



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α΄ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Ν. ΚΑΒΑΝΤΖΑΣ ΚΑΘ. ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΚΠΑ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ: ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ  
ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΗΣ  
ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ (ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ)»

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΠΜΣ

ΣΤ. ΘΕΟΧΑΡΗΣ ΚΑΘ. ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΚΠΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Εξωσώματα και αντοχή στη χημειοθεραπεία στον καρκίνο του  
μαστού

Όν/μο: Δημήτριος Σ. Ανδριόπουλος

Αρ. μητρώου: 20200651

Ιδιότητα: Ιατρός, Μεταπτυχιακός φοιτητής

Επιβλέπων ΜΔΕ: Σ. Θεοχάρης

ΑΘΗΝΑ, ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2024

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη

**«Νεοπλασματική Νόσος στον Άνθρωπο:**

**Έρευνα και Κλινικοπαθολογοανατομική Προσέγγιση στα Πλαίσια της Εξατομικευμένης Ιατρικής (Διάγνωση και Στοχευμένη Θεραπεία)»**

που απονέμει η Ιατρική Σχολή του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

**Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ**

**ΒΑΘΜΙΔΑ**

**ΥΠΟΓΡΑΦΗ**

**Σ. Θεοχάρης**

**ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

.....

**Μ. Καραμούζης**

**ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

.....

**Γ. Τσουρούφλης**

**ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

.....

**ΣΕΛΙΔΑ ΕΓΚΡΙΣΗΣ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

**Εξωσώματα και ανοχή στη χημειοθεραπεία στον καρκίνο του μαστού**

**ΑΝΔΡΙΟΠΟΥΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

**ΑΜ: 20200651**

**Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ**

**ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ**

**ΒΑΘΜΙΔΑ**

**ΥΠΟΓΡΑΦΗ**

**Σ. Θεοχάρης**

**ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

.....

**- Ημερομηνία εξέτασης: .....27/02/2024.....**

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΕΛ 5
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΕΛ7
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΣΕΛ 8
  - A.Επιδημιολογία του καρκίνου του μαστού ΣΕΛ 8
  - B. Γενετική προδιάθεση και παράγοντες κινδύνου στον καρκίνο του μαστού ΣΕΛ 8
  - Γ. Γενετικές αλλαγές και μοριακοί υπότυποι ΣΕΛ 9
  - Δ. Αντίσταση στη χημειοθεραπεία στον καρκίνο του μαστού ΣΕΛ 10
  - E. Εξωσώματα , Προέλευση , Βιοσύνθεση ΣΕΛ 12
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΕΙΣ ABC ΣΕΛ 14
  - A. ABCG2, ABCB1 και ABCC2 ΣΕΛ 14
  - B.Το σύμπλεγμα εζρίνης , ραδισίνης, μοεσίνης ΣΕΛ 14
  - Γ.Εμβιομηχανική και ακαμψία ιστών ΣΕΛ 15
  - Δ. Μοριακό μονοπάτι PI3K/Akt ΣΕΛ 16
  - E. Δίαυλος ασβεστίου TrpC5 ΣΕΛ 16
  - ΣΤ. UCH-L1 ΣΕΛ 17
5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ GSTP-1 ΣΕΛ 18
6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ HER ΣΕΛ 19
  - A. Εξωσώματα και HER2 ΣΕΛ19
  - B.Εξωσώματα και HER3,4 ΣΕΛ 20
7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ, ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ, ΧΗΜΕΙΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΤΡΙΠΛΑ ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΣΕΛ 21
8. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ miRNAS ΣΕΛ 23
  - A. Προέλευση, βιοσύνθεση, λειτουργία ΣΕΛ 23

- B. Μελέτες αντοχής στη χημειοθεραπεία ΣΕΛ 24
  - Γ. miR-451 και ορμονοεξαρτώμενος καρκίνος του μαστού ΣΕΛ 28
  - Δ. Εξωσωματικά miRNAs, αυτοφαγία και HER2 καρκίνος ΣΕΛ 28
  - Ε. Εξωσωματικά miRNAs και τριπλά αρνητικά καρκίνος του μαστού ΣΕΛ 29
  - ΣΤ. Εξωσωματικά miRNAs και ABC υποδοχείς ΣΕΛ 29
  - Ζ. Εξωσώματα, miRNAs και μικροπεριβάλλον του όγκου ΣΕΛ 30
  - Η. Εξωσώματα, miRNAs και κυκλίνες ΣΕΛ 34
9. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ LNCRNAS (LONG-NON-CODING RNAS) ΣΕΛ 36
  10. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΚΥΚΛΙΚΟ NONCODING RNA ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΣΕΛ 38
  11. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΜΤDNA ΣΕΛ 40
  12. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΛΟΙΠΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΧΗΜΕΙΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΣΕΛ 41
    - A. Εξωσώματα και σερβαϊβίνη ΣΕΛ 41
    - B. Εξωσώματα και αντοχή στους αναστολείς CDK4/6 (Cyclin-dependent kinase 4 and 6) ΣΕΛ 41
  13. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΣΕΛ 43
  14. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΣΕΛ 44

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την πιο συχνή κακοήθεια παγκοσμίως και ενώ θεωρείται ιάσιμος εάν εντοπιστεί σε πρώιμο στάδιο, η πρόγνωση για προχωρημένα περιστατικά παραμένει πτωχή. Παρά τις αλματώδεις προόδους της εξατομικευμένης ιατρικής και της ογκολογίας ακριβείας, οι περισσότεροι καρκίνοι αρχικά ανταποκρίνονται στη θεραπεία και στη συνέχεια αναπόφευκτα υποτροπιάζουν/προχωρούν. Η χημειοαντίσταση, η οποία μπορεί να εκδηλωθεί ως εγγενής ή επίκτητη, είναι ένα μείζον ζήτημα που εμποδίζει τις θεραπευτικές μας προσπάθειες. Τα εξωσώματα είναι μικροκυστίδια που προέρχονται από την εσωτερική εκβλάστηση της κυτταρικής μεμβράνης, προέρχονται από την οδό των ενδοσωμάτων και είναι απορυθμισμένα στον καρκίνο. Μπορούν να απομονωθούν από όλους τους ιστούς και τα βιολογικά υγρά και το περιεχόμενό τους αντικατοπτρίζει το κύτταρο προέλευσης. Το φορτίο τους αποτελείται από πρωτεΐνες, λιπίδια, DNA, mRNA και μη κωδικο- RNA. Σε αυτήν την ανασκόπηση, θα προσπαθήσουμε να διερευνήσουμε πώς τα εξωσώματα μπορούν να μεταφέρουν το περιεχόμενό τους στα καρκινικά κύτταρα του μαστού και να προκαλέσουν χημειοανθεκτικότητα. Θα εστιάσουμε κυρίως στην οριζόντια μεταφορά πρωτεϊνών, miRNAs, lncRNAs και circRNAs καθιερώνοντας την αξία τους ως πιθανό μελλοντικό προγνωστικό βιοδείκτη.

Λέξεις κλειδιά: καρκίνος μαστού, μικροκυστίδια, εξωσώματα, χημειοαντίσταση

## **SUMMARY**

Breast cancer constitutes the most frequent malignancy globally and while it is considered curable if detected at an early stage, the prognosis for advanced cases remains poor. Despite the advent of tailored medicine and precision oncology, most cancers will initially respond to treatment and then inevitably relapse/progress. Chemoresistance, which can manifest as de novo or acquired, is a major issue that hinders our therapeutic attempts. Exosomes are microvesicles that stem from the inward budding of the cell membrane, are derived from the endosomal pathway and are dysregulated in cancer. They can be isolated from all tissues and biological fluids and their contents reflect the cell of origin. Their cargo consists of proteins, lipids, DNA, mRNA, and non-coding RNA. In this review, we will attempt to explore how exosomes, can transport their cargo to recipient breast cancer cells and induce chemoresistance. We will mainly focus on the horizontal transfer of proteins, miRNAs and lncRNAs establishing their value as a potential future predictive biomarker.

Keywords: breast cancer, microvesicles, exosomes, chemoresistance

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του μαστού παραμένει μία από τις προκλήσεις στον τομέα της ογκολογίας. Από τον Ιπποκράτη και τον Γαληνό που προσπαθούσαν να ερμηνεύσουν την φύση της νόσου στον πρωτοπόρο για τα δεδομένα της εποχής Halsted που εφάρμοσε την ριζική μαστεκτομή και από εκεί στην εποχή των big data , των multi-omics , της ογκολογίας ακριβείας και της βιολογίας μονήρους κυττάρου, η ανθρωπότητα έχει επιδοθεί σε μία ατέρμονη μάχη με την επάρατη νόσο. Η χημειοθεραπεία αποτελεί ένα από τα πολυτιμότερα όπλα στην θεραπευτική μας φαρέτρα. Δυστυχώς τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν μία μοναδική ικανότητα να επιβιώνουν παρά την έκθεση σε μυριάδες χημειοθεραπευτικές ουσίες, μία σημαντική δυσκολία για την επίτευξη θετικών αποτελεσμάτων για τους ασθενείς. Ερευνητές συνεχίζουν να αποκαλύπτουν τους συναρπαστικούς και συνάμα πολύπλοκους μηχανισμούς που κρύβονται πίσω από το φαινόμενο της αντοχής και η ανάγκη για καινοτόμες και στοχευμένες στρατηγικές γίνεται όλο και πιο επιτακτική.

