία) που εντοπίζουν όγκους σε πρώιμα στάδια. Για την εξάλειψη δυνητικών μη ανιχνεύσιμων μικρομεταστάσεων, μετά τη χειρουργική επέμβαση, οι ασθενείς λαμβάνουν συχνά συμπληρωματική θεραπεία συμπεριλαμβανομένης της χημειοθεραπείας, ορμονοθεραπείας και/ ή στοχευμένης θεραπείας. Ωστόσο, ανάλογα με τον υπότυπο του καρκίνου του μαστού, όπως ο φλεγμονώδης, ορισμένοι ασθενείς μπορεί να λάβουν προεγχειρητική θεραπεία με την οποία ο πρωτογενής όγκος συρρικνώνεται πριν τη χειρουργική επέμβαση (Matsen et al., 2013). Ένα επιπλέον πλεονέκτημα αυτής της θεραπείας είναι ότι παρέχει ευκαιρίες για μελέτη της απόκρισης του όγκου σε μια θεραπεία.

Μελέτες έχουν αναδείξει παράγοντες οι οποίοι πιθανώς αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να έχουν μεγαλύτερη ή μικρότερη βαρύτητα στην εμφάνιση της νόσου. Ο κύριος παράγοντας κινδύνου είναι η ηλικία. Η γενετική προδιάθεση, ο θηλασμός, καθώς και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν κυρίαρχο ρόλο. Ο τρόπος ζωής, η παχυσαρκία, η ηλικία πρώτης έμμηνου ρύσης, κύησης και εμμηνόπαυσης, πρέπει να συνεκτιμούνται ως παράγοντες κινδύνου. Η πολυπαραγοντική φύση του καρκίνου του μαστού τονίζει την σημασία

διεξαγωγής μελετών με επίκεντρο την ταυτοποίηση προβλεπτικών και προγνωστικών δεικτών με σκοπό την καλύτερη διαβίωση, αντιμετώπιση και επιβίωση των ασθενών.

1.2 Ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια σε κλινικό και μοριακό επίπεδο. Τις τελευταίες δεκαετίες, ο καρκίνος του μαστού πιστεύεται ότι είναι αρκετά περίπλοκος και δεν θεωρείται ως μια απλή ασθένεια, αλλά μάλλον μια σειρά ξεχωριστών υποτύπων. Οι υποτύποι του καρκίνου του μαστού έχουν ταξινομηθεί σύμφωνα με ανοσοϊστοχημικούς δείκτες, κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, γονιδιωματικές αλλοιώσεις και προφίλ γονιδιακής έκφρασης (Koboldt et al., 2012; Curtis et al., 2012). Η μοριακή ταξινόμηση είναι ύψιστης σημασίας για την ακριβή πρόγνωση, διάγνωση και την πρόβλεψη της θεραπευτικής ανταπόκρισης (Rakha et al., 2017). Οι καρκίνοι του μαστού μπορούν να χωριστούν αδρά σε τέσσερις τουλάχιστον κύριους υπότυπους, με βάση τον μοριακό φαινότυπο και γνωστών βιοδεικτών, συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων προγεστερόνης (PR), οιστρογόνων (ER- α), επιδερμικού αυξητικού παράγοντα-2 (ERBB2, HER2/neu) και Ki-67 (Perou et al., 2000). Οι τέσσερις υπότυποι περιλαμβάνουν τους Luminal A, Luminal B, HER2 θετικούς και Basal-like όγκους. Ο Luminal A, ο πιο συνηθισμένος υπότυπος, είναι ER- α θετικός, PR θετικός, HER2 αρνητικός, με χαμηλή έκφραση του Ki-67, και έχει την καλύτερη ανταπόκριση στην ορμονοθεραπεία (Cheang et al., 2009). Ο Luminal B έχει παρόμοιο προφίλ με το Luminal A αλλά έχει υψηλή έκφραση του Ki-67, ένα γονίδιο που σχετίζεται με το πολλαπλασιασμό, χαρακτηρίζοντας τον υπότυπο αυτό πιο επιθετικό σε σχέση με τον από τον Luminal A (Cheang et al., 2009; Heitz et al., 2009). Οι ασθενείς που πάσχουν από τον Luminal B μπορούν να ωφεληθούν από ορμονοθεραπεία σε συνδυασμό με θεραπεία που περιλαμβάνει αντισώματα έναντι του HER2, Trastuzumab (Herceptin), ανάλογα με την έκφραση του HER2 (Onitilo et al., 2009; Yersal et al., 2014). Ο τρίτος υπότυπος καρκίνου του μαστού, που ονομάζεται HER2 θετικός (HER2+), χαρακτηρίζεται από γονιδιακή ενίσχυση ή υπερέκφραση του HER2 υποδοχέα και αντιμετωπίζεται κλινικά με χημειοθεραπεία συνδυασμένη με θεραπεία που περιλαμβάνει αντισώματα έναντι του HER2, όπως το Trastuzumab (Sorlie et al., 2001). Τέλος, ο basal-like/ triple negative breast cancer (τριπλά αρνητικά καρκινώματα μαστού, TNBC) είναι υπότυπος με κακή πρόγνωση, λόγω έλλειψης

συγκεκριμένων θεραπευτικών στόχων (Heitz et al., 2009). Η χημειοθεραπεία είναι η κύρια θεραπεία για αυτόν τον υποτύπο (Senkus et al., 2013).



Εικόνα 2: Μοριακή ταξινόμηση των υπότυπων του καρκίνου του μαστού (www.bcrf.org)

Τύπος	Βιοδείκτες	Θεραπεία	Ποσοστό
Luminal A	ER+, PR+/-, HER2- and Ki67 χαμηλό	Ορμονοθεραπεία	30-70
Luminal B	ER+, PR+/-, HER2+/- and Ki67 υψηλό	Ορμονοθεραπεία, Trastuzumab	10-20
HER2 (+)	ER-, PR- and HER2+	Trastuzumab, Χημειοθεραπεία	15-20
Basal-like	ER-, PR- and HER2-	Χημειοθεραπεία	5-15

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά των υπότυπων του καρκίνου μαστού με βάση την μοριακή ταξινόμηση.

Το σύστημα σταδιοποίησης TNM που διαμορφώθηκε από την American Joint Committee on Cancer (AJCC) βασίζεται σε δεδομένα τα οποία επιβεβαιώνουν τη σχέση της πρόγνωσης με τις ανατομικές ιδιότητες του όγκου (Edge and Compton, 2010). Η TNM σταδιοποίηση βασίζεται στη περιγραφή του μεγέθους του όγκου (T),

τη προσβολή των λεμφαδένων (N) και τη παρουσία μεταστάσεων (M) (Sobin et al., 2003). Αυτό το σύστημα ταξινόμησης παρέχει μια βάση για την πρόγνωση της νόσου, το σχεδιασμό των θεραπευτικών προσεγγίσεων και την αξιολόγηση των θεραπευτικών αποτελεσμάτων (Sobin et al., 2003).

Στους διηθητικούς καρκίνους χρησιμοποιείται ο βαθμός κακοήθειας (tumor grade) που ταξινομεί τους όγκους με βάση την μορφολογία των καρκινικών κυττάρων μικροσκοπικά (Elston et al., 2002). Χρησιμοποιείται ως προγνωστικός δείκτης για το πόσο γρήγορα ένας όγκος θα αναπτυχθεί και θα εξαπλωθεί (Elston et al., 1991, 2002). Ο βαθμός κακοήθειας αντιπροσωπεύει την πιθανή επιθετικότητα ενός όγκου λαμβάνοντας υπόψη την ύπαρξη λοβιακών/ σωληνοειδών σχηματισμών, τον πυρηνικό πολυμορφισμό (ποικιλομορφία στο μέγεθος και το σχήμα των πυρήνων και πυρηνίσκων) και τον αριθμό μιτωτικών διαιρέσεων (Elston et al., 1984). Από αυτό το σύστημα ταξινόμησης προκύπτουν τρεις υποομάδες. Όσο μικρότερος είναι ο βαθμός κακοήθειας, τόσο καλύτερη είναι η πρόγνωση. Το Grade 1 αντιπροσωπεύει χαμηλό βαθμό κακοήθειας και καλά διαφοροποιημένα κύτταρα, το Grade 2 αντιπροσωπεύει μέτρια διαφοροποίηση και το Grade 3 υποδηλώνει υψηλό βαθμό, ελάχιστα διαφοροποιημένα κύτταρα και επιθετικό τύπο καρκίνου (Elston et al., 1984).

1.3 Υποδοχέας οιστρογόνου και προγεστρόνης

Η υπερέκφραση των ορμονικών υποδοχέων οιστρογόνου (ER) και προγεστερόνης (PR) αποτελεί βασικό ογκογόνο μηχανισμό, ο οποίος συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων καρκίνου του μαστού, στην αναστολή της απόπτωσης, τη διήθηση και την αγγειογένεση (Feng et al., 2018). Η έκφραση των ER (ERα ισομορφή) και PR υποδοχέων καθορίζεται στα πλαίσια της κλινικής ρουτίνας για όλα τα καρκινώματα του μαστού μέσω της μεθόδου της ανοσοϊστοχημείας (IHC). Η αξιολόγηση (scoring) βασίζεται στον προσδιορισμό του ποσοστού των πυρήνων των καρκινικών κυττάρων που είναι θετικά στη χρώση (Duffy et al., 2017; Kos and Dabbs, 2016). Παρόλο που δεν υπάρχει κοινώς συμφωνημένη οριακή τιμή για τον καθορισμό αρνητικού (HR-) και θετικού (HR+) προφίλ ορμονικού υποδοχέα (hormonal receptor, HR), το 1% και το 10% είναι οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες οριακές τιμές στην κλινική πράξη για την επιλογή ασθενών που είναι πιθανό να ανταποκριθούν στην ορμονοθεραπεία (Fujii et al., 2017; Hammond et al., 2010). Περίπου το 50% των HER2+ καρκίνων του μαστού χαρακτηρίζονται από HR+

προφίλ (κυρίως ER+) (Howlader et al., 2014; Vici et al., 2015), αν και ο ER εκφράζεται σε χαμηλότερο επίπεδο σε σχέση με τα ER+ HER2- καρκινώματα μαστού (Konecny et al., 2003). Το αρνητικό HR προφίλ, ειδικά το ER-, αποτελεί προγνωστικό δείκτη για πρώιμη υποτροπή (Strasser-Weippl et al., 2015; Zurawska et al., 2013), μειωμένη επιβίωση μετά την υποτροπή (Park et al., 2010) και θάνατο (Vaz-Luis et al., 2012) στον HER2+ τύπο καρκίνου του μαστού. Αντιστοίχως, οι HR-HER2+ καρκίνοι του μαστού συχνά χαρακτηρίζονται από μεγάλο μέγεθος ($\geq pT3$), υψηλό βαθμό κακοήθειας (III) και λεμφαδενική συμμετοχή (Lee et al., 2014; Vaz-Luis et al., 2012). Η ορμονοθεραπεία έχειδειχθεί να προσφέρει ένα πλεονέκτημα στην επιβίωση των ER+ HER2+ καρκινωμάτων μαστού όταν αυτή συνδυάζεται με trastuzumab και χημειοθεραπεία (Hayashi et al., 2013). Τα παραπάνω προτείνουν την παραδοχή μιας αμφίδρομης μοριακής συνομιλίας μεταξύ των HER2 και ER σηματοδοτικών μονοπατιών (Giuliano et al., 2013).

1.4 Ο HER-2 υποδοχέας

Ο καθορισμός του προφίλ του HER2 είναι απαραίτητος για όλους τους τύπους όγκων του μαστού, λόγω του ότι τα HER2+ καρκινώματα προσφέρουν επιλογές για διαφορετικές θεραπευτικές προσεγγίσεις και έχουν διαφορετική πρόγνωση σε σχέση με τα καρκινώματα που χαρακτηρίζονται από φυσιολογική HER2 έκφραση, και αποτελούν τα HER2 αρνητικά (HER2-) (Duffy et al., 2017). Τα διαγνωστικά κριτήρια για το προσδιορισμό των HER2 θετικών όγκων ορίζονται από τις κατευθυντήριες οδηγίες της American Society of Clinical Oncology (ASCO) και του College of American Pathologists (CAP), που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Η πρωτεϊνική έκφραση καθορίζεται από τους παθολογοανατόμους μέσω της ανοσοϊστοχημείας, και το πρότυπο της χρώσης των κυτταρικών μεμβρανών αξιολογείται από διηθητικές περιοχές του καρκίνου. Το προφίλ της γονιδιακής ενίσχυσης του *HER2* καθορίζεται μέσω της τεχνικής του επιτόπιου υβριδισμού (*in situ* hybridization, ISH) χρησιμοποιώντας ιχνηθέτες (probes) σημασμένους με χρωμογόνο (CISH) ή φθοριόχρωμα (FISH). Η ISH μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί χρησιμοποιώντας είτε single-probe (έναντι του *HER2*) είτε dual-probe (έναντι των *HER2* και κεντρομεριδίου 17). Η ανάλυση βασίζεται στον αριθμητικό προσδιορισμό των γονιδιακών αντιγράφων του *HER2* ή σε σχέση με τα αντίγραφα του κεντρομεριδίου του χρωμοσώματος 17 (CEP17) (λόγος *HER2*:CEP17). (Duffy et al., 2017; Wolff et al., 2018). Τα καρκινώματα μαστού που χαρακτηρίζονται από πρωτεϊνική

υπερέκφραση του HER2 (IHC αξιολόγηση 3+) και/ ή ενισχυμένο *HER2* (≥ 6 αντίγραφα/κύτταρο ή λόγο $HER2:CEP17 \geq 2.0$ μέσω ISH) θεωρούνται HER2 θετικά (Wolff et al., 2018). Η υπερέκφραση του HER2 είναι αποτέλεσμα της γονιδιακής ενίσχυσης του HER2, ενώ τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του HER2 με σχετικά φυσιολογικό *HER2* γονιδιακό προφίλ είναι σπάνια στους καρκίνους του μαστού (Pauletti et al., 2000; Sircoulomb et al., 2010).

Αξιολόγηση	Περιγραφή	HER2 προφίλ
Ανοσοϊστοχημεία (πρωτεϊνική έκφραση HER2)		
0	Απουσία ή ελαφρά ατελής χρώση στο $\leq 10\%$ των καρκινικών κυττάρων	Αρνητικό
1+	Ασθενώς ατελής μεμβρανική χρώση στο $>10\%$ των καρκινικών κυττάρων	Αρνητικό
2+	Ασθενώς ή μετρίως πλήρης μεμβρανική χρώση στο $>10\%$ των καρκινικών κυττάρων	Απροσδιόριστο*
3+	Ισχυρή πλήρης περιφερική μεμβρανική χρώση στο $>10\%$ των καρκινικών κυττάρων	Θετικό
In situ hybridization with single-probe (HER2 αριθμός γονιδιακών αντιγράφων/ κύτταρο)		
<4	HER2 σήματα <4 ανά κύτταρο	Αρνητικό
≥ 4 to <6	HER2 σήματα 4-5 ανά κύτταρο	Απροσδιόριστο**
≥ 6	HER2 σήματα ≥ 6 ανά κύτταρο	Θετικό

Πίνακας 2: Κριτήρια αξιολόγησης για τον προσδιορισμό του HER2 προφίλ μέσω IHC and ISH (single-probe) σε καρκινώματα μαστού σύμφωνα με τη πρόσφατη σύσταση των ASCO/CAP για την κλινική πράξη (Wolff et al., 2018). *Δείγματα με απροσδιόριστα IHC αποτελέσματα πρέπει το HER2 προφίλ να επιβεβαιώνεται με ISH (αξιολόγηση ≥ 20 κυττάρων από την περιοχή του ιστού που προσδιορίστηκε ως αβέβαιη από την χρώση στην IHC) **Δείγματα με απροσδιόριστα ISH αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται με επανεξέταση/ παρατήρηση από άλλο ειδικό εάν η IHC αξιολόγηση είναι 2+ (αβέβαιο ISH με 3+ IHC -> HER2+, αβέβαιο ISH με 1+ IHC -> HER2-).

Ο κίνδυνος επανεμφάνισης της νόσου στα HER2+ καρκινώματα του μαστού είναι πολλαπλάσια υψηλότερη σε σχέση με τους luminal A καρκίνους του μαστού

(HR+, HER2-, χαμηλή έκφραση Ki67) μέσα στα 10 χρόνια από την πρωτογενή νόσο (Voduc et al., 2010). Περίπου το 25% των ασθενών με πρώιμο HER2+ καρκίνο του μαστού, στους οποίους δίδεται σαν επικουρική θεραπεία το trastuzumab, επανεμφανίζει τη νόσο μέσα σε τέσσερα με έξι χρόνια μετά τη διάγνωση (Gallagher et al., 2016). Γενικά, κατά τη διάρκεια της 15-ετούς παρακολούθησης, το 16% και 38% των ασθενών που έχουν λάβει επικουρική χημειοθεραπεία εμφανίζουν τοπικές ή περιφερικές μεταστάσεις, αντίστοιχα (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, EBCTCG, 2018). Το προφίλ του HER2 καθορίζει ουσιαστικά την πρόγνωση του καρκίνου του μαστού, και είναι ο πιο αξιόπιστος βιοδείκτης για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στις αντι-HER2 θεραπείες (Duffy et al., 2017; Wolff et al., 2018).

1.5 Η Ki-67 πρωτεΐνη

Η πρωτεΐνη Ki-67, κωδικοποιείται από το γονίδιο *MKI67*, εκφράζεται καθολικά στον πυρήνα κυττάρων που πολλαπλασιάζονται καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, με εξαίρεση την πρώιμη G1 και G0 φάση, οι οποίες χαρακτηρίζουν τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται με αργούς ρυθμούς και βρίσκονται σε φάση ηρεμίας. Τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα παρουσιάζουν χαμηλότερα Ki-67 επίπεδα στις G1 και πρώιμη S φάσεις, και πιο έντονη έκφραση στην φάση M (Lopez et al., 1991). Ο ακριβής μηχανισμός κατά τον οποίο η Ki-67 λειτουργεί στην κυτταρική διαίρεση δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί (Sun and Kaufman, 2018). Έχει αποδειχθεί ότι η Ki-67 σχετίζεται με συμπυκνωμένα χρωμοσώματα, εμποδίζοντάς τα να κολλήσουν μεταξύ τους και επιτρέποντας τη χρωμοσωμική κινητικότητα κατά την κυτταροκίνηση (Cuylen et al., 2016). Η Ki-67 έχει επίσης προταθεί ότι προωθεί την οργάνωση της ετεροχρωματίνης ρυθμίζοντας την γονιδιακή έκφραση (Sobecki et al., 2016). Η υψηλή έκφραση της Ki-67 είναι χαρακτηριστική σε κακοήθειες, και σχετίζεται με επιθετικά χαρακτηριστικά (μεγάλου μεγέθους όγκοι, υψηλός βαθμός κακοήθειας, HR αρνητικότητα, HER2+ προφίλ) και χαμηλά ποσοστά επιβίωσης (Knutsvik et al., 2014). Η Ki-67 προτείνεται και χρησιμοποιείται ευρέως ως βιοδείκτης για τον προσδιορισμό επιθετικών προτύπων ανάπτυξης στους καρκίνους του μαστού (Duffy et al., 2017).

Η έκφραση της Ki-67 μελετάται συνήθως μέσω της τεχνικής της ανοσοϊστοχημείας. Το ποσοστό των κυττάρων που είναι θετικά στη χρώση (Ki-67 labelling index, Ki67-LI) προσδιορίζεται και συγκρίνεται με τις τιμές αναφοράς (Kos

and Dabbs, 2016). Κλινικά έγκυρο θεωρείται το 20% ως οριακή τιμή για το προσδιορισμό χαμηλών (<20%) και υψηλών ($\geq 20\%$) επιπέδων έκφρασης (Goldhirsch et al., 2013), στους HER2- (Bustreo et al., 2016) αλλά και στους HER2+ (Muftah et al., 2017) καρκίνους του μαστού. Το 14% ως οριακή τιμή αποδείχθηκε ότι είναι εφαρμόσιμο μόνο στη διαφοροποίηση μεταξύ των luminal A (χαμηλή Ki-67) και luminal B (υψηλή Ki-67) καρκινωμάτων μαστού (Healey et al., 2017). Η Ki-67 χρησιμοποιείται για την κατηγοριοποίηση των ασθενών που είναι πιο πιθανό να επωφεληθούν από εισαγωγική (neoadjuvant) (Chen et al., 2018) ή συμπληρωματική (adjuvant) θεραπεία (Nitz et al., 2014) και για την εκτίμηση της ανταπόκρισης του εναπομείναντα όγκου στην θεραπεία (Cabrera-Galeana et al., 2018).

Παρά την ευρεία χρήση της Ki-67, η προγνωστική σημαντικότητά της είναι αμφιλεγόμενη, και έχει επικριθεί, κυρίως στους επιθετικούς HER2+ καρκίνους του μαστού (Niikura et al., 2014). Οι διαφορές που εντοπίζονται στις μεθόδους αξιολόγησης και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων έχουν υπονομεύσει την κλινική εφαρμογή της και, ως εκ τούτου η προτυποποίηση είναι απαραίτητη για την αύξηση της συνοχής των μεθόδων μεταξύ των εργαστηρίων (Duffy et al., 2017). Η χρήση της ψηφιακής ανάλυσης εικόνας (digital image analysis, DIA) έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την ακρίβεια και την αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου Ki-67 σε σύγκριση με τη συμβατική μικροσκοπία (Stålhammar et al., 2018).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

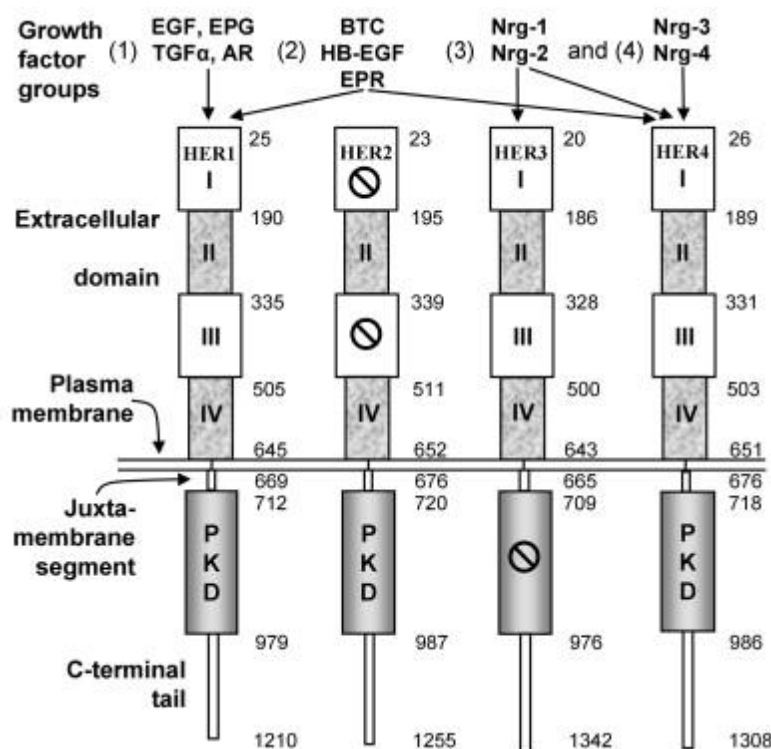
Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ EGFR

2.1 EGFR πρωτεϊνικές κινάσες

Η οικογένεια των υποδοχέων EGFR αποτελείται από τέσσερα μέλη, EGFR/ERBB1/HER1, ERBB2/HER2/NEU, ERBB3/HER3, ERBB4/HER4, τα οποία εκφράζονται στα επιθηλιακά, μεσεγχυματικά, και νευρικά κύτταρα καθώς και στους κυτταρικούς τους προγόνους. Αυτή η οικογένεια υποδοχέων είναι η καλύτερα μελετημένη οικογένεια κυτταρικής σηματοδότησης στη βιολογία. Ο Cohen ξεκίνησε μια σειρά μελετών και περιέγραψε τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (epidermal growth factor, EGF), τον υποδοχέα του (EGFR) καθώς και τις βιοχημικές του λειτουργίες (Cohen, 1983). Ανακάλυψε ότι ο EGFR είναι μια πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης, η ανακάλυψη αυτή ήταν πρωτοποριακή εκείνη την εποχή (Carpenter et al., 1990). Οι Cohenet και συνεργάτες βρήκαν ότι το πολυπεπίδιο των 170 kDa περιέχει δραστικότητα πρόσδεσης του EGF καθώς και δραστικότητα πρωτεϊνικής κινάσης (Cohen et al., 1982). Ο EGFR ήταν ο πρώτος υποδοχέας για τον οποίο αποδείχτηκε η σχέση μεταξύ της υπερέκφρασης και του καρκίνου (Thompson et al., 1985). Ο EGFR είναι από τους πιο καλά μελετημένους υποδοχείς πρωτεϊνικής κινάσης τυροσίνης λόγω του διευρυμένου ρόλου του στην μεταγωγή σήματος και στην ογκογένεση.

Οι Ulrich και συνεργάτες βασιζόμενοι στην πρωτοταγή δομή του, υπέθεσαν ότι ο υποδοχέας αποτελείται από ένα εξωκυττάριο τμήμα, ένα υδρόφοβο διαμεμβρανικό τμήμα, και ένα ενδοκυττάριο τμήμα με ενεργότητα πρωτεϊνικής κινάσης (Ullrich et al., 1984). Αυτή η υπόθεση άντεξε στην πίεση του χρόνου και εφαρμόζεται ως βασική αρχή σε όλους τους υποδοχείς πρωτεϊνικής κινάσης. Το εξωκυττάριο τμήμα των μελών της οικογένειας EGFR χωρίζεται σε τέσσερα τμήματα: τα τμήματα I και III, τα οποία είναι πλούσια σε λευκίνη και συμμετέχουν στην πρόσδεση του συνδέτη, και τα τμήματα II και IV, τα οποία περιέχουν αρκετά κατάλοιπα κυστεΐνης και συμμετέχουν στο σχηματισμό δισουλφιδικού δεσμού. Το τμήμα II συμμετέχει στο σχηματισμό ομοδιμερών και ετεροδιμερών μεταξύ των μελών της οικογένειας EGFR. Τα εξωκυττάρια τμήματα ακολουθούνται από ένα διαμεμβρανικό τμήμα 19-25 αμινοξικών καταλοίπων και ένα ενδοκυττάριο τμήμα

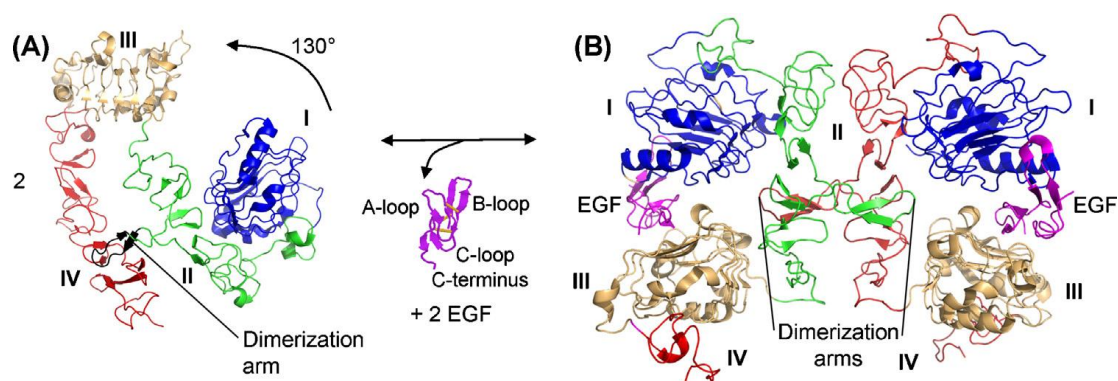
περίπου 550 αμινοξικών καταλοίπων που περιέχει (α) μια περιοχή παραπλεύρως της μεμβράνης, (β) ένα τμήμα πρωτεϊνικής κινάσης, και (γ) μια καρβοξυτελική ουρά.



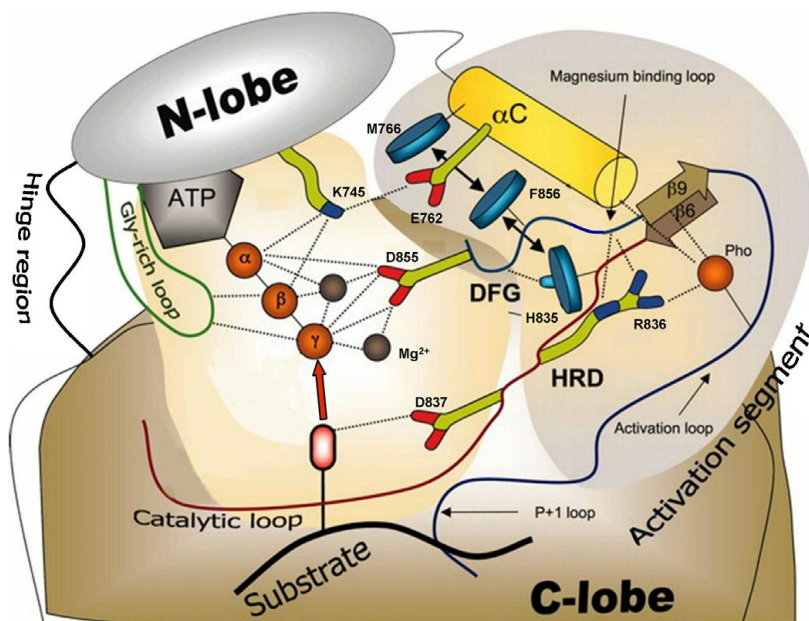
Εικόνα 3: Η δομή των ErbB/HER υποδοχών. Ο υποδοχέας HER2 δεν έχει τμήματα I και III που συμμετέχουν στην πρόσδεση του συνδέτη. Η ενεργότητα της κινάσης του υποδοχέα HER3 είναι μειωμένη. Οι αριθμοί στην εικόνα αντιστοιχούν στα αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης, συμπεριλαμβανομένου του πεπτιδίου σηματοδότησης (δεν απεικονίζεται), ο κάθε αριθμός αντιστοιχεί στο πρώτο κατάλοιπο του παρακείμενου τμήματος εκτός από το (α) τελευταίο κατάλοιπο του εξωκυττάριου τμήματος και (β) το τέλος των πρωτεϊνών. Υποδεικνύονται οι ομάδες των αυξητικών παραγόντων (1-4) που προσδένονται στους υποδοχείς. PKD, τμήμα πρωτεϊνικής κινάσης (Roskoski, 2014).

Η πρόσδεση των αυξητικών παραγόντων στους HER1/ 3/ 4 προωθεί τον διμερισμό των μονομερών υποδοχών και αυξάνει την ενεργότητα της κινάσης τυροσίνης του ενδοκυττάριου τμήματος των υποδοχών HER1/ 2/ 4 (Schlessinger, 2002). Παρά το γεγονός ότι ο HER2 δεν προσδένεται σε κάποιο συνδέτη ή αυξητικό παράγοντα, μπορεί να σχηματίζει ετεροδιμερή. Υπάρχουν ποικίλοι τρόποι με τους οποίους ένας αυξητικός παράγοντας ή συνδέτης μπορεί να επάγει το διμερισμό ενός υποδοχέα. Οι υποδοχείς HER1/ 3/ 4 ακολουθούν μεσολαβούμενο από τον υποδοχέα μηχανισμό διμερισμού (Ogiso et al., 2002; Garret et al., 2002). Οι δισθενείς συνδέτες, EGF (Ogiso et al., 2002) ή TGF (Garrett et al., 2002), έρχονται σε επαφή με δύο διαφορετικές περιοχές των τμημάτων I και III στο μόριο ενός υποδοχέα. Από

δεδομένα της κρυσταλογραφικής δομής του εξωκυττάριου τμήματος του EGFR αποδεικνύεται ότι το πλούσιο σε λευκίνη τμήμα I μοιάζει με το τμήμα III και το πλούσιο σε κυστεΐνη τμήμα II μοιάζει με το τμήμα IV (Garrett et al., 2003; Ferguson et al., 2003). Το τμήμα III του EGFR σχηματίζει μια β-έλικα σχήματος δεξιόστροφου έξι στροφών βαρελιού, η οποία καλύπτεται σε κάθε άκρο της από μία α-έλικα και ένα δισουλφιδικό δεσμό. Το τμήμα I έχει παρόμοια δομή. Αντίθετα, τα τμήματα II και IV σχηματίζουν εκτεταμένες ραβδόμορφες πτυχώσεις. Η πρόσδεση του συνδέτη προωθεί μεγάλες αλλαγές στη διαμόρφωση του εξωκυττάριου τμήματος εκθέτοντας τον βραχίονα διμερισμού, δομής β-φουρκέτα-θηλιά, από την αύλακα του τμήματος IV (Burgess et al., 2003). Πριν την πρόσδεση του συνδέτη, ο βραχίονας βρίσκεται κρυμμένος μέσα στο τμήμα IV, σταθεροποιώντας την κλειστή διαμόρφωση του υποδοχέα, η οποία περιορίζει την κινητικότητά του, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η πρόσδεση του συνδέτη και ο διμερισμός. Η πρόσδεση του συνδέτη σπάει τον ενδομοριακό δεσμό και επιτρέπει στο βραχίονα διμερισμού να εισέλθει στην αύλακα του τμήματος II ενός δεύτερου υποδοχέα που είναι προσδεμένος με τον συνδέτη του. Οι Cho και Leahy προσδιόρισαν την κρυσταλλική δομή του ελεύθερου HER3 (Cho and Leahy, 2002) και ο Bouyain και συνεργάτες την δομή του ελεύθερου HER4 (Bouyain et al., 2005). Η δομή των δύο υποδοχέων μοιάζει με αυτή του EGFR. Οι HER3 και HER4 κατέχουν μια κλειστή δομή με δεσμούς ανάμεσα στα τμήματα II και IV παρόμοιους με αυτούς που αναπτύσσονται στον EGFR. Σε αντίθεση, ο HER2 βρίσκεται σε εκτεταμένη και ανοιχτή διαμόρφωση με τον βραχίονα διμερισμού εκτεθειμένο, οπότε είναι ικανός να διμεριστεί με τα υπόλοιπα μέλη της EGFR οικογένειας (Cho et al., 2003). Παρόλη την διαμόρφωση του εξωκυττάριου τμήματός του, ο HER2 δεν σχηματίζει ενεργά διμερή εκτός αν υπερεκφράζεται. Παρόμοια με τους HER1/ 3/ 4, ο HER2 αυτοαναστέλλεται, αλλά μέσω ενός μηχανισμού που δεν εμπλέκει ένα κρυμμένο βραχίονα διμερισμού.



Εικόνα 4: Δομές της κλειστής διαμόρφωσης του εξωκυτταρικού τμήματος του ανθρώπινου EGFR και του επαγόμενου από τον αυξητικό παράγοντα ανοικτού εκτεταμένου διμερούς EGFR. (Α) Ο βραχίονας διμερισμού από το τμήμα II (μαύρο) του δεσμευμένου EGFR αλληλεπιδρά με το τμήμα IV (κόκκινο) και κρύβεται. Τα τμήματα I (μπλε), II (πράσινο) και III (μαύρισμα) παρουσιάζονται. (Β) Η πρόσδεση του συνδέτη προκαλεί μια μεγάλη αλλαγή στη διαμόρφωση που έχει σαν αποτέλεσμα την έκθεση του βραχίονα διμερισμού, επιτρέποντας τον σχηματισμό διμερών με τον EGFR (Roskoski, 2014).



Εικόνα 5: Διάγραμμα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των καταλοίπων της καταλυτικής περιοχής του EGFR, του ATP και του πρωτεϊνικού υποστρώματος (Roskoski, 2014).

Όλα τα μέλη της οικογένειας EGFR έχουν παρόμοια τμήματα πρωτεϊνικής κινάσης. Οι HER1 /2/ 4 έχουν ενεργότητα πρωτεϊνικής κινάσης, ενώ η καταλυτική ενεργότητα του HER3 είναι περιορισμένη. Τα σημαντικά κατάλοιπα της περιοχής της κινάσης των HER1/ 2/ 4 είναι συντηρημένα και τα τρία μέλη της οικογένειας μοιάζουν αρκετά στη δομή της πρωτεϊνικής κινάσης. Η περιοχή της κινάσης των μελών της οικογένειας EGFR περιέχει έναν μικρό αμινοτελικό λοβό και ένα μεγάλο καρβοξυτελικό λοβό, που περιέχει συντηρημένες α- έλικες και β- κλώνους και επιτελούν ρυθμιστικούς και καταλυτικούς ρόλους (Knighton et al., 1991). Κατάλοιπα από το μικρό και το μεγάλο λοβό απαρτίζουν το ρυθμιστικό κέντρο (R-spine) και το καταλυτικό κέντρο (C-spine). Τα δύο κέντρα υπαγορεύουν την τοποθέτηση του πρωτεϊνικού υποστρώματος (R- spine) και του ATP (C- spine), έτσι ώστε να πραγματοποιείται η κατάλυση. Η σωστή ευθυγράμμιση των κέντρων είναι απαραίτητη για τη συναρμολόγηση μιας ενεργούς κινάσης. Ο μικρός λοβός περιέχει συντηρημένες περιοχές που διευκολύνουν την πρόσδεση των φωσφορικών ομάδων

και της αδενίνης του προς κατάλυση ATP. Ο μεγάλος λοβός περιέχει κυρίως α-έλικες με έξι συντηρημένα τμήματα (αD- αI) (Taylor et al., 2012). Περιέχει επίσης, τέσσερις συντηρημένους β- κλώνους (β6- β9), οι οποίοι περιέχουν τα κατάλοιπα που σχετίζονται με τη μεταφορά των φωσφορικών ομάδων από το ATP στο υπόστρωμα του. Η θηλιά ενεργοποίησης στην ενεργή μορφή της σχηματίζει μια ανοιχτή δομή που επιτρέπει τη σύνδεση πρωτεΐνης/ πεπτιδίου. Η περιοχή ενεργοποίησης επηρεάζει την πρόσδεση του υποστρώματος και την απόδοση της κατάλυσης (Meharena et al., 2013).

2.2 Οι συνδέτες της οικογένειας υποδοχέων EGFR

Όλοι οι συνδέτες της οικογένειας υποδοχέων EGFR εκφράζονται ως διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που διαπερνούν μια φορά την κυτταρική μεμβράνη (Gullick, 2001). Οι πρόδρομες μορφές των συνδετών κατέχουν ένα εξωκυττάριο, ένα διαμεμβρανικό και ένα μικρό ενδοκυττάριο τμήμα. Οι ενεργές μορφές των αυξητικών παραγόντων απαντώνται στο εξωκυττάριο τμήμα και απελευθερώνονται μέσω πρωτεόλυσης από τα μέλη της οικογένειας ADAM (a disintegrin and metalloproteases) (Blobel, 2005). Η διαδικασία της πρωτεόλυσης και η απελευθέρωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών λειτουργεί ως μετα-μεταγραφικός διακόπτης που ρυθμίζει την ενεργότητα των αυξητικών παραγόντων. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται πρωτεϊνική πρωτεολυτική κατάτμηση (protein ectodomain shedding), και τα πρωτεολυτικά ένζυμα αναφέρονται συχνά ως sheddases. Από την πολυμελή οικογένεια ADAM, τα ADAM10 και ADAM17 συμμετέχουν στη δημιουργία λειτουργικών μελών της οικογένειας συνδετών EGF (Blobel, 2005; Rose-John, 2013). Ο EGF αποτελείται από 53 αμινοξικά κατάλοιπα. Αυτός όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων περιέχει έξι κατάλοιπα κυστεινών που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι neuregulins 1-3 περιέχουν μια περιοχή EGF-τύπου μέσα σε ένα μεγαλύτερο πολυπεπτίδιο, ενώ η Nrg-4 έχει παρόμοιο μέγεθος με αυτό του EGF. Οι συνδέτες της οικογένειας EGFR γενικά δρουν σε κοντινές αποστάσεις από την περιοχή παραγωγής τους (Blobel, 2005). Μπορεί να δράσουν με αυτοκρινή τρόπο στο ίδιο κύτταρο από το οποίο απελευθερώθηκαν, με συνδετοκρινή τρόπο σε παρακείμενο κύτταρο, ή παρακρινώς σε κοντινό κύτταρο.

Στον υποδοχέα EGFR προσδένονται επτά αυξητικοί παράγοντες, κανένας στον HER2, δύο στον HER3 και επτά στον HER4. Όπως οι υπόλοιποι υποδοχείς με δράση πρωτεϊνικής κινάσης τυροσίνης, η οικογένεια EGFR λειτουργεί ως διμερή ή ολιγομερή. Ο HER2 αδυνατεί να προσδεθεί σε οποιοδήποτε αυξητικό παράγοντα καθιστώντας τη δημιουργία ομοδιμερούς απίθανη. Παρόλα αυτά, μη φυσιολογική υπερέκφραση του HER2 οδηγεί στη δημιουργία λειτουργικών ομοδιμερών (Ghosh et al., 2011). Ο HER3 έχει μειωμένη ενεργότητα κινάσης, με αποτέλεσμα ο επαγόμενος σχηματισμός ομοδιμερούς να αδυνατεί να διεγείρει τη δραστηριότητα της πρωτεϊνικής κινάσης και την καθοδική σηματοδότηση. Ωστόσο, η μειωμένης ενεργότητας κινάση του HER3 διαθέτει το 1/ 1000 της δραστηριότητας αυτοφωσφορυλίωσης του EGFR (Shi et al., 2010) καθιστώντας πιθανό το ομοδιμερές HER3 να είναι λειτουργικό. Ο HER2 είναι ο προτιμώμενος εταίρος διμερισμού για όλα τα άλλα μέλη οικογένειας EGFR (Tzahar et al., 1996; Graus-Porta et al., 1997) και τα HER2 ετεροδιμερή με τους EGFR και HER3 παρουσιάζουν ισχυρή σηματοδοτική δραστηριότητα (Pinkas-Kramaski et al., 1996). Από τα προαναφερθέντα γίνεται αντιληπτό το εύρος των συνδετών που μπορούν να προωθήσουν το σχηματισμό ενός διμερούς καθώς και των συνδυασμών των διμερών που μπορούν να προκύψουν. Ο αριθμός αυτός μεγαλώνει κι άλλο εφόσον οι υποδοχείς απαντώνται σε περισσότερες από μία ισομορφές. Πιο συγκεκριμένα, ο EGFR απαντάται με μία κύρια ισομορφή, ο HER2 με δύο πλήρους μεγέθους ισομορφές που διαφέρουν ελαφρώς λόγω του εναλλακτικού ματίσματος του mRNA, ο HER3 με δύο πλήρους μεγέθους ισομορφές, ο ένας εκ των οποίων έχει χάσει τα κατάλοιπα 1-59. Όσο αφορά τον HER4 έχει τέσσερις πλήρους μεγέθους διαμεμβρανικές ισομορφές που παράγονται από το εναλλακτικό μάτισμα του mRNA, οι δύο διαφέρουν στο εξωκυττάριο παρακείμενο της μεμβράνης τμήμα και οι άλλες δύο στην καρβοξυτελική ουρά.

2.3 Ενεργοποίηση των EGFR υποδοχέων

Ο βασικός μηχανισμός ενεργοποίησης των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης, περιλαμβάνει την πρόσδεση συνδετών ή αυξητικών παραγόντων στα εξωκυττάρια τμήματα δύο υποδοχέων προκαλώντας τη δημιουργία ενεργοποιημένων διμερών (Lemmon and Schlessinger, 2010). Τα ενδοκυττάρια τμήματα κινάσης καταλύουν τη φωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης, συνήθως στην περιοχή ενεργοποίησης, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης. Επίσης, τα τμήματα της κινάσης καταλύουν τη φωσφορυλίωση επιπλέον καταλοίπων τυροσίνης

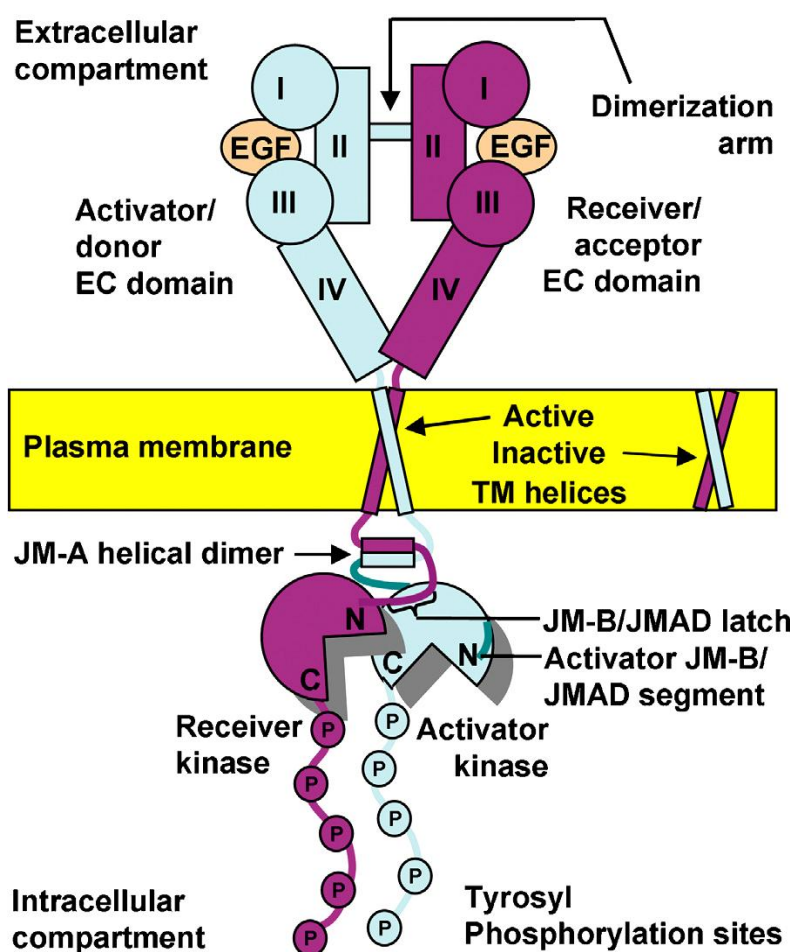
δημιουργώντας θέσεις πρόσδεσης (docking sites) για πρωτεΐνες- προσαρμοστές (adaptor proteins) ή ένζυμα που έχει σαν αποτέλεσμα την καθοδική σηματοδότηση. Οι πρωτεΐνες που προσδέονται περιέχουν μοριακά τμήματα, Src homology 2 (SH2) ή/ και phospho tyrosine binding (PTB), που αναγνωρίζουν ειδικά πλαίσια αλληλουχίας φωσφορυλιωμένων τυροσινών. Αυτή η φωσφορυλίωση επιτυγχάνεται *in trans*, δηλαδή το πρώτο μέλος του διμερούς φωσφορυλιώνει το δεύτερο και το δεύτερο φωσφορυλιώνει το πρώτο.

Παρόλο που ο EGFR ήταν ο πρώτος υποδοχέας κινάσης τυροσίνης που ανακαλύφθηκε, ο μηχανισμός ενεργοποίησης του διαφέρει από τους υπόλοιπους υποδοχείς κινάσης. Αν και η φωσφορυλίωση ενός ή περισσότερων καταλοίπων στην περιοχή ενεργοποίησης των περισσότερων πρωτεϊνικών κινάσεων είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση (Nolen and Taylor, 2004) και ενώ η Tyr869 στην περιοχή ενεργοποίησης του EGFR φωσφορυλιώνεται (Biscardi et al., 1999), αυτή η φωσφορυλίωση δεν είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση (Gotoh et al, 1992; Tice et al., 1999). Αντιθέτως, τα ενεργοποιημένα από το συνδέτη τμήματα κινάσης του EGFR σχηματίζουν ένα ασύμμετρο ομοδιμερές που μοιάζει με το ετεροδιμερές που σχηματίζουν οι CDK2 και cyclin A (Zhang et al., 2006). Στο ασύμμετρο ομοδιμερές του EGFR, το ένα τμήμα κινάσης παίζει το ρόλο του ενεργοποιητή/ δότη (activator/ donor) και το άλλο παίζει το ρόλο του δέκτη (receiver/ acceptor). Όπως και στους υπόλοιπους υποδοχείς κινάσης, η κινάση του ενεργοποιημένου δέκτη καταλύει την φωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης της κινάσης του ενεργοποιητή, η οποία στην συνέχεια λειτουργεί ως θέση πρόσδεσης για μεταγωγή σήματος. Ένας παρόμοιος μηχανισμός είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση των υπόλοιπων ομοδιμερών και ετεροδιμερών των μελών της οικογένειας EGFR.

Ο Macdonald-Obermann και συνεργάτες μελέτησαν το μηχανισμό ενεργοποίησης της κινάσης στο διμερές EGFR/HER2 (Macdonald-Obermann et., 2012). Στην βασική κατάσταση, οι υποδοχείς υπάρχουν ως μονομερή ή ως ανενεργά προ-διμερή. Η πρόσδεση του EGF στον EGFR προωθεί το διμερισμό του υποδοχέα με τον HER2 και κατευθύνει την περιοχή της κινάσης του EGFR να υιοθετήσει την θέση του δότη στο ασύμμετρο διμερές, υπενθυμίζεται ότι ο HER2 δεν έχει συνδέτη. Αποδείχθηκε ότι ο EGFR ενεργοποιείται πρώτος. Εάν ο EGFR είναι καταλυτικά ικανός, φωσφορυλιώνει την καρβοξυτελική ουρά του HER2, οδηγώντας σε αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωσή της. Αυτή η επαγόμενη αλλαγή στη διαμόρφωση

πραγματοποιείται πριν από το σχηματισμό του αμοιβαίου ασύμμετρου διμερούς στο οποίο η περιοχή κινάσης του HER2 είναι ενεργοποιημένη. Εάν ο EGFR δεν μπορεί να φωσφορυλιώσει τον εταίρο του, η αλλαγή στη διαμόρφωση δεν μπορεί να συμβεί και ο HER2 δεν ενεργοποιείται ποτέ. Ο EGFR αποδείχθηκε ότι λειτουργεί ως η πρώτη κινάση δέκτης και ο HER2 είναι η αρχική κινάση ενεργοποιητής στα κύτταρα που εκφράζουν και τους δύο υποδοχείς.

Η παρακείμενη της μεμβράνης (juxtamembrane, JM) περιοχή του EGFR έχει αναφερθεί ότι συμμετέχει στην ενεργοποίηση της κινάσης (Red Brewer et al., 2009). 19 κατάλοιπα στην καρβοξυτελική ουρά της JM περιοχής αναγνωρίστηκαν ως περιοχή ενεργοποίησης της JM (JM activation domain, JMAD). Από κρυσταλλογραφικές μελέτες αποδείχθηκε ότι η JM περιοχή της κινάσης του δέκτη περιβάλλει τον C- λοβό του δότη. Έχει προταθεί ότι η JMAD ενισχύει το σχηματισμό του ασύμμετρου διμερούς και προωθεί την αλλοστερική ενεργοποίηση του δέκτη.



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της δομής του EGFR. Ο υποδοχέας δότης είναι χρωματισμένος γαλάζιος και ο δέκτης μωβ. Στην ενεργή φάση, το καρβοξυτελικό

τμήμα του τμήματος της κινάσης του δότη αλληλεπιδρά με το αμινοτελικό τμήμα της κινάσης του δέκτη (Roskoski, 2014).

Ολόκληρη η περιοχή JM είναι απαραίτητη για την πλήρη ενεργοποίηση (Jura et al., 2009). NMR μελέτες στο απομονωμένο πεπτίδιο που αντιστοιχεί στην JM περιοχή του EGFR έδειξαν ότι το αμινοτελικό τμήμα της JM (JM-A) σχηματίζει μια αντιπαράλληλη υπερελικωμένη έλικα, η οποία σταθεροποιεί το ασύμμετρο διμερές των περιοχών της κινάσης και οδηγεί στην αλλοστερική ενεργοποίηση της κινάσης δέκτη. Με βάση τη κρυσταλλική δομή του ασύμμετρου διμερούς του HER4 (Wood et al., 2008), παρατηρήθηκε ότι καρβοξυτελικό τμήμα της JM (JM-B) δεσμεύει την κινάση δέκτη στην επιφάνεια του C-λοβού της κινάσης δότη (Jura et al., 2009).

Πειράματα NMR προσδιόρισαν τη δομή του διαμεμβρανικού τμήματος του EGFR και του HER2 σε περιβάλλον λιπιδικής διπλοστιβάδας (Bocharon et al., 2008; Endres et al., 2013). Τα ετεροδιμερή των EGFR και HER2 έχουν παρόμοια δομή και αποτελούνται από δύο διαμεμβρανικές έλικες που σχηματίζουν ένα δεξιόστροφο ελικοειδές, συμμετρικό διμερές, αφήνοντας τα C-τελικά άκρα να διαχωρίζονται (Mineev et al., 2010). Οι διαμεμβρανικές έλικες σχηματίζουν γωνία $\sim 44^\circ$ μεταξύ τους που οδηγεί στον διαχωρισμό των C-τελικών σημείων των ελίκων με $\sim 20^\circ \text{\AA}$, και αυτός ο διαχωρισμός παρέχει την κατάλληλη απόσταση για την αντιπαράλληλη αλληλεπίδραση μεταξύ των ελίκων JM-A, οι οποίες σχηματίζονται εκτός της λιπιδικής διπλοστιβάδας (Endres et al., 2013). Η αλληλεπίδραση των N-τελικών μοτίβων του διαμεμβρανικού διμερούς αντιστοιχεί στον υποδοχέα δότη ενώ η αλληλεπίδραση των C-τελικών του διαμεμβρανικού διμερούς αντιστοιχεί στον υποδοχέα δέκτη (Escher et al., 2009). Χρησιμοποιώντας προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, έχει αποδειχθεί ότι το N-τελικό διμερές είναι σταθερό ενώ το C-τελικό διμερές είναι ασταθές (Arkhipov et al., 2013).

Η αλληλεπίδραση των διαμεμβρανικών ελίκων μέσω της N-τελικής περιοχής διμερισμού τους που συνδέεται με τον σχηματισμό αντιπαράλληλης αλληλεπίδρασης των ελίκων JM-A είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της περιοχής κινάσης. Οι περιοχές JM-A πιστεύεται ότι υφίστανται ως (i) αντιπαράλληλο ελικοειδές διμερές (ενεργή κατάσταση) ή (ii) διαχωρισμένα τμήματα JM-A ενσωματωμένα στη μεμβράνη (ανενεργή κατάσταση). Ο ρόλος που παίζει η κυτταρική μεμβράνη στην εναλλαγή μεταξύ της ενεργής και ανενεργής κατάστασης της κινάσης του υποδοχέα, είναι σημαντικός για την ρύθμιση της ενεργότητας της κινάσης τυροσίνης του

υποδοχέα *in vivo*. Οπότε μια καλύτερη εκτίμηση της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα και της κυτταρικής μεμβράνης απαιτείται για την πλήρη κατανόηση της μεσολαβούμενης από υποδοχέα μεταγωγής σήματος.

Λόγω της ύπαρξης συντηρημένων σημαντικών ρυθμιστικών αμινοξέων στην οικογένεια EGFR, είναι πιθανό να ισχύει ο ίδιος μηχανισμός στο σχηματισμό ενεργών ομοδιμερών και ετεροδιμερών, λαμβάνοντας υπόψη την ανικανότητα του HER2 να προσδένεται σε συνδέτη και την μειωμένη ικανότητα του HER3 να λειτουργεί ως πρωτεϊνική κινάση. Επιγραμματικά, αυτός ο μηχανισμός περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του εξωκυττάριου τμήματος μετά πρόσδεση του συνδέτη στον υποδοχέα, τον διμερισμό των N-τελικών διαμεμβρανικών ελικών, προωθώντας το σχηματισμό ενεργού διαμεμβρανικού διμερούς. Επίσης, προωθείται ο διμερισμός των υποδοχέων μέσω της JM-A υπερελικομένης έλικας και της αγκυροβόλησης της JM. Τα παραπάνω γεγονότα μαζί με το σχηματισμό του ασύμμετρου διμερούς οδηγούν στην αλλοστερική ενεργοποίηση της κινάσης δέκτη.

2.4 Η EGFR σηματοδότηση

Το δίκτυο σηματοδότησης των μελών EGFR περιλαμβάνει πληθώρα μορίων που είναι διασυνδεδεμένα και επικαλυπτόμενα. Αυτό το δίκτυο περιλαμβάνει τα μονοπάτια PI3K/ Akt, το Ras/ Raf/ MEK/ ERK1/ 2, και το PLCγ. Το μονοπάτι PI3K/ Akt παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική επιβίωση και τα μονοπάτια Ras/ ERK1/ 2 και PLCγ συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Yarden and Pines, 2012). Τα παραπάνω καθώς και άλλα σηματοδοτικά μόρια της EGFR οικογένειας συμμετέχουν στην αγγειογένεση, την κυτταρική προσκόλληση, την ανάπτυξη και την οργανογένεση (Seshacharyulu et al., 2012).

Ο υποδοχέας HER3 παίζει ένα ζωτικής σημασίας ρόλο στην προώθηση την κυτταρικής επιβίωσης. Η ρυθμιστική υπομονάδα p85 του PI3K μπορεί να προσδένεται σε έξι φωσφορυλιωμένες τυροσίνες του HER3 ενεργοποιώντας την PI3K. Το ένζυμο αυτό φωσφορυλιώνει την μεμβρανική 4,5- διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP₂) παράγοντας την 3,4,5- τριφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP₃), η οποία στρατολογεί την Akt στην κυτταρική μεμβράνη. Η Akt, επίσης γνωστή ως πρωτεϊνική κινάση B (PKB), είναι μια κινάση σερίνης/ θρεονίνης, η οποία προσδένεται στην PIP₃ με μεγάλη συγγένεια (Engelman,

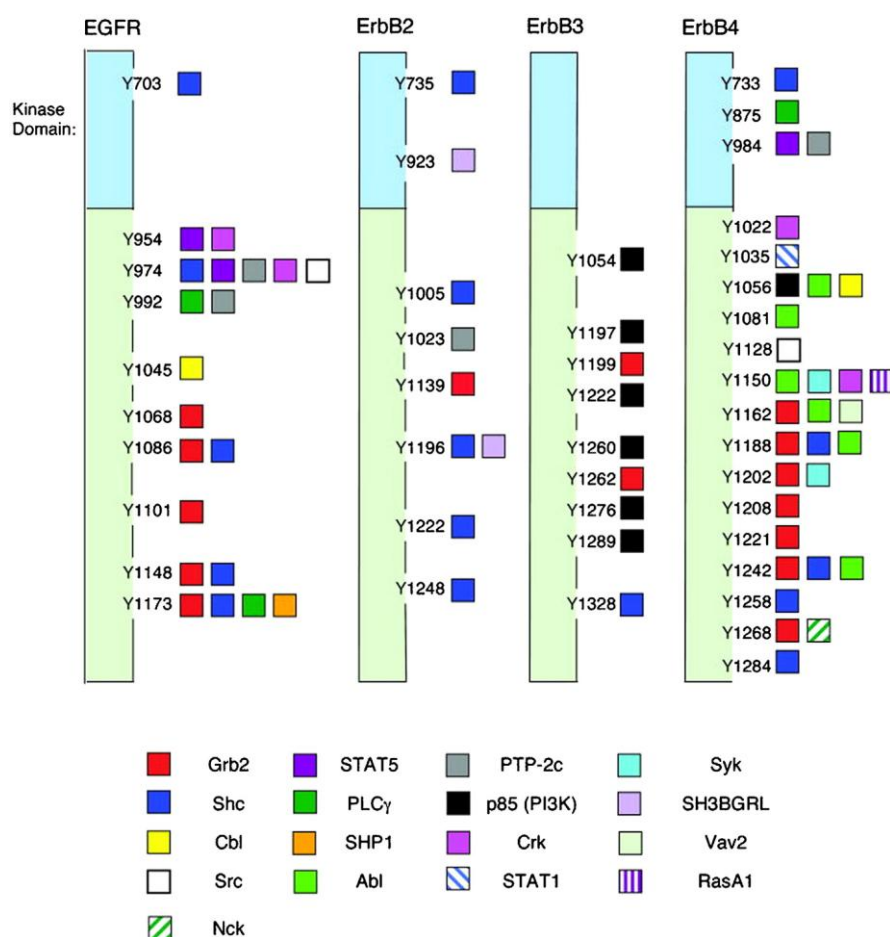
2009; Vanhaesebroeck et al., 2012). Το PTEN καταλύει την υδρόλυση της PIP3 παράγοντας PIP2 και ανόργανο φώσφορο, ρυθμίζοντας αρνητικά το μονοπάτι Akt.

Η PDK1 (phosphoinositide-dependent protein kinase 1) και το mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) φωσφορυλιώνουν την Akt στις θέσεις Thr308 και Ser473, αντίστοιχα, και με τη σειρά της η ενεργοποιημένη Akt φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον mTOR (mammalian target of rapamycin) (Engelman, 2009). Ο mTOR είναι μια κινάση σερίνης/ θρεονίνης που έχει δεκάδες υποστρώματα και συμμετέχει σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής επιβίωσης. Η Akt φωσφορυλιώνει και αναστέλλει την BAD (Bcl2-associated death promoter), η οποία στην μη φωσφορυλιωμένη της μορφή είναι προ-αποπτωτική (Vanhaesebroeck et al., 2012).

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της κινάσης ERK1/ 2 MAP από την οικογένεια EGFR είναι αρκετά πολύπλοκη. Η πρωτεΐνη- προσαρμοστής Grb2, η οποία βρίσκεται ανοδικά της Ras, προσδένεται σε αρκετά φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης στους HER1/ 2/ 3/ 4 (Wilson et al., 2009). Η πρωτεΐνη-προσαρμοστής Shc έχει πιθανές θέσεις πρόσδεσης στους HER1/ 2/ 3/ 4. Η πρόσδεση της Grb2 ή της Shc στα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης των μελών της EGFR οικογένειας σε ειδικά πλαίσια αλληλουχίας οδηγούν στην ενεργοποίηση του Ras/ Raf/ MEK/ ERK1/ 2 σηματοδοτικού μονοπατιού (Roskoski, 2010, 2012). Η SOS (son of sevenless) είναι ένας Ras- παράγοντας εξαγωγής γουανίνης που προκαλεί την ανταλλαγή του GDP για GTP και ενεργοποιεί το μονοπάτι της Ras/ MAPK. Η ERK1/ 2 έχει πολυάριθμα υποστρώματα συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνικών κινασών και μεταγραφικών παραγόντων που προωθούν την κυτταρική διαίρεση (Roskoski, 2012). Παρόλο που ο Grb2 συμμετέχει σε πολλές πτυχές της μεταγωγής σήματος συμπεριλαμβάνοντας πολυάριθμους υποδοχείς κινάσης τυροσίνης, ο βιολογικός του ρόλος αρχικά συνδέθηκε με την φωσφορυλίωση του EGFR και την ενεργοποίηση του Ras (Lowenstein et al., 1992).

Οι υποδοχείς της οικογένειας EGFR αποτελούνται από ποικίλες θέσεις πρόσδεσης διαφόρων πρωτεϊνών προσαρμοστών. Οι Nck1 και Nck2 είναι πρωτεΐνες-προσαρμοστές που περιέχουν ένα SH2 και τρία SH3 τμήματα και αλληλεπιδρούν με δεκάδες σηματοδοτικές πρωτεΐνες (Li and She, 2000). Συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της Ras. Τα τμήματα SH2 και SH3 δεσμεύουν πολυάριθμες

ικριωματικές και ρυθμιστικές πρωτεΐνες σε ποικίλα σηματοδοτικά δίκτυα. Οι CrkI (SH2–SH3) και CrkII (SH2–SH3–SH3) είναι ισομορφές της Crk που ρυθμίζουν την μεταγραφή και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, απαραίτητες για την κυτταρική αύξηση και κινητικότητα, συνδέοντας κινάσες τυροσίνης σε μικρές G πρωτεΐνες (Kobashigawa et al., 2007). Η CrkI παρουσιάζει σημαντική μετασχηματιστική ή ογκογονική δράση, ενώ αντίστοιχα της CrkII είναι χαμηλή. Η Vav2 είναι ένας παράγοντας εξαγωγής νουκλεοτιδίων γουανίνης της οικογένειας Rho των σχετιζόμενων με τη Ras GTPασών. Αποτελεί υπόστρωμα του EGFR και ο EGF ρυθμίζει την δραστηριότητα της Vav2 μέσω ενεργοποίησης της PI3K.



Εικόνα 7: Η σηματοδότηση των υποδοχέων EGFR. Περιγράφονται τα κατάλοιπα φωσφορυλιωμένης τυροσίνης και οι θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών-προσαρμοστών (Roskoski, 2014).

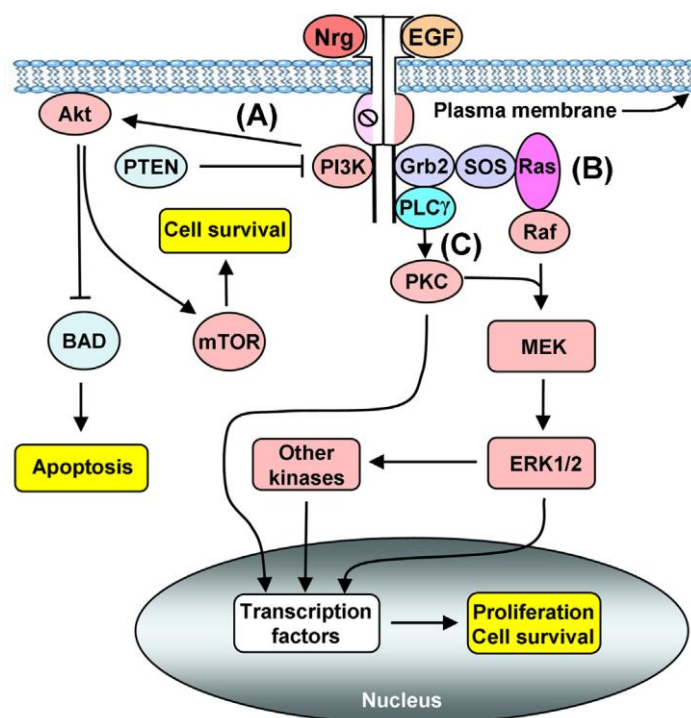
Οι STAT1 και STAT5 (signal transducers and activators of transcription) είναι μεταγραφικοί παράγοντες που περιέχουν ένα SH2 τμήμα και εμπλέκονται στην αγγειογένεση του όγκου και την κυτταρική επιβίωση. Ο STAT1 ενεργοποιείται

αμέσως μετά την πρόσδεση του EGF, στη συνέχεια μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου συμμετέχει στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η SH3BGR1 (SH3 domain-binding glutamic-acid-rich like protein) πιθανώς λειτουργεί ως ρυθμιστής οξειδωτικής δράσης (Mazzocco et al., 2002). Η RasA1 είναι μια από τις έξι Ras GTPάσες ενεργοποιητές πρωτεΐνες (RasGAPs), η οποία υδρολύει τη Ras-GTP για να παράγει ανενεργή Ras και το αμινοτελικό SH2-SH3-SH2 τμήμα συμμετέχει στη μιτογόνο σηματοδότηση (Tocque et al., 1997).

Οι EGFR και HER4 έχουν θέσεις πρόσδεσης για την μη-υποδοχέα κινάση τυροσίνης Src (Wilson et al., 2009). Η Src παίζει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επιβίωση και η ενεργοποίηση του EGFR οδηγεί στην ενεργοποίηση της Src (Roskoski, 2004). Τα Abl1 και Abl2 πρωτοογκογονίδια κωδικοποιούν μη-υποδοχείς κινάσες τυροσίνης που εμπλέκονται στην απόκριση στο γενοτοξικό στρες και στην ρύθμιση του κυτταροσκελετού ακτίνης (Panjarian et al., 2013). Η Syk (spleen protein-tyrosine kinase) είναι μια μη-υποδοχέας κινάση τυροσίνης αποτελούμενη από δύο SH2 τμήματα και συμμετέχει στη μεταγωγή σήματος καθοδικά του HER4. Παραδόξως, η Syk έχει εμπλακεί ως θετικός και αρνητικός ρυθμιστής στην παθογένεια του καρκίνου του μαστού (Stewart and Pietenpol, 2001).

Οι EGFR, HER2 και HER4 έχουν αρκετές πιθανές θέσεις πρόσδεσης για την PLCγ (Wilson et al., 2009). Οι ισομορφές PLCγ1 και γ2, προϊόντα διαφορετικών γονιδίων, αποτελούνται από δύο SH2 τμήματα (nSH2, κοντά στο N-άκρο και cSH2, κοντά στο C-άκρο) και ένα SH3 τμήμα. Η PLCγ1 εκφράζεται ευρέως σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, ενώ η PLCγ2 κυρίως σε κύτταρα του ανοσοποιητικού. Το nSH2 τμήμα της PLCγ1 είναι υπεύθυνο για την πρόσδεση στα κατάλοιπα φωσφορυλιωμένων τυροσινών της EGFR οικογένειας. Οι EGFR υποδοχείς ενεργοποιούν την PLCγ1 φωσφορυλιώνοντάς την. Η ενεργοποιημένη PLCγ υδρολύει την 4,5-διφωφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη παράγοντας 1,4,5-τριφωφορική ινοσιτόλη (IP3) και διακυλογλυκερόλη (DAG) (Kadamur and Ross, 2013). Η IP3 προωθεί την απελευθέρωση Ca²⁺ από το ενδοπλασματικό δίκτυο και η DAG ενεργοποιεί την PKC. Η PKC έχει ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, η φωσφορυλίωση των οποίων οδηγεί σε ποικίλες φυσιολογικές αποκρίσεις, συμπεριλαμβανομένων της αγγειογένεσης, κυτταρικού πολλαπλασιασμού, κυτταρικού θανάτου, αύξησης της μεταγραφής και μετάφρασης, κυτταρικής μετανάστευσης και κυτταρικής

προσκόλλησης (Mochly-Rosen et al., 2012). Ένας από τους καθοδικούς τελεστές της PKC είναι το Raf/ MEK/ ERK1/ 2 μονοπάτι (Roskoski, 2012; Basu and Sivaprasad, 2007). Η PKC υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου συμμετέχοντας στην παθογένεια τους.



Εικόνα 8: Επισκόπηση της σηματοδότησης της οικογένειας EGFR. Τα κύρια καθοδικά σηματοδοτικά μονοπάτια περιλαμβάνουν τα (A) PI3K, (B) Ras/ Raf/ MEK/ ERK1/ 2 και (C) PLC. Οι PI3K, PLC και Grb2 προσδένονται σε φωσφορυλιώμενες τυροσίνες στην καρβοξυτελική ουρά των υποδοχέων για να ξεκινήσει τη μεταγωγή σήματος. Η ρυθμιστική υπομονάδα της PI3K δεσμεύεται στον HER3, που έχει μειωμένη ενεργότητα κινάσης (Roskoski, 2014).

Οι Shp1 και Shp2 (PTP-2C) είναι κυτταροπλασματικές φωσφατάσες τυροσίνης που περιέχουν δύο SH2 τμήματα, μια περιοχή φωσφατάσης, και μία C-τελική ουρά με ανασταλτική δράση. Εκφράζονται σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους, και η Shp1 έχει εντοπιστεί και σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα. Το N-τελικό SH2 τμήμα μπλοκάρει τις καταλυτικές περιοχές και διατηρεί το ένζυμο στην ανενεργή διαμόρφωσή του (Yang et al., 2003). Η Shp1 προσδένεται στον EGFR καταλύοντας την αποφωσφορυλίωσή του (Tenev et al., 2000). Στα αιμοποιητικά κύτταρα η Shp1 είναι κυρίως αρνητικός ρυθμιστής της μεταγωγής σήματος που ελέγχει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την αγγειογένεση, καταλύοντας την αποφωσφορυλίωση του EGFR και σηματοδοτικών πρωτεϊνών καθοδικά του υποδοχέα (Lopez-Ruiz et al., 2011). Αντιθέτως, στα επιθηλιακά κύτταρα αυτά τα

ένζυμα είναι θετικοί ρυθμιστές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αντιστοίχως, έχει αναφερθεί ότι ένα σύνολο όγκων μαστού υψηλού βαθμού κακοήθειας εκφράζουν υψηλά επίπεδα Shp1, η οποία έχει θετικό ρόλο στη σηματοδότηση. Η RasGAP εμπλέκεται στην απενεργοποίηση της Ras. Η Shp2 καταλύοντας την αποφωσφορυλίωση μιας θέσης πρόσδεσης της RasGAP στον EGFR, ρυθμίζει αρνητικά την στρατολόγηση της RasGAP στον EGFR (Agazie and Hayman, 2003; Zhou and Agazie, 2009). Έχοντας ως αποτέλεσμα την παράταση της παραμονής της Ras στην ενεργή Ras-GTP κατάσταση και την ενίσχυση της σηματοδότησης που προωθεί την πολλαπλασιασμό και το μετασχηματισμό. Ο ακριβής ρόλος των Shp1 και Shp2 στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης εξαρτάται από το κυτταρικό πλαίσιο.

2.5 Σηματοδότηση της οικογένειας EGFR στον πυρήνα

Εκτός από τον καλά μελετημένο ρόλο των υποδοχέων EGFR ως μεμβρανικοί υποδοχείς, υπάρχουν ενδείξεις ότι μετατοπίζονται στον πυρήνα όπου συμμετέχουν στην κυτταρική σηματοδότηση (Carpenter and Liao, 2009). Οι EGFR, HER2 και HER3 εντοπίζονται στον πυρήνα ως μόρια πλήρους μεγέθους. Αντίθετα, η πυρηνική μετατόπιση του HER4 απαιτεί διπλή πρωτεολυτική κατάτμηση. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί για την πυρηνική μετατόπιση των EGFR υποδοχέων εμπλέκουν την εξαρτώμενη και ανεξάρτητη από κλαθρίνη ενδοκυττάρωση. Οι EGFR και HER2 έχουν αναφερθεί ότι μετατοπίζονται στον πυρήνα μέσω εξαρτώμενων από την ιμφορτίνη α/β μηχανισμούς (Lo et al., 2006; Giri et al., 2005). Όλοι οι EGFR υποδοχείς περιέχουν μια συντηρημένη αλληλουχία που αποτελείται από θετικά φορτισμένα αμινοξέα που λειτουργούν ως σήμα πυρηνικού εντοπισμού και αλληλεπιδρούν με την ιμφορτίνη β . Διάφορες λειτουργίες έχουν αποδοθεί στα μέλη της οικογένειας EGFR όταν εντοπίζονται στον πυρήνα. Αυτές περιλαμβάνουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, το διπλασιασμό του DNA, την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA, τη μεταγραφή, την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου (Wang and Hung, 2009). Οι C-τελικές περιοχές των HER1/ 2/ 3/ 4 λειτουργούν ως μεταγραφικοί ενεργοποιητές ρυθμίζοντας τη γονιδιακή έκφραση και έχουν ενδογενή δραστηριότητα κινάσης, με εξαίρεση τον HER3. Οι EGFR, HER2 και HER3 αλληλεπιδρούν με τον υποκινητή του γονιδίου της κυκλίνης D1, προωθώντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Brand, 2013).

2.6 Ο ρόλος του HER2 στην καρκινογένεση του μαστού

Τα μέλη της οικογένειας EGFR συνδέονται με την παθογένεια ποικίλων ανθρώπινων κακοηθειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού. Οι υποδοχείς EGFR ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων μέσω επαγωγής των PI3K/ Akt, οι MAPK, PLCγ/ PKC και Src καθοδικών σηματοδοτικών μονοπατιών.