Αυτό το έργο αποσκοπεί στο να εμβαθύνει στον περίπλοκο χώρο της αντοχής υπό την οπτική της επιγενετικής και των εξωσωμάτων. Αυτά τα μικροκυστίδια είναι πανταχού παρόντα και παρά το μέγεθος τους έχουν τεράστια συμμετοχή στην διασφάλιση της επιβίωσης του καρκίνου του μαστού. Θα επιχειρήσουμε να ρίξουμε φως στους μηχανισμούς ανάπτυξης αντοχής και στοχεύουμε στο να εντοπίσουμε νέες προσεγγίσεις για παρέμβαση .

Η παρούσα εργασία στηρίχθηκε στην βάση δεδομένων PUBMED και του αλγορίθμου αναζήτησης: ( " exosome\* " OR " extracellular vesicles " ) AND " breast cancer " AND " resistance ". Συμπεριλήφθησαν άρθρα από το 2005 έως και το 2022 και επιχειρήθηκε η αντικειμενικότερη ανάλυσή τους

Μαζί θα εξερευνήσουμε το καρκίνο και το μικροπεριβάλλον του και θα διαπιστώσουμε πως αυτός ο δαρβινικός μικρόκοσμος δεν είναι στατικός αλλά επικοινωνεί και εξελίσσεται διαρκώς με τα εξωσώματα να διαδραματίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στις διεργασίες αυτές.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

### A.Επιδημιολογία του καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού σύμφωνα με τα πλέον επικαιροποιημένα στοιχεία τα οποία διαθέτουμε μέσω της μελέτης GLOBOCAN 2020 έχει καταφέρει να ξεπεράσει τον καρκίνο του πνεύμονα όντας η κακοήθεια με την μεγαλύτερη επίπτωση παγκοσμίως . Εκτιμάται ότι 2,3 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις διεγνώσθησαν εντός του 2020, 11,7% επί του συνόλου των καρκίνων. Δυστυχώς περίπου 685.000 άνθρωποι απεβίωσαν εξαιτίας της νόσου τους τοποθετώντας τον καρκίνο του μαστού στην πέμπτη θέση της κατάταξης θνητότητας. Ειδικότερα για τις γυναίκες, η μελέτη GLOBOCAN 2020 αναφέρει πως σε 159 από τις 185 χώρες για τις οποίες διαθέτουμε στοιχεία ο καρκίνος του μαστού είναι πρώτος σε επίπτωση ενώ είναι πρώτος σε θνητότητα σε 110 χώρες εξ αυτών. Η συχνότητα εμφάνισης παρουσιάζει σημαντικότερη διακύμανση αναλόγως των γεωπολιτικών και οικονομικών συνθηκών που εξετάζονται. Σε ανεπτυγμένες χώρες με υψηλό Human Development Index (HDI) π.χ. Βόρεια Αμερική και Αυστραλία η επίπτωση είναι αρκετά υψηλότερη, 55.9/100.000 πληθυσμού σε σχέση με αναπτυσσόμενες χώρες της Αφρικής, νοτιοανατολικής Ασίας < 40/100.000, ωστόσο η τάση αυτή αντιστρέφεται όταν μελετάμε την θνητότητα. Αυτή η επιδημιολογική παρατήρηση αντικατοπτρίζει διαφορές τόσο σε γνωστούς παράγοντες κινδύνου ( γενετικούς, ορμονικούς, δυτικός τρόπος ζωής και δίαιτα ) αλλά και στην πιο γρήγορη και πρωιμότερη εντόπιση στις ανεπτυγμένες χώρες, λόγω καλύτερης πρόσβασης σε διαγνωστικούς ελέγχους, όπως μαστογραφία και υπερηχογράφημα μαστού [1].

### B.Γενετική προδιάθεση και παράγοντες κινδύνου στον καρκίνο του μαστού

Υπολογίζεται πως σχεδόν το 10% του καρκίνου του μαστού οφείλεται σε κληρονομικούς προδιαθεσικούς παράγοντες και σχετίζεται με το οικογενειακό ιστορικό . Το γονίδιο BRCA1 το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 (17q21) αλλά και το γονίδιο BRCA2 του χρωμοσώματος 13 (13q13) κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού των χρωματίδων και οι μεταλλάξεις τους ανεβάζουν την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε γυναίκες έως τα 80 έτη σε 72% και 69% αντιστοίχως. Άνδρες που φέρουν μετάλλαξη του

BRCA2 έχουν έναν δια βίου σχετικό κίνδυνο της τάξης του 6%. Επιπροσθέτως μέσω της αλληλούχισης νέας γενιάς (next-generation sequencing) έχουν εντοπιστεί και άλλες γαμετικές -germline μεταλλάξεις σε γονίδια που εντείνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Τα κυριότερα εξ αυτών είναι τα ATM, CHEK2, PALB2, PTEN, STK11, TP53, RAD51C, BARD1 και πρόκειται για ογκοκατασταλτικά γονίδια τα οποία όπως και τα BRCA1/2 εμπλέκονται στην διατήρηση της συνοχής του γονιδιώματος και την επιδιόρθωση τυχόν βλαβών [1-4].

Σημαντικότεροι παράγοντες κινδύνου φαίνεται να σχετίζονται με αλλαγές που επιφέρει ο σύγχρονος τρόπος ζωής στις αναπαραγωγικές μας συνήθειες καθώς και με το ορμονικό περιβάλλον στο οποίο εκτίθεται ο μαστός κατά τη διάρκεια ζωής. ( πρώιμη εμμηναρχή, όψιμη εμμηνόπαυση, προχωρημένη ηλικία πρώτης εγκυμοσύνης , λιγότερος αριθμός τέκνων, συντομότερη διακοπή του βρεφικού θηλασμού ) Σημειωτέον , η χρήση αντισυλληπτικών εξακολουθεί να αποτελεί θέμα έντονης αντιπαράθεσης στους κόλπους της επιστημονικής κοινότητας. Πέραν αυτών, το λεγόμενο μεταβολικό σύνδρομο και οι συνιστώσες του ανήκουν στους τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου καρκίνου του μαστού. Παχυσαρκία, αντίσταση στην ινσουλίνη και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης, καθιστικός τρόπος ζωής με έλλειψη φυσικής δραστηριότητας, κάπνισμα, κατανάλωση αλκοόλ ενοχοποιούνται για το περίπου το 20 % των περιστατικών. Ενδεικτικά μόνο αναφέρεται ότι έρευνες έχουν δείξει πως 10 γραμμάρια καθημερινής κατανάλωσης αλκοόλ ( ισοδυναμούν με ένα ποτό ) αυξάνουν τον κίνδυνο κατά 7-10% είτε πρόκειται για προεμμηνοπαυσιακές ή μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες [1-2].

### **Γ.Γενετικές αλλαγές και μοριακοί υπότυποι**

Σε μοριακό επίπεδο ο καρκίνος του μαστού συνιστά μία ετερογενή νόσο. Αν και δεν γνωρίζουμε τον επακριβή μηχανισμό εκκίνησης της καρκινογένεσης τα δύο πιο επικρατή μοντέλα είναι αυτό της κλωνικής εξάπλωσης όπου διαδοχικές μεταλλάξεις προσδίδουν ένα εξελικτικό πλεονέκτημα επιβίωσης στο καρκινικό κύτταρο το οποίο συσσωρεύεται με την πάροδο του χρόνου αλλά και εκείνο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων όπου σε αυτή τη διεργασία μόνο προγονικά κύτταρα διαθέτουν την ικανότητα έναρξης και διατήρησης του όγκου [2].

Όσον αφορά την γενετική υπογραφή του καρκίνου του μαστού οι πιο συχνά απαντώμενες χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι η ενίσχυση των 1q, 11q13, 17q12, και απώλεια των 11q13, 13q, 16q [2]. Σε επίπεδο γονιδίων οι πιο συχνές μεταλλάξεις/ενισχύσεις κατά σειρά φθίνουσας συχνότητας είναι TP53 (41%), PIK3CA (30%), MYC (20%), PTEN (16%), CCND1 (16%), ERBB2 (13%), FGFR1 (11%) and GATA3 (10%) και αφορούν πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, μεταγραφικούς παράγοντες, κυτταρικούς υποδοχείς και δεύτερους αγγελιοφόρους με πολύπλοκες επιδράσεις στον πολλαπλασιασμό και στην επιβίωση των κυττάρων που άλλοτε ενεργοποιούνται (π.χ Κυκλίνη D1) και άλλοτε αναστέλλονται (ογκοκατασταλτικό γονίδιο PTEN) [2].

Στην καθημέρα κλινική πράξη χρησιμοποιούμε ανοσοϊστοχημικούς δείκτες για να κατατάξουμε τους όγκους σε υποομάδες με πολύ διαφορετική πρόγνωση καθώς και ενδεδειγμένη θεραπευτική προσέγγιση. Απαραίτητη κρίνεται η πληροφορία ως προς την έκφραση του υποδοχέα οιστρογόνων ER, προγεσταγόνων PR, του HER2, των κυττοκερατινών 5 και 6 καθώς και στο δείκτη πολλαπλασιασμού ki67. Βάσει αυτών προκύπτουν οι εξής ομάδες: Luminal A (ER+ και/ή PR+, HER2- Ki67 low), luminal B (ER+ και/ή PR+, HER2- Ki67 high), luminal-HER2 (ER+ και/ή PR+ and HER2+), HER2-enriched (ER-, PR-, HER2+), basal-like (ER-, PR-, HER2-, και EFGR+ ή CK5/6+), και triple-negative-τριπλά αρνητικός (TN) (ER-, PR-, HER2-). Αξίζει να διευκρινιστεί ότι ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού παρουσιάζει υψηλό επιπολασμό μετάλλαξης του p53 και εμφανίζει basal-like χαρακτηριστικά αλλά ταξινομείται ως TN-non basal [2-4].

#### **Δ.Αντίσταση στη χημειοθεραπεία στον καρκίνο του μαστού**

Δυστυχώς η εμφάνιση ανοχής στην χημειοθεραπεία του καρκίνου του μαστού είναι ένα φαινόμενο άρρηκτα συνδεδεμένο με την υψηλή του θνησιμότητα. Επίσης δεν έχουν καθιερωθεί ακόμα αξιόπιστες μέθοδοι που θα ξεχωρίζουν τα άτομα που θα ανταποκριθούν στην θεραπεία από αυτά που δεν θα αντλήσουν το οποιοδήποτε κλινικό όφελος. Αυτό το γεγονός συχνά έχει ως αποτέλεσμα ασθενείς να υποβάλλονται σε πολλαπλούς και μάταιους κύκλους θεραπειών με οδυνηρές συνέπειες στην αυτονομία, αξιοπρέπεια και το επίπεδο ζωής τους. Συνεπώς δεν μπορεί να τονιστεί αρκετά το πόσο πρωταρχικής σημασίας είναι να διαλευκανθούν εις βάθος οι μηχανισμοί αντίστασης στην χημειοθεραπεία. Σύμφωνα με τα μέχρι στιγμής στοιχεία, μία πληθώρα γενετικών,

επιγενετικών, μεταβολικών καθώς και ανοσολογικών παραγόντων εμπλέκονται και συμμετέχουν στην δημιουργία κλώνων που καθιστούν την νόσο προοδευτικά ανθεκτική σε μία ευρεία ομάδα θεραπειών [5].

Η αντίσταση στην θεραπεία χωρίζεται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, την εγγενή - intrinsic και την επίκτητη – acquired. Η εγγενής αντίσταση περικλείει μηχανισμούς οι οποίοι προϋπάρχουν στο καρκινικό κύτταρο προτού αυτό εκτεθεί σε οποιαδήποτε μορφή θεραπείας. Ετερογενείς υποπληθυσμοί καρκινικών βλαστικών κυττάρων παρουσιάζουν γενετικές αλλαγές ( μεταλλάξεις, χρωμοσωμική αστάθεια, μεταθέσεις, ενισχύσεις γονιδίων και απαλοιφές ) οι οποίες τους επιτρέπουν να επιβιώνουν παρά την αυξανόμενη έκθεση σε χημειοθεραπεία. Επιπροσθέτως παρουσιάζουν τροποποιήσεις σε μονοπάτια- pathways πολλαπλασιασμού και απόπτωσης. Αυτό το γεγονός εξηγεί την αρχική ανταπόκριση του ασθενούς με καρκίνο του μαστού στο χημειοθεραπευτικό σχήμα και την μετέπειτα πιο επιθετική υποτροπή της νόσου του. Για παράδειγμα η υπερέκφραση του HER2 οδηγεί συγχρόνως στην αύξηση του μεταγραφικού παράγοντα Snail προσδίδοντας στο κύτταρο μεσεγγυματογενή χαρακτηριστικά μέσω της διαδικασίας EMT ( epithelial-to-mesenchymal transition/ επιθηλιομεσεγγυματογενούς μετατροπής) με αποτέλεσμα την χημειοαντοχή στην σισπλατίνη. Ωστόσο εκτός του γενετικού προφίλ , εξίσου σημαντική είναι η απορρύθμιση σε επιγενετικό επίπεδο ( τροποποιήσεις ιστονών και οργάνωση νουκλεοσωμάτων , μεθυλίωση DNA, non-coding RNAs ) η οποία συνδυάζεται με του προηγουμένως αναφερθείσες μηχανισμούς εγγενούς χημειοαντίστασης και οδηγεί δυστυχώς σε απογοητευτικά κλινικά αποτελέσματα [5].

Όσον αφορά την επίκτητη αντίσταση, τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να εκδηλώνεται τεράστιο ερευνητικό ενδιαφέρον γύρω από το θέμα αυτό. Με το όρο επίκτητη , εννοούμε την σταδιακή απόκτηση αντοχής ύστερα από επανειλημμένη έκθεση στον εκάστοτε παράγοντα. Αυτή μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσω ενεργοποίησης και επικράτησης ενός δεύτερου οδηγού πρωτο-ογκογονιδίου (driver proto-oncogene), είτε τροποποίησης του στόχου του φαρμακευτικού παράγοντα, είτε μέσω αλληλεπίδρασης με το μικροπεριβάλλον του όγκου (TME/ tumor microenvironment) . Ο καρκίνος του μαστού δεν απαρτίζεται μονάχα από κακοήθη κύτταρα του ίδιου του όγκου αλλά είναι ένα μωσαϊκό κυττάρων διαφορετικής ταυτότητας του οποίου η σύνθεση διαφέρει αναλόγως της προελεύσεως του όγκου καθώς και από εξωκυττάρια ουσία (extracellular matrix) η σύσταση της οποίας ευοδώνει την εξάπλωση του καρκίνου. Κύτταρα του ανοσιακού

συστήματος (ανοσορυθμιστικά T λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, B λεμφοκύτταρα, T κυτταροτοξικά, δενδριτικά κύτταρα, κύτταρα φυσικοί φονείς, ουδετερόφιλα), ινοβλάστες σχετιζόμενοι με τον όγκο (CAFs, cancer associated fibroblasts), λιποκύτταρα, βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών, μεσεγχυματογενή βλαστικά του μαστού, ενδοθηλιακά κύτταρα, όλοι αυτοί οι πληθυσμοί επικοινωνούν διαρκώς με τα κύτταρα του όγκου αλλά και μεταξύ τους διαμορφώνοντας έτσι τις κατάλληλες συνθήκες που θα επιτρέψουν στον καρκίνο του μαστού να μετατραπεί σε χημειοανθεκτική νόσο ενώ προηγουμένως τα κύτταρα του ήταν ευαίσθητα στην θεραπεία [5].

Ένας από τους τρόπους επικοινωνίας και συνεπώς μηχανισμός οριζόντιας μεταφοράς (horizontal transfer) επίκτητης χημειοαντοχής είναι τα εξωσώματα. Αυτή ακριβώς την συνιστώσα πραγματεύεται η παρούσα αφηγηματική ανασκόπηση και θα επιδιώξει να διερευνήσει εις βάθος την πολύπλοκη και πολυδιάστατη συνεισφορά των εξωσωμάτων στην ανάπτυξη αντοχής στην χημειοθεραπεία του καρκίνου του μαστού. Θα επιχειρηθεί συγχρόνως να αναδειχθεί ο σπουδαίος τους ρόλος ως προβλεπτικός βιοδείκτης ο οποίος ενδέχεται να αποτελέσει εφόδιο και εφαλτήριο στην περεταίρω διεξαγωγή ερευνών με σκοπό την εκμετάλλευση των εξωσωμάτων ως πιθανών φαρμακευτικών στόχων για την επίτευξη της αναστροφής της χημειοαντοχής [6].