Ο HER2 υποδοχέας είναι το πιο μελετημένο όσο αφορά τον καρκίνο του μαστού μέλος της οικογένειας EGFR. Συγκεντρώνει μεγάλο κλινικό ενδιαφέρον γιατί έχει προγνωστική και προβλεπτική αξία, αποτελώντας θεραπευτικό στόχο. Περίπου το 30% των όγκων του μαστού διαθέτουν κύτταρα που παρουσιάζουν γονιδιακή ενίσχυση του *HER2* ή υπερέκφραση του HER2 και σχετίζονται με μειωμένη συνολική επιβίωση και κακή πρόγνωση (Katri Koninki et al., 2009; Sauter et al., 2009; Yu and Hung, 2000). Ο HER2 συμμετέχει στην ογκογόνο ανάπτυξη των κυττάρων του καρκίνου του μαστού. Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη HER2 συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με μεταστατικά γεγονότα (Yu and Hung, 2000) και επιθετικό φαινότυπο (Weinberg, 2007). Περίπου το 40% των φλεγμονωδών καρκινωμάτων μαστού μπορεί να παρουσιάσει HER2 υπερέκφραση (Zell et al., 2009). Ένας περιορισμένος αριθμός περιπτώσεων (1-2%) εμφανίζει πρωτεϊνική υπερέκφραση του HER2 χωρίς γονιδιακή ενίσχυση (Varshney et al., 2004). Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω τροποποιήσεων στο σύστημα ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης (Dennis et al., 1989). Η γονιδιακή ενίσχυση του HER2 καταλήγει σε υπερέκφραση της πρωτεΐνης επηρεάζοντας τη δραστικότητα του υποδοχέα, ο οποίος μπορεί να διμερίζεται απουσία συνδέτη σχηματίζοντας ομοδιμερή, ή να διμερίζεται με τα υπόλοιπα μέλη της EGFR οικογένειας (Thomas Holbro et al., 2003). Ο HER2 δεν περιλαμβάνει εξωκυττάριο τμήμα ειδικό για την πρόσδεση συνδέτη, αλλά είναι ικανός να σχηματίζει ετεροδιμερή με υψηλή συγγένεια (Zwick et al., 2001). Εντός της οικογένειας EGFR, ο HER2 προτιμάται ως μοριακός εταίρος για το σχηματισμό διμερών, λόγω του ισχυρού δεσμού που αναπτύσσεται μεταξύ συνδέτη και ετεροδιμερούς και συνεπώς παρατείνεται η ενεργοποίηση των καθοδικών μονοπατιών (Graus- Porta et al., 1997; Prenzel et al., 2001). Επιπλέον, ο HER2 δεν αλληλεπιδρά με κανένα συνδέτη, οπότε ο βραχίονας διμερισμού είναι διαρκώς εκτεθειμένος και έτοιμος να αλληλεπιδράσει με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας (Burgess et al., 2001).

Μια μετάλλαξη στο 655 κωδικόνιο του *HER2* γονιδίου έχει συσχετισθεί με την αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρκινώματος στο μαστό. Η μετάλλαξη αυτή τροποποιεί τη δομή του διαμεμβρανικού τμήματος του υποδοχέα, με αποτέλεσμα μια ενεργή μορφή που προωθεί το σχηματισμό *HER2* ομοδιμερών. Τα κύτταρα που χαρακτηρίζονται είτε από τη γονιδιακή μετάλλαξη ή την πρωτεϊνική υπερέκφραση του *HER2* εμφανίζουν μεγάλη πιθανότητα σχηματισμού ομοδιμερών, προωθώντας τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη, καθώς και την επιβίωση των κυττάρων αυτών. Ωστόσο, στους *HER2+* καρκίνους του μαστού, η σηματοδότηση βασίζεται κυρίως στα ενεργά *HER2* ετεροδιμερή. Ο *HER2* σχηματίζει ετεροδιμερή με τους *EGFR*, *HER3* και *HER4* που αντιπροσωπεύουν το 74%, 66% και 58% των περιπτώσεων, αντίστοιχα (Barros et al., 2014). Το πρότυπο διμερισμού των μελών της *EGFR* οικογένειας είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη στοχευμένων παραγόντων και την επιλογή του κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος.

Η υπερέκφραση του *HER2* έχει ως αποτέλεσμα την μεταγωγή μιτογόνων και αντι-αποπτωτικών σημάτων (Carpenter, 2006). Πιο συγκεκριμένα μπορεί να προάγει τον πολλαπλασιασμό ενεργοποιώντας το *RAS/ MAPK* μονοπάτι, την αναστολή της απόπτωσης μέσω του *PI3K/ Akt* μονοπατιού και την προώθηση της αγγειογένεσης μέσω της παραγωγής του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (*VEGF*). Το *PI3K/ Akt* μονοπάτι ενεργοποιείται κυρίως από το *HER2/ HER3* διμερές. Το διμερές αυτό αποτελεί μια ισχυρή συνεργασία, λόγω της έντονης καθοδικής *PI3K* σηματοδότησης. Πιο συγκεκριμένα, ο *HER3* είναι ικανός να ενεργοποιεί ισχυρά το *PI3K* μονοπάτι μέσω των έξι θέσεων πρόσδεσης της ρυθμιστικής υπομονάδα *p85* του *PI3K*. Με την ενίσχυση της *PI3K* σηματοδότησης προάγεται ο κυτταρικός κύκλος και η επιβίωση λόγω της έκφρασης της κυκλίνης *D1* και της αναστολής της *p27*. Η κυκλίνη *D1* εκφράζεται έντονα σε κύτταρα που υπερεκφράζουν τον *HER2* και εμφανίζει μειωμένη δραστηριότητα όταν μπλοκάρεται η έκφραση του *HER2*, μειώνοντας την ανάπτυξη του όγκου λόγω της παραμονής των κυττάρων στη φάση *G1* (Lee et al., 2000). Το μόριο *p27*, το οποίο αναστέλλει την έκφραση του γονιδίου *Cdk2* που σχετίζεται με την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, αναστέλλεται από τα υψηλά επίπεδα των *c-Myc* και *D-cyclins* που εντοπίζονται όταν τα κύτταρα υπερεκφράζουν τον *HER2* (Sherr and Roberts, 1999; Le et al., 2003). Το *PI3K/ Akt* μονοπάτι μπορεί επίσης να αναστείλει την απόπτωση μειώνοντας τη δραστηριότητα της *p21* (Zhou et al., 2001).

2.7 Θεραπευτικές προσεγγίσεις για τον HER2+ καρκίνο του μαστού

Τις τελευταίες δεκαετίες, οι ασθενείς με HER2+ καρκίνο μαστού υποβάλλονται σε θεραπεία με καινοτόμους μοριακούς παράγοντες έναντι του HER2.

Το Trastuzumab έχει ήδη εγκριθεί από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), και χορηγείται στους ασθενείς με HER2 θετικό καρκίνο του μαστού. Το trastuzumab είναι ένα εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του τμήματος IV του HER2, η πρόσδεσή του σε αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποφυγή σχηματισμού ετεροδιμερών ή ομοδιμερών (Weiberg, 2007). Ο υποδοχέας HER2 δεν αποτελεί ογκοειδικό αντιγόνο, παρά μόνο όταν εκφράζεται 10 έως 100 φορές πάνω από το κανονικό επίπεδο, με το trastuzumab να τον αναγνωρίζει σαν στόχο. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι χρήσιμο εφόσον σκοπός είναι να στοχεύονται μόνο τα καρκινικά κύτταρα και συνεπώς αυτή η διάκριση μπορεί να συμβάλει στην επιτυχία του trastuzumab στη θεραπεία του καρκίνου. Από κλινικές δοκιμές, είναι βέβαιο ότι το trastuzumab είναι αποτελεσματικό σε ασθενείς που διαγνώστηκαν με όγκους που εμφανίζουν χρώση υψηλής έντασης της πρωτεΐνης HER2 ή υψηλή γονιδιακή ενίσχυση χρησιμοποιώντας FISH ή CISH. Ωστόσο, οι ασθενείς που παρουσιάζουν μέτρια πρωτεϊνική έκφραση δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία αν δεν συνυπάρχει γονιδιακή ενίσχυση (Seidman et al., 2004). Η χορήγηση του trastuzumab συμπληρωματικά της χημειοθεραπείας, αυξάνει κατά 20% την επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου και τη συνολική επιβίωση στους HER2+ ασθενείς, σε σχέση με τη χημειοθεραπεία (Perez et al., 2005).

Ο μηχανισμός δράσης του trastuzumab δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός, αλλά μπορεί να χωριστεί σε δύο κύριους μηχανισμούς ως διέγερση της ανοσολογικής απόκρισης και αναστολή των μονοπατιών καθοδικά της EGFR οικογένειας. Όταν το trastuzumab χορηγείται σε ασθενείς προωθείται η απόπτωση των καρκινικών κυττάρων μέσω της μεσολαβούμενης από αντισώματα κυτταροτοξικότητας (Weiner and Adams, 2000). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι το trastuzumab μπορεί να δράσει ως αντι-αγγειογόνο φάρμακο, μειώνοντας την έκφραση των προ-αγγειογόνων παραγόντων VEGF, TGF α , αγγειοποιητίνη-1 και PAI-1 και ενισχύοντας τους αντι-αγγειογόνους παράγοντες όπως η TSP-1 (Yotaro et al., 2002). Όταν το trastuzumab συνδυάζεται με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, είναι ακόμη πιο αποτελεσματικό στην αναστολή της αγγειογένεσης (Kristine et al., 2003). Επιπρόσθετα, οι HER2+ όγκοι του μαστού περιορίζονται σημαντικά όταν υποβάλλονται σε θεραπεία με

trastuzumab λόγω της ενίσχυσης της κυτταρικής απόπτωσης. Πιο συγκεκριμένα, μπλοκάρει ο σχηματισμός διμερών και των καθοδικών σηματοδοτικών μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένου του PI3K, προκαλώντας απόπτωση και διακοπή του κυτταρικού κύκλου (Baselga et al., 2001; Sliwkowski et al., 1999). Επιπλέον, το trastuzumab φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά τον HER2 προωθώντας την ενδοκύττωση και αποικοδόμησή του (Sliwkowski et al., 1999). Έχει αναφερθεί ότι το trastuzumab σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία μπορεί να μπλοκάρει την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA (Mayfield et al., 2001). Τέλος, μια μελέτη απέδειξε ότι το trastuzumab μπορεί να εμποδίσει τη διάσπασης του εξωκυττάριου τμήματος του HER2 (p185), αποφεύγοντας την ανάπτυξη του ενεργού p95 HER2, ενός μεμβρανικού κομμένου τμήματος του HER2 που σχετίζεται με την εμφάνιση μετάστασης στους λεμφαδένες (Christianson et al., 1998).

Παρόλο που το trastuzumab παρουσιάζει αξιοσημείωτα αποτελέσματα στην κλινική πράξη, ένα ανησυχητικά μεγάλο ποσοστό ασθενών αναπτύσσει ανθεκτικότητα εντός μηνών από την έναρξη της θεραπείας. Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας βασίζονται σε ποικίλους μηχανισμούς. Ένας πιθανός μηχανισμός εμπλέκει τον p95 HER2, ο οποίος στερείται εξωκυττάριου τμήματος έτσι το trastuzumab δεν μπορεί να προσδεθεί σε αυτό και να σημάνει την αποικοδόμησή του. Ωστόσο, τα κύτταρα που εκφράζουν τον p95 HER2 είναι ανθεκτικά στο trastuzumab και ευαίσθητα στο lapatinib. Επίσης, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του PTEN που είναι φυσικός ανταγωνιστής της PI3K ενεργοποίησης έχουν συσχετισθεί με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο trastuzumab και την κακή πρόγνωση. Η χορήγηση PI3K αναστολέων είναι μια πιθανή στρατηγική με σκοπό την αύξηση της ευαισθησίας των HER2+ κυττάρων στο trastuzumab. Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του EGFR αποτελούν μια ένδειξη για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Η ανθεκτικότητα αναπτύσσεται από την παρουσία EGFR/ EGFR ομοδιμερών ή EGFR/ HER2 ετεροδιμερών, τα οποία ενεργοποιούν αρκετά καθοδικά μονοπάτια συμπεριλαμβανομένων των MAPK και AKT. Η μακροχρόνια έκθεση στο trastuzumab προάγει την έκφραση του EGFR αναπτύσσοντας τελικά ανθεκτικότητα σε αυτό. Η χορήγηση όμως αντι-EGFR παραγόντων, όπως gefinitib, cetuximab και lapatinib, αυξάνουν την ευαισθησία των κυττάρων. Υπάρχουν ενδείξεις που καθιστούν τον HER3 υπεύθυνο για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο trastuzumab. Πιο συγκεκριμένα, το trastuzumab δεν μπλοκάρει αποτελεσματικά τη σηματοδότηση

του HER2/ HER3, έτσι το PI3K/ Akt μονοπάτι παραμένει λειτουργικό προωθώντας την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό. Ο HER3 έχει προστατευτικό ρόλο για τη λειτουργία του HER2/ HER3 διμερούς λόγω του μεγάλου εύρους διαφορετικών μηχανισμών που ρυθμίζουν την έκφραση και τη σηματοδότησή του, αναδεικνύοντας την ανάγκη στόχευσής του. Πρόσφατα βρέθηκε ότι ο HER4 μεσολαβεί στην επίκτητη ανθεκτικότητα και σχετίζεται με κακή πρόγνωση στον HER2 θετικό καρκίνο του μαστού (Nafi et al., 2014, Canfield et al., 2015). Επιπρόσθετα, η έκφραση των συνδετών της EGFR οικογένειας, EGF, TGF α , betacellulin και heregulin, έχει επίσης συνδεθεί με την ανθεκτικότητα στο trastuzumab. Τέλος, ένας άλλος μηχανισμός αφορά την εμπλοκή υποδοχέων κινάσης τυροσίνης και των καθοδικών τους μονοπατιών, πέρα από την οικογένεια EGFR.

Στη νέα γενιά μονοκλωνικών αντισωμάτων που αναπτύχθηκε για να αναστέλλει το διμερισμό του HER2, συμπεριλαμβάνεται το pertuzumab. Το pertuzumab εμποδίζει τον ετεροδιμερισμό του HER2, κυρίως με τον HER3, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των PI3K και MAPK μονοπατιών, καθώς και ενεργοποιώντας την μεσολαβούμενη από αντισώματα κυτταροτοξικότητα (David et al., 2002). Αντίθετα με το trastuzumab, το pertuzumab προσδένεται στην περιοχή II του HER2 (Nahta et al., 2004; Matthew et al., 2004), καθιστώντας το πολύτιμο στις περιπτώσεις ανθεκτικότητας στο trastuzumab και το συνδυασμό του με το trastuzumab ως μια καλή στρατηγική λόγω της αναγνώρισης διαφορετικών επιτόπων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

RANKL/ RANK ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

3.1 RANKL/RANK/OPG

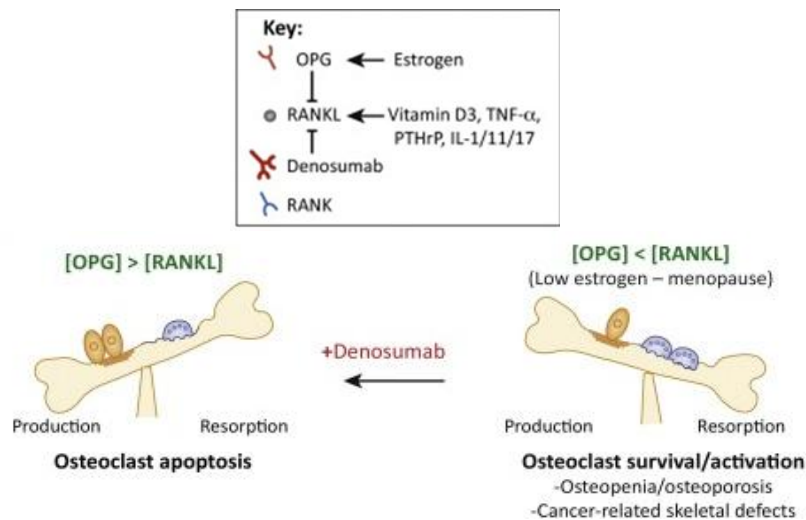
Η υπερικογενεία του καρκινικού νεκρωτικού παράγοντα-α (TNFα) αποτελείται από πολλές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένου του RANK, του συνδέτη του RANK (RANKL) και του ενδογενούς, διαλυτού, ανταγωνιστικού για τον RANK υποδοχέα που ονομάζεται οστεοπροτεγερίνη (OPG). Ο RANKL είναι μια ομοτριμερής πρωτεΐνη που εντοπίζεται σε διαμεμβρανικές και διαλυτές μορφές. Η εκκρινόμενη, διαλυτή μορφή είναι αποτέλεσμα του εναλλακτικού ματίσματος, ή πρωτεολυτικής κατάτμησης της μεμβρανικής μορφής. Η πρωτεολυτική κατάτμηση διενεργείται μέσω των μεταλλοπρωτεασών εξωκυττάριας ουσίας (MMP) ή μελών της οικογένειας ADAM. Ο RANKL εκτελεί τις λειτουργίες του αλληλεπιδρώντας με τον υποδοχέα RANK. Ο RANK είναι μια ομοτριμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη που στερείται ενδογενούς καταλυτικής ενεργότητας. Η RANK σηματοδότηση ρυθμίζεται από την OPG, η οποία δεσμεύει τον RANKL, με αποτέλεσμα να αποτρέπει την αλληλεπίδρασή του με τον RANK (Renema et al., 2016). Η OPG εκκρίνεται από ποικίλους κυτταρικούς τύπους και η έκφρασή της ρυθμίζεται από τους περισσότερους παράγοντες που επάγουν την έκφραση του RANKL (κυτταροκίνες, ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες, και άλλους παράγοντες).

Η αναλογία RANKL/ OPG είναι κρίσιμη για την ενεργοποίηση του RANK. Η RANK σηματοδότηση είναι περισσότερο γνωστή για το ρόλο που διαδραματίζει στον μεταβολισμό των οστών όπου ρυθμίζει την ομοιοστάση στο πλαίσιο οστεοβλάστη-οστεοκλάστη. Ωστόσο, η RANK σηματοδότηση ρυθμίζει επίσης την ανοσία, την επέκταση των πρόδρομων κυττάρων του μαστού και την ανάπτυξη του γαλακτικού μαζικού αδένα. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης αυτών των τριών πρωτεϊνών δεν προβλέπουν απαραίτητα τους βιολογικούς τους ρόλους. Για παράδειγμα, η έκφραση της OPG φαίνεται να είναι πανταχού παρούσα με υψηλή έκφραση στο ήπαρ, στο στομάχι, στα οστά, στον πνεύμονα, στην καρδιά και στο νεφρό. Ωστόσο, οι φυσιολογικοί ρόλοι για την OPG δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί σε πολλούς από αυτούς τους ιστούς. Η έκφραση του RANK είναι επίσης ευρεία και εντοπίζεται στα

οστά, στο μυελό των οστών, στο σκελετικό μυ, στον εγκέφαλο, στην καρδιά, στο συκώτι και στο μαζικό ιστό. Ο RANKL εκφράζεται σε περιφερικούς λεμφαδένες, οστά, θύμο αδένες, σκελετικούς μύες και στο μαζικό ιστό (Kearns et al., 2008).

3.2 Η RANK σηματοδότηση στα οστά

Ο μεταβολισμός των οστών συντονίζεται μέσω ενός συνδυασμού της RANK σηματοδότησης, της Wnt/ β -κατενίνης σηματοδότησης και της jagged1/ notch-1 σηματοδότησης. Ο RANKL προσδένεται και ενεργοποιεί τον RANK, ο οποίος εκφράζεται στην επιφάνεια των πρόδρομων οστεοκλαστών ως διαμεμβρανική πρωτεΐνη που στερείται ενδογενούς καταλυτικής ενεργότητας. Η RANK σηματοδότηση βασίζεται στην στρατολόγηση γνωστών πρωτεϊνών-προσαρμοστών, TRAF και Gab2, σε ειδικές θέσεις πρόσδεσης που βρίσκονται στο κυτταροπλασματικό τμήμα του RANK. Οι TRAFs (TNF-receptor associated factors) είναι πρωτεΐνες-προσαρμοστές που προσδένονται σε ειδικά μοτίβα (1, 2 ή 3) του RANK. Αυτά τα μοτίβα επηρεάζουν την καθοδική σηματοδότηση και επιτρέπουν τη ρύθμιση του RANK μονοπατιού. Οι TRAF2, TRAF5 και TRAF6 είναι οι κύριοι TRAFs που προσδένονται στον RANK. Ο TRAF που προσδένεται στο μοτίβο 1 ενεργοποιεί τα NF- κ B, JNK, ERK, p38 και Akt καθοδικά μονοπάτια. Εστιάζοντας στον NF- κ B, με την πρόσδεση του TRAF6 στον RANK φωσφορυλιώνονται οι ανασταλτικές κινάσες, IKKs (Inhibitory κ kinases), επιτρέποντας την μετατόπιση του NF- κ B στον πυρήνα. Ο NF- κ B είναι ικανός να σχηματίσει σύμπλοκο με τους c-jun, c-fos και άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, στον εκκινητή του NFATc1 (nuclear factor of activated T cells 1), με αποτέλεσμα την επικείμενη μεταγραφή σημαντικών γονιδίων απαραίτητων για την οστεοκλαστογένεση και τη διαφοροποίηση (Kearns et al., 2008). Τα γεγονότα αυτά τελικά θα οδηγήσουν στην οστική απορρόφηση, με τους οστεοκλάστες να επιτελούν ρυθμιστικό ρόλο στη διάσπαση του οστού. Ως ρυθμιστικός μηχανισμός, η OPG μπορεί να προσδεθεί στον RANKL με μεγάλη συγγένεια και να εμποδίσει την αλληλεπίδρασή του με τον RANK, παρεμποδίζοντας την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που περιγράφηκαν προηγουμένως. Συμπερασματικά, η OPG ρυθμίζει τη RANK σηματοδότηση και αναστέλλει την αποσύνθεση του οστού (Nagy and Penninger, 2015).

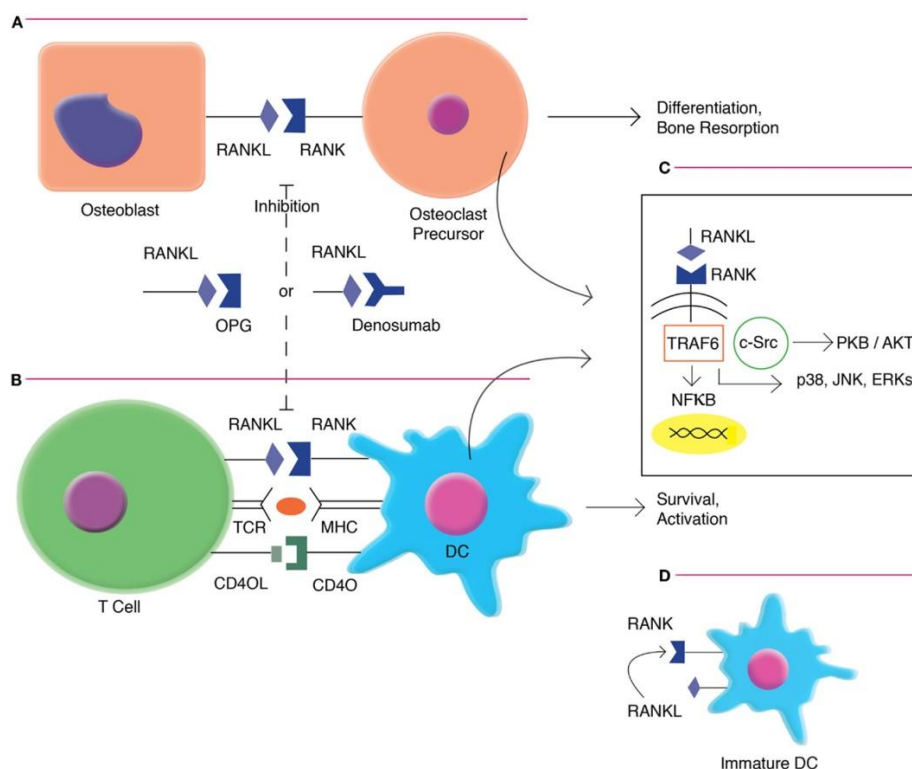


Εικόνα 9: Το RANKL/RANK μονοπάτι ελέγχει το παθοφυσιολογικό οστικό μεταβολισμό. Παράγοντες οστικής απορρόφησης, όπως PTHrP, IL-1, IL-11, IL-17, και TNF-α, δρουν ως σήματα στους οστεοβλάστες για να παράγουν RANKL, ο οποίος προσδένεται στον RANK που βρίσκεται στην επιφάνεια των πρόδρομων οστεοκλαστών (προ-οστεοκλάστες). Η αλληλεπίδραση του μεμβρανικού ή διαλυτού RANKL με τους προ-οστεοκλάστες που εκφράζουν RANK προάγουν την διαφοροποίησή τους σε οστεοκλάστες καθώς και την ενεργοποίηση και επιβίωση των ώριμων οστεοκλαστών. Η έκφραση της OPG μπορεί να ενισχυθεί από οιστρογόνα, IL-4, TGF-β ή άλλους παράγοντες. Η OPG προσδένεται στον RANKL και έτσι εμποδίζει την RANKL/RANK αλληλεπίδραση, αναστέλλοντας έτσι την οστική απορρόφηση. Τα σχετικά επίπεδα της OPG και του RANKL βρίσκονται σε μια λεπτή ισορροπία εξασφαλίζοντας υγιή οστική δομή. Κάτω από παθολογικές καταστάσεις ή κατά τη διάρκεια την εμμηνόπαυσης όπου τα οιστρογόνα είναι χαμηλά, έτσι και η OPG, εντοπίζεται μεγαλύτερη συγκέντρωση RANKL, η οποία οδηγεί σε ενισχυμένη ανάπτυξη/ ενεργοποίηση οστεοκλαστών και σε τοπική ή συστηματική οστική απώλεια. Το πλήρως εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα denosumab, που προσδένεται στον RANKL, έχει δειχθεί σε κλινικές μελέτες ότι αντισταθμίζει αυτά τα γεγονότα (Rao et al., 2017).

3.3 Η RANK σηματοδότηση στο ανοσοποιητικό σύστημα

Οι RANK και RANKL εκφράζονται σε T-κύτταρα, B κύτταρα και δενδριτικά κύτταρα (ΔΚ). Το RANK σηματοδοτικό μονοπάτι είναι σημαντικό για την ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος και μεσολαβεί σε ανοσολογικές αποκρίσεις. Πράγματι, ποντίκια που έχουν σχεδιαστεί για να εκφράζουν ανεπαρκώς τον RANK αποτυγχάνουν να αναπτύξουν λεμφαδένες, παρουσιάζουν μη φυσιολογική ανάπτυξη και μειωμένο αριθμό B κυττάρων. Ασθενείς με μεταλλάξεις στον RANK εμφανίζουν επίσης προβλήματα στη φυσιολογία των B κυττάρων. Η RANK σηματοδότηση είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση της ανάπτυξης των πρώιμων T- και B- λεμφοκυττάρων. Επίσης, το RANK μονοπάτι απαιτείται για την ανάπτυξη CD80+ AIRE+ μυελικών

θυμικών επιθηλιακών κυττάρων. Αυτά τα κύτταρα είναι ρυθμιστές της αυτοανοσίας, εκφράζουν το γονίδιο του ρυθμιστή της αυτοανοσίας (autoimmune regulator, AIRE) και μεσολαβούν στην αυτοανοχή των T-κυττάρων (Kearns et al., 2008, Rao et al., 2018).



Εικόνα 10: Η σηματοδότηση RANKL/ RANK στο σχηματισμό οστεοκλαστών και την ενεργοποίηση των ΔΚ. (Α) Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των RANKL και RANK ενισχύουν τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών και την οστική απορρόφηση. (Β) Οι αλληλεπιδράσεις RANKL/ RANK εμφανίζονται επίσης στο ανοσοποιητικό σύστημα, οδηγώντας την επιβίωση των δενδριτικών κυττάρων και την ενεργοποίησή τους. (C) Η σηματοδότηση πραγματοποιείται μέσω της στρατολόγησης μορίων προσαρμοστών, κυρίως του TRAF6, ο οποίος ενεργοποιεί τα καθοδικά σηματοδοτικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένου του NFκB, καθώς και των MAPK όπως η p38, η JNK και η ERK. Το TRAF6 σχηματίζει σύμπλοκα με το c-Src που ενεργοποιούν την αντιαποπτωτική AKT/ PKB. (D) Τα ανώριμα ενδιάμεσα ΔΚ συνεκφράζουν τους RANKL και RANK και παρουσιάζουν αυτοκρινή διέγερση. Ωστόσο, καθώς αυτά τα κύτταρα ωριμάζουν, ρυθμίζουν αρνητικά το RANKL και εξαρτώνται από εξωγενείς παράγοντες (Cheng and Fong, 2014).

Η αναγνώριση ενός αντιγόνου που παρουσιάζουν τα ΔΚ από τον υποδοχέα των T-κυττάρων, επάγει την έκφραση του RANKL. Σε δεύτερο χρόνο, ο RANKL των T-κυττάρων αλληλεπιδρά με τον RANK που εκφράζεται στα ΔΚ, απελευθερώνοντας αντι-αποπτωτικά μόρια, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση και επιβίωση των ΔΚ καθώς και την ενισχυμένη ανοσολογική απόκριση των T-κυττάρων. Επίσης, αυτή η αλληλεπίδραση έχει ως αποτέλεσμα τον αυξημένο αριθμό αντιγονοπαρουσιαστικών

ΔΚ και αντιγονοειδικών T-κυττάρων, καθώς και βελτιωμένη απόκριση των T κυττάρων μνήμης.

Ο RANKL εκκρίνεται επίσης από λεμφοκύτταρα και αλληλεπιδρά με τον RANK στο εντερικό επιθήλιο (Rao et al, 2018). Αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί τελικά στην ωρίμανση και τη διαφοροποίηση των M κυττάρων (microfold cells), τα οποία είναι εξειδικευμένα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, που σχετίζονται με τις πλάκες του Peyer, και είναι απαραίτητα για τη διαλογή των αντιγόνων (Kearns et al., 2008). Αξίζει να σημειωθεί ότι, η διαγραφή των RANKL και OPG δεν έχει τις ίδιες συνέπειες στο ανοσοποιητικό σύστημα όπως η RANK διαγραφή σε ποντίκια. Αυτό υποδηλώνει ότι ο RANKL και η OPG παίζουν πιθανότατα πιο περιττούς ρόλους στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος σε σύγκριση με το RANK (Kearns et al., 2008).

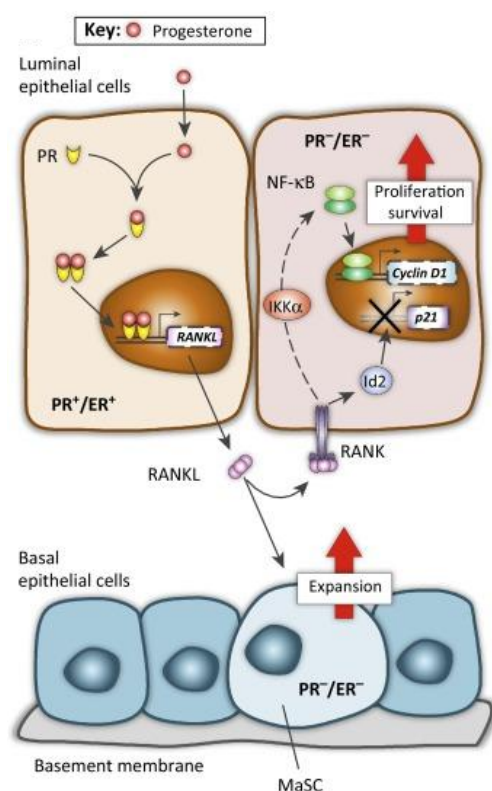
Ενίσχυση της ανοσίας	Αναστολή της ανοσίας
Ρύθμιση της ανάπτυξης των T- και B- λεμφοκυττάρων	Ανάπτυξη των μυελικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων (mTECs), τα οποία μεσολαβούν στην αυτοανοχή των T-κυττάρων
Οργανογένεση λεμφαδένων	Ενισχυμένη ανοχή των ΔΚ στις πλάκες του Peyer
Αυξημένη επιβίωση των ΔΚ, έκφραση κυτταροκινών και μετανάστευση	Παραγωγή ρυθμιστικών T- κυττάρων (Tregs)
Ενισχυμένη επαγωγή αποκρίσεων των T- κυττάρων	Επαγωγή ανεκτικότητας και απομάκρυνσης των T-κυττάρων

Πίνακας 3: Η ρύθμιση ποικίλων λειτουργιών του ανοσοποιητικού συστήματος από το RANKL/ RANK σηματοδοτικό μονοπάτι.

3.4 Η RANK σηματοδότηση στο μαστό

Το RANKL/ RANK σηματοδοτικό μονοπάτι είναι κρίσιμης σημασίας στη φυσιολογία του μαστικού αδένα. Ο RANK εκφράζεται συνεχώς στα επιθηλιακά κύτταρα και στα βλαστοκύτταρα του μαστού (MaSCs). Η υπερέκφραση του RANK σε διαγονιδιακά ποντίκια έχει ως αποτέλεσμα τον αυξημένο πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Το RANK

μονοπάτι είναι ιδιαίτερης σημασίας για τον σχηματισμό γαλακτοφόρων αδένων κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Είναι ενδιαφέρον ότι τα RANK και RANKL-knockout ποντίκια αποτυγχάνουν να υποστούν διαφοροποίηση των λοβών και των κυψελίδων κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ως εκ τούτου αποτυγχάνουν να αναπτύξουν πόρους που εκκρίνουν γάλα (Sigl et al., 2016). Μελέτες βασισμένες στη σημαντικότητα των ορμονών στην εγκυμοσύνη, έδειξαν ότι συγκεκριμένα ορμονικά σήματα, όπως η προγεστερόνη, η προλακτίνη και η παραθορμόνη, μπορούν να διεγείρουν την έκφραση του RANKL, προάγοντας την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού (Fata et al., 2000; Srivastava et al., 2003; Mulac-Jerioevic et al., 2003; Mukherjee et al., 2010). Αυτές οι λειτουργίες φαίνονται να προωθούνται από την επαγωγή της έκφρασης του RANKL (Fata et al., 2000) και την ενεργοποίηση των IKKα-NF-κB-κυκλίνης D1 (Cao et al., 2001; 2007) και Id2-p21 μονοπατιών (Kim et al., 2006).



Εικόνα 11: Ο ρόλος της RANK/ RANKL σηματοδότησης στη φυσιολογική ανάπτυξη του μαστού. Η προγεστερόνη διεγείρει άμεσα τους υποδοχείς προγεστερόνης, που εκφράζονται σε ένα σύνολο luminal επιθηλιακών κυττάρων του μαστού. Η ενεργοποίηση της σηματοδότησης της προγεστερόνης αυξάνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του RANKL προάγοντας τη μεταγραφή ή την σταθεροποίηση του mRNA του. Ο RANKL δρα ως παρακρινής μεσολαβητής προωθώντας τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των γειτονικών PR/ ER αρνητικών luminal κυττάρων, ενεργοποιώντας τα IKKα-κυκλίνη D1 και Id2-p21 καθοδικά μονοπάτια. Ο RANK ρυθμίζει και την επέκταση των PR/ ER αρνητικών MaSCs, τα οποία βρίσκονται στην βασική μεμβράνη (Zoi et al., 2016).

Σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού που εκφράζουν τους PR και ER η προγεστερόνη διεγείρει τους υποδοχείς της ρυθμίζοντας την έκφραση του RANKL σε μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο (Obr et al., 2013; Tanos et al., 2013). Στη συνέχεια, ο RANKL δρα παρακρινώς σε PR-, ER-, RANK+ luminal επιθηλιακά

κύτταρα μαστού προωθώντας τον πολλαπλασιασμό τους (Asselin-Labat et al., 2010; Joshi et al., 2010). Μια πρόσθετη λειτουργία της παρακρινούς RANKL σηματοδότησης είναι η μεσολαβούμενη της προγεστερόνης επέκταση των RANK+ βλαστοκυττάρων του μαστού, η οποία, μεταξύ άλλων, είναι απαραίτητη κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης για να διαμορφωθούν οι πόροι που εκκρίνουν γάλα. Επίσης, τα βλαστοκύτταρα μεταβάλλονται καθ' όλη τη διάρκεια του εμμηνορροϊκού κύκλου και υπόκεινται στη ρύθμιση της RANK σηματοδότησης.

3.5 Ρύθμιση της RANK σηματοδότησης

Λαμβάνοντας υπόψη το ευρύ φάσμα έκφρασης των RANKL και OPG, και τις σημαντικές φυσιολογικές διεργασίες που συντονίζει η RANK σηματοδότηση, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι πλήθος παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των ορμονών και των κυτταροκινών ρυθμίζουν την έκφραση των RANKL, RANK, OPG καθώς και τη RANK σηματοδότηση (Theoleyre et al., 2004). Όπως θα περίμενε κανείς, τα μόρια που προάγουν την οστική απορρόφηση τείνουν να ρυθμίζουν θετικά τον RANKL ή αρνητικά την OPG, αυτό ονομάζεται «αμοιβαία ρύθμιση». Αυτή η μορφή ρύθμισης πραγματοποιείται από διάφορες ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση εντός του RANK σηματοδοτικού μονοπατιού. Για παράδειγμα, η παραθορμόνη (PTH) διεγείρει την αμοιβαία ρύθμιση των RANKL και OPG. Πράγματι, μελέτες έχουν δείξει ότι η διέγερση της PTH οδηγεί σε μια δόσοεξαρτώμενη αύξηση της έκφρασης του RANKL, με ταυτόχρονη δόσοεξαρτώμενη μείωση της έκφρασης της OPG (Ma et al., 2001). Δεν συμμετέχουν όμως, όλα τα μόρια που προάγουν την οστική απορρόφηση στην αμοιβαία ρύθμιση. Για παράδειγμα, ο TNF-α και η ιντερλευκίνη-7 (IL-7) ρυθμίζουν την RANK σηματοδότηση αυξάνοντας την έκφραση του RANKL αλλά δεν έχουν καμία επίδραση στο OPG. Η ιντερλευκίνη-1 (IL-1), ιντερλευκίνη-17 (IL-17), προσταγλανδίνη E2 και βιταμίνη D αυξάνουν τον RANKL και μειώνουν την έκφραση της OPG ως προ-απορροφητικοί παράγοντες. Από την άλλη πλευρά, ορμόνες και οι κυτταροκίνες που προστατεύουν τα οστά ρυθμίζουν επίσης την RANK σηματοδότηση. Τα Οιστρογόνα, TGF-β, ιντερλευκίνη-13 (IL-13) ρυθμίζουν αμοιβαία την RANK σηματοδότηση αυξάνοντας τα επίπεδα της OPG, μειώνοντας παράλληλα τα επίπεδα του RANKL. Είναι ενδιαφέρον να ειπωθεί ότι ο RANK δεν είναι τόσο αυστηρά ρυθμιζόμενος όπως είναι η OPG ή ο RANKL. Πιο συγκεκριμένα, μόνο η IL-6, IL-1, προσταγλανδίνη E2 και η βιταμίνη D φαίνεται να ρυθμίζουν την

έκφραση του RANK. Η IL-6 διεγείρει την αρνητική ρύθμιση του RANK, ενώ οι υπόλοιποι παράγοντες αυξάνουν την έκφραση του RANK (Kearns et al., 2008). Υπάρχει μια περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ των ορμονών, των κυτταροκινών και των αυξητικών παραγόντων με το RANK σηματοδοτικό μονοπάτι, η οποία ρυθμίζει διάφορες πτυχές της φυσιολογίας. Η πλήρης κατανόηση της ρύθμισης της RANK σηματοδότησης βρίσκεται ακόμη υπό διερεύνηση.

Ρυθμιστές	RANKL	OPG	RANK
Ορμόνες			
Βιταμίνη D3	↑	↓	↑
PTH	↑	↓	-
PTHrP	↑	-	-
Εστραδιόλη	↓	↑	-
Τεστοστερόνη	-	↑	-
Προλακτίνη	↑	↓	-
Κυτταροκίνες			
TNF-α	↑	-	-
IL-1	↑	↓	↑
IL-6	↑	↑	↓
IL-17	↑	↓	-
Αυξητικοί παράγοντες			
TGF-β	↓	↑	↓
BMP-2	↑	↑	-
Λοιποί παράγοντες			
Προσταγλανδίνη E2	↑	↓	↑
Γλυκοκορτικοειδή	↑	↓	-

Πίνακας 4: Οι βασικοί κυτταρικοί ρυθμιστές της έκφρασης των OPG, RANKL, και RANK.

3.6 Η RANK σηματοδότηση στον καρκίνο

Ο RANKL/ RANK άξονας παίζει ρόλο σε σημαντικές παθολογικές καταστάσεις που αφορούν μεταστάσεις στα οστά και εξαρτώνται λειτουργικά από τους οστεοκλάστες. Σε αυτές τις καταστάσεις παρατηρείται ένας "φαύλος κύκλος",

αμοιβαίας ανατροφοδότησης μεταξύ του πολλαπλασιασμού του όγκου και της διάσπασης των οστών. Η διήθηση των μεταστατικών κυττάρων και η παραγωγή παραγόντων κατά την ανάπτυξη του όγκου αυξάνουν την οστική απορρόφηση, η οποία με τη σειρά της προκαλεί την απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων που προάγουν περαιτέρω τον πολλαπλασιασμό του όγκου. Αρκετές μελέτες αναφέρουν μειωμένη ανάπτυξη και αυξημένη απόπτωση στους σκελετικούς όγκους δευτερογενώς μετά την αναστολή των οστεοκλαστών μπλοκάροντας τον RANKL. Αυτή η ιδέα έχει αποδειχθεί σε ζωικά μοντέλα καρκίνου του προστάτη (Miller et al., 2008; Fizazi et al., 2003), καρκίνου του μαστού (Canon et al., 2008) και πολλαπλού μυελώματος (Vanderkerken et al., 2003). Ωστόσο, μελέτες δείχνουν ότι το RANKL/RANK μονοπάτι μπορεί επίσης να έχει σύνθετες επιδράσεις ανεξάρτητες από τη λειτουργία των οστεοκλαστών σε κακοήθειες. Οι όγκοι που εκφράζουν RANK περιλαμβάνουν τον καρκίνο του προστάτη, τον καρκίνο του μαστού, τον καρκίνο του πνεύμονα, το νεφρικό καρκίνωμα και το μελάνωμα. Σε μια έρευνα που αξιολογήθηκαν πολλαπλοί συμπαγείς όγκοι δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στην έκφραση του RANK μεταξύ πρωτογενών όγκων και αντίστοιχων μεταστάσεων στα οστά (Santini et al., 2011).

Αυξημένη έκφραση των RANKL, RANK και OPG εντοπίζεται στον καρκίνο του προστάτη, ενώ η έκφραση είναι χαμηλή σε φυσιολογικά κύτταρα. Επιπλέον, η έκφραση και των τριών πρωτεϊνών συσχετίστηκε θετικά με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους που υποδεικνύουν πιο επιθετική και προχωρημένη νόσο, συμπεριλαμβανομένης της βαθμολόγησης Gleason, των επιπέδων PSA, της αρνητικότητας των ανδρογονικών υποδοχέων (AR) και της παρουσίας μεταστάσεων (Chen et al., 2006). Επιπροσθέτως, ο RANKL έχει δείχθει ότι ενεργοποιεί την IκB κινάση α (IKK α), στον καρκίνο του προστάτη και αναστείλει την έκφραση του αναστολέα μετάστασης Maspin, οδηγώντας σε εξέλιξη της ασθένειας. Η ενεργοποιημένη IKK α συσχετίστηκε με τη διήθηση λεμφοκυττάρων που εκφράζουν τον RANKL (Luo et al., 2007). Η έκφραση του RANKL έχει επίσης συνδεθεί με την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάπτωση (epithelial to mesenchymal transition, EMT), έναν μορφολογικό μετασχηματισμό στον οποίο τα καρκινικά κύτταρα ρυθμίζουν θετικά τα μεσεγχυματικού τύπου γονίδια και υιοθετούν έναν αυξανόμενο μεταναστευτικό και διηθητικό φαινότυπο ανεξάρτητο της κυτταρικής προσκόλλησης. Η αυξημένη έκφραση RANKL έχει περιγραφεί σε μοντέλα EMT καρκίνου του

προστάτη, υποδεικνύοντας ότι μπορεί να αντιπροσωπεύει έναν νέο δείκτη αυτής της μετάβασης (Odero-Marrah et al., 2008).

Το RANKL/ RANK μονοπάτι έχει επίσης ερευνηθεί στο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (RCC) και μπορεί να έχει διαφορετικούς ρόλους μεταξύ των διαφόρων ιστολογικών υποτύπων. Ανάλυση ιστών με RCC έδειξε ότι το RANKL mRNA ήταν σημαντικά υψηλότερο στα κλασικά διαυγοκυτταρικά RCCs σε σύγκριση με τα θηλώδη RCCs, τα χρωμοφόβα RCCs ή τους μη νεοπλαστικούς ιστούς. Η έκφραση του RANK mRNA είναι αυξημένη και του OPG μειωμένη σε διαυγοκυτταρικά RCCs σε σχέση με μη νεοπλαστικούς ιστούς. Η αναλογία των RANKL προς OPG mRNA ήταν υψηλότερη σε διαυγοκυτταρικά RCCs σε σχέση με τα θηλώδη RCCs και τους μη νεοπλασματικούς ιστούς. Επιπροσθέτως, η ανοσοχρώση για την ανίχνευση της πρωτεϊνικής έκφρασης του RANKL ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε διαυγοκυτταρικά RCCs από ότι οι άλλους ιστούς. Η διαμόλυνση με RANKL της Caki-1, μιας κυτταρικής σειράς διαυγοκυτταρικού RCC, επιτάχυνε κατά τέσσερις φορές την μετανάστευση του όγκου και οδήγησε ιστολογικά σε μεγαλύτερη διασπορά και εμπλοκή των περιθωρίων του όγκου σε σύγκριση με τον ιστό ελέγχου. Η χορήγηση OPG παρεμπόδισε αυτή την επίδραση με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Από κλινική άποψη, οι ασθενείς με όγκους που υπερεκφράζουν τους RANKL και RANK παρουσίασαν βραχύτερη επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου, ειδικής της νόσου επιβίωσης και επιβίωση χωρίς μετάσταση στα οστά. Οι όγκοι με υψηλή έκφραση OPG συσχετίστηκαν με μεγαλύτερη επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου και κανένας όγκος με υψηλό OPG δεν ανέπτυξε μεταστάσεις στα οστά (Mikami et al., 2009).

Σε ένα μοντέλο καρκίνου του πνεύμονα αποδείχθηκε ότι ο RANKL πυροδοτεί τη μετανάστευση μέσω της αύξησης της έκφρασης του μορίου ενδοκυτταρικής προσκόλλησης-1 (ICAM-1) (Chen et al., 2011). Έχει αναφερθεί περίπτωση περιορισμού της εξέλιξης μεταστατικού αδenoκαρκινώματος του πνεύμονα μετά από θεραπεία με denosumab. Η αρνητική ρύθμιση της AKT λόγω της αναστολής του RANK, θεωρήθηκε ως ένας πιθανός μηχανισμός αυτής της παρατήρησης (Curioni-Fontecedro et al., 2013). Ο RANKL έχει βρεθεί να εκφράζεται σε περιπτώσεις HCV και HBV-οδηγούμενου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC), και σχετίζεται σημαντικά με την ανάπτυξη οστικών μεταστάσεων (Sasaki et al., 2007). Ο RANKL έχει επίσης εντοπιστεί σε πολλαπλό μυέλωμα και χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και επάγει κυτταροκίνες που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου,

συμπεριλαμβανομένων των TNF, IL-6 και IL-8. Μία ανασταλτική πρωτεΐνη, η RANK-Fc, αλλά όχι το denosumab, αποδείχθηκε ότι επάγει την μεσολαβούμενη από τα φυσικά φονικά κύτταρα (NK) ανοσία κατά των καρκινικών στόχων που εκφράζουν τον RANKL (Schmiedel et al., 2013). Οι RANKL, RANK και OPG εκφράζονται ποικιλοτρόπως σε όγκους του θυρεοειδούς, συμπεριλαμβανομένων των θηλωματικών καρκινωμάτων, των μυελικών καρκινωμάτων και των μακροαγγειακών αδενωμάτων (Heymann et al., 2008).

Η RANK σηματοδότηση είναι πιθανό να επηρεάζει σημαντικά τη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων εντός του μικροπεριβάλλοντος των οστών. Ο RANKL που εκφράζεται από οστεοβλάστες και κύτταρα στρώματος στον οστικό ιστό μπορεί να προσελκύει χημειοτακτικά τη μετάσταση συγκεκριμένων όγκων στο οστό. Η διέγερση με RANKL των καρκινικών κυττάρων του προστάτη μπορεί να ενεργοποιήσει πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια που διεγείρουν την κυτταρική μετανάστευση, χημειοταξία και διήθηση μέσω της μήτρας κολλαγόνου (Armstrong et al., 2008). Η έκφραση των RANKL, RANK και OPG ήταν μεγαλύτερη στις οστικές μεταστάσεις σε σχέση με τις μεταστάσεις στους λεμφαδένες στον καρκίνο του προστάτη (Chen et al., 2006). Παρομοίως, κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και καρκίνου του προστάτη που εκφράζουν τον RANK επιδεικνύουν θετική ρύθμιση της MMP-1 και επακόλουθη μετανάστευση και διήθηση μετά τη χορήγηση του RANKL (Casimiro et al., 2013). Η υψηλή RANK και η χαμηλή OPG έκφραση σε πρωτογενείς όγκους καρκίνου του μαστού συσχετίστηκαν με αυξημένη οστική μετάσταση και περιορισμένη επιβίωση χωρίς σκελετική ασθένεια (Santini et al., 2011). Η *in vivo* αναστολή του RANKL σε κακόηθες μελάνωμα μείωσε τη μετάσταση στα οστά αλλά όχι σε άλλες θέσεις, καθώς και τη νοσηρότητα.

Το RANK μονοπάτι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, NSCLC (Lu et al., 2016). Έχουν αναφερθεί σημαντικές διαφορές σχετικά με την συγκέντρωση του RANKL στον ορό και την αναλογία RANKL/ OPG μεταξύ των ασθενών με NSCLC, ασθενών με καλοήγη οζίδια στους πνεύμονες και υγιών ατόμων (Lu et al., 2016). Τα επίπεδα του RANKL καθώς και ο λόγος RANKL/ OPG στους ασθενείς με NSCLC ήταν σημαντικά υψηλότερα συγκριτικά με τις άλλες ομάδες. Είναι ενδιαφέρον ότι δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του OPG μεταξύ των τριών ομάδων. Η αυξημένη αναλογία RANKL/ OPG μπορεί να παραπέμπει σε υψηλότερα

επίπεδα κυκλοφορούντος RANKL ή χαμηλότερα επίπεδα κυκλοφορούντος OPG. Ο λόγος RANKL/ OPG έχει προταθεί ως βιοδείκτης για έγκαιρη διάγνωση του NSCLC.

Ο ρόλος του OPG είναι σημαντικός παράγοντας σε πολλές κακοήθειες. Ο OPG έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την απόπτωση στον παγκρεατικό, ορθοκολικό και τον καρκίνο των ωοθηκών, πιθανώς μέσω της δράσης του ως ανασταλτικός υποδοχέας του TRAIL, μέλος της υπερικογένειας του TNF. Από την άλλη μεριά, ο OPG έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί παράγοντα επιβίωσης για τον καρκίνο του προστάτη (Holen et al., 2002), τον καρκίνο του μαστού (Holen et al., 2005) και το πολλαπλό μύελωμα (Shipman et al., 2005). Η αύξηση του OPG στον ορό συσχετίστηκε επίσης με κακή πρόγνωση στο γαστρικό καρκίνωμα (Ito et al., 2003) και στο καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης (Mizutani et al., 2004).

3.7 Η RANK σηματοδότηση στον καρκίνο του μαστού

Ο υποδοχέας RANK και ο συνδέτης του RANKL πρόσφατα προτάθηκαν ως πιθανοί προγνωστικοί και προβλεπτικοί δείκτες για τα καρκινώματα του μαστού (Hein et al., 2014; Santini et al., 2011; Zhang et al., 2012; Pfitzner et al., 2014). Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των RANK, RANKL είναι ενδεικτικά του μεταστατικού δυναμικού των πρωτογενών καρκίνων του μαστού. Οι RANKL, RANKL εκφράζονται σε αρκετές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, σε πρωτογενείς όγκους καθώς και σε μεταστάσεις στα οστά. Η υπερέκφραση του RANK έχει συσχετισθεί με υψηλό βαθμό κακοήθειας, αρνητικότητα των ορμονικών υποδοχέων και δυσμενή πρόγνωση. Ενώ, η υπερέκφραση του RANKL έχει συνδεθεί με ογκογένεση σε νεαρές ηλικίες και τον καρκίνο του μαστού που σχετίζεται με την εγκυμοσύνη, καθώς και με την ενεργοποίηση σημαντικών μονοπατιών που ρυθμίζουν την καρκινογένεση.

Το RANK σηματοδοτικό μονοπάτι παίζει ζωτικό ρόλο σε όλα τα στάδια του καρκίνου του μαστού, από την έναρξη έως τη μετάσταση, ενισχύοντας βασικές λειτουργίες και χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων (Palafox et al., 2012; Tan et al., 2011; Gonzalez-Suarez et al., 2010; Nolan et al., 2016). Πιο συγκεκριμένα, ο RANKL/ RANK άξονας είναι σημαντικός ρυθμιστής της ορμονοεξαρτώμενης καρκινογένεσης του μαστού. Ο RANKL επάγεται από την οξική μεδροξυπρογεστερόνη (MPA), μια συνθετική προγεστίνη, στο μαζικό αδέν. Στη συνέχεια, ο RANKL ενεργοποιεί τον RANK, προάγοντας τον πολλαπλασιασμό, την

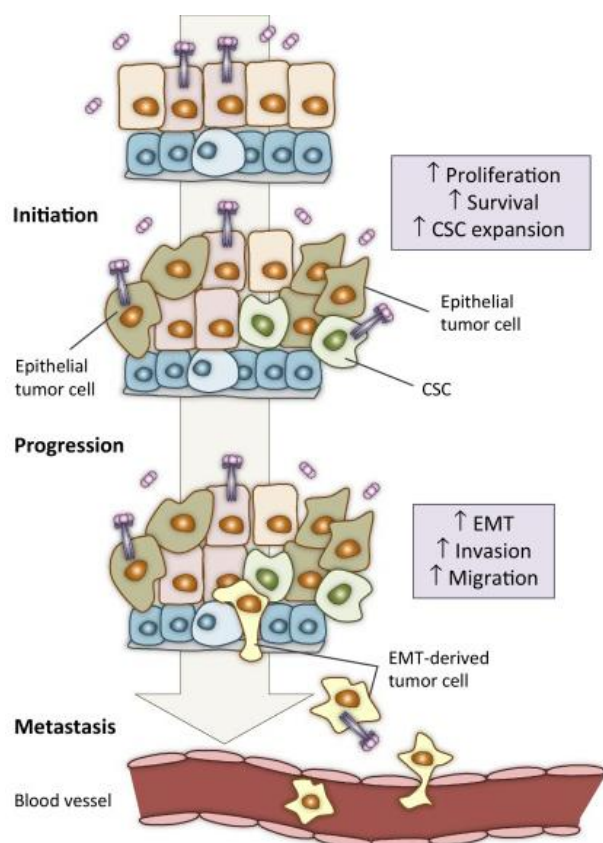
εξάπλωση των καρκινικών βλαστοκυττάρων και την προστασία των επιθηλιακών κυττάρων από τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από τις βλάβες του DNA (Schramek et al, 2010). Η προώθηση του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης από τον RANKL ρυθμίζονται από την καθοδική ενεργοποίηση των NF-κB, cyclin D1 και Bcl2 μέσω ενός AKT-εξαρτώμενου τρόπου, ευνοώντας την ογκογένεση. Η αναστολή του RANKL είναι ιδιαίτερης σημαντικότητας στη διαχείριση του καρκίνου του μαστού. Σε μελέτες με ζωικά μοντέλα ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου του μαστού, η λειτουργική αναστολή του RANKL αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου, τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού και μειώνει τα επίπεδα κυκλίνης D1 (Gonzalez-Suarez et al, 2010).

Το μονοπάτι RANK έχει επίσης, συσχετισθεί με την έναρξη της καρκινογένεσης σε φορείς *BRCA1* μεταλλάξεων, αναδεικνύοντας τα RANK+ luminal πρόδρομα κύτταρα ως τον κύριο στόχο αυτού του υπότυπου καρκίνου του μαστού (Nolan et al., 2016). Αυτός ο κυτταρικός πληθυσμός ανταποκρίνεται στην παρουσία του RANKL και εξελίσσεται σε basal-like όγκους. Όμως, η χορήγηση του denosumab, ενός μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του RANKL, αποτελεί αποτελεσματική στρατηγική στην αντιμετώπιση της ογκογένεσης στο μαστό.

Επιπροσθέτως, ο άξονας RANK/ RANKL είναι υπεύθυνος την επέκταση του πληθυσμού των καρκινικών βλαστοκυττάρων (cancer stem cell, CSC) του μαστού, ευνοώντας την ανθεκτικότητα στις εφαρμοζόμενες θεραπείες και τη μεταστατική συμπεριφορά του όγκου. Λειτουργικές δοκιμασίες έχουν δείξει ότι η έκφραση του RANK αυξάνει σημαντικά την αυτοανανέωση του πληθυσμού των CSC (Schramek et al., 2010). Η υπερέκφραση του RANK έχει δείχθει ότι προκαλεί έναν CD44 + CD24- φαινότυπο, χαρακτηριστικό της βλαστικότητας (Palafox et al., 2012). Η διαρκής ενεργοποίηση του RANK έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία σωστής διαφοροποίησης των κυττάρων του μαστού, οδηγώντας στον σχηματισμό ετερογενών όγκων (Pellegrini et al., 2013). Οι Ithimakin και συνεργάτες έδειξαν ότι η διέγερση με RANKL αύξησε την έκφραση του HER2 στα καρκινικά βλαστοκύτταρα του μαστού, ρυθμίζοντας την αυτοανανέωσή τους (Ithimakin et al., 2013). Ενώ, τα γεγονότα αυτά αναστέλλονται με τη χορήγηση του denosumab (εγκεκριμένου για τη θεραπεία της οστικής μετάστασης). Πιθανώς η RANK μεσολαβούμενη ενεργοποίηση του IKKα-NF-κB μονοπατιού συνδέεται με αυτήν την ρύθμιση (Bailey et al., 2014) και την

αύξηση της έκφρασης του HER2, ο οποίος ενεργοποιεί περαιτέρω το NF-κB, δημιουργώντας ένα βρόχο θετικής ανάδρασης (Cao et al., 2001).

Μια άλλη διαδικασία που συνδέει το RANK με την ογκογένεση στο μαστό είναι η ρύθμιση της EMT, μιας διαδικασίας που ενισχύει την μεταστατική ικανότητα (Mani et al., 2008; Hyun et al., 2016). Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού διαμολυσμένα με τον RANK έχειδειχθεί ότι εκφράζουν μεσεγχυματικούς δείκτες (φιμπρονεκτίνη, βιμεντίνη, N-καδερίνη) και μεταγραφικούς παράγοντες (Snail, Twist, Zeb1 και Zeb2), σημάδια επαγωγής της EMT (Palafox et al., 2012). Μία *in vitro* μελέτη, απέδειξε ότι η EMT που επάγεται από τον RANKL απαιτεί την ενεργοποίηση της NF-κB σηματοδότησης καθώς και την αύξηση της έκφρασης των Snail and Twist, προκειμένου να δοθεί το σήμα για τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, τη διήθηση και τη μετάσταση (Tsubaki et al., 2013). Σε άλλη μελέτη, η διέγερση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων από τον RANKL προκάλεσε τη μετανάστευσή τους ενεργοποιώντας το Akt και το ERK σηματοδοτικό μονοπάτι με c-Src μεσολαβούμενο τρόπο και οι διαδικασίες αυτές μπορούσαν να μπλοκαριστούν από ειδικούς αναστολείς (Zhang et al., 2012). Συνεπώς, φαίνεται ότι η σηματοδότηση RANK είναι υψίστης σημασίας στην EMT και επηρεάζει τη μεταστατική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων.



Εικόνα 12: Ο ρόλος του RANK/RANKL μονοπατιού στην καρκινογένεση του μαστού. Ο RANK εμπλέκεται στην παθογένεια του καρκίνου του μαστού, ενεργοποιώντας κυρίως το NF-κB μονοπάτι. Ο RANKL προάγει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των επιθηλιακών κυττάρων του όγκου που εκφράζουν τον RANK, καθώς και την επέκταση των καρκινικών βλαστοκυττάρων, επηρεάζοντας έτσι την ανάπτυξη του όγκου, την ανθεκτικότητα στα φάρμακα και το μεταστατικό δυναμικό. Επιπλέον, η RANK σηματοδότηση προκαλεί EMT, μια διαδικασία με την οποία ένα επιθηλιακό κύτταρο αποκτά μεσεγχυματική μορφολογία και συμπεριφορά. Τα καρκινικά κύτταρα που προέρχονται από την

EMT χαρακτηρίζονται από αυξημένη μεταναστευτική ικανότητα και διεισδυτικότητα, λειτουργίες που τελικά επιτρέπουν τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Zoi et al., 2016).

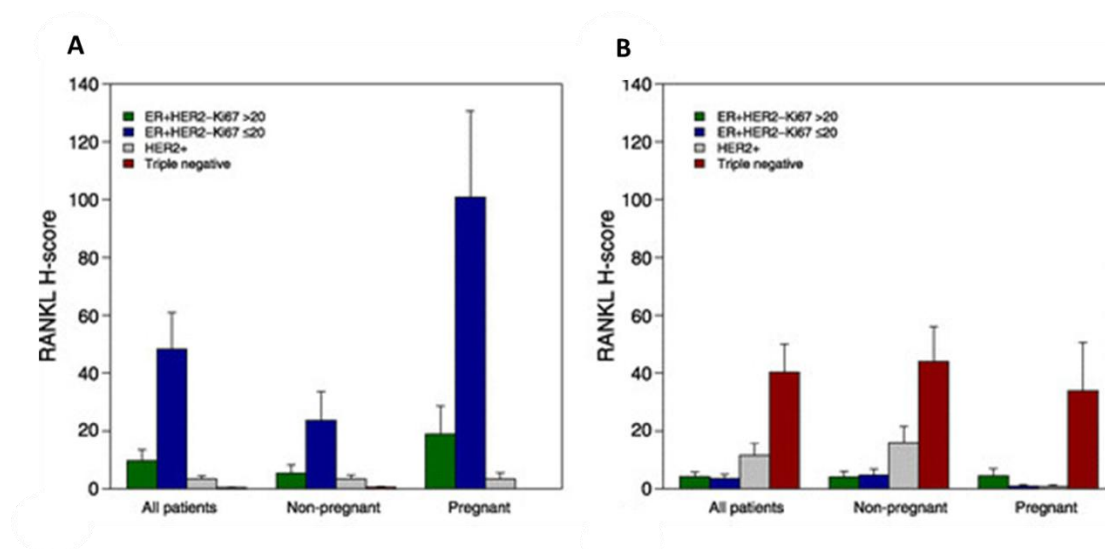
Γνωρίζοντας τη σημασία του RANKL στη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων του μαστού, υπήρξε τεράστια ανάγκη να καθοριστούν οι τύποι κυττάρων που παράγουν το RANKL. Μία σημαντική πηγή παραγωγής RANKL φαίνεται να παρέχεται από τα CD4⁺ FoxP3⁺ ρυθμιστικά T κύτταρα (Tan et al., 2011), τα οποία είναι αρκετά αυξημένα σε HER2 θετικά καρκινώματα μαστού (Perez et al., 2007). Η μετάσταση στους πνεύμονες σε ένα μοντέλο καρκίνου του μαστού που προκαλείται από την υπερέκφραση του πρωτο-ογκογονιδίου HER2, αποδείχθηκε ότι προκαλείται από το RANKL που εκφράζεται από τα Treg ή χορηγείται εξωγενώς. Ο RANKL μπορεί επίσης, να παραχθεί από κύτταρα του όγκου, συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Azim et al., 2015) καθώς και των φυσιολογικών κυττάρων στις περιοχές μετάστασης, όπως οι οστεοβλάστες στο οστό (Jones et al., 2006). Μια ενδιαφέρουσα μελέτη έδειξε ότι τα κύτταρα μελανώματος που εκφράζουν τον RANK μπορούν να μεταναστεύσουν στα οστά, ενώ το OPG μείωσε αξιοσημείωτα αυτά τα γεγονότα (Jones et al., 2006). Τα κύτταρα αυτά καθώς και τα καρκινικά κύτταρα του μαστού προσελκύονται χημειοτακτικά από τον RANKL προκειμένου να μετασταθούν στα οστά (Jones et al., 2006). Εκτός από χημειοτακτικός παράγοντας, ο RANKL που παράγεται από τους οστεοβλάστες είναι και σήμα για οστική απορρόφηση, με αποτέλεσμα την επακόλουθη έκκριση διαφόρων αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών, που προάγουν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των μεταστατικών κυττάρων του μαστού (Sosnoski et al., 2012). Σε απόκριση αυτών των σημάτων, τα μεταστατικά κύτταρα εκκρίνουν γνωστούς διεγέρτες του RANKL, δημιουργώντας έτσι έναν ενισχυμένο κύκλο ανατροφοδότησης (Futakuchi et al., 2016).

3.8 Η εμπλοκή του RANK μονοπατιού στα HER2 θετικά καρκινώματα μαστού

Πειραματικά δεδομένα επισημαίνουν τη σημασία της RANK σηματοδότησης στα HER2 θετικά καρκινώματα του μαστού. Συγκεκριμένα, οι Gonzalez- Suarez και συνεργάτες έδειξαν ότι η λειτουργική αναστολή του RANKL μπορεί να μειώσει την αυθόρμητη ογκογένεση του μαστού, το σχηματισμό προ-κακοηθών αλλοιώσεων, τον πολλαπλασιασμό και το μεταστατικό δυναμικό σε MMTV-HER2 διαγονιδιακούς ποντικούς (Gonzalez-Suarez et al., 2010). Συμπληρωματικά, οι Tan και συνεργάτες

(Tan et al., 2011) παρατήρησαν ότι οι MMTV-HER2/ Rank+/- ποντικοί εμφανίζουν μειωμένο μεταστατικό ρυθμό σε σύγκριση με τους ομοζυγώτες. Επιπλέον, η αποσιώπηση ή η αναστολή του RANK σε καρκινικά κύτταρα που υπερέκφραζουν τον HER2 μπορούσε να μειώσει τις μεταστάσεις και να εμποδίσει την απόκριση στο RANKL. Αντίθετα, ο μεταστατικός ρυθμός αυξανόταν μετά τη χορήγηση του RANKL (με ένεση δύο φορές την εβδομάδα) σε ποντικούς στους οποίους έγινε μεταμόσχευση HER2+ καρκινικών κυττάρων μαστού, που εκφράζουν τον υποδοχέα RANK (Tan et al., 2011).

Η NF-κB σηματοδότηση είναι το κύριο καθοδικό μονοπάτι του RANK και αποτελεί καθοδικό στόχο του HER2, προωθώντας τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων καρκίνου του μαστού. Ο ενεργοποιημένος NF-κB φαίνεται να παίζει πρωταρχικό ρόλο στα ER-αρνητικά/ HER2-θετικά καρκινώματα του μαστού. Ωστόσο, ο μηχανισμός της ενεργοποίησης του NF-κB και της ογκογένεσης σε αυτά τα κύτταρα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Ορισμένες μελέτες υποδεικνύουν την εμπλοκή του PI3K/ Akt σηματοδοτικού μονοπατιού στην ενεργοποίηση του NF-κB (Chen et al., 2013; Jiang et al., 2014; Ma et al., 2013; Hinohara et al., 2012). Ωστόσο, οι Merkhofer και συνεργάτες απέδειξαν ότι ο HER2 μπορούσε να ενεργοποιήσει τον NF-κB μέσω του κανονικού μονοπατιού ανεξάρτητα από το PI3K σε ER-αρνητικά/ HER2-θετικά κύτταρα καρκίνου του μαστού (Merkhofer et al., 2010).



Εικόνα 13: Η έκφραση των RANKL (A) και RANK (B) σύμφωνα με τον υπότυπο καρκίνου του μαστού (Azim et al., 2015).

Η ενεργοποίηση του NF-κB μπορεί να συμβεί μέσω κανονικών και μη κανονικών μονοπατιών. Είναι γνωστό ότι η IKKβ εμπλέκεται ως κύρια υπομονάδα στο κανονικό NF-κB μονοπάτι, ενώ η IKKα ως βασικός τελεστής στο μη κανονικό μονοπάτι. Ενδιαφέρουσες μελέτες με knockdown ποντίκια αποκάλυψαν ότι η IKKα διαδραματίζει παραδόξως, σημαντικότερο ρόλο από την IKKβ στην ενεργοποίηση του κανονικού NF-κB μονοπατιού, προωθώντας την εξέλιξη του όγκου (Merkhofer et al., 2010). Η IKKα φαίνεται να δρα ως η κεντρική πρωτεΐνη ενεργοποίησης του NF-κB στην καρκινογένεση που σχετίζεται με τον HER2. Η RANK σηματοδότηση ενεργοποιεί άμεσα την IKKα όχι μόνο στο φυσιολογικό μαζικό επιθήλιο (Cao et al., 2001) αλλά και σε HER2+ κύτταρα καρκίνου του μαστού (Tan et al., 2011). Η IKKα κινάση απαιτείται για την ογκογόνο ανάπτυξη και τον συνεχή κυτταρικό πολλαπλασιασμό διεγείροντας την κυκλίνη D1 σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο. Επιπλέον, ρυθμίζει την αυτοανανέωση των καρκινικών βλαστοκυττάρων, επηρεάζοντας έτσι τη δημιουργία δευτερογενών όγκων (Cao et al., 2007). Πράγματι, η επαγόμενη από τον HER2 επέκταση του πληθυσμού αυτού έχει αποδειχθεί ότι λαμβάνει χώρα μέσω της IKKα μεσολαβούμενης απόκλεισης του p27, αρνητικού ρυθμιστή της μετάβασης G1-S κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, από τον πυρήνα (Zhang et al., 2013).

In vivo μελέτες με MMTV-HER2 διαγονιδιακά ποντίκια απέδειξαν ότι ο NF-κB ελέγχει την αυτοανανέωση των καρκινικών βλαστοκυττάρων διεγείροντας την έκφραση των δεικτών βλαστικότητα του μαστού (π.χ., CD44, Sox2, Nanog), καθώς και το σχηματισμό σφαιριδίων (Liu et al., 2010). Η ικανότητα σχηματισμού σφαιριδίων μπορεί να ανασταλεί μέσω του ογκοκατασταλτικού miRNA let-7a, κατά τον αποκλεισμό του Ras/ NF-κB μονοπατιού στα HER2+ SKBR3 κύτταρα (Xu et al., 2015). Επιπλέον, ο NF-κB προάγει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Bailey et al., 2014; Liu et al., 2009) καθώς και την *in vivo* αγγειογένεση του όγκου, λειτουργίες οι οποίες ενισχύουν την HER2 μεσολαβούμενη ογκογένεση του μαστού (Liu et al., 2009).

Το lapatinib έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη φωσφορυλίωση της υπομονάδας p65 του NF-κB και του IκBa, καθώς και τη μεταγραφή γονιδίων που διεγείρονται από τον NF-κB σε ανθρώπινα HER2 θετικά κύτταρα καρκίνου του μαστού, επιβεβαιώνοντας ότι το κανονικό μονοπάτι ελέγχεται από τον HER2 (Merkhofer et al., 2010). Το lapatinib αναστέλλει λειτουργικά τον NF-κB μέσω του PI3K/ Akt

μονοπατιού (Ma et al., 2013). Παρομοίως, το trastuzumab αναστέλλει την ενεργοποίηση του NF-κΒ σε ανθρώπινα ER-αρνητικά/ HER2-θετικά καρκινικά κύτταρα μαστού (Biswas et al., 2004). Σε τελική ανάλυση όμως, οι αντι-HER2 φαρμακευτικοί παράγοντες φαίνεται να ενισχύσουν τη ενεργότητα του NF-κΒ και τον ογκογόνο εθισμό των HER2 θετικών κυττάρων στον NF-κΒ, αναδεικνύοντας έναν πιθανό μηχανισμό ανθεκτικότητας στις αντι-HER2 στρατηγικές για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού (Bailey et al., 2004; Chen et al., 2013). Οπότε, ο συνδυασμός HER2 αναστολέων με αναστολείς πρωτεασώματος (οι οποίοι μπλοκάρουν την αποικοδόμηση του IκΒ και συνεπώς την ενεργοποίηση του NF-κΒ) (Chen et al., 2013) ή με NF-κΒ αναστολείς (Bailey et al., 2004; Jiang et al., 2014) διαφαίνεται ως μια νέα θεραπευτική οδός για τους ασθενείς με HER2 θετικό ΚΜ.

3.9 Θεραπευτικές προσεγγίσεις έναντι της RANK σηματοδότησης στον καρκίνο του μαστού

Τα τελευταία χρόνια η επιστημονική κοινότητα έχει επικεντρωθεί στην πιθανή προστατευτική και θεραπευτική επίδραση της αναστολής του RANKL στον καρκίνο του μαστού. Το denosumab, ένα πλήρως εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του RANKL, έχει εγκριθεί για την αντιμετώπιση της οστικής απορρόφησης και της οστεοπόρωσης (Body et al., 2010; Lipton et al., 2015). Το φάρμακο έχει εκτεταμένα δοκιμαστεί σε οστικές μεταστάσεις του καρκίνου του μαστού. Μια τυχαιοποιημένη, διπλή- τυφλή μελέτη έδειξε ότι το denosumab είναι ανεκτό και πιο αποτελεσματικό από το ζολενδρονικό οξύ στην καθυστέρηση ή την πρόληψη των οστεολυτικών γεγονότων σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού μεταστατικό στα οστά (Stopeck et al, 2010). Μια μελέτη φάσης II έδειξε ότι η χορήγηση του denosumab δύο φορές το χρόνο μειώνει τον κίνδυνο καταγμάτων χωρίς επιπλέον τοξικότητα σε γυναίκες με εμμηνόπαυση και ορμονοεξαρτώμενο καρκίνο του μαστού που λαμβάνουν αναστολείς αρωματάσης (Gnant et al, 2015). Σε προκλινικές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι το denosumab μπλοκάρει τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού σε φορείς της *BRCA1* μετάλλαξης και μειώνει αξιοσημείωτα την ογκογένεση του μαστού σε *BRCA1*- μεταλλαγμένα ποντίκια (Nolan et al., 2016).