## **E.Εξωσώματα , Προέλευση , Βιοσύνθεση**

Ιοί, προκαρυωτικοί και ευκαρυωτικοί οργανισμοί παράγουν κυστίδια με λιπιδικές διπλοστοίβαδες μεμβράνες τα οποία ονομάζουμε εξωκυττάρια κυστίδια (extracellular vesicles/EVs) . Οι τρεις κύριες κατηγορίες των EVs βάσει μεγέθους είναι τα εξωσώματα (διάμετρος 30-150 νανόμετρα), τα μικροκυστίδια ή αλλιώς εκτοσώματα (διάμετρος 100 νανόμετρα-1 μικρόμετρο) και τα αποπτωτικά σωμάτια (διάμετρος 50 νανόμετρα-5 μικρόμετρα). Τα εξωσώματα προέρχονται από το inward budding, μία επί της ουσίας προς τα έξω εκκόλπωση της κυτταρικής μεμβράνης και μέσω της οδού των όψιμων ενδοσωμάτων παράγοντας ενδοαυλικά κυστίδια (Intraluminal vesicles, ILVs) και δημιουργώντας τα λεγόμενα πολυκιστυδώδη σώματα (Multivesicular bodies MVBs). Στη συνέχεια τα εξωσώματα απελευθερώνονται στο εξωκυττάριο περιβάλλον ύστερα από την σύντηξη των MVBs με την πλασματική μεμβράνη του κυτταρού από το οποίο προέρχονται. Συνοπτικά, κύριο ρόλο σε αυτή την διαδικασία κατέχει ένα σύστημα διαλογής το οποίο

στην διεθνή βιβλιογραφία απαντάται ως Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) αποτελούμενο από 4 πρωτεϊνικά συμπλέγματα ESCRT 0,I,II,III και άλλες εμπλεκόμενες πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων των ALIX (Apoptosis-linked gene 2-interacting protein X), VTA1 (Vesicle Trafficking 1), VPS4 (Vacuolar protein sorting-associated protein 4), και TSG101 (Tumor susceptibility gene 101 protein) αλλά και ένα μονοπάτι ανεξάρτητο του ESCRT (ESCRT independent pathway) όπου συμμετέχει το λιπίδιο κεραμίδιο και το ένζυμο neutral sphingomyelinase [6-7]

Τα εξωσώματα είχαν απομονωθεί για πρώτη φορά από δικτυοερυθροκύτταρα προβάτων την δεκαετία του 1980 όπου είχε βρεθεί πως συμμετέχουν στην ανακύκλωση των υποδοχέων τρανσφερίνης [8]. Δυστυχώς τα επόμενα χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον ατόνησε διότι λανθασμένα εθεωρήθη ότι αυτά τα κυστίδια είναι απλώς κυτταρικά απόβλητα χωρίς να μπορούν να επιφέρουν καμία αλλαγή στην ομοίωση των γειτονικών κυττάρων. Μόλις προσφάτως καθιερώθηκαν τα εξωσώματα ως οχήματα τα οποία κατέχουν την ικανότητα να μεταφέρουν πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα και να επαναπρογραμματίσουν το κύτταρο αποδέκτη [6,8]. Υπό αυτό το πρίσμα λοιπόν, στις επόμενες ενότητες θα αναλυθεί το φορτίο-περιεχόμενο των εξωσωμάτων και θα προσπαθήσουμε να αναδείξουμε τους ποικίλους μηχανισμούς ανάπτυξης χημειοαντοχής στον καρκίνο του μαστού.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΕΙΣ ABC

### A. ABCG2, ABCB1 και ABCC2

Η υπεροικογένεια των μεταφορέων τύπου κασέτας σχετιζόμενων με τριφωσφορική αδενοσίνη (ABC-ATP binding cassette transporters) και ειδικότερα τα μέλη της ABCG2, ABCB1 και ABCC2 σχετίζονται με ανάπτυξη χημειοαντοχής σε πολλαπλά φάρμακα δομικώς ασύνδετα μεταξύ τους [5]. Όταν το φάρμακο προσδένεται τότε το ATP υδρολύεται, πυροδοτώντας μία αλλαγή στην στερεοδομή των υποδοχέων η οποία οδηγεί στην απομάκρυνση του φαρμάκου από το εσωτερικό του κυττάρου. Αυτό το φαινόμενο στην βιβλιογραφία αναφέρεται ως MDR –multidrug resistance / πολλαπλή αντίσταση στα φάρμακα [5].

Μία από τις ερευνητικές προσπάθειες των Ifergan et al. εν έτει 2005 ανέδειξε πως σειρές από καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7/MR and MCF-7/FLV1000 παρουσίαζαν αυξημένη αντοχή στον χημειοθεραπευτικό παράγοντα μιτοξαντρόνη. Έπειτα από παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ευρέθηκε πως στις επιφάνειες προσκόλλησης μεταξύ των κυττάρων παρατηρούνται μικροκυστίδια (η ομάδα δεν τα βαφτίζει ως εξωσώματα -πολύ πρώιμη μελέτη-) τα οποία υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη ABCG2 και μέσω αυτού του υποδοχέα η συγκέντρωση της μιτοξαντρόνης μετρήθηκε περίπου χίλιες φορές υψηλότερη σε σχέση με το μέσο καλλιέργειας ύστερα από 12 ώρες επώασης. Αυτή ήταν από τις πρώτες έρευνες στον καρκίνο του μαστού που έδειξε πως μικροκυστίδια χρησιμεύουν ως επί της ουσίας “θάλαμοι απόρριψης” κυτταροτοξικών φαρμάκων που μοιράζονται ανάμεσα σε πολλά γειτονικά καρκινικά κύτταρα [10]. Η ίδια ομάδα μάλιστα, λίγα χρόνια αργότερα, το 2009, απέδειξε ότι στο εσωτερικό αυτών των κυστιδίων μαζί με την μιτοξαντρόνη συσσωρεύεται και ριβοφλαβίνη η οποία προτάθηκε ως ένας έμμεσος βιοδείκτης ανίχνευσης χημειοαντοχής προκαλούμενης από την υπερέκφραση του μεταφορέα ABCG2 [11].

### B. Το σύμπλεγμα εξρίνης , ραδισίνης, μοεσίνης

Το 2011, η προσπάθεια αποσαφήνισης της δομής και της λειτουργίας αυτών των εξωκυττάρων κυστιδίων εντάθηκε περισσότερο. Συγκεκριμένα εντοπίστηκαν δομικές και λειτουργικές ομοιότητες με τα χολικά τριχοειδή (bile canaliculi) ενώ η ικανότητα των κυστιδίων αυτών να ανιχνεύονται σε αυτές τις εξωκυττάριας ζώνες ανάμεσα στα καρκινικά

κύτταρα συσχετίστηκε με την έκφραση πρωτεϊνών στενής σύνδεσης (tight junction) οκκλουδίνη και ZO-1. Παράλληλα θεσπίστηκε ο ρόλος τους στην ανάπτυξη χημειοαντοχής σε πολλαπλούς παράγοντες καθώς στο εσωτερικό τους βρέθηκαν πολύ αυξημένες συγκεντρώσεις τοποτεκάνης, ιμιδαζοακρινονών, μεθοτρεξάτης και παρατηρήθηκε ότι στην επιφάνεια τους υπάρχουν και άλλα μέλη της υπεροικογένειας μεταφορέων ABC όπως οι ABCB1 and ABCC2. Σε αυτή την επιλεκτική προσκόλληση (tethering) και διαλογή (sorting) των ABC υποδοχέων συμβάλλει καθοριστικά το σύμπλεγμα εζρίνης, ραδιξίνης, μοεσίνης (ERM complex, ezrin-radixin-moesin) [12].

Οι Pokharel et al επιδίωξαν να διευκρινίσουν με πιο εμπειριστατωμένο τρόπο την συμβολή του συγκεκριμένου συμπλέγματος στην οντογένεση των εξωσωμάτων. Αρχικά, το μόριο CD44, μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη αλληλεπιδρά με υαλουρονικό οξύ διεγείρωντας την παραγωγή πι-γλυκοπρωτεΐνης (παράγωγο του γονιδίου ABCB1). Στη συνέχεια το σύμπλεγμα ERM προσαρτάται στο καρβοξυτελικό άκρο ινιδίων ακτίνης και στο αμινοτελικό άκρο του CD44 ενώ η πι-γλυκοπρωτεΐνη προσκολλάται στα αμινοξέα 149-242 του αμινοτελικού άκρου της εζρίνης. Το μόριο CD44 προσδίδει ιστική εκλεκτικότητα στα εξωσώματα, ενώ η εζρίνη και η μοεσίνη είναι απαραίτητες για την ενσωμάτωση της πι-γλυκοπρωτεΐνης. Το σύνολο του συμπλέγματος ERM είναι αναγκαίο για την λειτουργικότητα των εξωσωμάτων δεδομένης της αναστροφής της χημειοαντίστασης όταν οι ερευνητές κατέλυσαν πειραματικά με χρήση siRNA (small interfering RNA) την έκφραση του [13].