Η δραστηριότητα του denosumab σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού μελετήθηκε πρόσφατα σε δύο μεγάλες τυχαιοποιημένες μελέτες. Στην ABCSG (Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group)- 18 μελέτη (συγκρίνοντας τη

χορήγηση εικονικού φαρμάκου ή denosumab 60 mg υποδορίως κάθε έξι μήνες για πέντε χρόνια σε 3425 ασθενείς με εμμηνόπαυση και ορμονοεξαρτώμενο πρώιμο καρκίνο του μαστού που είχαν έλαβαν θεραπεία με αναστολέα αρωματάσης) αποδείχθηκε ότι η επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου ήταν σημαντικά καλύτερη στην ομάδα που είχε χορηγηθεί το denosumab (Gnant et al., 2018). Στη DCARE (Denosumab for Early Breast Cancer) μελέτη (αξιολογώντας 4509 υψηλού κινδύνου ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού που έλαβαν θεραπεία είτε με denosumab 120 mg υποδορίως κάθε μήνα για έξι μήνες, στη συνέχεια κάθε τρεις μήνες για έως πέντε έτη) δεν παρατηρήθηκε βελτίωση στην επιβίωση χωρίς οστική μετάσταση, στην επιβίωση χωρίς ασθένεια ή στη συνολική επιβίωση, αν και υπήρξε μια βελτίωση στο χρόνο για την εμφάνιση οστικής μετάστασης στην ομάδα που είχε λάβει το denosumab (Coleman et al., 2018). Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι οι περισσότεροι (95,9%) αυτών των ασθενών είχαν λάβει χημειοθεραπεία με ταξάνη ή ανθρακυκλίνη. Αυτό εγείρει την υπόθεση ότι η χημειοθεραπεία μπορεί να μειώσει μέρος των ογκοκατασταλτικών δράσεων της αναστολής του RANK/ RANKL άξονα στο καρκινικό μικροπεριβάλλον. Άλλη εξήγηση μπορεί να αποτελούν οι διαφορές στα μοριακά χαρακτηριστικά των όγκων αυτών των πληθυσμών ή οι επιπτώσεις της εμμηνόπαυσης και της ορμονοθεραπείας στη συμπεριφορά του όγκου. Είναι σαφές ότι απαιτείται περισσότερη έρευνα για να αποσαφηνιστεί η δράση του denosumab στην ανάπτυξη του όγκου. Στην D-BEYOND (Denosumab in Young Patients with Primary Breast Cancer) μελέτη αξιολογήθηκαν οι βιολογικές επιπτώσεις δύο ενέσεων 120 mg denosumab σε διάστημα μιας εβδομάδας σε 27 ασθενείς με προεμμηνοπαυσιακό πρωτογενή καρκίνο του μαστού (Nguyen et al., 2018). Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι δύο εβδομάδες αναστολής του RANKL δεν είχαν αποτέλεσμα στο ρυθμό πολλαπλασιασμού του όγκου αλλά αύξησε σημαντικά τον αριθμό των λεμφοκυττάρων που διεισδύουν στον όγκο (TIL) στο περιβάλλον του όγκου, καθιστώντας τους θεωρητικά πιο ευαίσθητους στην ανοσοθεραπεία. Με βάση τα περιγραφόμενα αποτελέσματα, το denosumab φαίνεται να είναι ιδανικός υποψήφιος για την αναστολή της έναρξης και εξέλιξης του όγκου του μαστού.

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η υπόθεση εργασίας της παρούσας διδακτορικής διατριβής βασίζεται σε ερευνητικές μελέτες που μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο άξονες: α) στις ενδείξεις ότι ο RANK υποδοχέας, και πιο συγκεκριμένα το καθοδικό σηματοδοτικό μονοπάτι NF-κΒ παίζει ρόλο στην ογκογένεση των HER2+ καρκινωμάτων του μαστού, και β) στην λειτουργική και φυσική αλληλεπίδραση που υφίσταται μεταξύ του EGFR και του RANK στους οστεοκλάστες. Απόρροια αυτών των ευρημάτων είναι η υπόθεση ότι οι υποδοχείς της οικογένειας EGFR σχηματίζουν πρωτεϊνικά σύμπλοκα με τον RANK υποδοχέα, ενισχύοντας την RANK καθοδική σηματοδότηση. Η ενδεχόμενη μοριακή «διασυνομιλία» αποτελεί μοριακό μηχανισμό-κλειδί στην παθοβιολογία των HER2+ καρκινωμάτων μαστού.

Σκοπός της μελέτης λοιπόν, είναι η ανίχνευση της λειτουργικής και βιολογικής εμπλοκής της RANK/ RANKL ενεργοποίησης σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού ποικίλων μοριακών προφίλ. Καθώς επίσης και η διερεύνηση του ακριβούς μοριακού μηχανισμού της ρύθμισης των καθοδικών μονοπατιών του RANK από μέλη της οικογένειας EGFR επηρεάζοντας βασικές ιδιότητες των HER2+ καρκινικών κυττάρων μαστού.

Για το σκοπό αυτό αρχικά μελετήθηκε, με τεχνικές RT-PCR και ανοσοσύτωσης Western, η έκφραση των RANK, RANKL σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού. Στη συνέχεια, μελετήθηκε ο κυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνικών μορίων μέσω ανοσοφθορισμού. Πραγματοποιήθηκε διεύρυνση της φυσικής αλληλεπίδρασης των υποδοχέων της EGFR οικογένειας με τον υποδοχέα RANK μέσω της μεθόδου Proximity Ligation Assay (PLA). Ακολούθως, μελετήθηκε με ανοσοσύτωση Western η πιθανή ρύθμιση μέσω του HER2, του σηματοδοτικού μονοπατιού NF-κΒ μετά την επίδραση HER-2 και RANK/RANKL συνδετών και αναστολέων. Τέλος, διερευνήθηκε μέσω λειτουργικών δοκιμασιών η εμπλοκή του RANK μονοπατιού και των EGFR υποδοχέων σε βασικές ιδιότητες (μετανάστευση, απόπτωση και πολλαπλασιασμός) των νεοπλασματικών κυττάρων του μαστού.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων

Καλλιεργήθηκαν οι καρκινικές κυτταρικές σειρές ανθρώπινης προέλευσης:

- SKBR3: κυτταρική σειρά αδenoκαρκινώματος του μαστού από 43χρονη Καυκάσια γυναίκα
- MCF-7: κυτταρική σειρά αδenoκαρκινώματος του μαστού από 69χρονη Καυκάσια γυναίκα
- MDA-MB-453: κυτταρική σειρά μεταστατικού καρκινώματος του μαστού από 48χρονη Καυκάσια γυναίκα
- BT-474: κυτταρική σειρά πορογενούς καρκινώματος του μαστού από 60χρονη Καυκάσια γυναίκα

Χρησιμοποιήθηκε θάλαμος νηματικής ροής με βάση τους προβλεπόμενους κανόνες υγιεινής και ασφάλειας στη Μονάδα Κυτταρικών Καλλιιεργειών του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε πλαστικές φλάσκες επιφανείας 25-75cm² ή σε μικροπλάκες καλλιιεργειας, σε επωαστικό κλίβανο με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας 37°C, υγρασίας 95% και 5% CO₂, παρουσία θρεπτικού υλικού DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM, L-γλουταμίνη, 4,5g/L D- γλυκόζη, πυροσταφυλικό νάτριο, Gibco®) και RPMI (RPMI Media 1640, Gibco®) εμπλουτισμένου με 10% εμβρυϊκό βόειο ορό (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco®), 100U/ml πενικιλίνη και 100μg/ml (Antibiotic 100X, 10000U/ml πενικιλίνη, 10000μg/ml στρεπτομυκίνη, Gibco®). Χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα Trypsin-EDTA (0,5%w/v θρυψίνη και 0,53mM EDTA, Gibco®) και PBS (phosphate buffered saline, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄ x7H₂O, Gibco®).

1.2 Απομόνωση ολικού RNA από καρκινικά κύτταρα

Η απομόνωση ολικού RNA από τα καρκινικά κύτταρα ΚΜ έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του RNEasy Extraction Kit (Qiagen). Εν συντομία, τα στάδια εκτέλεσης περιλαμβάνουν:

- Λύση των κυττάρων με διάλυμα RLT και β-μερκαπτοαιθανόλη το οποίο απενεργοποιεί τις RNάσες.
- Ομογενοποίηση των δειγμάτων.
- Καθαρισμός του RNA με RNeasy spin columns, όπου το RNA προσδένεται επιλεκτικά, ενώ οι άλλες χημικές προσμίξεις από τα περιεχόμενα του κυττάρου, αδυνατώντας να προσδεθούν στη στήλη, ξεπλένονται διεξοδικά.
- Το καθαρό RNA εκλύεται τέλος από τη στήλη με νερό απιονισμένο και απαλλαγμένο από RNάσες.

Για τον έλεγχο της καθαρότητας και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του εκχυλισμένου RNA χρησιμοποιήθηκε φωτόμετρο biorad. Το δείγμα αραιώθηκε 1/50 σε ρυθμιστικό διάλυμα (χ) pH και ελήφθησαν οι οπτικές απορροφήσεις A260nm (μήκος κύματος απορρόφησης αζωτούχων βάσεων των νουκλεϊκών οξέων) και A280nm (μήκος κύματος απορρόφησης των αρωματικών αμινοξέων των πρωτεϊνών) αντίστοιχα. Για τον έλεγχο της καθαρότητας υπολογίστηκε ο λόγος A260nm/A280nm. Για το καθαρό απομονωμένο RNA χωρίς προσμίξεις ο λόγος κυμαίνεται από 1,8 έως 2,2. Λόγος <1,8 υποδηλώνει την παρουσία πρωτεϊνών ενώ λόγος >2,2 την παρουσία DNA. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του ολικού RNA γίνεται με τη βοήθεια της σχέσης:

$$\text{Συγκέντρωση RNA (ng/}\mu\text{l)} = \text{A260nm} \times 50 \times 44$$

Όπου 50 ο συντελεστής αραιώσης και 44 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ η μονάδα οπτικής απορρόφησης που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση RNA ίση με 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ σε μήκος κύματος 260nm. Για το μηδενισμό του φωτόμετρου και την αραιώση του RNA χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris•Cl, pH 7.0.

1.3 RT-PCR (Reverse Transcription-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής RT-PCR (reverse transcription PCR) χρησιμοποιεί τις ιδιότητες του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση για τη παραγωγή cDNA από εκμαγείο RNA. Οι αντίστροφες

μεταγραφάσεις είναι ένζυμα που προέρχονται από ρετροϊούς, με δράσεις 5' - 3' πολυμεράσης και 3' - 5' εξωνουκλεάσης με αποτέλεσμα την υδρόλυση του RNA και την απελευθέρωση αδέσμευτου cDNA το οποίο μπορεί στη συνέχεια να ενισχυθεί με αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης. Για τη δημιουργία του cDNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν τυχαία εξαμερή (random hexamers) που υβριδίζονται μη ειδικά στο εκμαγείο RNA, παράγοντας περισσότερα από ένα μόρια cDNA ανά μόριο αρχικού RNA και τα ολιγονουκλεοτίδια δεόξυθυμιδίνης (oligo-dT) που εμφανίζουν μεγαλύτερη ειδικότητα.

Χρησιμοποιήθηκαν: ρυθμιστικό διάλυμα 5X, μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων δεόξυθυμιδίνης και τυχαίων εξαμερών (Takara), αντίστροφη μεταγραφή AMV (Avian Myeloblastosis Virus, AMV), ολικό RNA, νερό απιονισμένο και απαλλαγμένο από RNάσες. Το RNA υποβλήθηκε σε σύνθεση ενός κλώνου cDNA με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης AMV (Avian Myeloblastosis Virus, AMV). Σε μικροσωλήνα τύπου eppendorf όγκου 0,5 mL προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια, σύμφωνα με τις οδηγίες του PrimeScript RT reagent kit της Takara:

Πίνακας 1.1. Αντιδραστήρια σύνθεσης cDNA

Συστατικό	Όγκος (μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα 5X	4
Αντίστροφη μεταγραφή	1
Μίγμα dT εκκινητών	1
Μίγμα τυχαίων εξαμερών	1
Δείγμα ολικού RNA ποσότητας 1000ng	
dH ₂ O	
Όγκος αντίδρασης	20

Ο όγκος του RNA που χρησιμοποιήθηκε από κάθε δείγμα υπολογίστηκε από την εξίσωση:

$$\text{Όγκος RNA} = \frac{\text{ποσότητα ολικού RNA (mg)}}{\text{συγκέντρωση RNA ng/}\mu\text{l}}$$

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή master cycler personal (eppendorf) και οι αντιδράσεις της αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις συνθήκες του πρωτοκόλλου PrimeScript RT reagent kit (Takara):

- 15 λεπτά στους 37°C (βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της αντίστροφης μεταγραφάσης)
- 5 δευτερόλεπτα στους 85°C (θερμοκρασία απενεργοποίησης του ενζύμου)

1.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Σε φιαλίδιο τύπου eppendorf 0,5ml προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή: DNA 2μl, ddH₂O 4,5μl, εκκινητές 0,5μl, ρυθμιστικό διάλυμα (2x) που περιέχει KAPA2G Fast HotStart DNA Polymerase, διάλυμα αντίδρασης, dNTPs και MgCl₂ (τελική συγκέντρωση 3 mM), Σύνολο 15μl.

Τα αντιδραστήρια αναδεύθηκαν με τη βοήθεια μικροπιπέτας για να εξασφαλιστεί η ομοιόμορφη κατανομή του ενζύμου ενώ όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 4°C για να αποφευχθεί πρόωμη έναρξη της αντίδρασης. Τα αντιδραστήρια διατηρήθηκαν στους -20°C. Οι συνθήκες της αντίδρασης (θερμοκρασία και διάρκεια κάθε σταδίου καθώς και ο αριθμός των κυκλικών επαναλήψεων) διαφοροποιήθηκαν ανάλογα με την νουκλεοτιδική αλληλουχία που ενισχύθηκε (Αντιδραστήρια: 0,2mM εκκινητές, Invitrogen, KAPA2G Fast Multiplex Mix 2x, που περιέχει KAPA2G Buffer A (1.5X στο 1X), dNTPs (0.2 mM κάθε dNTP στο 1X), MgCl₂ (3.0 mM στο 1X), KAPA2G Fast HotStart DNA Polymerase (0,04 U/μl αντίδρασης, τροποποιημένη μορφή της Taq DNA πολυμεράσης η οποία δεν έχει 5'→3' εξονουκλεοτιδική δραστικότητα), Sigma Aldrich (Πίνακας 1.2).

Πίνακας 1.2. Εκκινητές και βέλτιστες συνθήκες PCR

Γονίδιο	Εκκινητές		Μέγεθος προϊόντος (bp)	Θερμοκρασία υβριδισμού (°C)	Αριθμός κύκλων
TNFRSF11A	Forward	CCCGTTGCAGCTCAACAAG	85	60	38
	Reverse	GCATTTGTCCGTGGAGGAA			
TNFSF11	Forward	AGCAGAGAAAAGCGATGGT	341	60	38
	Reverse	GGGTATGAGAAGCTTGGGATT			

1.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα προϊόντα της τεχνικής PCR διαχωρίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης. Η επιλογή της συγκέντρωσης της αγαρόζης

καθορίζεται από το μέγεθος των τμημάτων DNA που θα διαχωριστούν και συγκεκριμένα, η συγκέντρωσή της είναι αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού βάρους των τμημάτων DNA.

Για την παρασκευή πηκτώματος αгарόζης συγκέντρωσης 2% διαλύονται 2g αгарόζης (Invitrogen) σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1X TAE (Tris, κρυσταλλικό οξικό οξύ και δινάτριο EDTA, pH 8) και το μίγμα θερμαίνεται μέχρι τη θερμοκρασία βρασμού ώστε να διαλυθεί η αгарόζη. Στη συνέχεια το διάλυμα αφήνεται για λίγο σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml. Το διάλυμα τοποθετείται σε εκμαγείο οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφού τοποθετηθούν τα ειδικά χτενάκια που δημιουργούν τις θέσεις προσθήκης του δείγματος, αφήνεται να στερεοποιηθεί σε χαμηλή θερμοκρασία. Στη συνέχεια φορτώνονται τα δείγματα του DNA (προϊόντα PCR, πλασμιδιακό ή γενωμικό DNA) μαζί με διάλυμα φόρτωσης (loading buffer, NEB Biolabs). Παράλληλα με τα δείγματα DNA φορτώνεται και δείκτης μοριακών βαρών (DNA ladder 100bp, NIPPON Genetics). Στη συνέχεια η συσκευή συνδέεται με τροφοδοτικό ηλεκτρικού ρεύματος. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης είναι θερμοκρασία δωματίου, 100 Volts, 30 mA. Οι ζώνες του DNA είναι ορατές χάρη στο βρωμιούχο αιθίδιο που παρεμβαλλόμενο ανάμεσα στους κλώνους του DNA γίνεται ορατό με την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας.

1.6 Απομόνωση πρωτεϊνών από καρκινικά κύτταρα

Τα κύτταρα εκπλύθηκαν με PBS και προστέθηκε διάλυμα θρυψίνης για 5 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια, η θρυψίνη απενεργοποιήθηκε με την προσθήκη ίσης ποσότητας θρεπτικού υλικού DMEM ή RPMI εμπλουτισμένου με 10% FBS και τα κύτταρα αφού αποκολλήθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν στα 300g για 5 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύθηκε σε 100μl διαλύματος RIPA, Thermo Scientific (25mM Tris-HCl (pH 7,6) 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% Δεοξυχολικό νάτριο, 0,1% SDS, Sodium Dodecyl Sulfate) στο οποίο είχε προστεθεί το μίγμα φωσφατασών: 1mM PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride), και τοποθετήθηκε σε πάγο για 15 λεπτά. Το κυτταρικό εκχυλίσμα που προέκυψε φυγοκεντρήθηκε στις 14000rpm για 20 λεπτά. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο το οποίο διατηρήθηκε στους -20°C για άμεση χρήση ή στους -80°C για μακροπρόθεσμη χρήση.

1.7 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος βασίζεται στην παρατήρηση ότι η μέγιστη απορρόφηση του όξινου διαλύματος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει από μήκος κύματος 465nm σε 595nm όταν δεσμεύεται σε πρωτεϊνικά μόρια. Χρησιμοποιώντας ως πρότυπη ουσία αλβουμίνη από βόειο ορό (Bovine Serum Albumin, BSA) κατασκευάστηκε γραμμική καμπύλη αναφοράς αυξανόμενων συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης σε σχέση με την απορρόφηση του διαλύματος σε μήκος κύματος 595nm. Με βάση την πρότυπη καμπύλη και την εξίσωση που προκύπτει από αυτή, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης του υπό εξέταση δείγματος με βάση την τιμή της απορρόφησης που δίνει στα 595nm, όταν επωαστεί με το διάλυμα της χρωστικής. Για κάθε δείγμα, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που υπολογίστηκε πολλαπλασιάστηκε με την αρχική αραίωση που έγινε σε αυτό (Αντιδραστήριο Bradford: Χρωστική G-250 σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης, Quick Start Bradford Dye Reagent 1x, Biorad - Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης (BSA) σε συγκέντρωση 2mg/ml).

Σε σωληνάρια τύπου eppendorf όγκου 1,5ml παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα αλβουμίνης συγκεντρώσεων 0μg/ml, 125μg/ml, 250μg/ml, 500μg/ml, 750μg/ml, και 1000μg/ml, 1500μg/ml και 2000μg/ml. Από κάθε ένα από τα διαλύματα αυτά μεταφέρθηκαν 20μl σε νέο eppendorf όπου προστέθηκε 1ml αντιδραστηρίου Bradford και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Η φωτομέτρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μέσα σε διάστημα μικρότερο της 1 ώρας, κατά τη διάρκεια της οποίας το σύμπλοκο πρωτεΐνη-χρωστική παραμένει σταθερό. Αφού πραγματοποιήθηκε η πρότυπη καμπύλη, τα πρωτεϊνικά δείγματα αραιώθηκαν κατά 1:10 (τελικός όγκος 20μl) με δις απιονισμένο νερό, ενώ στο διάλυμα αυτό προστέθηκε 1ml αντιδραστηρίου Bradford. Ως τυφλό δείγμα για τη φωτομέτρηση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα RIPA-αναστολέων αραιωμένο (1:10) με δις απιονισμένο νερό τελικού όγκου 20μl και 1ml αντιδραστηρίου Bradford.

1.8 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-PAGE

Με την ηλεκτροφόρηση Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis-PAGE) έγινε διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση τη διαφορετική μοριακή τους μάζα. Βάσει της αρχής ότι όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ακρυλαμίδιου τόσο μικρότερο είναι το μέγεθος των πόρων της πηκτής κατασκευάστηκαν διαφορετικές πηκτές διαχωρισμού 10% για

τις IKKα, p-IKKα και RANK, 12% για τις p65, p-p65 και ακτίνη, 15% για τις IκBα, p-IκBα και RANKL, και πηκτή επιστίβαξης 5% (διάλυμα ακρυλαμιδίου δισακρυλαμιδίου 30%w/v Applichem, ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού Tris-HCl 1,5M pH 8,8, ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστίβαξης Tris-HCl 0,5M pH 6,8, N,N,N',N'-τετραμεθυλ-αιθανο-1,2-διαμίνη TEMED, Sigma, υπερθειϊκό αμμώνιο, AmmoniumPerSulfate-APS 0,1g/ml, διάλυμα θειοδωδεκυλικού νατρίου (SDS) 10%w/v). Χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτεϊνικοί δείκτες μοριακών βαρών Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11-245 kDa), Genscript και διάλυμα ηλεκτροφόρησης Running buffer (25mM Tris, 192mM γλυκίνη, 1% SDS).

Με βάση τον Πίνακα 1.3 ετοιμάστηκαν οι πηκτές διαχωρισμού (separating gel) και επιστοίβαξης (stacking gel) και τοποθετήθηκαν μεταξύ των πλακών σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης πάχους 1,5mm. Αρχικά προστέθηκε η πηκτή διαχωρισμού μέχρι ύψους 0,5cm κάτω από τις εγχοπές της χτένας με σκοπό να πολυμεριστεί για 30λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου αφού πρώτα καλύφθηκε με 1ml ισοπροπανόλη προκειμένου να αποκλειστεί το οξυγόνο που θα εμποδίσει τον πολυμερισμό. Μετά την απομάκρυνση της ισοπροπανόλης, προστέθηκε η πηκτή επιστίβαξης και τοποθετήθηκε η πλαστική χτένα που επιτρέπει το σχηματισμό 10 πηγαδιών. Τα πρωτεϊνικά δείγματα ίσης συγκέντρωσης αναμίχθηκαν με αναγωγικό ρυθμιστικό διάλυμα SDS σε αναλογία όγκου 5:1 αντίστοιχα. Ακολούθησε θέρμανση στους 95οC για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 14000rpm. Τα υπερκείμενα καθώς και ο δείκτης μοριακών βαρών φορτώθηκαν στο πήκτωμα και ηλεκτροφορήθηκαν στα 90-130 Volt.

Πίνακας 1.3. Σύσταση των πηκτών διαχωρισμού και επιστοίβαξης

Συστατικά	Πηκτή διαχωρισμού 10%	Πηκτή διαχωρισμού 12%	Πηκτή διαχωρισμού 15%	Πηκτή επιστοίβαξης 5%
30% ακρυλαμιδίου-Δισακρυλαμιδίου	3.3	4	5	0.83
ddH2O	4	3.3	2.3	3.4
1,5M Tris pH 8,8	2.5	2.5	2.5	
0,5M Tris pH 6,8				0.63

10% SDS	0.1	0.1	0.1	0.05
TEMED	0.1	0.1	0.1	0.05
APS (0,1g/ml)	0.004	0.004	0.004	0.005

1.9 Ανοσοαποτύπωση Western (Western blot)

Τα μετουσιωμένα πολυπεπτίδια, που διαχωρίστηκαν ηλεκτροφορητικά με SDS-PAGE, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (διάλυμα μεταφοράς: 25mM Tris, 192mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη). Για να ελέγξουμε αν έγινε επιτυχής μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη, βάψαμε την μεμβράνη με διάλυμα Ponceau S [0,2% (w/v) Ponceau S – 3% (w/v) τριχλωροοξικό οξύ]. Η χρωστική αυτή βάφει τις πρωτεΐνες οπότε στην επιτυχή μεταφορά παρατηρήσαμε ζώνες πρωτεϊνών στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ακολούθως, το διάλυμα Ponceau S απομακρύνεται και η μεμβράνη εκπλένεται με νερό. Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαστηκε σε διάλυμα 5% άπαχου γάλακτος σε TBS-T για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να παρεμποδιστούν όλες οι μη-ειδικές αντιγονικές θέσεις (ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T pH 7,5 : 20mM Tris, 150mM NaCl, 0,05% Tween-20, διάλυμα γάλακτος 0% λιπαρά 5% σε TBS-T).

Στο αποτύπωμα πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση των πρωτεϊνών (αντιγόνων) έμμεσα. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ένα μη-σημασμένο αντίσωμα ειδικό έναντι του συγκεκριμένου αντιγόνου στην κατάλληλη αραίωση που προτείνει ο κατασκευαστής σε διάλυμα 5% γάλακτος σε TBS-T υπό ανακίνηση για 16 περίπου ώρες στους 4°C. Στη συνέχεια ένα δεύτερο αντίσωμα, ειδικό για το πρώτο, το οποίο ήταν συζευγμένο με κατάλληλο ιχνηθέτη, την υπεροξειδάση του μαύρου ρεπανιού (Horse-Radish Peroxidase, HRP), ώστε να μετατρέψει το υπόστρωμα σε ανιχνεύσιμο φωτεινό σήμα με φωτογραφικά/απεικονιστικά μέσα (σε διάλυμα 5% γάλακτος σε TBS-T υπό ανάδευση για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου). Μετά από πλύσεις με διάλυμα TBS-T (3 φορές από 5 λεπτά), η μεμβράνη επώαστηκε για 5 λεπτά με (βασισμένο στην λουμινόλη) χημειοφωταυγές υπόστρωμα του ενζύμου HRP (Clarity Western ECL Substrate, Biorad), καλύφθηκε με διαφανή μεμβράνη και τοποθετήθηκε σε κασέτα εμφάνισης. Εκτέθηκε σε φωτογραφικό φιλμ (Fuji, ο χρόνος έκθεσης ποικίλλει ανάλογα με το πρωτογενές αντίσωμα) και ακολούθησε εμφάνιση του φιλμ με επώαση πρώτα στο διάλυμα εμφάνισης (developer, Sigma) και έπειτα στο διάλυμα

μονιμοποίησης (fixer, Sigma) και τέλος έκπλυση με απιονισμένο νερό. Για την ημι-ποσοτική ανάλυση του σήματος από τα δείγματα που επεξεργάστηκαν, τα φιλμ σαρώθηκαν και κατόπιν αναλύθηκαν με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (Image-J).

Πρωτογενή αντισώματα:

- RANK antibody (H-300) (sc-9072)
- RANKL antibody (N-19) (sc-7628)
- IKK α antibody (3G12) (#11930)
- phospho-IKK α (phospho S176 + S180) antibody (ab17943)
- NF- κ B p65 antibody (F-6) (sc-8008)
- phospho- NF- κ B p65 (Ser536) antibody (93H1) (#3033)
- I κ B α antibody (H-4) (sc-1643)
- phospho-I κ B α antibody (B-9) (sc-8404)
- anti-actin antibody, clone C4 MAB1501 (Millipore, MA).

Δευτερογενή αντισώματα:

- Goat Anti-Mouse IgG Antibody, HRP conjugate | 12-349 (Millipore)
- Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, HRP-conjugate | 12-348 (Millipore)
- Donkey anti-goat IgG-HRP (sc-2033, Santa Cruz Bt)

1.10 Δοκιμασία XTT

Η αξιολόγηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων καρκίνου του μαστού διεξήχθη με το XTT Cell Proliferation Assay Kit (10010200, Cayman Chemical, USA). Τα κύτταρα επιστρώνονται σε πηγάδια μικροπλάκας καλλιέργειας 96-θέσεων, με αρχική πυκνότητα 10^3 - 10^5 κύτταρα/πηγάδι σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Μετά από 8 ώρες το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται και προστίθεται θρεπτικό υλικό χωρίς κόκκινο της φαινόλης εμπλουτισμένο με 5% CSS (charcoal stripped serum) και τα κύτταρα επωάζονται για 16 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στο προαναφερθέν θρεπτικό μέσο με ή χωρίς τις προς μελέτη ουσίες σε επωαστήρα CO₂ στους 37°C για ποικίλα χρονικά διαστήματα. Ακολούθως, προστέθηκαν 10μl XTT Mixture σε κάθε πηγάδι και αναμίχθηκαν ήπια για 1 λεπτό σε έναν τροχιακό αναδευτήρα. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες στους 37°C σε επωαστήρα CO₂. Η απορρόφηση του κάθε δείγματος μετρήθηκε χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών στα 450 nm.

1.11 Βιοδοκιμή προσομοίωσης τραύματος δι' αμυχής (Scratch-Wound Healing Assay)

Κύτταρα καρκίνου του μαστού επιστρώθηκαν σε μικροπλάκες 6 πηγαδιών και επώαστηκαν σε επωαστήρα CO₂ στους 37°C. Η πυκνότητα προσαρμόστηκε κατάλληλα για κάθε κυτταρική σειρά προκειμένου να σχηματίσει μια μονοστιβάδα σε 100% πληρότητα. Η μονοστιβάδα των κυττάρων χαραχτήκε σε ευθεία γραμμή με ένα αποστειρωμένο ακρορύγχιο 200μl πιπέτας. Τα υπολείμματα των κυττάρων αφαιρέθηκαν με πλύση των κυττάρων με PBS, το οποίο στη συνέχεια αντικαταστάθηκε με θρεπτικό μέσο που περιείχε τις εξεταζόμενες ουσίες. Οι πλάκες τοποθετήθηκαν κάτω από αντίθεσης φάσης μικροσκόπιο ελεγχόμενο από υπολογιστή και φωτογραφήθηκε σε 10x μεγέθυνση η πρώτη εικόνα της χαραγής. Χρησιμοποιήθηκαν σημεία αναφοράς για να είναι εφικτός ο εντοπισμός της θέσης που φωτογραφήθηκε. Οι πλάκες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα για 24 και 48 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, οι πλάκες τοποθετήθηκαν ξανά κάτω από το μικροσκόπιο, έχοντας σημεία αναφοράς για τον εντοπισμό της θέσης και φωτογραφήσαμε τη χαραγή. Οι εικόνες για κάθε συνθήκη στις 0, 24 και 48 ώρες αναλύθηκαν ποσοτικά χρησιμοποιώντας το λογισμικό TScratch (πλατφόρμα ανάλυσης εικόνας Wimasis).

1.12 Μέθοδος κλωνογενούς ικανότητας (Clonogenic Assay)

Κύτταρα καρκίνου του μαστού επιστρώθηκαν σε μικροπλάκες 6 πηγαδιών, σε κατάλληλη πυκνότητα (~10³ κύτταρα/ πηγάδι). Τα κύτταρα αφέθηκαν να προσκολληθούν στα πηγάδια και κατόπιν επώαστηκαν με τις εξεταζόμενες ουσίες. Οι μικροπλάκες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα CO₂ στους 37°C για 10-15 ημέρες, μέχρις ότου τα κύτταρα ελέγχου να σχηματίσαν επαρκώς μεγάλες αποικίες. Τα κύτταρα στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν με ένα διάλυμα που περιείχε 1 οξικό οξύ: 7 μεθανόλη και βάφτηκαν με 0.5% κρυσταλλικό ιώδες σε μεθανόλη για 15 λεπτά. Οι μικροπλάκες εμβαπτίστηκαν προσεκτικά σε μια δεξαμενή με νερό βρύσης και αφέθηκαν να στεγνώσουν. Έπειτα, σαρώθηκαν και η σχετική ικανότητα παραγωγής αποικιών αξιολογήθηκε με ανάλυση πυκνομετρίας χρησιμοποιώντας λογισμικό Image J.

1.13 Κυτταρομετρία Ροής

Για την εκτίμηση της απόπτωσης των κυττάρων καρκίνου του μαστού χρησιμοποιήσαμε το TACS® Annexin V Kit (Trevigen) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε μικροπλάκα έξι πηγαδιών (10^5 - 10^6 κύτταρα/ πηγάδι) και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς κόκκινο της φαινόλης εμπλουτισμένο με 5% CSS για 16 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάστηκαν για 48 ώρες με τις προς μελέτη ουσίες, συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας 0.25% θρυψίνη σε PBS και φυγοκεντρήθηκαν στα 300g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε πλύση, τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 500μl PBS (4°C) και στη συνέχεια συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση όπως προηγουμένως. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν απαλά στο Annexin V Incubation Reagen (Trevigen) που παρασκευάστηκε όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.4 για συγκέντρωση κυττάρων 10^5 έως 10^6 ανά 100μl αντιδραστηρίου. Επωάστηκαν στο σκοτάδι για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέσαμε 400μl 1X Binding Buffer (Trevigen) στα δείγματα (ανά 100μl αντίδρασης) και με τη βοήθεια κυτταρομέτρου ροής FACSCalibur και του λογισμικού CellQuest αναλύσαμε 10.000 γεγονότα ανά δείγμα εντός μίας ώρας για μέγιστο σήμα. Τα γεγονότα του τεταρτημόριου με τα Annexin V- θετικά / ιωδιούχο προπίδιο (PI)- αρνητικά ήταν αντιπροσωπευτικά των αποπτωτικών κυττάρων.

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν δείχνουν ένα ξεχωριστό πληθυσμό κυττάρων που έχουν δεσμεύσει την Annexin V (κάτω δεξιό τεταρτημόριο μιας γραφικής παράστασης πυκνότητας). Αυτά τα κύτταρα είναι πρώιμα αποπτωτικά. Τα θετικά κύτταρα στην Annexin V που επίσης λαμβάνουν PI είναι είτε όψιμα αποπτωτικά είτε νεκρωτικά (άνω δεξιό τεταρτημόριο της γραφικής παράστασης). Επίσης, υπάρχει ένας πληθυσμός κυττάρων που είναι αρνητικός τόσο για την Annexin V όσο και για το PI (κάτω αριστερό τεταρτημόριο της γραφικής παράστασης) και πρόκειται για τα φυσιολογικά βιώσιμα κύτταρα.

Πίνακας 1.4. Συστατικά σύνθεσης Annexin V Incubation Reagent

Συστατικό	Όγκος (μl)
10X Binding Buffer	10
Ιωδιούχο προπίδιο (PI)	10

Annexin V-FITC	1
dH ₂ O	79
Όγκος αντίδρασης	100

1.14 Ανοσοφθορισμός

Τα κύτταρα καρκίνου του μαστού επιστρώθηκαν σε καλυπτρίδες των 13mm μέσα σε μικροπλάκα καλλιέργειας 12 θέσεων. Όταν έφτασαν ~70% κάλυψη, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς κόκκινο της φαινόλης εμπλουτισμένο με 5% CSS για 16 ώρες στους 37°C και στη συνέχεια επώστηκαν με τις εξεταζόμενες ουσίες για μια ώρα. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και μονιμοποιήθηκαν με τη 100% παγωμένη μεθανόλη για 5 λεπτά τους -20°C. Ακολούθησε πλύση με PBS και δέσμευση των μη ειδικών θέσεων με διάλυμα 5% BSA σε PBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώστηκαν με το πρωτογενές αντίσωμα το οποίο αραιώθηκε σε διάλυμα 1% BSA σε PBS για 16 ώρες στους 4°C. Ακολούθησαν 3 πλύσεις με PBS και επώση με το δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένου με φθοριόχρωμα το οποίο αραιώνεται σε διάλυμα 1% BSA σε PBS. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις με PBS. Τα κύτταρα επώστηκαν με DAPI για χρώση των πυρήνων, προστέθηκε μέσο στερέωσης και οι γυάλινες καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Μετά την έγκληση των καλυπτρίδων τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης Leica TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Πρωτογενή αντισώματα:

- RANK antibody (H-300) (sc-9072)
- RANKL antibody (N-19) (sc-7628)

Δευτερογενή αντισώματα:

- CF 543 Donkey Anti-Rabbit IgG (H + L), Highly Cross-Adsorbed (#20308, Biotinum)
- CF 543 Donkey Anti-Goat IgG (H + L), Highly Cross-Adsorbed (#20314, Biotinum)
- DAPI NucBlue™ Fixed Cell ReadyProbes™ Reagent (R37606, Thermo Fisher Scientific)

- Μέσο μονιμοποίησης ProLong™ Diamond Antifade Mountant (P36965, Thermo Fisher Scientific)

1.15 Duolink (PLA, Proximity Ligation Assay)

Τα κύτταρα καρκίνου του μαστού επιστρώθηκαν σε καλυπτρίδες των 13mm μέσα σε μικροπλάκα καλλιέργειας 12 θέσεων. Όταν έφτασαν ~70% κάλυψη, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς κόκκινο της φαινόλης εμπλουτισμένο με 5% CSS για 16 ώρες στους 37°C και στη συνέχεια επώαστηκαν με τις εξεταζόμενες ουσίες για μια ώρα. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και μονιμοποιήθηκαν με τη 100% παγωμένη μεθανόλη για 5 λεπτά τους -20°C. Το πρωτόκολλο PLA εφαρμόστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Sigma-Aldrich). Πιο συγκεκριμένα, ακολούθησε πλύση με PBS και δέσμευση των μη ειδικών θέσεων με το Duolink® Blocking Solution για 30 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν για 1 ώρα στους 37°C με τα πρωτογενή αντισώματα τα οποία αραιώθηκαν σε διάλυμα (Duolink® Antibody Diluent). Ακολούθησαν 2 πλύσεις με PBS και επώαση για 1 ώρα στους 37°C με τους PLA probes MINUS/PLUS, οι οποίοι αραιώνονται 1: 5 σε διάλυμα (Duolink® Antibody Diluent) και είναι συζευγμένοι με ολιγονουκλεοτίδια. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις με PBS, προστέθηκε στο δείγμα το διάλυμα της λιγάσης και του ρυθμιστικού της διαλύματος και τα κύτταρα επώαστηκαν για 30 λεπτά στους 37°C. Μετά την πλύση με PBS, προστέθηκε στο δείγμα το διάλυμα της πολυμεράσης και του ρυθμιστικού της διαλύματος και επώαστηκε για 100 λεπτά στους 37°C. Όλες οι επώσεις διεξήχθησαν σε επωαστήρα στους 37°C. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις με PBS. Τα κύτταρα επώαστηκαν με DAPI για χρώση των πυρήνων, προστέθηκε μέσο στερέωσης και οι γυάλινες καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Μετά την έγκληση των καλυπτρίδων τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης Leica TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το Duolink® Image Tool Software (Sigma-Aldrich), που αναπτύχθηκε για την αντικειμενική ποσοτικοποίηση των PLA σημάτων (Smal et al. 2010).

Πρωτογενή αντίσωματα:

- RANK antibody (H-300) (sc-9072)
- EGFR antibody (ab30)
- Neu antibody (3B5) (sc-33684)

- HER3 antibody (2F9) (ab91084)

- HER4 antibody (L20) (sc-31149)

Αντιδραστήρια:

- Duolink® Blocking Solution (Sigma-Aldrich)

- Duolink® Antibody Diluent (Sigma-Aldrich)

- PLA probes MINUS/ PLUS (Sigma-Aldrich)

- Ligation buffer (5x), Ligase (1 U/μl) (Sigma-Aldrich)

- Amplification buffer (5x), Polymerase (10 U/μl) (Sigma-Aldrich)

- DAPI NucBlue™ Fixed Cell ReadyProbes™ Reagent (R37606, Thermo Fisher Scientific)

- Μέσο μονιμοποίησης ProLong™ Diamond Antifade Mountant (P36965, Thermo Fisher Scientific)



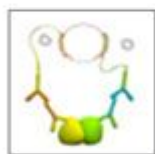
A

Επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα



B

Επώαση με δευτερογενή αντισώματα, συζευγμένα με
ολιγονουκλεοτίδια



C

Σύνδεση των δυο ιχνηθετών



D

Αντίδραση ενίσχυσης κυλιόμενου κύκλου

Εικόνα 14: Αρχή μεθόδου Duolink.

1.16 Στατιστική ανάλυση

Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν τουλάχιστον τρεις φορές και αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα ενός πειράματος δείχνονται. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση και αναλύθηκαν με one-way

ANOVA. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με το στατιστικό πακέτο GraphPad Prism

6. Θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα οι συσχετίσεις με $p \text{ value} \leq 0,05$.

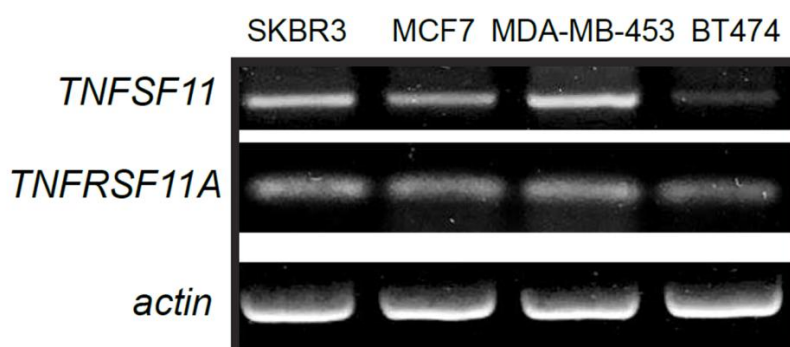
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1 Ανίχνευση της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης των RANK και RANKL σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού

Αρχικά, μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα RANK και του συνδέτη του, RANKL, σε δύο HER2 θετικές: SKBR3 (ER αρνητική), BT-474 (ER θετική) και σε δύο HER2 αρνητικές: MDA-MB-453 (ER αρνητική), MCF7 (ER θετική) καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού.

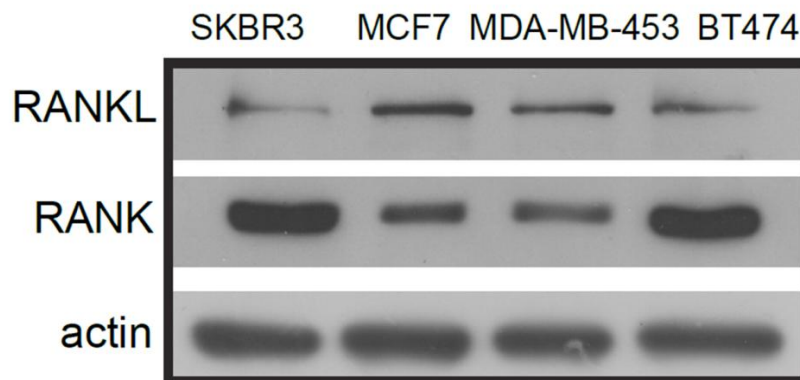
Η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης (επίπεδο mRNA) των γονιδίων *TNFRSF11A* και *TNFSF11* που κωδικοποιούν τον RANK και RANKL αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε μέσω PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών (Κεφάλαιο 1.4) αφού είχε προηγηθεί η απομόνωση ολικού RNA και η μετατροπή του σε cDNA μέσω RT-PCR (Κεφάλαιο 1.3) από τις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Τα αποτελέσματα, όπως φαίνεται από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR στην **Εικόνα 15**, έδειξαν την παρουσία και γονιδιακή έκφραση και των δύο γονιδίων, *TNFRSF11A* (85bp) και *TNFSF11* (341bp), και στις τέσσερις καρκινικές σειρές που μελετήθηκαν.



Εικόνα 15: Ανίχνευση έκφρασης των *TNFRSF11A* (κωδικοποιεί για τον RANK) και *TNFSF11* (κωδικοποιεί για τον RANKL) σε επίπεδο mRNA σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς.

Η μελέτη της ενδογενούς πρωτεϊνικής έκφρασης των μορίων RANK και RANKL πραγματοποιήθηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης Western, αφού είχε προηγηθεί η απομόνωση των ολικών πρωτεϊνών (Κεφάλαιο 1.6) από τα καρκινικά κύτταρα.

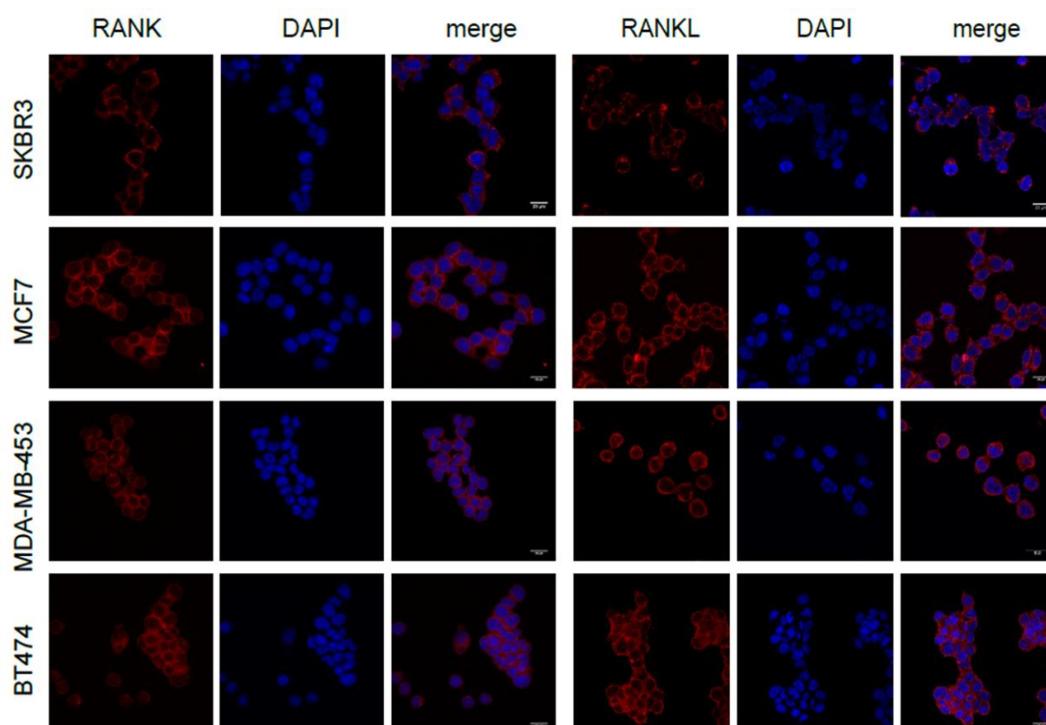
Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 16** όλες οι μελετώμενες κυτταρικές σειρές εκφράζουν σε ποικίλα επίπεδα τις δύο πρωτεΐνες.



Εικόνα 16: Ανίχνευση της ενδογενούς έκφρασης των RANK και RANKL σε επίπεδο πρωτεΐνης στα SKBR3, MCF7, MDA-MB-453, BT-474 κύτταρα.

2.2 Κυτταρικός εντοπισμός των RANK και RANKL στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού

Με πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας, επιβεβαιώθηκε η πρωτεϊνική έκφραση των RANK, RANKL στα εξεταζόμενα κύτταρα. Επίσης, στην **Εικόνα 17** φαίνεται ο υποκυτταρικός εντοπισμός των δύο πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, ο RANK εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη και το κυτταρόπλασμα, ενώ ο RANKL κυρίως στο κυτταρόπλασμα.



Εικόνα 17: Φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των RANK και RANKL με χρώση ανοσοφθορισμού σε καρκινικά κύτταρα μαστού. Οι πυρήνες απεικονίστηκαν χρησιμοποιώντας DAPI. Οι ράβδοι κλίμακας αντιπροσωπεύουν τα 20μm. Εμφανίζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες.

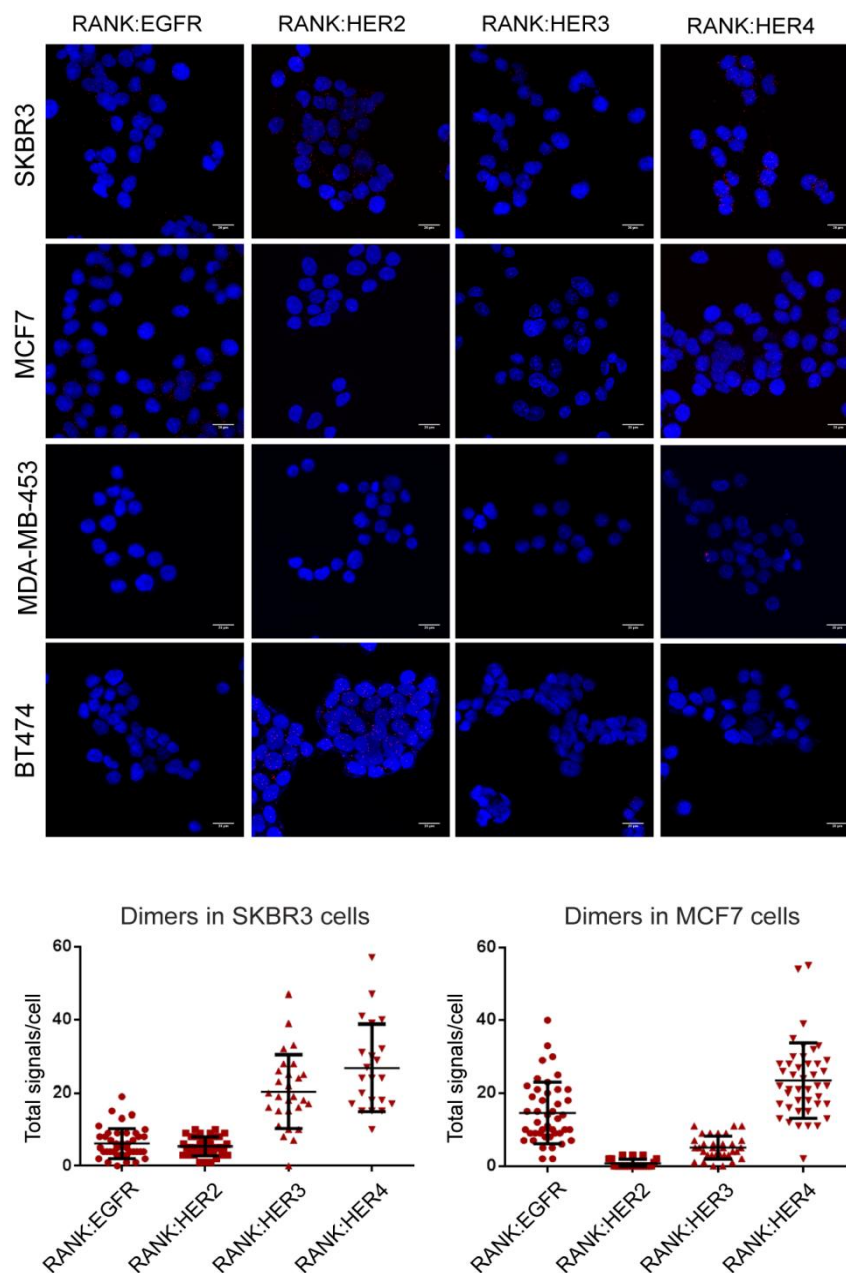
2.3 Μελέτη της φυσικής αλληλεπίδρασης των RANK και EGFR μελών στα κύτταρα καρκίνου του μαστού

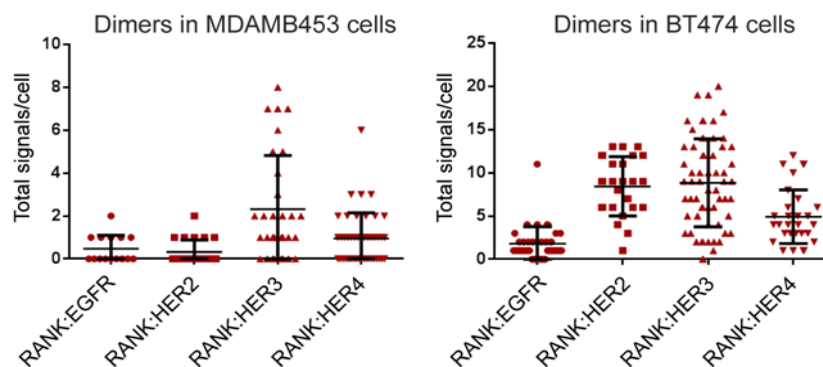
Στηριζόμενοι σε πειραματικά δεδομένα που αποδεικνύουν τη φυσική αλληλεπίδραση του RANK με τον EGFR στους οστεοκλάστες (Yi et al., 2008), εξετάστηκε η υπόθεση ότι ο RANK θα μπορούσε να σχηματίζει πρωτεϊνικά σύμπλοκα με τα μέλη της οικογένειας του EGFR σε καρκινικά κύτταρα καρκίνου του μαστού. Προκειμένου να βρεθούν αποδείξεις για μια ενδεχόμενη συσχέτιση μεταξύ του RANK υποδοχέα και των μελών της οικογένειας EGFR, εφαρμόστηκε η μέθοδος proximity ligation assay (PLA) στις κυτταρικές σειρές, SKBR3, MDA-MB-453, MCF7 και BT-474. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 18**, ανιχνεύονται PLA σήματα κατά τη διερεύνηση σχηματισμού ετεροδιμερών μεταξύ του RANK και των EGFR, HER2, HER3 και HER4, υποδεικνύοντας ότι οι υποδοχείς αλληλεπιδρούν φυσικά σε κύτταρα καρκίνου του μαστού. Στα SKBR3 (κλίμακα PLA σήματος 0-60) και BT-474 κύτταρα (κλίμακα PLA σήματος 0-25), υπήρξε μεγάλος αριθμός RANK/ HER2 ετεροδιμερών (5.4 και 8.2, αντίστοιχα). Από την άλλη πλευρά, τα MCF7 (κλίμακα PLA σήματος 0-60) και MDA-MB-453 (κλίμακα PLA σήματος 0-10) παρουσιάζουν μικρότερο αριθμό RANK/ HER2 διμερών ανά κύτταρο, 0,7 και 0,3 αντίστοιχως. Βάσει των παραπάνω δεδομένων φαίνεται ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του σχηματισμού RANK/ HER2 διμερών και της πρωτεϊνικής έκφρασης του HER2.

Στη συνέχεια ερευνήσαμε το σχηματισμό RANK/ HER2 διμερών με και χωρίς την προσθήκη του ανθρώπινου διαλυτού RANKL. Στα SKBR3 και BT-474 κύτταρα παρατηρήσαμε αύξηση των ετεροδιμερών RANK/ HER2 σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, 5,4 έναντι 11,8 και 8,2 έναντι 11,6, αντίστοιχα. Στα MCF7 και MDA-MB-453 κύτταρα δεν υπήρξε σημαντική διαφοροποίηση στον αριθμό των σχηματιζόμενων διμερών (**Εικόνα 19**).

Ακολούθως, διερευνήσαμε το σχηματισμό RANK/ HER2 διμερών με και χωρίς την προσθήκη denosumab. Το denosumab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του RANKL, το οποίο αναστέλλει την ενεργοποίηση του RANK υποδοχέα. Το denosumab εγκρίθηκε πρόσφατα για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης και της οστικής

απώλειας (Kostenuik et al ., 2009). Συγκεκριμένα, το denosumab οδήγησε σε μείωση των RANK / HER2 ετεροδιμερών σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου στις κυτταρικές σειρές SKBR3 (1,2 έναντι 5,4) και BT-474 (3,1 έναντι 8,2), ενώ δεν παρατηρήθηκε διακριτή διαφορά στα MCF7 και MDA-MB-453 κύτταρα (**Εικόνα 19**). Επιπλέον, η προσθήκη του RANKL σε συνδυασμό με το denosumab αύξησε το σχηματισμό RANK/ HER2 διμερών σε σύγκριση με τα BT-474 κύτταρα που τους είχε χορηγηθεί μόνο το denosumab (5,6 έναντι 3,1) (**Εικόνα 19**). Σε αντίθεση με τα BT-474 κύτταρα, η συνδυαστική χορήγηση των δύο παραγόντων δεν είχε καμία επίδραση στα SKBR3, MCF7 και MDA-MB-453 κύτταρα (**Εικόνα 19**).





Εικόνα 18: Πρότυπο διμερισμού μεταξύ του υποδοχέα RANK και των μελών της οικογένειας EGFR στα καρκινικά κύτταρα μαστού. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας. Οι κόκκινες κουκκίδες αντιπροσωπεύουν το θετικό σήμα των ετεροδιμερών RANK/ (EGFR, HER2, HER3, HER4) στα SKBR3, MCF7, MDA-MB-453 και BT-474 κύτταρα, εφαρμόζοντας τη μέθοδο της *in situ* proximity ligation (PLA) DUOLINK. Οι ράβδοι κλίμακας αντιπροσωπεύουν τα 20 μm . Τα γραφήματα αντιπροσωπεύουν το συνολικό σήμα ανά κύτταρο όπως αναλύεται από το λογισμικό Duolink Image Tool Software. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση.

Στη συνέχεια εξετάσαμε την επίδραση του trastuzumab στο σχηματισμό των RANK/ HER2 διμερών. Το trastuzumab είναι ένα εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει την εξωκυττάρια περιοχή IV του υποδοχέα HER2 και προκαλεί διάσπαση των διμερών του υποδοχέα (Zoi et al., 2016). Στα SKBR3 (1,9 έναντι 5,4) και BT-474 (4,3 έναντι 8,2) κύτταρα, το PLA σήμα μειώθηκε παρουσία του trastuzumab σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου (**Εικόνα 19**). Αντίθετα, στα MDA-MB-453 κύτταρα υπήρξε περιορισμένη αύξηση των RANK / HER2 διμερών (0,3 έναντι 1,7), ενώ τα MCF7 κύτταρα δεν επηρεάστηκαν σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου (**Εικόνα 19**). Επιπλέον, τα BT-474 κύτταρα που επωάστηκαν παράλληλα με RANKL και trastuzumab εμφάνισαν χαμηλότερο ποσοστό RANK/HER2 (2,0 έναντι 4,3) σε σύγκριση με αυτά που επωάστηκαν μόνο με trastuzumab. Αντιθέτως, η συνδυαστική χορήγηση RANKL και trastuzumab δεν είχε καμία επίδραση στα SKBR3, MCF7 και MDA-MB-453 κύτταρα.

Η παρούσα πειραματική ενότητα ολοκληρώνεται με τη διερεύνηση του σχηματισμού RANK / HER2 διμερών μετά τη διπλή αναστολή χορηγώντας denosumab και trastuzumab στα κύτταρα. Στα SKBR3 κύτταρα η συνδυαστική επώαση είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του PLA σήματος σε σύγκριση με τα κύτταρα

ελέγχου και κύτταρα που επώαστηκαν μόνο με trastuzumab (0,6 έναντι 5,4 έναντι 1,9) **(Εικόνα 19)**. Στα BT-474 κύτταρα υπήρξε μείωση του σχηματισμού RANK/HER2 ετεροδιμερών μετά από τη χορήγηση των δύο αναστολέων σε σύγκριση με κύτταρα που επώαστηκαν μόνο με denosumab ή trastuzumab (0,7 έναντι 3,1 έναντι 4,3) **(Εικόνα 19)**. Το PLA σήμα δεν παρουσίασε σημαντικές μεταβολές στα MCF7 και MDA-MB-453 κύτταρα. Η προσθήκη του RANKL στον συνδυασμό των denosumab και trastuzumab δεν είχε περαιτέρω επίδραση όσον αφορά το σχηματισμό διμερών σε κύτταρα καρκίνου του μαστού **(Εικόνα 19)**.

Η PLA μέθοδος επιβεβαίωσε ότι ο RANKL έχει την ικανότητα να προωθεί το σχηματισμό RANK/HER2 ετεροδιμερών, ενώ τα denosumab και trastuzumab διαταράσσουν το πρότυπο διμερισμού των HER2 θετικών καρκινικών κυττάρων μαστού. Τα ευρήματά μας αποδεικνύουν ότι η συνδυαστική χορήγηση του trastuzumab με το denosumab σε HER2 θετικά κύτταρα καρκίνου του μαστού μειώνει τον διμερισμό του HER2 με τον RANK πιο αποτελεσματικά σε σχέση με την μονή στόχευση.

2.4 Διερεύνηση της εμπλοκής του RANK/ HER2 διμερούς στο καθοδικό NF-κB μονοπάτι του RANK

Στη συνέχεια, ερευνήσαμε τη μοριακή σημασία της φυσικής συσχέτισης των RANK και HER2 στη NF-κB σηματοδότηση, το κύριο καθοδικό μονοπάτι του υποδοχέα RANK. Συγκεκριμένα, παρακολουθήσαμε την κατάσταση φωσφορυλίωσης των βασικών τελεστών του κανονικού NF-κB μονοπατιού μετά από την ενεργοποίηση του RANK, την του RANKL και του HER2 σε καρκινικά κύτταρα μαστού. Εστίασαμε στη μελέτη των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της IKKα και όχι της IKKβ, βασιζόμενοι σε πειραματικά δεδομένα από μελέτες σε φυσιολογικό (Cao et al., 2001) και κακοήγη μαζικό επιθήλιο (Cao et al., 2007; Merkhofer et al., 2010) που υπογραμμίζουν τη ζωτική σημασία της στο μαστό.

Η ανοσοτύπωση Western έδειξε ότι η επώαση με RANKL, αύξησε σημαντικά τη φωσφορυλίωση του IκBa, του αρνητικού ρυθμιστή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB, σε σύγκριση με τα SKBR3 κύτταρα ελέγχου (**Εικόνα 20**). Τα MDA-MB-453 εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης των IκBa και IKKα (**Εικόνα 20**). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στην ενεργοποίηση του NF-κB μονοπατιού στα MCF7 και BT-474 μετά τη χορήγηση του RANKL (**Εικόνα 20**).

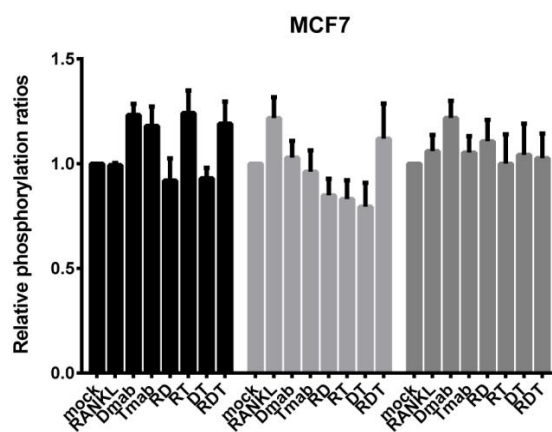
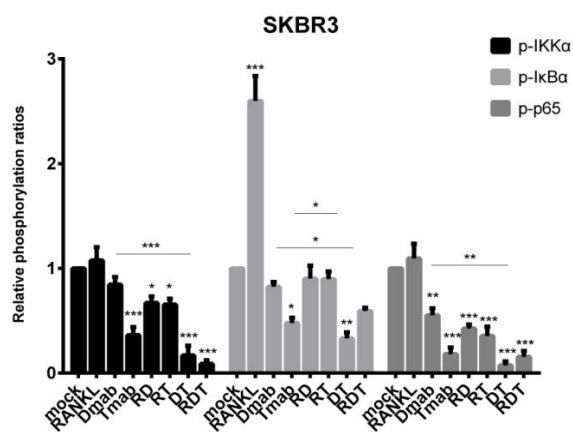
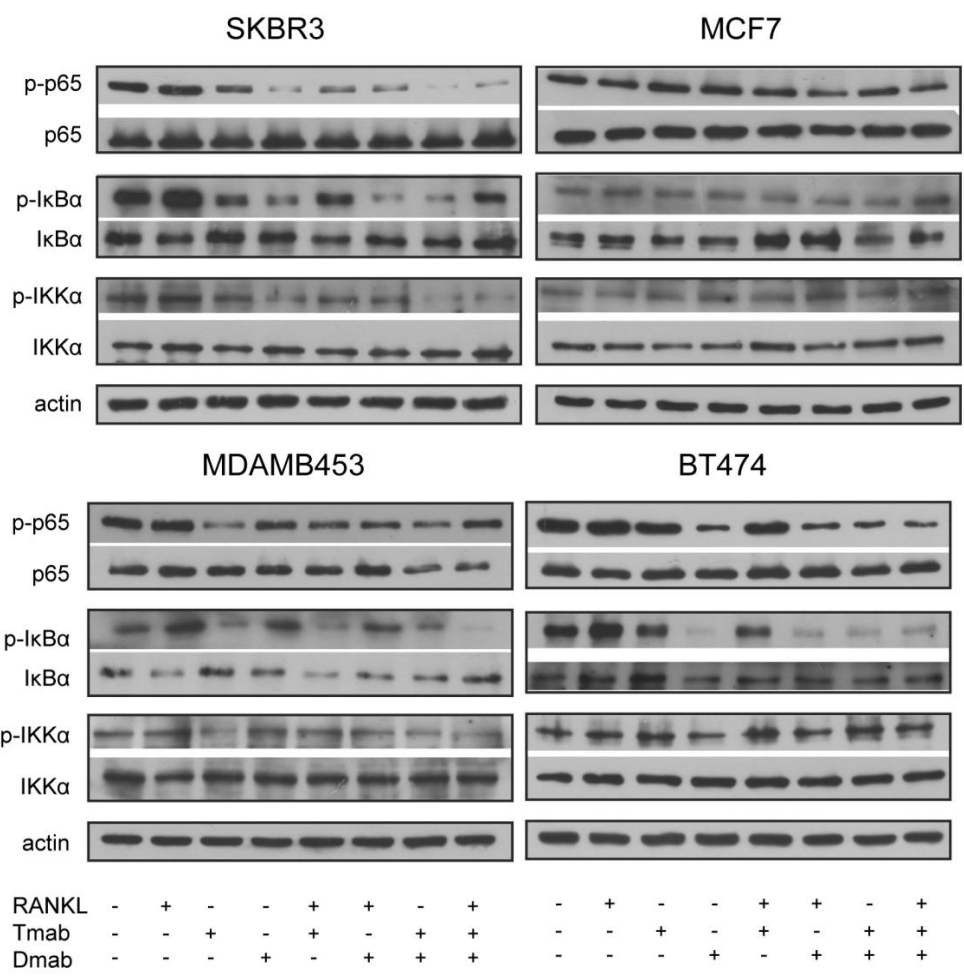
Για να διερευνηθεί η επίδραση της αναστολής του RANKL στη σηματοδότηση του NF-κB, τα κύτταρα καρκίνου του μαστού επώαστηκαν με το denosumab. Η χορήγηση του denosumab στα SKBR3 είχε σαν αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα φωσφο-p65 (**Εικόνα 20**). Τα MDA-MB-453 που επώαστηκαν με το denosumab παρουσίασαν μειωμένη φωσφορυλίωση των IKKα, IκBa και NF-κB p65 σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου (**Εικόνα 20**). Το denosumab δεν φαίνεται να επηρεάζει την NF-κB σηματοδότηση στα MCF7 και BT-474 κύτταρα (**Εικόνα 20**). Η προσθήκη του RANKL στο denosumab δεν είχε αξιοσημείωτη επίδραση στην ενεργοποίηση του NF-κB μονοπατιού στα καρκινικά κύτταρα μαστού.

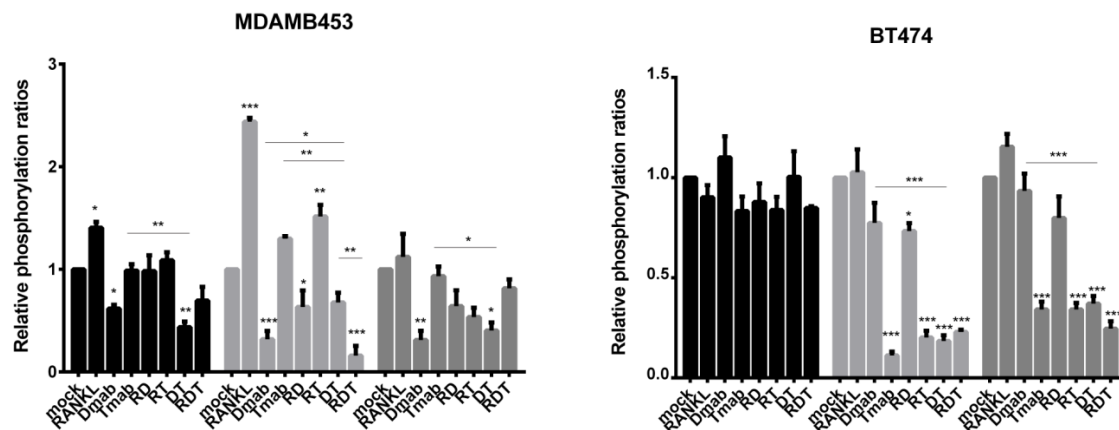
Για να προσδιοριστεί η εμπλοκή του HER2 στην ενεργοποίηση της NF-κB σηματοδότησης, επώασαμε τα κύτταρα καρκίνου του μαστού με το trastuzumab. Το NF-κB μονοπάτι αναστέλλεται σημαντικά στα SKBR3 κύτταρα μετά την αναστολή του HER2 σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (**Εικόνα 20**). Ωστόσο, η προσθήκη του RANKL φαίνεται να αντιστρέφει αυτή την επίδραση, αυξάνοντας τα επίπεδα του φωσφο-IκBa σε σύγκριση με τα SKBR3 κύτταρα που έχουν επωαστεί μόνο με το trastuzumab (**Εικόνα 20**). Η χορήγηση trastuzumab στα BT-474 κύτταρα οδήγησε σε

δραματική μείωση της φωσφορυλίωσης των IκΒα και p65, αλλά δεν είχε σημαντική επίδραση στην ενεργοποίηση της IKKα **(Εικόνα 20)**. Όπως αναμενόταν, τα MCF7 και MDA-MB-453 δεν ανταποκρίθηκαν στον αναστολέα **(Εικόνα 20)**.

Τέλος, ερευνήσαμε την επίδραση της διπλής αναστολής των RANKL και HER2. Η συνδυαστική επώαση είχε μεγαλύτερη ανασταλτική δράση σε σχέση με τη χορήγηση του denosumab στα SKBR3 κύτταρα **(Εικόνα 20)**. Η προσθήκη του RANKL αύξησε ελαφρώς τη φωσφορυλίωση των IκΒα και NF-κΒ p65 σε σύγκριση με τα διπλά ανασταλμένα κύτταρα **(Εικόνα 20)**. Η διπλή αναστολή στα MDA-MB-453 κύτταρα μείωσε περαιτέρω τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των IKKα και p65 σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου, ενώ η δραστηριότητα του denosumab όσον αφορά τη μείωση της φωσφο-IκΒα εξασθενεί όταν προστεθεί το trastuzumab **(Εικόνα 20)**. Από την άλλη πλευρά, η συνδυαστική επώαση δεν προσέφερε κανένα πλεονέκτημα στα BT-474 κύτταρα σε σύγκριση με το trastuzumab **(Εικόνα 20)**. Τα MCF7 κύτταρα δεν εμφάνισαν καμία σημαντική αλλαγή **(Εικόνα 20)**.

Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το RANKL και το denosumab έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν τη σηματοδότηση του NF-κΒ στα SKBR3 και MDA-MB-453 κύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παρουσία του RANKL περιόρισε την αποτελεσματικότητα του trastuzumab στα SKBR3. Αντίθετα, η προσθήκη του denosumab στο trastuzumab ενίσχυσε τη δράση και των δύο αναστολέων.



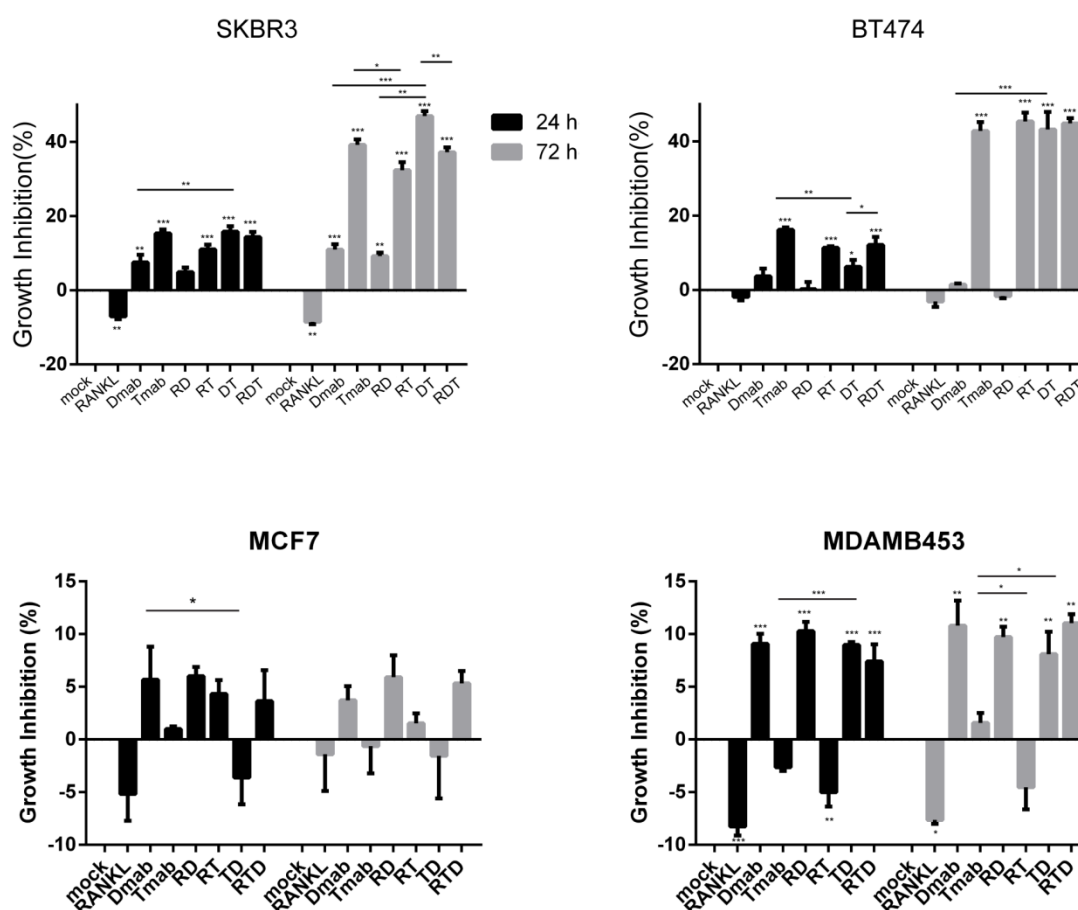


Εικόνα 20: Επίδραση των RANKL, Denosumab και Trastuzumab στο NF-κB σηματοδοτικό μονοπάτι. Τα καρκινικά κύτταρα μαστού επώαστηκαν με RANKL, denosumab και/ ή trastuzumab. Παρουσιάζονται ανοσοαποτυπώσεις Western από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των SKBR3, MCF7, MDA-MB-453 και BT-474 χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των φωσφο-IKKα, IKKα, φωσφο-IκBa, IκBa, φωσφο-NF-κB p65 και NF-κB p65. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά πειράματα για κάθε κυτταρική σειρά. Τα ιστογράμματα αντιπροσωπεύουν την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων των φωσφο- πρωτεϊνών μετά από κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα έκφρασης της αντίστοιχης ολικής πρωτεΐνης καθώς και της ακτίνης. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με one- way ANOVA και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

2.5 Επίδραση της αναστολής των RANKL και HER2 στις ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων του μαστού

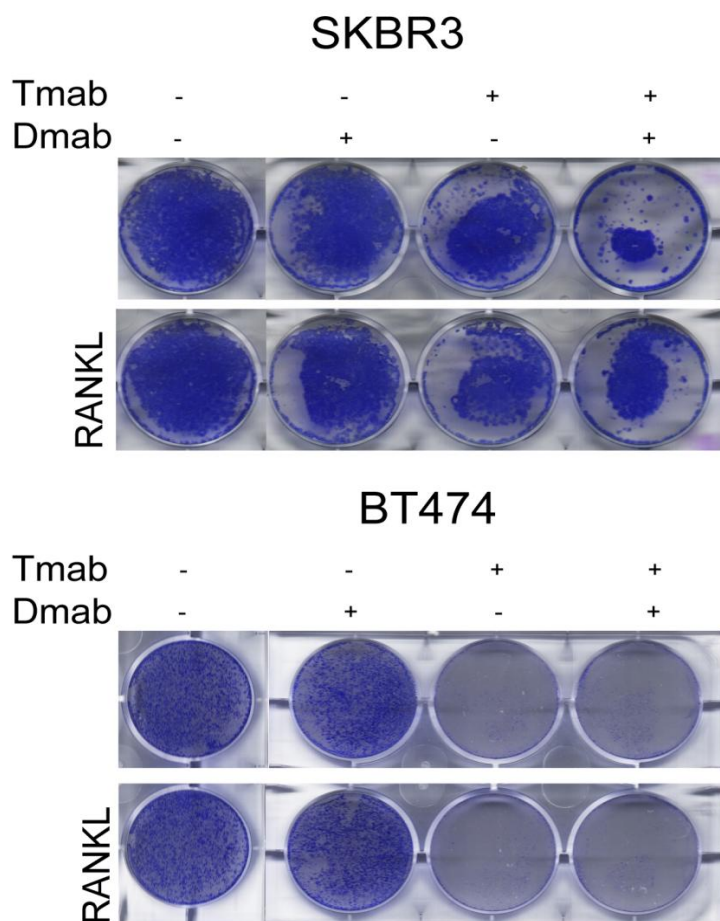
Στην παρούσα πειραματική ενότητα, πραγματοποιήσαμε *in vitro* λειτουργικές δοκιμασίες προκειμένου να αξιολογήσουμε εάν η παρατηρούμενη μείωση της ενεργότητας της σηματοδότησης του NF-κB (**Εικόνα 20**) μετά τη χορήγηση denosumab και trastuzumab είχε αντίκτυπο στις ιδιότητες κυττάρων καρκίνου του μαστού. Η αξιολόγηση της επίδρασης του denosumab και του trastuzumab στη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε μέσω της δοκιμασία MTT. Η επώαση για 24 και 72 ώρες των SKBR3 και MDA-MB-453 με τον RANKL, είχε σαν αποτέλεσμα να αυξηθεί σημαντικά ο πολλαπλασιασμός σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (**Εικόνα 21**). Αντίθετα, το denosumab ανέστειλε την κυτταρική ανάπτυξη σε αυτές τις κυτταρικές σειρές. Όπως αναμενόταν, τα SKBR3 και BT-474 που επώαστηκαν με το trastuzumab εμφάνισαν μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (**Εικόνα 21**). Είναι ενδιαφέρον ότι η προσθήκη του RANKL στο trastuzumab και η επώαση για 72 ώρες των SKBR3 κυττάρων οδήγησε στην ανάκτηση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού ($p < 0,05$). Η συνδυαστική επώαση των SKBR3

κυττάρων με denosumab και trastuzumab είχε ως αποτέλεσμα μια πιο αποτελεσματική αναστολή της ανάπτυξης σε σύγκριση με τη μονή στόχευση στις 72 ώρες (D έναντι DT, $p < 0,001$, T έναντι DT, $p < 0,01$). Ωστόσο, η προσθήκη του RANKL ανέτρεψε αυτή την επίδραση (DT έναντι RDT, $p < 0,01$). Η αποτελεσματικότητα της διπλής αναστολής επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο κλωνογενούς ικανότητας στα SKBR3 κύτταρα (**Εικόνα 22**). Είναι ενδιαφέρον ότι η κλωνογενής επιβίωση των SKBR3 κυττάρων επηρεάστηκε από την προσθήκη του RANKL στο σχήμα των δύο αναστολέων (**Εικόνα 22**). Επιπλέον, το trastuzumab μείωσε δραματικά την ικανότητα των BT-474 κυττάρων να σχηματίζουν αποικίες (**Εικόνα 22**).