## **Γ.Εμβιομηχανική και ακαμψία ιστών**

Η ίδια ομάδα σε μεταγενέστερη έρευνα ασχολείται και με την αλλαγή στην εμβιομηχανική και ακαμψία σε ιστικό επίπεδο που επιφέρουν τα εν λόγω εξωσώματα μέσω τροποποίησης του ERM συμπλέγματος. Με την πολύ εκλεπτυσμένη μέθοδο της ελαστογραφίας οπτικής συνοχής (optical coherence elastography) και μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (atomic force microscopy) τόσο σε μονοστοιβάδες κυττάρων καρκίνου του μαστού καθώς και σε σφαιροειδή όγκου, κατέληξαν στο συμπέρασμα πως οι ανθεκτικοί κλώνοι είναι πιο άκαμπτοι, ιδιότητα η οποία δύναται να μεταφερθεί μέσω εξωσωμάτων αλλά και να αντιστραφεί όταν αποσιωπείται το μόριο CD44 και το σύμπλεγμα ERM. Η παρατήρηση αυτή έχει ιδιαίτερες προεκτάσεις διότι συνδέει σηματοδοτικούς καταρράκτες οι



οποίοι ενεργοποιούνται με μηχανικά ερεθίσματα (mechano-transduced signaling cascades), το φαινόμενο της χημειοαντίστασης και την αλλαγή στο βαθμό ακαμψίας (stiffness) με την οριζόντια μεταφορά μέσω εξωσωμάτων [14].

#### **Δ. Μοριακό μονοπάτι PI3K/Akt**

Όσον αφορά το υποκείμενο μοριακό μονοπάτι οδηγό αυτής της διαδικασίας, φαίνεται πως εξέχουσα θέση κατέχει η κινάση της 3 -φωσφατιδυλινοσιτόλης PI3K και η πρωτεϊνική κινάση B Akt – PI3K/Akt pathway. Η αξία αυτής της παρατήρησης έγκειται στο ότι μέσω της ενεργοποίησης αυτού του μονοπατιού, τα κύτταρα παρουσιάζουν εγγενή χημειοαντίσταση εξαιτίας αλλαγών στην επιβίωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά ταυτόχρονα ο μεταφορέας ABCG2 μπορεί και ενσωματώνεται στα μικροκυστίδια και αυτό αποτελεί ένα χαρακτηριστικό επίκτητης χημειοαντίστασης των καρκινικών κυττάρων, πρόκειται δηλαδή για διττή λειτουργία του μονοπατιού PI3K/Akt [15].

Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώνονται και σε επίπεδο ασθενών. Άτομα τα οποία έλαβαν προεγχειρητική χημειοθεραπεία και στην συνέχεια είχαν είτε σταθερή ή πρόοδο νόσου εμφάνιζαν στον ορό τους αυξημένα επίπεδα εξωσωμάτων που έφεραν στην επιφάνειά τους ABCG2, MUC1 (μουκίνη 1), φλοτιλλίνη 2, καθώς και αυξημένα επίπεδα mRNA των συγκεκριμένων πρωτεϊνών εντός των καρκινικών κυττάρων. Αυτό έρχεται σε πλήρη αντιδιαστολή με τους ασθενείς που δεν τους χορηγήθηκε θεραπεία πριν το χειρουργείο, αναδεικνύοντας έτσι την αξία των εξωσωμάτων ως προβλεπτικό βιοδείκτη πτωχής ανταπόκρισης στην χημειοθεραπεία [16].

#### **Ε. Δίαυλος ασβεστίου TrpC5**

Εκτός από την απευθείας παραγωγή εξωσωμάτων με μεταφορείς ABC, υπάρχουν και άλλοι τρόποι για να αποκτήσει το καρκινικό κύτταρο αυτή την ικανότητα. Κυτταρικές σειρές ανθεκτικές στην αδριαμυκίνη απελευθερώνουν εξωσώματα στην μεμβράνη των οποίων εντοπίζεται ο διάυλος ασβεστίου TrpC5 (Short transient receptor potential channel 5). Η ενσωμάτωση αυτού του διαύλου στα χημειοευαίσθητα κύτταρα τροποποιεί το δυναμικό της μεμβράνης λόγω της εισροής κατιόντων ασβεστίου με αποτέλεσμα ο μεταγραφικός παράγοντας-activated T-cells isoform c3 (NFATc3) να μετατοπίζεται στον πυρήνα. Ο NFATc3 είναι από τους κύριους μεταγραφικούς παράγοντες που ελέγχουν την

έκφραση του μεταφορέα ABCB1. Η έκφραση του TrpC5 μετρήθηκε σημαντικά υψηλότερη στο ορό ασθενών με σταθερή ή πρόοδο νόσου σε σχέση με τους ασθενείς με πλήρη ή μερική ανταπόκριση. Πιο σημαντική όμως είναι η διαπίστωση ότι δεν ανιχνεύονται εξωσώματα/TrpC5 σε ασθενείς οι οποίοι δεν έχουν λάβει προηγουμένως χημειοθεραπεία [17].

Με την αξία του εξωσωματικού TrpC5 ως προβλεπτικού βιοδείκτη σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού ασχολήθηκε και η ομάδα των Teng Wang et al. Στο δείγμα που επιλέχθηκε, 62 ασθενείς εμφάνισαν σταθερή ή πρόοδο νόσου ενώ 69 ανταποκρίθηκαν στο χημειοθεραπευτικό σχήμα. Τα επίπεδα εξωσωματικού TrpC5 πριν την χορήγηση χημειοθεραπείας μπορούσαν να προβλέψουν ποιοι ασθενείς θα απαντήσουν ενώ η αύξηση του TrpC5 που έπεται της χορήγησης συσχετίζεται με την μετέπειτα ανάπτυξη επίκτητης χημειοαντοχής [18].

## **ΣΤ. UCH-L1**

Σε αυτό το σημείο βέβαια αξίζει να τονισθεί πως και άλλες εξωσωματικές πρωτεΐνες επηρεάζουν την έκφραση των ABC μεταφορέων με διαφορετικό μηχανισμό . Το μέλος L1 των υδρολασών καρβοξυτελικής ουβικουιλίνης (UCH-L1), προερχόμενο από εξωσώματα καρκινικών κυττάρων του μαστού ανθεκτικά στην αδριαμικίνη, διαθέτει την δυνατότητα να αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης της πι-γλυκοπρωτεΐνης μέσω ευόδωσης του μονοπατιού MAPK/ERK. Η χημειοαντίσταση στα κύτταρα αποδέκτες επαληθεύεται τόσο με την μέτρηση του ρυθμού απόπτωσης αλλά και με την ανίχνευση της αδριαμικίνης στο κυτταρόπλασμα αντί για τον πυρήνα όπου αναμένεται ύπο κανονικές προϋποθέσεις ο τόπος δράσης της [19].

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ GSTP-1**

Η πρωτεΐνη GSTP-1 (glutathione S-transferase P1) ανήκει στην οικογένεια της φάσης II μεταβολικών ενζύμων , δηλαδή είναι μία πρωτεΐνη η οποία συνδέει ξενοβιοτικά ή μεταβολίτες τους με διάφορες ενδογενείς ουσίες, σε αυτή την περίπτωση με γλουταθειόνη, προκειμένου αυτά να καταστούν πιο υδατοδιαλυτά έτσι ώστε να αποβληθούν ευκολότερα από τον οργανισμό. Στον καρκίνο τα επίπεδα της έχουν βρεθεί σημαντικά αυξημένα σε σχέση με φυσιολογικά κύτταρα και το ένζυμο αυτό μπορεί και μεταβολίζει πάρα πολλά χημειοθεραπευτικά φάρμακα μέσω σύνδεσης με γλουταθειόνη. Κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού με αντίσταση στην αδριαμυκίνη καθώς και τα εξωσώματα τους εκφράζουν το εν λόγω ένζυμο [20].

Η ομάδα των Su-Ji Yang et al ανέλυσε βιοψίες 42 ασθενών με καρκίνο του μαστού πριν και μετά την χορήγηση χημειοθεραπευτικού σχήματος βασισμένο σε ανθρακυκλίνη/ταξάνη και μέσω ανοσοϊστοχημείας απέδειξε την υψηλή έκφραση της GSTP-1 σε όσους είχαν πτωχή ανταπόκριση . Εν συνεχεία μέτρησε τα εξωσώματα στον ορό 30 ασθενών που έλαβαν νεοεπικουρική θεραπεία με το ίδιο σχήμα και κατέληξε στην ίδια παρατήρηση, δηλαδή ασθενείς με σταθερή ή πρόοδο νόσου είχαν πολύ μεγαλύτερα επίπεδα εξωσωμάτων που έκραζαν το GSTP-1 ένζυμο. Οι συγγραφείς προτείνουν την χρήση της εξέτασης αυτής ως προβλεπτικό βιοδείκτη ανταπόκρισης στην χημειοθεραπεία βασισμένη σε ανθρακυκλίνη/ταξάνη [20].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ HER

### A. Εξωσώματα και HER2

Οι μηχανισμοί αντίστασης με τους οποίους τα εξωσώματα σε συνδυασμό με το μικροπεριβάλλον του όγκου επιδιώκουν να καταστήσουν τις θεραπείες αναποτελεσματικές, δεν περιορίζονται μόνο στην απομάκρυνση φαρμάκων μέσω μεταφορέων ή στην αδρανοποίηση τους. Σε μία σπουδαία μελέτη των Ciravolo et al. διαπιστώθηκε ότι εξωσώματα από την κυτταρική σειρά SKBR3 και BT474 υπερεξέφραζαν τον υποδοχέα HER2. Αυτό το γεγονός λειτουργεί ανταγωνιστικά με τις θέσεις πρόσδεσης του μονοκλωνικού αντισώματος Trastuzumab στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο τα εξωσώματα τροποποιούν την ευαισθησία στην συγκεκριμένη θεραπεία καθώς το αντίσωμα δεν επιδρά στα κύτταρα-στόχο και απομακρύνεται από το μικροπεριβάλλον του όγκου. Μάλιστα ορός ασθενών με early stage HER2 καρκίνο του μαστού παρουσιάζει μικρότερη ικανότητα δέσμευσης του Trastuzumab σε σχέση με πιο προχωρημένα στάδια, φαινόμενο που ίσως υποδηλώνει κατά τους ερευνητές ότι η έκκριση εξωσωμάτων επιδεινώνεται όσο μεγαλύτερο το καρκινικό φορτίο (tumor burden) [21].

Επιπροσθέτως σε μία διαφορετική μελέτη των Martinez et al διαπιστώθηκε μία έτερη συνιστώσα στην ανάπτυξη αντοχής στο μονοκλωνικό αντίσωμα Trastuzumab. Το νευροπεπτιδίο νευρομεδίνη-U υπερεκφράζεται στους HER- 2 καρκίνους του μαστού και ευθύνεται για πτωχή επιβίωση, επιθετική συμπεριφορά και χημειοαντίσταση στα anti-HER2 μονοκλωνικά αντισώματα. Ανθεκτικοί κλώνοι HER2 +, νευρομεδίνη+ εκκρίνουν εξωσώματα με υψηλά επίπεδα TGF-β1 (Tumor growth factor-beta) μία ανοσοκατασταλτική κυτοκίνη και PD-L1 (programmed death-ligant 1) έναν προσδέτη οποίος αναγνωρίζεται από τον PD υποδοχέα (programmed death) με αποτέλεσμα να μειώνεται σημαντικά η αντιγονοεξαρτώμενη κυτταροτοξικότητα προκαλούμενη από το Trastuzumab. Στην κλινική δοκιμή, απομονώθηκαν εξωσώματα από ορό ασθενών προτού λάβουν Trastuzumab. Όσοι εμφάνιζαν υψηλά επίπεδα εξωσωματικού TGF-β1 δεν είχαν την επιθυμητή ανταπόκριση στην θεραπεία [22].

## **B.Εξωσώματα και HER3,4**

Οι υποδοχείς HER3 και HER4 ανήκουν και αυτοί στην οικογένεια human epidermal growth factor receptor (HER/EGFR) όπως και ο υποδοχέας HER2 έχοντας όμως κάποιες ουσιαστικές διαφορές και ιδιομορφίες. Ο HER3 δεν έχει ενδοκυττάριο τμήμα τυροσινικής κινάσης και ενεργοποιείται μέσω διμερισμού με άλλα μέλη της οικογένειας EGFR π.χ HER2. Ο HER4 ενεργοποιείται έπειτα από πρωτεολυτική διάσπαση του ενδοκυτταρίου τμήματος το οποίο μπορεί και εισέρχεται εντός του πυρήνα. Ένας από τους προσδέτες των υποδοχέων είναι η ερεγκουλίνη (heregulin). Εξωσώματα-hergulin+ απελευθερώνονται από χημειοανθεκτικούς κλώνους και μέσω του άξονα HER3/4-hergulin επίφερον οριζόντια μεταφορά χημειοαντίστασης. Μάλιστα η ουσία γ-τοκοτριενόλη παρεμποδίζει την απελευθέρωση εξωσωμάτων και έτσι εξασθενείται η σηματοδότηση μέσω HER3/4 [23].

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ, ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ, ΧΗΜΕΙΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΤΡΙΠΛΑ ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

Ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού είναι ο πιο επιθετικός υπότυπος και δυστυχώς οι ασθενείς έχουν το χειρότερο προσδόκιμο επιβίωσης. Η χημειοθεραπεία ενώ αρχικώς εξουδετερώνει τα νεοπλασματικά κύτταρα, η υποτροπή είναι σχεδόν αναπόφευκτη προδικάζοντας ένα φτωχό θεραπευτικό αποτέλεσμα. Ένας λόγος που ίσως μπορεί να επεξηγήσει αυτό το φαινόμενο είναι πως τα καρκινικά κύτταρα περιέρχονται σε μία κατάσταση παρατεταμένης αδράνειας και μάλιστα τα κύτταρα αυτά ενεργοποιούν τα μονοπάτια μοριακής γήρανσης (senescence) Στην διεθνή βιβλιογραφία ο αγγλικός όρος είναι chemoresistant therapeutic induced senescent (TIS) cells. Τα TIS κύτταρα λοιπόν εμφανίζουν και ιδιότητες κοινές με βλαστικά κύτταρα και επιβιώνουν σε φωλεές -niches για πολλά χρόνια ανεπηρέαστα από την χημειοθεραπεία [24].

Σε μία πολύ σπουδαία ερευνητική προσπάθεια των Kavanagh et al χαρτογραφήθηκε των πρωτεομικό προφίλ των εξωσωμάτων αυτών, ενώ με μεθόδους βιοπληροφορικής όπως και σε προηγούμενες αντίστοιχες προσπάθειες επιχειρήθηκε να σκιαγραφηθούν τα σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρεάζονται από την μεταφορά των εξωσωμάτων. Αφού θεσπίστηκαν κυτταρικές σειρές ανθεκτικές στην πακλιταξέλη, μέσω φασματομετρίας μάζας ταυτοποιήθηκαν 142 πρωτεΐνες στα εξωσώματα τους, με πολύ υψηλότερη έκφραση σε σχέση με τα εξωσώματα από κυτταρικές σειρές αναφοράς. 69 από αυτές τις 142 πρωτεΐνες εμπλέκονται σε μονοπάτια πολλαπλασιασμού και ανάπτυξης . Οι συγγραφείς διατυπώνουν την άποψη ότι η απομάκρυνση μέσω εξωσωμάτων αυτών των πρωτεϊνών είναι υπεύθυνη για την διατήρηση αυτού του senescent φαινότυπου. Ιδιαίτερη έμφαση αποδίδουν στις παρακάτω κατηγορίες .

ΑΤΡασες : 8 μέλη , πιθανόν τα ανθεκτικά κύτταρα εξοικονομούν με αυτό τον τρόπο ATP για την επιβίωση τους.

Αννεξίνες : 8 μέλη , εμπλέκονται με την διαδικασία της απόπτωσης

Υπομονάδες τουμπουλίνης : 9 μέλη, ιδιαίτερη έμφαση στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού καθώς και στο μονοπάτι της σταθμίνης που διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην αντοχή στην πακλιταξέλη και σε άλλους τύπους καρκίνου

Ιντεργκρίνες : 3 μέλη, σηματοδότηση μέσω MAPK

Πρωτεΐνες Rab (Ras associated binding protein): 6 μέλη, εμπλέκονται στην απελευθέρωση εξωσωμάτων

Πέραν αυτού, μέσω της χρωστικής Flutax-2, ανάλογο της πακλιταξέλης απεικόνισαν τον χημειοθεραπευτικό παράγοντα εντός των εξωσωμάτων αναδεικνύοντας άλλον έναν μηχανισμό ανάπτυξης χημειοαντοχής [24].