Εικόνα 21: Επίδραση του Denosumab και Trastuzumab στον πολλαπλασιασμό των SKBR3, MCF7, MDA-MB-453 και BT-474 κυττάρων. Τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία XTT των κυττάρων που επωάστηκαν με RANKL, denosumab και / ή trastuzumab για 24 και 72 ώρες εκφράζονται στο ιστόγραμμα ως αναστολή της ανάπτυξης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με one-way ANOVA και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

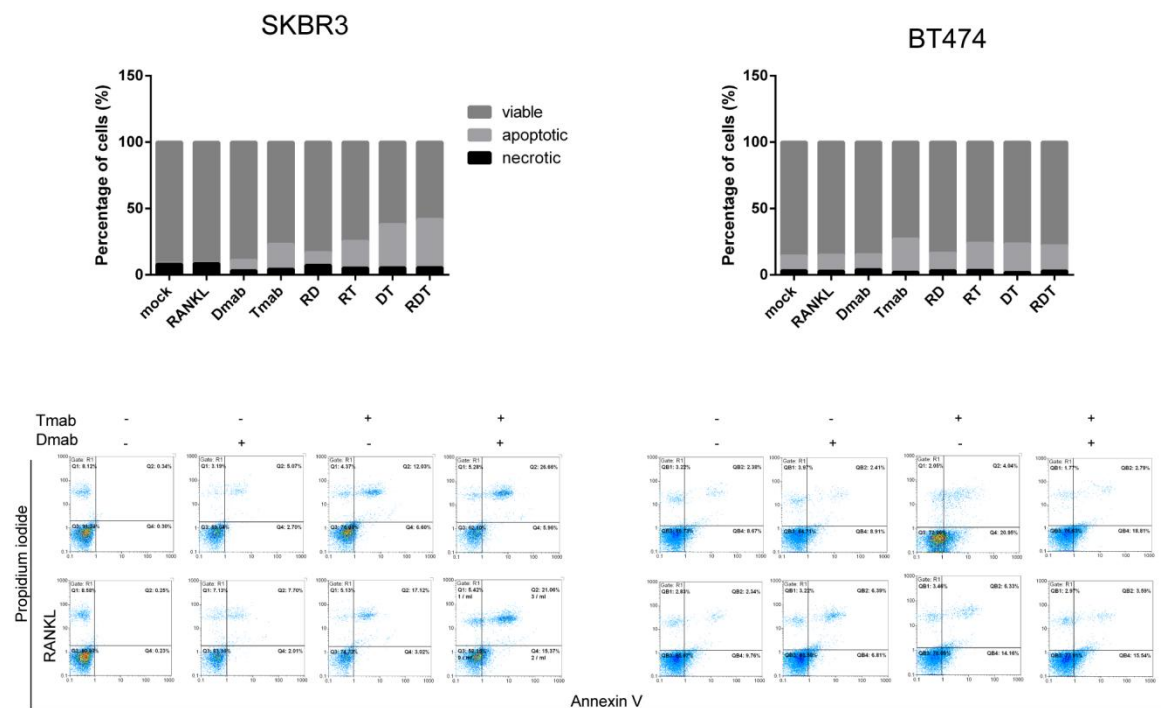
Ακολούθως, διεξήγαμε κυτταρομετρία ροής με χρώση annexin V και Propidium Iodide (PI) στα HER2+ κύτταρα καρκίνου του μαστού, προκειμένου να εξετάσουμε περαιτέρω το αποτέλεσμα της διπλής αναστολής στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης υποδεικνύουν ότι η επώαση για 48 ώρες με denosumab ή trastuzumab προκάλεσε απόπτωση στα SKBR3 κύτταρα, ενώ η διπλή αναστολή φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με την μονή στόχευση (**Εικόνα 23**). Σε αντίθεση με τα δεδομένα από τις δοκιμασίες πολλαπλασιασμού, η προσθήκη του RANKL δεν είχε σημαντική επίδραση στον κυτταρικό θάνατο των SKBR3. Παρόλο που το trastuzumab προκάλεσε υψηλά ποσοστά απόπτωσης στα BT-474 κύτταρα, το RANKL και το denosumab είχαν περιορισμένη επίδραση στην κυτταρική κατανομή σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (**Εικόνα 23**).



Εικόνα 22: Επίδραση του Denosumab και Trastuzumab στην κλωνογενή ικανότητα των SKBR3 και BT-474 κυττάρων.

Επιπλέον, εξετάσαμε την επίδραση του denosumab και του trastuzumab στην μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Η συνδυαστική

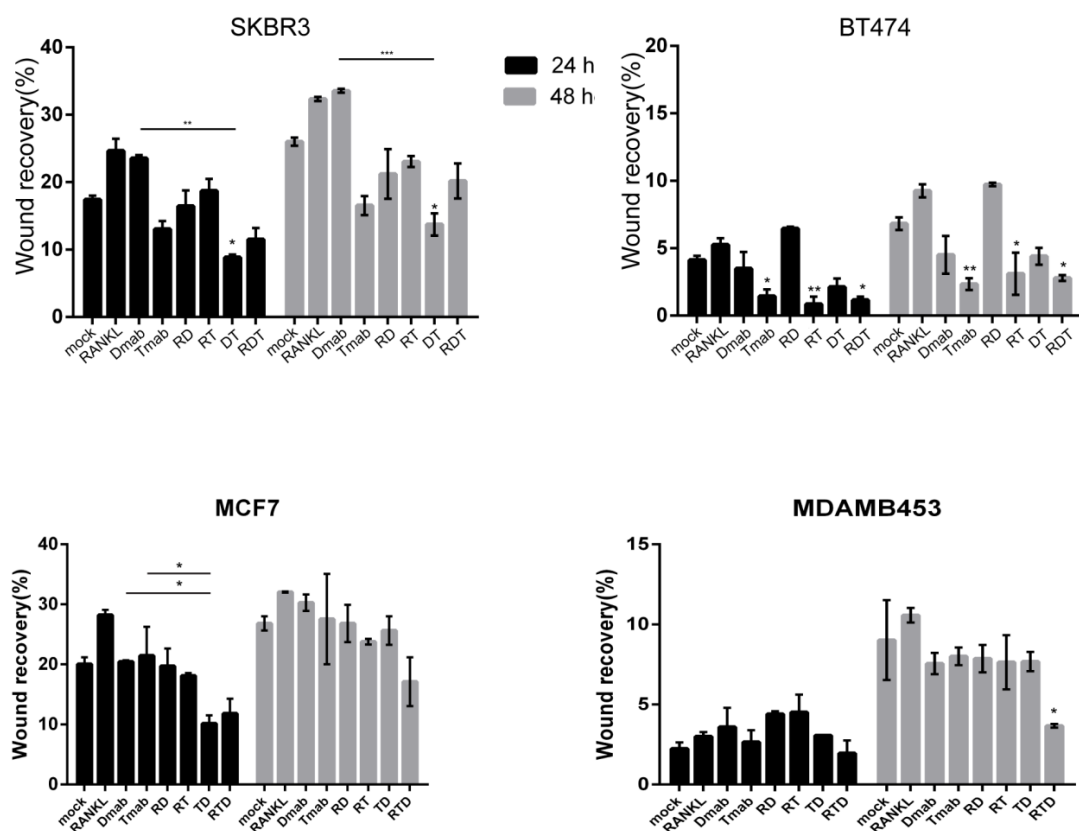
χορήγηση των δύο αναστολέων για 24 και 48 ώρες αναστέλλει αποτελεσματικά την κινητικότητα των στις SKBR3 κυττάρων βιοδοκιμές προσομοίωσης τραύματος δι' αμυχής σε σύγκριση με κύτταρα ελέγχου ($p < 0,05$) και τα κύτταρα που επώαστηκαν με το denosumab ($p < 0,01$ και $p < 0,001$ αντίστοιχα) (**Εικόνα 24**). Το μεταστατικό δυναμικό των BT-474 επηρεάστηκε κυρίως από την παρουσία του trastuzumab, είτε όταν χορηγείται μόνο του ($p < 0,05$ για τις 24 ώρες, $p < 0,01$ για τις 48 ώρες), με RANKL ($p < 0,01$ για τις 24 ώρες, $p < 0,05$ για τις 48 ώρες) ή συνδυαστικά με το RANKL και denosumab ($p < 0,05$) (**Εικόνα 24**). Όσον αφορά τα MCF7 και MDA-MB-453 κύτταρα, η συνδυαστική χορήγηση των RANKL, denosumab και trastuzumab μείωσε σημαντικά τον ρυθμό επούλωσης του τραύματος μετά από 24 ($p < 0,05$) και 48 ώρες ($p < 0,05$), αντιστοίχως (**Εικόνα 24**).



Εικόνα 23: Επίδραση του Denosumab και Trastuzumab στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο των SKBR3 και BT-474 κυττάρων. Τα ιστογράμματα αντιπροσωπεύουν δεδομένα από την κυτταρομετρία ροής με χρώση Annexin V-FITC και Propidium Iodide (PI) μετά από 48 ώρες επώασης των κυττάρων με τους προς μελέτη παράγοντες. Τα ιστογράμματα δείχνουν την κατανομή των κυττάρων ως ποσοστό βιώσιμων, αποπτωτικών και νεκρωτικών.

Δεδομένα από τις δοκιμασίες πολλαπλασιασμού, κλωνογενούς ικανότητας, κυτταρικού θανάτου και μετανάστευσης που πραγματοποιήθηκαν στα κύτταρα καρκίνου του μαστού, δείχνουν ότι η χορήγηση του denosumab συνδυαστικά με το

trastuzumab ενισχύει την αντιπολλαπλασιαστική και αντιμεταναστευτική δράση των δύο αναστολέων στα HER2 θετικά ER αρνητικά κύτταρα.

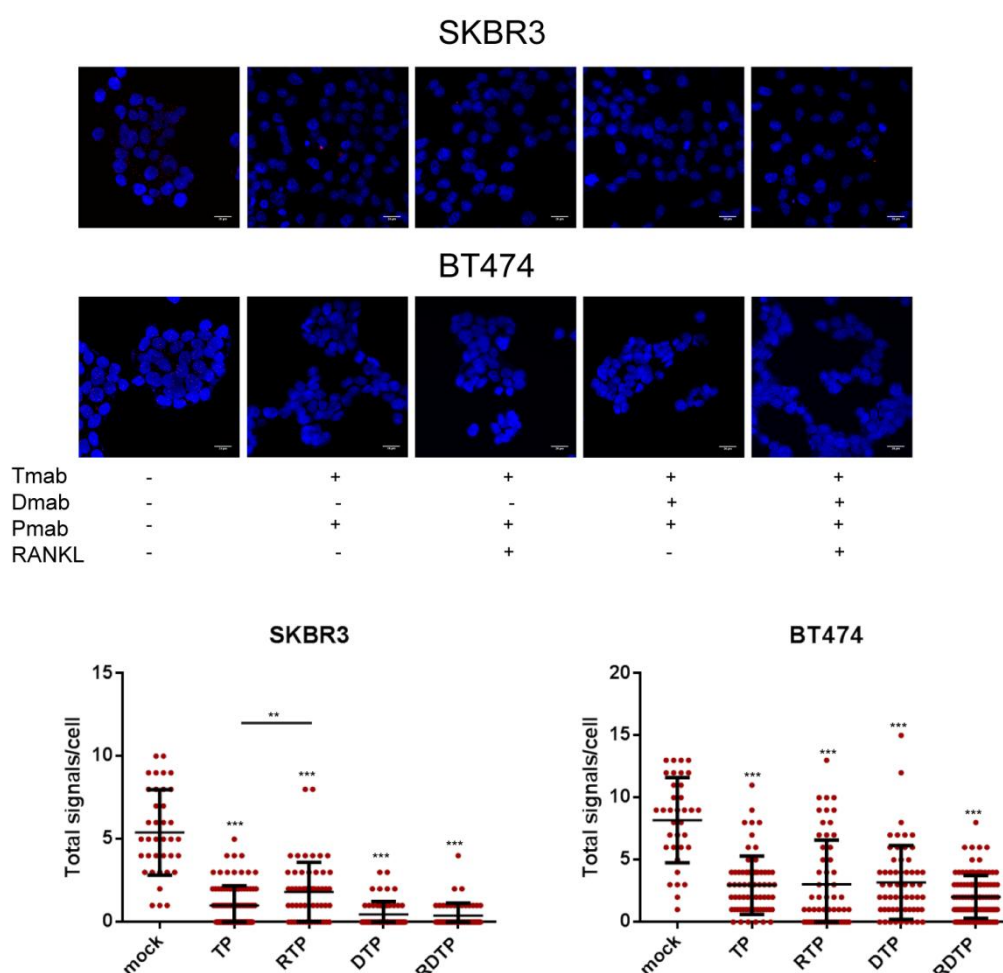


Εικόνα 24: Επίδραση του Denosumab και Trastuzumab στο μεταναστευτικό δυναμικό των SKBR3, MCF7, MDA-MB-453 και BT-474 κυττάρων. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της βιοδοκιμής προσομοίωσης τραύματος δι' αμυχής για τα κύτταρα που επωάστηκαν για 24 και 48 ώρες. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν το ποσοστό επούλωσης του τραύματος στις 24 και 48 ώρες σε σχέση με τη χρονική στιγμή 0. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με one-way ANOVA και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

2.6 Η επίδραση της διπλής αναστολής του HER2 στη δραστηριότητα του denosumab στα HER2+ κύτταρα καρκίνου του μαστού

Η συνδυαστική θεραπεία με trastuzumab και pertuzumab θεωρείται πλέον μια τυπική στρατηγική στην κλινική πράξη όσον αφορά τους ασθενείς με HER2 θετικό καρκίνο του μαστού (von Minckwitz et al., 2017). Επομένως, εξετάσαμε την επίδραση της προσθήκης του pertuzumab σε HER2+ κύτταρα καρκίνου του μαστού, στα οποία χορηγήθηκε παράλληλα denosumab και trastuzumab. Τα SKBR3 και BT-474 κύτταρα επωάστηκαν με τους προς μελέτη παράγοντες και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η μέθοδος Duolink (Εικόνα 25). Μετά τη συνδυαστική χορήγηση

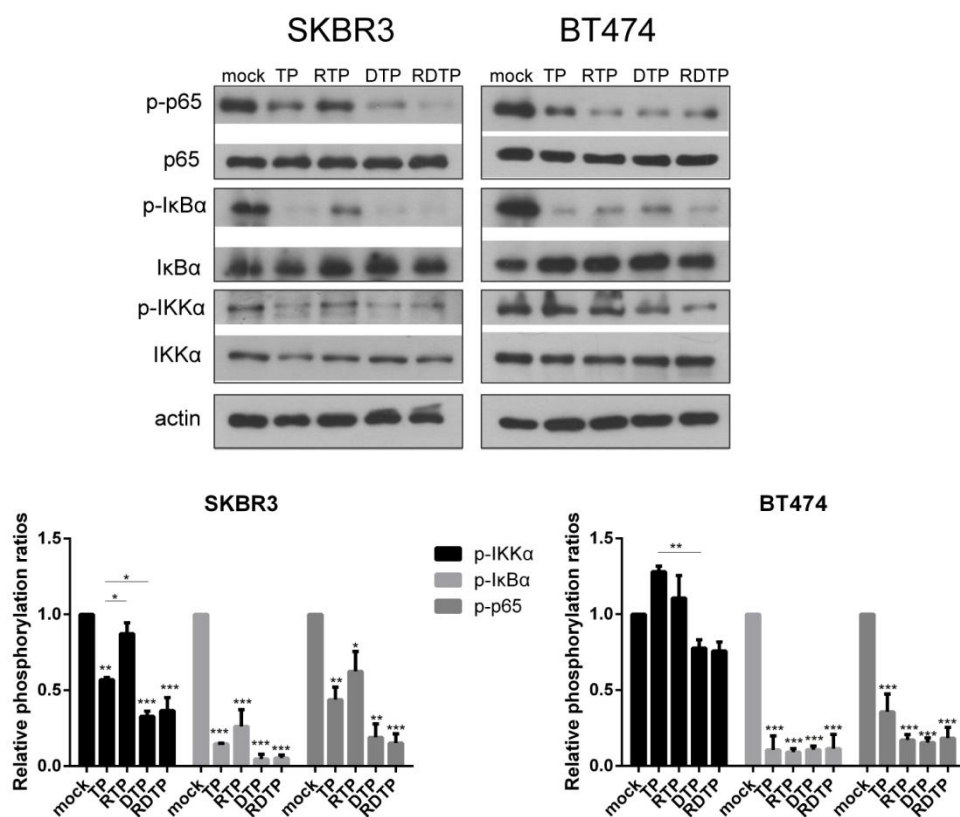
pertuzumab και trastuzumab, τα RANK/ HER2 διμερή μειώθηκαν περαιτέρω σε σύγκριση με τα SKBR3 κύτταρα που επώαστηκαν με trastuzumab (κλίμακα PLA σήματος 0-15), ενώ η προσθήκη του RANKL σε αυτό το σχήμα περιορίζει την προαναφερθείσα μείωση (**Εικόνα 25**). Επιπλέον, η χορήγηση των τριών ανασταλτικών παραγόντων είχε ως αποτέλεσμα ένα σημαντικά μικρότερο αριθμό διμερών σε σύγκριση με τα κύτταρα SKBR3 που είχαν επωαστεί με denosumab ή trastuzumab, καθώς και με το συνδυασμό trastuzumab και pertuzumab (**Εικόνα 25**). Αντίθετα, η προσθήκη pertuzumab σε οποιονδήποτε συνδυασμό δεν είχε σημαντική επίδραση στο σχηματισμό διμερών στα BT-474 κύτταρα (κλίμακα PLA σήματος 0-20) (**Εικόνα 25**).



Εικόνα 25: Επίδραση του Pertuzumab, Denosumab και Trastuzumab στο πρότυπο διμερισμού μεταξύ των υποδοχέων RANK και HER2 στα HER2 θετικά καρκινικά κύτταρα μαστού. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας. Οι κόκκινες κουκκίδες αντιπροσωπεύουν το θετικό σήμα των RANK/HER2 ετεροδιμερών στα SKBR3 και BT-474 κύτταρα, εφαρμόζοντας τη μέθοδο DUOLINK. Οι ράβδοι κλίμακας αντιπροσωπεύουν τα 20 μm . Τα γραφήματα

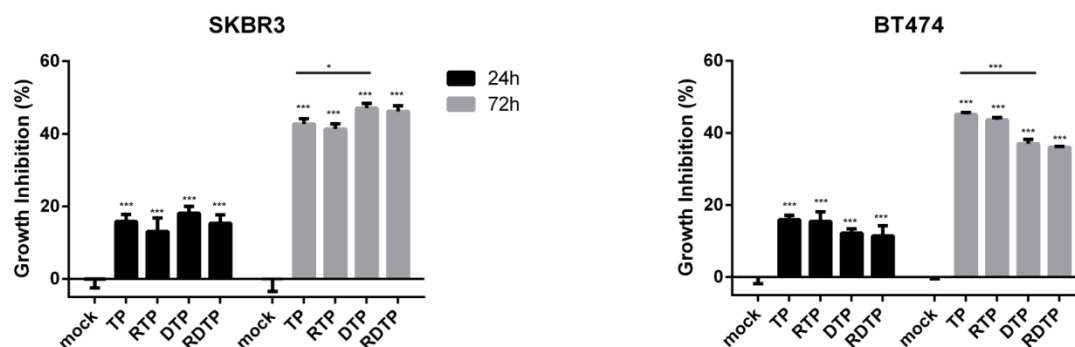
αντιπροσωπεύουν το συνολικό σήμα ανά κύτταρο όπως αναλύεται από το λογισμικό Duolink Image Tool Software. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Στη συνέχεια, αξιολογήσαμε κατά πόσο η προσθήκη του pertuzumab μπορεί να προσφέρει πλεονέκτημα στην αρνητική ρύθμιση της σηματοδότησης του NF- κ B. Συγκεκριμένα, η ανοσοαποτύπωση Western αποκάλυψε ότι η συνδυαστική χορήγηση του trastuzumab και pertuzumab στα SKBR3 κύτταρα επέφερε μειωμένα επίπεδα φωσφορυλίωσης των IKK α , I κ B α και NP- κ B p65 σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, ενώ υπήρξε μικρή αύξηση όταν προστέθηκε το RANKL (**Εικόνα 26**). Επιπλέον, η χορήγηση των τριών αναστολέων ήταν πιο αποτελεσματική όσον αφορά τη μείωση της φωσφορυλιωμένης IKK α σε σύγκριση με τα SKBR3 κύτταρα που επώαστηκαν με το συνδυασμό του trastuzumab και pertuzumab (**Εικόνα 26**). Ως προς τα BT-474 κύτταρα, όλοι οι συνδυασμοί των εξεταζόμενων παραγόντων επηρέασαν την NF- κ B σηματοδότηση, μειώνοντας τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των I κ B α και p65 (**Εικόνα 26**). Ωστόσο, η φωσφορυλιωμένη μορφή της IKK α φάνηκε ανεπηρέαστη μετά τη χορήγηση του trastuzumab, pertuzumab και / ή denosumab.



Εικόνα 26: Επίδραση των Pertuzumab, Denosumab και Trastuzumab στο NF- κ B σηματοδοτικό μονοπάτι. Τα καρκινικά κύτταρα μαστού επώαστηκαν με RANKL,

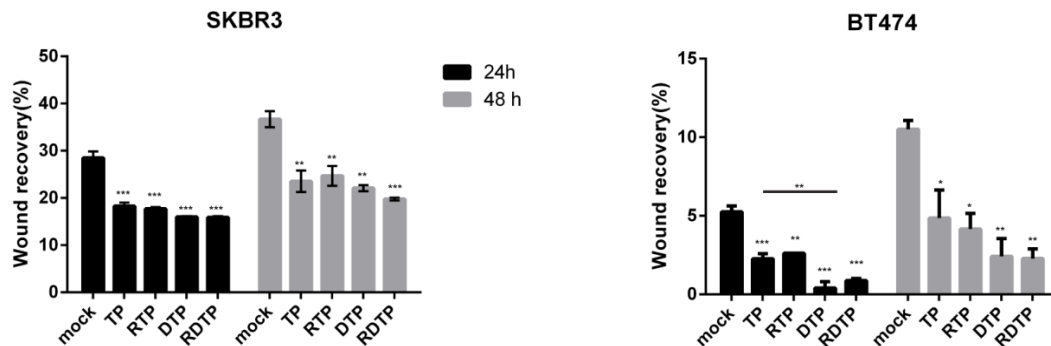
denosumab και/ ή trastuzumab. Παρουσιάζονται ανοσοαποτυπώσεις Western από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των SKBR3 και BT-474 χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των φωσφο-IKKα, IKKα, φωσφο-IκΒα, IκΒα, φωσφο-NF-κΒ p65 και NF-κΒ p65. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά πειράματα για κάθε κυτταρική σειρά. Τα ιστογράμματα αντιπροσωπεύουν την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων των φωσφο- πρωτεϊνών μετά από κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα έκφρασης της αντίστοιχης ολικής πρωτεΐνης καθώς και της ακτίνης. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με one- way ANOVA και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.



Εικόνα 27: Επίδραση του Pertuzumab, Denosumab και Trastuzumab στον πολλαπλασιασμό των SKBR3 και BT-474 κυττάρων. Τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία XTT των κυττάρων που επώαστηκαν με τους αναστολείς για 24 και 72 ώρες εκφράζονται στο ιστόγραμμα ως αναστολή της ανάπτυξης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με one- way ANOVA και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Τέλος, αξιολογήσαμε την αντικαρκινική δράση του συνδυασμού των αναστολέων, denosumab, trastuzumab και pertuzumab, εφαρμόζοντας δοκιμασίες πολλαπλασιασμού XTT και βιοδοκιμές προσομοίωσης τραύματος δι' αμυγλής στα καρκινικά κύτταρα μαστού. Μετά από 72 ώρες επώασης με τον τριπλό συνδυασμό των αναστολέων, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με τα SKBR3 κύτταρα που επώαστηκαν με το συνδυασμό των trastuzumab και pertuzumab ($p < 0,05$) (**Εικόνα 27**). Η χορήγηση των trastuzumab, pertuzumab και / ή denosumab μείωσε δραματικά την κυτταρική επιβίωση των BT-474 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (**Εικόνα 27**). Η προσθήκη του RANKL δεν επηρέασε την κυτταρική ανάπτυξη ούτε των SKBR3 ούτε των BT-474 (**Εικόνα 27**). Τα δεδομένα από τις δοκιμασίες μετανάστευσης αποκάλυψαν την αποτελεσματική αναστολή του ρυθμού μετανάστευσης μετά από την τριπλή στόχευση, η οποία δεν επηρεάστηκε παρουσία του RANKL στα SKBR3 και BT-474 κύτταρα (**Εικόνα 28**).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω ευρήματα, καταλήγουμε στο ότι η προσθήκη του pertuzumab στο συνδυασμό των denosumab και trastuzumab προσφέρει ένα πλεονέκτημα όσον αφορά την επίδραση του RANKL στη δραστικότητα του trastuzumab και του pertuzumab στα SKBR3 κύτταρα.



Εικόνα 28: Επίδραση του Pertuzumab, Denosumab και Trastuzumab στο μεταναστευτικό δυναμικό των SKBR3 και BT-474 κυττάρων. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της βιοδοκιμής προσομοίωσης τραύματος δι' αμυχήs για τα κύτταρα που επωάστηκαν για 24 και 48 ώρες. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν το ποσοστό επούλωσης του τραύματος στις 24 και 48 ώρες σε σχέση με τη χρονική στιγμή 0. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με one- way ANOVA και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι RANK και RANKL εκφράζονται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και μέσω της σηματοδότησής τους μπορούν να διαμορφώνουν βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Μεταξύ των κυτταρικών συστημάτων που έχει αναφερθεί ότι εμπλέκεται ο RANK άξονας είναι η ογκογένεση του μαστού. Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν επιστημονικές αναφορές που αποκαλύπτουν τη συμμετοχή της RANK σηματοδότησης σε κάθε στάδιο της καρκινογένεσης του μαστού (Gonzalez-Suarez et al., 2010; Tan et al., 2011; Palafox et al., 2012; Nolan et al., 2016). Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν το ρόλο του RANK σε ορμονοεξαρτώμενους (Gonzalez-Suarez et al., 2010; Schramek et al., 2010) και σχετιζόμενους με μετάλλαξη *BRCA1* (Nolan et al., 2016) καρκίνους του μαστού. Επιπροσθέτως, υποδεικνύεται η εμπλοκή του στα HER2 θετικά καρκινώματα του μαστού (Gonzalez-Suarez et al., 2010; Tan et al., 2011; Merkhofer et al., 2010). Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, διερευνήσαμε και αποκαλύψαμε ένα νέο ρόλο του RANK ως φυσικού εταίρου των μελών της οικογένειας EGFR σε καρκινικά κύτταρα μαστού που εκφράζουν τον RANK. Η φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο υποδοχέων είναι ικανή να διαμορφώνει το NF-κB σηματοδοτικό μονοπάτι με αποτέλεσμα τη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των HER2 θετικών ER αρνητικών κυττάρων καρκίνου του μαστού.

In vitro πειράματα με διαφοροποιημένους οστεοκλάστες αποκάλυψαν για πρώτη φορά μια λειτουργική και φυσική συσχέτιση μεταξύ της RANK και EGFR σηματοδότησης (Yi et al., 2008). Συγκεκριμένα, ο RANKL προάγει την έκφραση και την ενεργοποίηση του EGFR *in trans*. Ακολούθως, ο ενεργοποιημένος EGFR σχηματίζει ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που συμπεριλαμβάνει τον RANK, το οποίο οδηγεί σε ενισχυμένη σηματοδότηση καθοδικά του RANK, ρυθμίζοντας τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών και την επιβίωσή τους (Yi et al., 2008). Είναι αξιοσημείωτο ότι η εργαστηριακή ομάδα του Καλόφωνου έχει παρατηρήσει παρόμοια αποτελέσματα σε πρωτογενείς καρκίνους του μαστού (Papanastasiou et al., 2017). Παρείχαν προκαταρκτικές ενδείξεις για την αλληλεπίδραση του RANK με τη

EGFR σηματοδότηση. Μια θετική συσχέτιση επισημάνθηκε μεταξύ της έκφρασης του RANK (*TNFRSF11A*) και του EGFR σε κύτταρα καρκίνου του μαστού (Papanastasiou et al., 2017). Επιπλέον, η συν-έκφραση των RANK και EGFR είναι ενδεικτική για κακή πρόγνωση, ενισχυμένα καθοδικά μονοπάτια και επαγόμενη κυτταρική διείσδυση σε καρκινικά κύτταρα μαστού (Papanastasiou et al., 2017). Τα ευρήματά μας από τη μέθοδο Duolink αποτελούν συνέχεια και εξέλιξη των προαναφερθεισών μελετών, αποκαλύπτοντας για πρώτη φορά μια άμεση συσχέτιση του RANK με μέλη της EGFR οικογένειας (EGFR/ HER2/ HER3/ HER4) σε κύτταρα καρκίνου του μαστού.

Ο σχηματισμός διμερών μεταξύ των RANK και HER2 φάνηκε να σχετίζεται θετικά με την έκφραση του HER2, επομένως τα SKBR3 και BT-474, HER2 θετικά κύτταρα, παρουσιάζουν μεγάλο αριθμό διμερών RANK/ HER2, ενώ τα MCF7 και MDA-MB-453, HER2 αρνητικά κύτταρα, εμφανίζουν χαμηλότερο αριθμό. Η επώαση με τον RANKL είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του RANK/ HER2 διμερισμού, ενώ η χορήγηση των denosumab, trastuzumab και/ ή pertuzumab είχε το αντίθετο αποτέλεσμα στα HER2+ καρκινικά κύτταρα μαστού. Τα ευρήματά μας είναι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες σε οστεοκλάστες που έδειξαν ότι η συσχέτιση μεταξύ του RANK και του EGFR ενισχύθηκε από το θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης οστεοκλαστών, το οποίο περιέχει RANKL, και μειώθηκε παρουσία AG1478, έναν αναστολέα κινάσης EGFR (Yi et al., 2008). Η παρουσία του RANKL φαίνεται να είναι κρίσιμης σημασίας καθώς η προσθήκη και η αναστολή του επηρεάζει το πρότυπο RANK/ HER2 διμερισμού. Η παρατήρηση ότι η διπλή στόχευση του HER2 με trastuzumab και pertuzumab είναι πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με τη μονή (trastuzumab), σε συνδυασμό με τη μοριακή δράση των αναστολέων (Harbeck et al., 2013) οδηγεί στην παραδοχή ότι ο HER2 αλληλεπιδρά με τον RANK ως εταίρος ενός ενεργού ομοδιμερούς ή ετεροδιμερούς με άλλα μέλη της οικογένειας EGFR, σχηματίζοντας ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο.

Προηγούμενες μελέτες σε οστεοκλάστες και κύτταρα καρκίνου του μαστού έδειξαν ότι ο EGFR εμπλέκεται στην ενίσχυση της σηματοδότησης καθοδικά του RANK (Yi et al., 2008; Papanastasiou et al., 2017). Η NF-κB σηματοδότηση είναι το κύριο καθοδικό μονοπάτι του RANK. Ο ενεργοποιημένος NF-κB έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη του όγκου (Cao et al., 2007) και την ανθεκτικότητα στις θεραπείες (Bailey et al., 2014) στον HER2 θετικό καρκίνο του μαστού. Ο NF-κB ενεργοποιείται

μέσω κανονικών και μη κανονικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Παρόλο που η IKKβ θεωρείται ο βασικός τελεστής του κανονικού μονοπατιού, δεδομένα από φυσιολογικό (Cao et al., 2001) και κακοήγη (Merkhofer et al., 2010) μαστό αποκάλυψαν ένα λειτουργικό ρόλο του IKKα στο κανονικό μονοπάτι. Η IKKα είναι απαραίτητη για την επαγόμενη από τον HER2 ογκογένεση του μαστού και παίζει έναν ουσιώδη ρόλο στην αυτοανανέωση των καρκινικών βλαστοκυττάρων (Cao et al., 2007). Ο RANKL ρυθμίζει θετικά τη φωσφορυλίωση και την πυρηνική μετατόπιση της IKKα σε μία κυτταρική σειρά καρκινώματος του μαστού που προκαλείται από τον HER2 (Tan et al., 2011). Επιπρόσθετα, η παρουσία του RANKL προκάλεσε την ενεργοποίηση του NF-κB σε SKBR3 κύτταρα (Schramek et al., 2010). Σύμφωνα με αυτό, παρατηρήσαμε μια σημαντική αύξηση της φωσφορυλιωμένης IκBa ενώ, η φωσφορυλίωση των IKKα και p65 αυξήθηκε ελαφρώς μετά την επώαση των SKBR3 με RANKL. Επιπλέον, μελέτες ανέφεραν ότι το lapatinib και το trastuzumab μείωσαν τη NF-κB σηματοδότηση σε SKBR3 κύτταρα (Merkhofer et al., 2010; Biswas et al., 2004). Σημειωτέον, πέρα από τα μειωμένα επίπεδα φωσφορυλίωσης των IκBa και p65, παρατηρήσαμε μια σημαντική μείωση της φωσφο-IKKα σε SKBR3 κύτταρα που είχαν επωαστεί με trastuzumab ή trastuzumab συν pertuzumab. Οι Merkhofer και συνεργάτες, σε μια προσπάθεια να διασαφηνιστεί ο μοριακός μηχανισμός που οδηγεί στην ενεργοποίηση του NF-κB, απέδειξαν ότι ο HER2 χρειάζεται την IKKα προκειμένου να ενεργοποιήσει τον NF-κB μέσω του κανονικού μονοπατιού ανεξάρτητα από το PI3K μονοπάτι σε HER2 θετικά κύτταρα καρκίνου του μαστού (Merkhofer et al., 2010). Επομένως, ο HER2 μπορεί να παίζει ρυθμιστικό ρόλο στο IKKα- μεσολαβούμενο κανονικό μονοπάτι. Αξίζει να σημειωθεί ότι η προσθήκη του RANKL φαίνεται να περιορίζει τη δραστηριότητα των HER2 αναστολέων. Ενώ όταν χορηγείται και το denosumab στον συνδυασμό, ο RANKL παύει να επηρεάζει τη NF-κB σηματοδότηση στα SKBR3 κύτταρα. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο HER2 συνεργάζεται με το RANK για να ρυθμίσει την IKKα- μεσολαβούμενη κανονική σηματοδότηση.