Σέ ένα ακόμη πολύ έξυπνο πείραμα διαπιστώθηκε άλλος ένας μηχανισμός ανάπτυξης χημειοαντίστασης στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού. Τα εξωσώματα διαθέτουν την ικανότητα να “κρύβουν” μόρια στόχους. Πιο συγκεκριμένα, μπορούν και περικλείουν τον υποδοχέα EGFR (epidermal growth factor receptor) έτσι ώστε να μην είναι προσβάσιμος στις στοχευμένες μας θεραπείες. Εντυπωσιακό είναι πως ο EGFR όντας ενσωματωμένος στα εξωσώματα δεν είναι αδρανής, αλλά εμφανίζει πλήρη λειτουργικότητα την οποία δυστυχώς θα αξιοποιήσουν τα κύτταρα αποδέκτες. Διαπιστώνουμε για άλλη μία φορά το γεγονός ότι τα εξωσώματα έχουν έναν πολύ εκτεταμένο τρόπο δράσης και για αυτό η χημειοαντίσταση επιτυγχάνεται με ποικίλους μηχανισμούς [25].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ miRNAS

### A. Προέλευση, βιοσύνθεση, λειτουργία

Ιδιαίτερη μνεία πρέπει να αποδοθεί στα miRNAs τα οποία μεταφέρονται μέσω των εξωσωμάτων. Τα miRNAs απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1993 στον σκώληκα *Caenorhabditis elegans* όπου το ώριμο,μεγέθους 22 νουκλεοτιδίων, miRNA προερχόμενο από το γονίδιο *lin4* αποδείχθηκε ότι ρυθμίζει τα επίπεδα του mRNA γονιδίου *LIN14* μέσω μίας RNA-RNA αλληλεπίδρασης στην 3' αμετάφραστη περιοχή [26]. Το πρώτο βήμα για την παραγωγή των miRNAs είναι η μεταγραφή του πρωτογενούς primary miRNA από την RNA πολυμεράση II ή και ορισμένες φορές από την RNA πολυμεράση III. Στη συνέχεια ένα σύμπλεγμα αποτελούμενο από τις πρωτεΐνες *Drosha* και τον συμπαραγοντά της *DGCR8* επεξεργάζεται και αναγνωρίζει το σχήμα φουρκέτας (*hairpin loop*) του pri-miRNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός προδρόμου precursor pre-miRNA που διατηρεί το σχήμα φουρκέτας αλλά έχει μήκος 70 νουκλεοτιδίων πλέον [27]. Μερικά pre-miRNAs μπορούν να παραχθούν και από μία εναλλακτική οδό, το *mirtron pathway*, κατά το οποίο ιντρόνια αποκόπτονται και διακλαδίζονται από το ένζυμο *lariat debranching enzyme* [28]. Έπειτα το pre-miRNA εξέρχεται του πυρήνα με την συνδρομή της πυρηνικής πρωτεΐνης μεταφορέα εξπορτίνη-5, και ενσωματώνεται στο σύμπλεγμα RISC (*RNA-induced-silencing-complex*) όπου επεξεργάζεται περαιτέρω μέσω της πρωτεΐνης *Dicer* σε ώριμο -mature miRNA (18-25 νουκλεοτίδια μήκος). Αυτό το γραμμικό RNA πλέον διαθέτει μία περιοχή (*seed region*) συνήθως στις θέσεις 2-7 η οποία παρουσιάζει συμπληρωματικότητα ατελή ή πλήρη με την 3' αμετάφραστη περιοχή των εκάστοτε mRNA στόχων. Η σύνδεση αυτή καταλήγει είτε στην αρνητική ρύθμιση το mRNA ή στην αποδόμηση του εάν το ταίριασμα των αλληλουχιών είναι πλήρες [26]. Κάποιες μελέτες ωστόσο υποστηρίζουν πως ορισμένα miRNAs διαθέτουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων αλληλεπιδρώντας και με την 5' αμετάφραστη περιοχή [29].

Ο ρόλος των miRNAs στον καρκίνο εδραιώθηκε για πρώτη φορά όταν η επιστημονική κοινότητα ανέδειξε πως η απαλοιφή και η προς τα κάτω ρύθμιση των *mir-15,16* είναι γεγονός κομβικό για την ανάπτυξη χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας [30]. Στον καρκίνο του μαστού η πρώτη συσχέτιση με απορρύθμιση των miRNAs προήλθε από την μελέτη των *Iorio et al* και ιδιαίτερα με τα επίπεδα των *mir-125b*, *mir-145*, *mir-21*, and *mir-155* [31]. Η ομάδα των *Valadi et al* ήταν η πρώτη που ανέδειξε πως η μεταφορά δια



εξωσωμάτων mRNA και microRNA είναι ένας καινούργιος τρόπος ανταλλαγής γονιδιακού υλικού μεταξύ κυττάρων [32].

## **B. Μελέτες αντοχής στη χημειοθεραπεία**

Οι Jaiswal et al ήταν από τους πρωτοπόρους, οι οποίοι κατόρθωσαν να ολοκληρώσουν μία εκτεταμένη ανάλυση του προφίλ των miRNA στα εξωσώματα από καρκίνο του μαστού ανθεκτικά στην χημειοθεραπεία και θέλησαν να μετρήσουν την επίδραση τους σε κύτταρα δίχως αντίσταση. Καταγράφηκαν 847 miRNAs εκ των οποίων 140 παρουσίαζαν στενή συσχέτιση μεταξύ των εξωσωμάτων, των κυττάρων με ανθεκτικότητα και των ευαίσθητων κυττάρων ύστερα από επώαση. Επί της ουσίας το φορτίο των εξωσωμάτων αντικατοπτρίζει το καρκινικό ή στρωματικό κύτταρο από το οποίο προέρχεται [33].

Σε ένα πολύ εντυπωσιακό πείραμα, κύτταρα καρκίνου του μαστού που παρουσίαζαν χημειοευαισθησία επωάστηκαν με εξωσώματα προερχόμενα από κυτταρικές σειρές ανθεκτικές στην αδριαμυκίνη και την δοσεξατέλη, δύο από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα φάρμακα στην θεραπευτική μας φαρέτρα. Για να επιβεβαιωθεί η ταυτότητα των σωματιδίων ως εξωσώματα οι εν προκειμένω ερευνητές επαλήθευσαν την μηδενική έκφραση της ενδοπλασματικής πρωτεΐνης καλνεξίνης ενώ παράλληλα ανιχνεύθηκε η παρουσία των πρωτεϊνών Tsg101, b-actin, CD44, τετρασπανινών που αποτελούν πολύ ευαίσθητους και ειδικούς δείκτες εξωσωματικής προέλευσης. Τα προηγούμενως χημειοευαίσθητα κύτταρα απέκτησαν την ικανότητα επιβίωσης και πολλαπλασιασμού παρά την επίδραση των εν λόγω φαρμάκων ενώ όταν χρησιμοποιήθηκαν εξωσώματα από τα χημειοευαίσθητα κύτταρα τότε δεν επηρεάστηκε ο ρυθμός απόπτωσης τους. Στο επόμενο στάδιο οι ερευνητές μέσω χρήσης της τεχνολογίας μικροσυστοιχίας (microarray) και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR ανέλυσαν τα διάφορα miRNAs στα εξωσώματα των κυττάρων ανθεκτικών σε αδριαμυκίνη A/exo και σε δοσεταξέλη D/exo καθώς και στα χημειοευαίσθητα καρκινικά κύτταρα. 374 miRNAs παρουσίαζαν διαφορετική έκφραση στα A/exo και 307 στα D/exo σε σχέση με τις χημειοευαίσθητες καρκινικές σειρές, ωστόσο όταν αυτές επωάστηκαν με τα εν λόγω εξωσώματα τότε οι αλλαγές στο προφίλ των miRNAs συμβάδιζαν με το περιεχόμενο των εξωσωμάτων. Η μέθοδος KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

χρησιμοποιήθηκε για να συνδεθούν miRNAs με καθιερωμένα μονοπάτια ογκογένεσης. Επιλέχθηκαν τα miR-100, miR-222, miR-30a λόγω πληθώρας βιβλιογραφικών δεδομένων με ιδιαίτερη αναφορά στο miR-222 διότι έχει ως στόχο το ογκοκατασταλτικό γονίδιο PTEN [34].

Σε άλλη μελέτη των Wei et al ανακαλύφθηκε πως το miR-222 καθώς και το miR-221 μεταφέρονται μέσω εξωσωμάτων και καθιστούν τις καρκινικές σειρές ανθεκτικές στην ταμοξιφαίνη. Πάλι με την ίδια μεθοδολογία, επωάζονται τα ευαίσθητα κύτταρα με τα εξωσώματα προερχόμενα από ανθεκτικούς κλώνους. Σε αυτή την περίπτωση η αντίσταση στην ταμοξιφένη ποσοτικοποιήθηκε αφού μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του p27 και του οιστρογονικού υποδοχέα ERα . Το φαινόμενο δύναται να αντιστραφεί όταν χορηγούμε ειδικά σχεδιασμένα anti-miRs, το οποίο υποδηλώνει έμμεσα και την εμπλοκή των παραπάνω miRNAs [35].