Η ενεργοποίηση του NF-κB, που ρυθμίζεται από τον HER2 μέσω της IKKα, προωθεί επιθετικό φαινότυπο στα HER2-θετικά κύτταρα BC (Merkhofer et al., 2010). Πιο συγκεκριμένα, ο NF-κB προάγει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση, ενισχύοντας την HER2-μεσολαβούμενη ογκογένεση του μαστού (Bailey et al., 2014). Η RANK σηματοδότηση διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των

καρκινικών κυττάρων του μαστού μέσω επαγωγής της πρωτεϊνικής έκφρασης των κυκλίνης D1 και Bcl-2 (Booralan et al., 2015). Η IKKα παίζει έναν κρίσιμο ρόλο στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων που προωθείται καθοδικά από το NF-κB-κυκλίνη D1 μονοπάτι (Schramek et al., 2010). Αντίστοιχα, δεδομένα που συλλέξαμε από τις λειτουργικές δοκιμασίες πολλαπλασιασμού, απόπτωσης και κλωνογενούς ικανότητας αποκάλυψαν ότι ο RANKL ενισχύει τον πολλαπλασιασμό, χωρίς να επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την επιβίωση στα SKBR3 κύτταρα. Επίσης, τα SKBR3 κύτταρα παρουσίασαν μειωμένα ποσοστά πολλαπλασιασμού και αυξημένη απόπτωση όταν τους χορηγήθηκε ο συνδυασμός των αναστολέων denosumab και trastuzumab. Η προσθήκη του RANKL στον προαναφερθέντα συνδυασμό περιόρισε τη δραστηριότητα των αναστολέων. Ωστόσο, ο συνδυασμός του denosumab με τη διπλή στόχευση του HER2 φάνηκε να είναι πιο αποτελεσματικός όσον αφορά την αναστολή της ανάπτυξης και την ανοχή στον RANKL.

Ο RANKL προωθεί τη μετανάστευση, τη διήθηση και τη μετάσταση, ενεργοποιώντας την NF-κB σηματοδότηση και αυξάνοντας σαν αποτέλεσμα την έκφραση των Snail και Twist, βασικών ρυθμιστών της επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβασης (EMT) (Tsubaki et al., 2013). Η RANKL σηματοδότηση έχει επίσης ένα ζωτικό ρόλο στην επέκταση των βλαστοκυττάρων καρκίνου του μαστού (Schramek et al., 2010), οδηγώντας πιθανότατα σε ισχυρή μεταστατική δραστηριότητα. Ο RANKL έχει αποδειχθεί ότι μεσολαβεί στην αυτοανανέωση των καρκινικών βλαστοκυττάρων σε HER2 θετικά κύτταρα (Ithimakin et al., 2013). Συγκεκριμένα, η IKKα είναι απαραίτητη για τη διαδικασία αυτή (Cao et al., 2007). Συγκεκριμένα, η IKKα έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει την HER2- επαγόμενη επέκταση των βλαστοκυττάρων προωθώντας την εξαγωγή της p27, ενός αρνητικού ρυθμιστή της G1-S μετάβασης, από τον πυρήνα (Zhang et al., 2013). Οι παρατηρήσεις μας είναι αντίθετες με τις προαναφερθείσες μελέτες, εφόσον δεν αναφέρθηκε σημαντική επίδραση του RANKL στη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων. Ωστόσο, το denosumab σε συνδυασμό με το trastuzumab και/ ή το pertuzumab μείωσε σημαντικά το ποσοστό μετανάστευσης στα SKBR3 κύτταρα. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με προηγούμενα ευρήματα που δείχνουν ότι η αναστολή του RANKL μειώνει τον πολλαπλασιασμό και τις μεταστάσεις σε HER2 διαγονιδιακά ποντίκια (Gonzalez-Suarez et al., 2010). Στο ίδιο πλαίσιο, διαγονιδιακοί RANK+/- HER2 ποντικοί εμφάνισαν μειωμένους μεταστατικούς ρυθμούς σε σύγκριση με τους ομοζυγώτες

(Tan et al., 2011). Επιπλέον, η αποσιώπηση ή η αναστολή του RANK μείωσε τον μεταστατικό ρυθμό, ενώ η χορήγηση του RANKL επέφερε αντίθετα αποτελέσματα στα καρκινώματα μαστού που προκαλούνται από τον HER2 (Tan et al., 2011).

Με βάση τα δεδομένα που περιγράφηκαν μέχρι τώρα, μπορούμε να υποθέσουμε τη σημασία της RANK σηματοδότησης στον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και το μεταστατικό δυναμικό των HER2 θετικών κυττάρων καρκίνου του μαστού. Επίσης, είναι εύλογο να συμπεράνουμε ότι η συνδυαστική στόχευση των HER2 και RANKL είναι μια πιο αποτελεσματική προσέγγιση, η οποία είναι ικανή να εξουδετερώσει το αποτέλεσμα του RANKL όσον αφορά την καταστολή της αντικαρκινικής δράσης των αντι-HER2 παραγόντων. Υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν ότι η NF-κΒ σηματοδότηση μπορεί να αποτελέσει έναν βασικό μηχανισμό ανάπτυξης ανθεκτικότητας στις αντι-HER2 θεραπείες για τον καρκίνο του μαστού (Bailey et al., 2014; Chen et al., 2013). Ακολουθώντας αυτό το σκεπτικό, ο συνδυασμός αντι-HER2 παραγόντων με αναστολείς πρωτεασώματος (οι οποίοι παρεμποδίζουν την αποικοδόμηση του IκB και συνεπώς την ενεργοποίηση του NF-κΒ) (Chen et al., 2013) και αναστολείς NF-κΒ (Bailey et al., 2014; Jiang et al., 2014) δοκιμάστηκε επιτυχώς ως νέα θεραπευτική στρατηγική για την αντιμετώπιση των HER2 θετικών ασθενών καρκίνου του μαστού.

Η έκφραση του RANK έχει συνδεθεί με την αρνητικότητα των ορμονικών υποδοχέων, την υψηλή βαθμό κακοήθειας και κακή πρόγνωση (Pfitzner et al., 2014). Επιπλέον, μια πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη αποκάλυψε τη σχέση της συν-έκφρασης των RANK και RANKL με την κακή πρόγνωση σε τριπλά αρνητικά καρκινώματα μαστού (TNBC) (Reyes et al., 2017). Αξίζει να σημειωθεί ότι η έρευνά μας με MDA-MB-453 κύτταρα έδειξε ότι η διέγερση και η αναστολή του RANKL επηρέασαν τη NF-κΒ σηματοδότηση, τον πολλαπλασιασμό και ελαφρώς τη μετανάστευση, υποδηλώνοντας ένα ρόλο του RANK σε αυτόν τον υπότυπο καρκίνου του μαστού.

Συμπερασματικά, αυτή η μελέτη αποκαλύπτει για πρώτη φορά μια λειτουργική και φυσική σχέση μεταξύ του RANK υποδοχέα και των μελών της οικογένειας EGFR. Ο διμερισμός του RANK με τον HER2 φαίνεται να διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στην εξέλιξη των HER2 θετικών καρκινωμάτων του μαστού. Προτείνουμε λοιπόν έναν καινοτόμο μοριακό μηχανισμό σχετικά με τον ρυθμιστικό

ρόλο του HER2, που εκτελείται μέσω της λειτουργικής διασυννομιλίας του με τον RANK, στη NF-κΒ σηματοδότηση, το βασικό καθοδικό μονοπάτι του RANK. Η IKKα είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του κανονικού NF-κΒ μονοπατιού, που απαιτείται για την ογκογένεση του μαστού και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στις θεραπείες. Η αξιοσημείωτη αντικαρκινική δράση σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο του denosumab όταν συνδυάζεται με αντι-HER2 παράγοντες σε HER2 θετικά καρκινικά κύτταρα μαστού, ανοίγει το δρόμο για το σχεδιασμό θεραπευτικών στρατηγικών με υπάρχοντα φάρμακα που θα μπορούσαν να εφαρμοστούν σε μια συγκεκριμένη υποομάδα ασθενών με HER2 θετικά καρκινώματα μαστού που εκφράζουν τον RANK. Τα *in vitro* ευρήματά μας ενθαρρύνουν την διεξαγωγή περαιτέρω προκλινικών ερευνών και υπογραμμίζουν την ανάγκη σχεδιασμού κλινικών δοκιμών προκειμένου να αξιολογηθεί εάν η στρατηγική της συνδυαστικής αναστολής των δύο σηματοδοτικών μονοπατιών στην διπλά θετική ομάδα ασθενών με καρκίνο του μαστού θα οδηγήσει σε σημαντικά πλεονεκτήματα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alonso A, et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 2004;117:699–711.
- Arkhipov A, et al. Architecture and membrane interactions of the EGF receptor. *Cell* 2013;152:557–69.
- Armstrong AP, et al. RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. *Prostate* (2008) 68:92–104.
- Asselin-Labat, M. L. et al. (2010). Control of mammary stem cell function by steroid hormone signaling. *Nature*, 465(7299), 798-802.
- Bailey, S.T. et al. (2014) NF- κ B activation-induced anti-apoptosis renders HER2-positive cells drug resistant and accelerates tumor growth. *Mol. Cancer Res.* 12, 408–420
- Baselga, J., et al. Mechanism of action of trastuzumab and scientific update. *Seminars in Oncology* 28, 4-11 (2001).
- Basu A, Sivaprasad U. Protein kinase C makes the life and death decision. *Cell Signal* 2007;19:1633–42.
- Biscardi JS, et al. c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem* 1999;274:8335–43.
- Biswas DK, et al. NF- κ B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:10137–42.
- Blobel CP. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:32–43.
- Bocharov EV, et al. Spatial structure of the dimeric transmembrane domain of the growth factor receptor ErbB2 presumably corresponding to the receptor active state. *J Biol Chem* 2008;283:6950–6.
- Body, J.J. et al. (2010) Effects of denosumab in patients with bone metastases with and without previous bisphosphonate exposure. *J. Bone Min. Res.* 25, 440–446
- Boopalan T, et al. Receptor activator for nuclear factor- κ B ligand signaling promotes progesterone-mediated estrogen-induced mammary carcinogenesis. *Cancer Sci.* 2015;106:25–33.
- Bouyain S, et al. The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:15024–9.
- Burgess, A. W. et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Molecular Cell* 12, 541-552 (2003).
- Bustreo, S., et al. (2016). Optimal Ki67 cut-off for luminal breast cancer prognostic evaluation: a large case series study with a long-term follow-up. *Breast Cancer Research and Treatment*, 157(2), 363-371.

Cabrera-Galeana, P., et al. (2018). Ki67 Changes Identify Worse Outcomes in Residual Breast Cancer Tumors After Neoadjuvant Chemotherapy. *The Oncologist*, 23(6), 670-678.

Canon JR, et al. Inhibition of RANKL blocks skeletal tumor progression and improves survival in a mouse model of breast cancer bone metastasis. *Clin Exp Metastasis* (2008) 25:119–29.

Cao, Y. et al. (2001) IKK/ provides an essential link between RANK signaling and cyclinD1 expression during mammary gland development. *Cell* 107, 763–775

Cao, Y. et al. (2007) I κ B kinase / kinase activity is required for self- renewal of ErbB2/Her2-transformed mammary tumor-initiating cells. *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 104, 15852–15857

Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1990;265:7709–12.

Carpenter G, Liao HJ. Trafficking of receptor tyrosine kinases to the nucleus. *Exp Cell Res* 2009;315:1556–66.

Carpenter, B. L. a. G. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends in Cell Biology* 16, 649-656, (2006).

Casimiro S, et al. RANKL/RANK/MMP-1 molecular triad contributes to the metastatic phenotype of breast and prostate cancer cells in vitro. *PLoSOne* (2013) 8:e63153.

Cheang, M.C., et al., Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2009. 101(10): p. 736-50.

Chen G, et al. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer* (2006) 107:289–98.

Chen, R., et al. (2018). Assessment of the predictive role of pretreatment Ki-67 and Ki-67 changes in breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy according to the molecular classification: a retrospective study of 1010 patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 170(1), 35-43.

Chen, Y.J. et al. (2013) Lapatinib-induced NF- κ B activation sensitizes triple-negative breast cancer cells to proteasome inhibitors. *Breast Cancer Res.* 15, R108

Chen L M, et al. RANKL increases migration of human lung cancer cells through intercellular adhesion molecule-1 up-regulation. *J Cell Biochem* (2011) 112:933–41.

Cho HS, et al. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 2003;421:756–60.

Cho HS, Leahy DJ. Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science* 2002;297:1330–3.

Christianson, T. A. et al. NH₂-terminally truncated HER-2/neu protein: Relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Research* 58, 5123-5129 (1998).

Cohen S, et al. A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *J Biol Chem* 1982;257:1523–31.

Cohen S. The epidermal growth factor (EGF). *Cancer* 1983;51:1787–91.

Curioni-Fontecedro A, et al. Primary non-small cell lung cancer response upon treatment with denosumab. *Lung Cancer* (2013) 82:506–8.

Curtis C, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012;486:346–52.

Cuylen, S., et al. (2016). Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature*, 535(7611), 308-312.

David B. Agus, et al. Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *CANCER CELL* 2, 127-138 (2002).

Dennis J. Slamon, et al. Studies of the HER-2/neu Protooncogene in Human Breast and Ovarian Cancer. *Science* 244, 707-712 (1989).

Diana Graus-Porta, et al. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *The EMBO Journal* 16, 1647–1655 (1997).

Duffy, M. J., et al. (2017). Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *European Journal of Cancer*, 75, 284-298.

Edge, S.B. and C.C. Compton, The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*, 2010. 17(6): p. 1471-4.

Elston, C.W. and I.O. Ellis, Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with longterm follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. *Histopathology*, 2002. 41(3A): p. 151-2, discussion 152-3.

Elston, C.W. and I.O. Ellis, Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with longterm follow-up. *Histopathology*, 1991. 19(5): p. 403-10.

Elston, C.W., The assessment of histological differentiation in breast cancer. *Aust N Z J Surg*, 1984. 54(1): p. 11-5.

Endres NF, et al. Conformational coupling across the plasma membrane in activation of the EGF receptor. *Cell* 2013;152:543–56.

Engelman JA. Targeting PI3K signaling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 2009;9:550–62.

Escher C, et al. Two GxxxG-like motifs facilitate promiscuous interactions of the human ErbB transmembrane domains. *J Mol Biol* 2009;389:10–6.

Fata, J.E. et al. (2000) The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 103, 41–50

Feng, Y., et al. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, 5(2), 77-

Ferguson KM, et al. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* 2003;11:507–17.

Fisher, B., et al., Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med*, 2002. 347(16): p. 1233-41.

Fizazi K, et al. Prostate cancer cells-osteoblast interaction shifts expression of growth/survival-related genes in prostate cancer and reduces expression of osteoprotegerin in osteoblasts. *Clin Cancer Res* (2003) 9:2587–97.

Fujii, T., et al. (2017). Revisiting the definition of estrogen receptor positivity in HER2-negative primary breast cancer. *Annals of Oncology*, 28(10), 2420-2428.

Gallagher, C. M., et al. (2016). Survival in patients with non-metastatic breast cancer treated with adjuvant trastuzumab in clinical practice. *SpringerPlus*, 5, 395-016-2008-9. eCollection 2016.

Garrett TP, et al. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor . *Cell* 2002;110:763–73.

Garrett TP, et al. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* 2003;11:495–505.

Ghosh R, et al. Trastuzumab has preferential activity against breast cancers driven by ERBB2 homodimers. *Cancer Res* 2011;71:1871–82.

Giri DK, et al. Endosomal transport of ErbB-2: mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor. *Mol Cell Biol* 2005;25:11005–18.

Giuliano, M., et al. (2013). Bidirectional Crosstalk between the Estrogen Receptor and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Signaling Pathways in Breast Cancer: Molecular Basis and Clinical Implications. *Breast Care*, 8(4), 256-262.

Goldhirsch, A., et al. (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of Oncology*, 24(9), 2206-2223.

Gonzalez-Suarez, E. et al. (2010) RANK ligand mediates progestin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. *Nature* 468, 103–107

Gotoh N, et al. A highly conserved tyrosine residue at codon 845 within the kinase domain is not required for the transforming activity of human epidermal growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;186:768–74.

Graus-Porta D, et al. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 1997;16:1647–55.

Gullick WJ. The Type 1 growth factor receptors and their ligands considered as a complex system. *Endocr Relat Cancer* 2001;8:75–82.

Hammond, M. E., et al. (2010). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(16), 2784-2795.

Harbeck N, et al. HER2 Dimerization Inhibitor Pertuzumab - Mode of Action and Clinical Data in Breast Cancer. *Breast Care*. 2013;8:49–55.

Hayashi, N., et al. (2013). Adding hormonal therapy to chemotherapy and trastuzumab improves prognosis in patients with hormone receptor-positive and human epidermal

growth factor receptor 2-positive primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 137(2), 523-531.

Healey, M. A., et al. (2017). Assessment of Ki67 expression for breast cancer subtype classification and prognosis in the Nurses' Health Study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 166(2), 613-622.

Hein, A. et al. (2014) Polymorphisms in the RANK/RANKL genes and their effect on bone specific prognosis in breast cancer patients. *Biomed. Res. Int.* 2014, 842452

Heitz, F., et al., Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancers exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases. *Eur J Cancer*, 2009. 45(16): p. 2792-8.

Heymann M-F, et al. OPG, RANK and RANK ligand expression in thyroid lesions. *Regul Pept* (2008)148:46–53.

Holen I, et al. Osteoprotegerin (OPG) expression by breast cancer cells in vitro and breast tumours in vivo– a role in tumour cell survival? *Breast Cancer Res Treat* (2005) 92:207–15.

Holen I, et al. Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Res* (2002) 62:1619–23.

Howlader, N., et al. (2014). US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(5), 10.1093/jnci/dju055.

Hyun,K.A. et al. (2016) Epithelial-to-mesenchymal transition leads to loss of EpCAM and different physical properties in circulating tumor cells from metastatic breast cancer. *Oncotarget* 7, 24677–24687

Ithimakin, S. et al. (2013) HER2 drives luminal breast cancer stem cells in the absence of HER2 amplification: implications for efficacy of adjuvant trastuzumab. *Cancer Res.* 73, 1635–1646

Ito R, et al. Expression of osteoprotegerin correlates with aggressiveness and poor prognosis of gastric carcinoma. *Virchows Arch* (2003) 443:146–51.

Jones, D.H. et al. (2006) Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 440, 692–696

Joshi, P. A. et al. 6 (2010). Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature*, 465(7299), 803-807.

Jura N, et al. Mechanismfor activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell* 2009;137:1293–307.

Kadamur G, Ross EM. Mammalian phospholipase C. *Annu Rev Physiol*2013;75:127–54.

Katri Koninki, M. T., et al. HER-2 positive breast cancer: decreasing proportion but stable incidence in Finnish population from 1982 to 2005. *Breast Cancer Res* 11, (2009).

Kearns, A. E., et al. (2008). Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev*, 29(2), 155-192.

- Kim, N.S. et al. (2006) Receptor activator of NF- κ B ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. *Mol. Cell. Biol.* 26, 1002–1013
- Knighton DR, et al. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 1991;253:407–14.
- Knutsvik, G., et al. (2014). Evaluation of Ki67 expression across distinct categories of breast cancer specimens: A population-based study of matched surgical specimens, core needle biopsies and tissue microarrays. *PloS One*, 9(11), e112121.
- Kobashigawa Y, et al. Structural basis for the transforming activity of human cancer-related signaling adaptor protein CRK. *Nat Struct Mol Biol* 2007;14:503–10.
- Koboldt DC, et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490:61–70.
- Konecny, G., et al. (2003). Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(2), 142-153.
- Kos, Z., and Dabbs, D. J. (2016). Biomarker assessment and molecular testing for prognostication in breast cancer. *Histopathology*, 68(1), 70-85.
- Kostenuik PJ, et al. Denosumab, a fully human monoclonal antibody to RANKL, inhibits bone resorption and increases BMD in knock-in mice that express chimeric (murine/human) RANKL. *J Bone Miner Res.* 2009 ;24:182–95.
- Kristine S. Klos, et al. Combined Trastuzumab and Paclitaxel Treatment Better Inhibits ErbB-2-Mediated Angiogenesis in Breast Carcinoma through a More Effective Inhibition of Akt than Either Treatment Alone. *Cancer cell* 98, 1377-1385, (2003).
- Le, X. F. et al. The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) in anti-HER2 antibody-induced G(1) cell cycle arrest and tumor growth inhibition. *J Biol Chem* 278, 23441-23450, (2003).
- Lee, H. J., et al. (2014). Two histopathologically different diseases: Hormone receptor-positive and hormone receptor-negative tumors in HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 145(3), 615-623.
- Lee, R. J. et al. Cyclin D1 is required for transformation by activated Neu and is induced through an E2F-dependent signaling pathway. *Mol Cel Biol* 20, 672-683 (2000).
- Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141:1117–34.
- Li W, She H. The SH2 and SH3 adapter Nck: a two-gene family and a linker between tyrosine kinases and multiple signaling networks. *Histol Histopathol* 2000;15:947–55.
- Lipton, A. et al. (2015) Effect of denosumab versus zoledronic acid in preventing skeletal-related events in patients with bone metastases by baseline characteristics. *Eur.J.Cancer* 53, 75–83
- Liu, M. et al. (2010) The canonical NF- κ B pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer Res.* 70, 10464–10473
- Lo HW, et al. Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin α 1 and CRM1. *J Cell Biochem* 2006;98:1570–83.

- Lopez, F., et al. (1991). Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry*, 12(1), 42-49.
- López-Ruiz P, et al. SHP-1 in cell-cycle regulation. *Anticancer Agents Med Chem* 2011;11:89–98.
- Louis M Weiner and G. P. Adams. New approaches to antibody therapy. *Oncogene* 19, 6144 - 6151 (2000).
- Lowenstein EJ, et al. The SH2and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases toras signaling. *Cell* 1992;70:431–42.
- Luo J-L, et al. Nuclear cytokine-activated IKK alpha controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin. *Nature* (2007) 446:690–4.
- Ma, C. et al. (2013) Lapatinib inhibits the activation of NF-κB through reducing phosphorylation of IκB/ in breast cancer cells. *Oncol. Rep.* 29, 812–818
- Ma, Y. L., et al. (2001). Catabolic effects of continuous human PTH (1--38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology*, 142(9), 4047-4054.
- Macdonald-Obermann JL, et al. Mechanics of EGF receptor/ErbB2 kinase activation revealed by luciferase fragment complementation imaging. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:137–42.
- Mani, S.A. et al. (2008) The epithelial–mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704–715
- Manning G, et al. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002;298:1912–34.
- Matsen, C.B. and L.A. Neumayer, Breast cancer: a review for the general surgeon. *JAMA Surg*, 2013. 148(10): p. 971-9.
- Matthew C. Franklin, et al. Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* 5, 317-328 (2004).
- Mayfield, S., et al. DNA strand breaks and cell cycle perturbation in Herceptin treated breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 70, 123-129 (2001).
- Mazzocco M, et al. The identification of a novel human homologue of the SH3 binding glutamic acid-rich(SH3BGR) gene establishes a new family of highly conserved small proteins related to thioredoxin superfamily. *Gene* 2002;291:233–9.
- Meharena HS, et al. Deciphering the structural basis of eukaryotic protein kinase regulation. *PLoS Biol* 2013;11:e1001680.
- Mikami S, et al. Increased RANKL expression is related to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas. *J Pathol* (2009) 218:530–9.
- Miller RE, et al. RANK ligand inhibition plus docetaxel improves survival and reduces tumor burden in a murine model of prostate cancer bone metastasis. *Mol Cancer Ther* (2008) 7:2160–9.
- Mineev KS, et al. Spatial structure of the transmembrane domain heterodimer of ErbB1 andErbB2 receptor tyrosine kinases. *J Mol Biol* 2010;400:231–43.

- Mizutani Y, et al. Prognostic significance of serum osteoprotegerin levels in patients with bladder carcinoma. *Cancer* (2004) 101:1794–802.
- Mochly-Rosen D, et al. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Discov* 2012;11:937–57.
- Muftah, A. A., et al. (2017). Ki67 expression in invasive breast cancer: the use of tissue microarrays compared with whole tissue sections. *Breast Cancer Research and Treatment*, 164(2), 341–348.
- Mukherjee, A. et al. (2010) Targeting RANKL to a specific subset of murine mammary epithelial cells induces ordered branching morphogenesis and alveologenesis in the absence of progesterone receptor expression. *FASEB J.* 24, 4408–4419
- Mulac-Jericevic, B. et al. (2003) Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor Bisoforn. *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100, 9744–9749
- Nagy, V., & Penninger, J. M. (2015). The RANKL-RANK Story. *Gerontology*, 61(6), 534–542.
- Niikura, N., et al. (2014). Prognostic significance of the Ki67 scoring categories in breast cancer subgroups. *Clinical Breast Cancer*, 14(5), 323–329.e3.
- Nitz, U., et al. (2014). Final analysis of the prospective WSG-AGO EC-doc versus FEC phase III trial in intermediate-risk (pN1) early breast cancer: efficacy and predictive value of Ki67 Nolen B, Taylor S, Ghosh G. Regulation of protein kinases: controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell* 2004;15:661–75.
- Nolan, E. et al. (2016) RANK ligand as a potential target for breast cancer prevention in BRCA1-mutation carriers. *Nat. Med.*
- Obr, A.E. et al. (2013) Progesterone receptor and Stat5 signaling cross talk through RANKL in mammary epithelial cells. *Mol. Endocrinol.* 27, 1808–1824
- Odero-MaravVA, et al. Receptor activator of NF kappa B Ligand (RANKL) expression is associated with epithelial to mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cell Res* (2008) 18:858–70.
- Ogiso H, et al. Crystalstructure of the complex of human epidermal growth factor and receptorextracellular domains. *Cell* 2002;110:775–87.
- Onitilo, A.A., et al., Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. *Clin Med Res*, 2009. 7(1-2): p.4–13.
- Palafox, M. et al. (2012) RANK induces epithelial-mesenchymal transition and stemness in human mammary epithelial cells and promotes tumorigenesis and metastasis. *Cancer Res.* 72, 2879–2888
- Panjarian S, et al. Structure and dynamic regulation of Abl kinases. *J Biol Chem* 2013;288:5443–50.
- Papanastasiou AD, et al. RANK and EGFR in invasive breast carcinoma. *Cancer Genet.* 2017;216–217:61–6.
- Park, Y. H., et al. (2010). Patterns of relapse and metastatic spread in HER2-overexpressing breast cancer according to estrogen receptor status. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 66(3), 507–516.

- Pauletti, G., et al. (2000). Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Journal of Clinical Oncology*, 18(21), 3651-3664.
- Pellegrini, P. et al. (2013) Constitutive activation of RANK disrupts mammary cell fate leading to tumorigenesis. *Stem Cells* 31, 1954–1965
- Perez EA, et al. NCCTG N9831, May 2005. Presented at the 45th annual meeting of the American Society of Clinical Oncology, Orlando, FL, . (2005).
- Perou, C. M., et al. (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." *Nature* 406 (6797):747-52
- Pfitzner, B.M. et al. (2014) RANK expression as a prognostic and predictive marker in breast cancer. *Breast Cancer Res.Treat.* 145, 307–315
- Pinkas-Kramarski R, et al. Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J* 1996;15:2452–67.
- Prenzel, N., et al. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocrine-Related Cancer* 8, 11-31 (2001).
- Rakha EA, Green AR. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. *Pathology*. 2017;49:111–9.
- Rao, S., et al. (2018). RANKL and RANK: From Mammalian Physiology to Cancer Treatment. *Trends Cell Biol*, 28(3), 213-223.
- Red Brewer M, et al. The juxtamembrane region of the EGF receptor functions as an activation domain. *Mol Cell* 2009;34:641–51.
- Renema, N., et al. (2016). RANK-RANKL signalling in cancer. *Biosci Rep*, 36(4).
- Reyes ME, et al. Poor prognosis of patients with triple-negative breast cancer can be stratified by RANK and RANKL dual expression. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;164:57–67.
- Rita Nahta, et al. The HER-2-Targeting Antibodies Trastuzumab and Pertuzumab Synergistically Inhibit the Survival of Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 64, 2343–2346 (2004).
- Rose-John S. ADAM17, shedding, TACE as therapeutic targets. *Pharmacol Res* 2013;71:19–22.
- Roskoski Jr R. MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;417:5–10.[88] Roskoski Jr R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 2012;66:105–43.
- Roskoski Jr R. RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;399:313–7.
- Roskoski Jr R. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;324:1155–64.

Sacks, N.P. and M. Baum, Primary management of carcinoma of the breast. *Lancet*, 1993. 342(8884): p. 1402-8.

Santini D, et al. Expression pattern of receptor activator of NF κ B (RANK) in a series of primary solid tumors and related bone metastases. *J Cell Physiol* (2011) 226:780–4.

Santini, D. et al. (2011) Receptor activator of NF- κ B (RANK) expression in primary tumors associates with bone metastasis occurrence in breast cancer patients. *PLoS ONE* 6, e19234

Sasaki A, et al. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) expression in hepatocellular carcinoma with bone metastasis. *Ann Surg Oncol* (2007) 14:1191–9.

Sauter, G., et al. Guidelines for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing: Biologic and Methodologic Considerations. *J Clin Oncol* 27, 1323-1333, (2009).

Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 2002;110:669–72.

Schmiedel BJ, et al. RANKL expression, function, and therapeutic targeting in multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* (2013) 73:683–94.

Schramek, D. et al. (2010) Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progesterin-driven mammary cancer. *Nature* 468, 98–102

Seidman AD, et al. . CALGB 9840: phase III study of weekly (W) paclitaxel (P) via 1-hour (h) infusion versus standard (S) 3h infusion every third week in the treatment of metastatic breast cancer (MBC), with trastuzumab (T) for HER2 positive MBC and randomized for T in HER2 normal MBC. *Proc Am Soc Clin Oncol* 23, 512 (2004).

Senkus, E., et al., Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 2013. 24 Suppl 6: p. vi7-23.

Seshacharyulu P, et al. Target-ing the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2012;16:15–31.

Sherr, C. J. & Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G(1)-phase progression. *Genes & Development* 13, 1501-1512 (1999).

Shi F, et al. ErbB3/HER3 intra-cellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:7692–7.

Shipman CM, Croucher PI. Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor- related apoptosis- inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. *Cancer Res* (2003) 63:912–6.

Sigl, V., et al. (2016). RANKL/RANK control Brca1 mutation-driven mammary tumors. *Cell Res*, 26(7), 761-774.

Sircoulomb, F., et al. (2010). Genome profiling of ERBB2-amplified breast cancers. *BMC Cancer*, 10, 539-2407-10-539.

Sliwkowski MX, et al. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). (1999).

Sobecki, M., et al. (2016). The cell proliferation antigen Ki-67 organizes heterochromatin. *eLife*, 5, e13722.

- Sobin, L.H., TNM: evolution and relation to other prognostic factors. *Semin Surg Oncol*, 2003. 21(1): p. 3-7.
- Sorlie, T., et al. (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (19):10869-74
- Srivastava, S. et al. (2003) Receptor activator of NF- κ B ligand induction via Jak2 and Stat5a in mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278, 46171–46178
- Stålhammar, G., et al. (2018). Digital image analysis of Ki67 in hot spots is superior to both manual Ki67 and mitotic counts in breast cancer. *Histopathology*, 72(6), 974-989.
- Stewart ZA, Pietenpol JA. Syk: a new player in the field of breast cancer. *BreastCancer Res* 2001;3:5–7.
- Strasser-Weippl, K., et al. (2015). Long-term hazard of recurrence in HER2+ breast cancer patients untreated with anti-HER2 therapy. *Breast Cancer Research*, 17, 56-015-0568-1.
- Sun, X., and Kaufman, P. D. (2018). Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, 127(2), 175-186.
- Tan, W. et al. (2011) Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature* 470, 548–553
- Tanos, T. et al. (2013) Progesterone/RANKL is a major regulatory axis in the human breast. *Sci. Transl. Med.* 5, 182ra155
- Taylor SS, et al. Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches. *Philos Trans R Soc Lond BiolSci* 2012;367:2517–28.
- Tenev T, et al. Perinuclear localization of the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 and inhibition of epidermal growth factor-stimulated STAT1/3 activation in A431 cells. *EurJ Cell Biol* 2000;79:261–71.
- Theoleyre, S., et al. (2004). The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15(6), 457-475.
- Thomas Holbro, et al. The ErbB2 ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Medical Sciences* 100, 8933–8938, (2003).
- Thompson DM, Gill GN. The EGF receptor: structure, regulation, and potential role in malignancy. *Cancer Surv* 1985;4:767–88.
- Tice DA, et al. Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Proc Natl AcadSci USA* 1999;96:1415–20.expression. *Annals of Oncology*, 25(8), 1551-1557.
- Tocque B, et al. Ras-GTPase activating protein (GAP): a putative effector for Ras. *Cell Signal* 1997;9:153–8.
- Tsubaki, M. et al. (2013) Activation of NF- κ B by the RANKL/RANK system up-regulates snail and twist expressions and induces epithelial-to-mesenchymal transition in mammary tumor cell lines. *J. Exp.Clin.CancerRes.* 32, 62

Tzahar E, et al. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 1996;16:5276–87.

Ullrich A, et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 1984;309:418–25.

Vanderkerken K, et al. Recombinant osteoprotegerin decreases tumor burden and increases survival in a murine model of multiple myeloma. *Cancer Res* (2003) 63:287–9.

Vanhaesebroeck B, et al. PI3K signaling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:195–203.

Varshney, D., et al. Determination of HER-2 status and chromosome 17 polysomy in breast carcinomas comparing HercepTest and PathVysion FISH assay. *American Journal of Clinical Pathology* 121, 70-77, (2004).

Vaz-Luis, I., et al. (2012). Impact of hormone receptor status on patterns of recurrence and clinical outcomes among patients with human epidermal growth factor-2- positive breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network: a prospective cohort study. *Breast Cancer Research*, 14(5), R129.

Vici, P., et al. (2015). Triple positive breast cancer: a distinct subtype? *Cancer Treatment Reviews*, 41(2), 69-76.

Voduc, K. D., et al. (2010). Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *Journal of Clinical Oncology*, 28(10), 1684-1691.

von Minckwitz G, et al. Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2017;377:122–31.

Wang SC, Hung MC. Nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor family membrane tyrosine kinase receptors. *Clin Cancer Res* 2009;15:6484–9.

Weinberg, R. A. *The Biology of Cancer*. Garland Science (2007).

Wilson KJ, et al. Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer. *Pharmacol Ther* 2009;122:1–8.

Wolff, A. C., et al. (2018). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 142(11), 1364-1382.

Wood ER, et al. 6-Ethynylthieno[3,2-d]- and 6-ethynylthieno[2,3-d]pyrimidin-4-anilines astunable covalent modifiers of ErbB kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:2773–8. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:6208.

Xu, C. et al. (2015) Let-7a regulates mammosphere formation capacity through Ras/NF- κ B and Ras/MAPK/ERK pathway in breast cancer stem cells. *Cell Cycle* 14, 1686–1697

Yang J, et al. Crystal structure of human protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *J Biol Chem* 2003;278:6516–20.

Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer* 2012;12:553–63.

- Yersal, O. and S. Barutca, Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*, 2014. 5(3): p. 412-24.
- Yi T, et al. Epidermal growth factor receptor regulates osteoclast differentiation and survival through cross-talking with RANK signaling. *J Cell Physiol*. 2008;217:409–22.
- Yotaro Izumi, et al. Herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* 416, 279- 280 (2002).
- Yu, D. H. & Hung, M. C. Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *Oncogene* 19, 6115-6121 (2000).
- Zell, J. A., et al. Prognostic impact of human epidermal growth factor-like receptor 2 and hormone receptor status in inflammatory breast cancer (IBC): analysis of 2,014 IBC patient cases from the California Cancer Registry. *Breast Cancer Res* 11, (2009).
- Zhang X, et al. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 2006;125:1137–49.
- Zhang, L. et al. (2012) C-Src-mediated RANKL-induced breast cancer cell migration by activation of the ERK and Akt pathway. *Oncol. Lett.* 3, 395–400
- Zhang, L. et al. (2012) Receptor activator for nuclear factor kB expression predicts poor prognosis in breast cancer patients with bone metastasis but not in patients with visceral metastasis. *J. Clin. Pathol.* 65, 36–40
- Zhou X, Agazie YM. Molecular mechanism for SHP2 in promoting HER2-induced signaling and transformation. *J Biol Chem* 2009;284:12226–34.
- Zhou, B. H. P. et al. Cytoplasmic localization of p21(Cip1/WAF1) by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nature Cell Biol* 3, 245-252 (2001).
- Zoi I, et al. RANKL Signaling and ErbB Receptors in Breast Carcinogenesis. *Trends Mol Med*. 2016;22:839–50.
- Zurawska, U., et al. (2013). Outcomes of her2-positive early-stage breast cancer in the trastuzumab era: a population-based study of Canadian patients. *Current Oncology*, 20(6), e539-45.
- Zwick, E., et al. Receptor tyrosine kinase signaling as a target for cancer intervention strategies. *Endocrine-Related Cancer* 8, 161-173 (2001).