Μία πιο λεπτομερή προσέγγιση στο περιεχόμενο των D/exo επιτεύχθηκε από τους Wei-xian Chen et al. Στο συγκεκριμένο εγχείρημα αναλύθηκαν εις βάθος τα γονίδια στόχοι των 20 πιο άφθονων miRNA στα εξωσώματα D/exo (miR-1246, miR-23a, miR1469, miR-638, mir-1915, miR-2861, let7b, let7a, miR-24, miR-149star, mir-3178, mir-3196, miR-16, miR-23b, miR-762, miR-663, let7c, mir-26a, miR-27a, miR1908) . Μάλιστα για να αυξηθεί η ευαισθησία των ευρημάτων , χρησιμοποιήθηκαν 3 αλγόριθμοι βιοπληροφορικής ανάλυσης PicTar, TargetScan, και MicroCosm και μόνο όταν περισσότεροι από 2 στους 3 αλγορίθμους συμφωνούσαν, τα αποτελέσματα λαμβάνονταν υπόψιν. Από τα δεδομένα που προέκυψαν διαπιστώθηκε ότι 1937 γονίδια επηρεάζονταν , ενώ ένα miRNA μπορούσε να επηρεάσει εκατοντάδες γονίδια (π.χ το miR-23a επηρεάζει 283 γονίδια ) Μέσω του διαδεδομένου εργαλείου DAVID καταγράφηκαν τα οντολογικά μονοπάτια στα οποία άνηκαν τα εν λόγω γονίδια. 31 μονοπάτια-pathways συμπεριλήφθηκαν με εκείνο των MAPK κινασών να παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον (miR-24 -11 γονίδια, miR-26a -11 γονίδια, miR-27a-17 γονίδια). Η πειραματική επιβεβαίωση των αλγοριθμικών ευρημάτων προήλθε από την μέτρηση των επιπέδων mRNA των γονιδίων Sprouty2 -στόχος του miR-23a, PTEN-στόχος του miR-222, APC4-στόχος του mir-452 [36].

Οι Mao et al, σε μία ανάλογη προσπάθεια, εστίασαν στην εμπλοκή των εξωσωματικών miRNA προερχόμενα από κύτταρα του μαστού ανθεκτικά στην αδριαμικίνη και το γνωστό μονοπάτι ογκογένεσης Wnt (Wingless-related integration site). Αφότου επέλεξαν τα 30 miRNA με την υψηλότερη έκφραση, διαπίστωσαν ότι η πλειονότητα αυτών

σχετίζεται με το Wnt μονοπάτι, εύρημα που και εδώ διασταυρώθηκε από τους προαναφερθείσες 3 αλγόριθμους βιοπληροφορικής. Το Wnt εκτός από την συμμετοχή του στην επιθετικότητα, μεταστατικό δυναμικό και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων θεωρείται πως ενοχοποιείται και για εγγενή αντίσταση στην χημειοθεραπεία [37].

Με το ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι καταπιάστηκε και η ομάδα των Jia και των συνεργατών του. Η προέλευσή των εξωσωμάτων δεν είναι από ανθεκτικά στην χημειοθεραπεία κύτταρα αλλά μεσεγχυματικά κύτταρα του λιπώδους ιστού. Το miR-1236 των εξωσωμάτων επηρεάζει την έκφραση του διαύλου νατρίου SLC9A1 (solute carrier family 9 member 1) το οποίο εμπλέκεται στην σηματοδότηση μέσω Wnt και με την αντίσταση στην σισπλατίνη [38].

Οι τεχνικές RT-PCR (real-time polymerase chain reaction) αντιπροσωπεύουν την μέση έκφραση των miRNA και συχνά χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα με την μέθοδο LNA-FISH (locked nucleic acid –fluorescent in situ hybridization), όπου ανιχνευτές με μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία μπορούν και υβριδοποιούνται εντός κυττάρων χωρίς να απαιτείται λύση των κυττάρων. Δυστυχώς η ευαισθησία μειώνεται σε σημαντικό βαθμό όταν θέλουμε να μελετήσουμε ένα συγκεκριμένο miRNA στο εσωτερικό ενός και μοναδικού κυττάρου. Οι Yu et al αξιοποίησαν την μεθοδολογία enzyme labeled fluorescence, LNA ELF FISH και μπόρεσαν να οπτικοποιήσουν μεμονωμένα μόρια miR-222 τα οποία ακριβώς όπως και στα προηγούμενα πειράματα περικλείονται σε εξωσώματα προερχόμενα από κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού ανθεκτικές στην αδριαμυκίνη και μετατρέπουν προηγουμένως ευαίσθητα κύτταρα σε ανθεκτικά [39].

Επιχειρώντας να επιβεβαιώσουν πειραματικά δεδομένα σε αληθινούς ασθενείς, η μελέτη των Zhong et al θέσπισε τρεις κυτταρικές σειρές ανθεκτικές σε δοσεταξέλη, επιρουβικίνη και βινορελμπίνη αντίστοιχα και καταγράφηκαν τα miRNAs στα εξωσώματά τους. Μετέπειτα, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία σε δείγματα βιοψίας 23 ασθενών που τους είχε χορηγηθεί προεγχειρητική χημειοθεραπεία καθώς και σε μετεγχειρητικά δείγματα. 22 miRNAs είχαν την μεγαλύτερη διακύμανση με 12 εξ αυτών (miR-4443, miR-574-3p, miR-7847-3p, miR-423-5p, miR-4298, miR-3178, miR-6780b-3p, miR-7107-5p, miR-744-5p, miR-4258, miR-138-5p και miR-210-3p) να παρουσιάζουν την σημαντικότερη αύξηση στην έκφραση τους. Τα μοριακά μονοπάτια με άμεση συμμετοχή στην ανάπτυξη χημειοαντίστασης ήταν τα p53, Wnt, MAPK (Mitogen-activated protein kinase), ErbB

(erythroblastic oncogene b) και το miR- 4443 ήταν το μόριο που εμπλεκόταν στα περισσότερα από αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια [40].

Θέλοντας να παρέχει την πιο ουσιαστική ανάλυση του προφίλ των miRNA στα εξωσώματα καρκινικών κυττάρων με αντίσταση στην αδριαμυκίνη, η ομάδα των Chen et al προχώρησε στην συστηματική τους μελέτη. Επίσης η *in silico* πρόβλεψη των mRNA στόχων των miRNA πραγματοποιήθηκε μέσω της πλατφόρμας starBase V2.0 η οποία συνδυάζει τα αποτελέσματα από 5 βάσεις δεδομένων (TargetScan, 16 PicTar, RNA22, PITA, και miRanda). Τα δίκτυα γονιδίων χαρτογραφήθηκαν μέσω του αλγορίθμου KEGG ενώ διά της βάσης δεδομένων STRING σχεδιάστηκαν και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των εμπλεκόμενων πρωτεϊνών. Συνολικά καταγράφηκαν 309 miRNA με αυξημένη έκφραση και 66 με ελαττωμένη. Οι στόχοι των 13 πιο συχνά απαντώμενων miRNA (miR-17-5p, miR-23a-3p, miR-23b-3p, miR-26a-5p, miR-27a-3p, miR-30a-5p, 22 miR-181a-5p, miR-193a-3p, miR-193b-3p, miR-320a, miR-328-3p, και let-7b-5p) αναλύθηκαν με τις προηγούμενες μεθόδους βιοπληροφορικής για να διαλευκανθούν πιθανά μονοπάτια χημειοαντοχής. Με αυτό τον τρόπο ταυτοποιήθηκαν 1762 γονίδια και 24 σηματοδοτικά μονοπάτια. Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι το πιο σημαντικό από αυτά αποτελεί η μεταγραφική απορρύθμιση στον καρκίνο στο οποίο συμπεριλήφθηκαν και τα περισσότερα miRNA (miR-17-5p (14 γονίδια), miR-23a-3p (7 γονίδια), miR-23b-3p (8 γονίδια), miR-27a-3p (8 γονίδια), miR-181a-5p (7 γονίδια), 10 miR-193a-3p (4 γονίδια), miR-193b-3p (4 γονίδια), and miR-328-3p (3 γονίδια) [41].

Μία παρόμοια αλλά σαφώς μικρότερης κλίμακας απόπειρα επιχείρησε η έρευνα των Wang et al. Χαρτογραφήθηκαν τα εξωσωματικά miRNA από ανθεκτικά στην σισπλατίνη καρκινικά κύτταρα του μαστού και συγκρίθηκαν με το περιεχόμενο των εξωσωμάτων χημειοευαίσθητων κυττάρων. Τα επίπεδα 60 miRNAs ήταν σημαντικά υψηλότερα στα εξωσώματα των ανθεκτικών κυττάρων. Την μεγαλύτερη διακύμανση εμφάνιζαν τα miR-370-3p, miR-423-5p και miR-373. Οι μελετητές τονίζουν με ιδιαίτερο ενδιαφέρον την περίπτωση του miR-423-5p διότι η πειραματική καταστολή του είχε και την μεγαλύτερη επίδραση στην επιβίωση των κυττάρων αλλά και στην χημειοαντοχή όπως αυτή εκτιμήθηκε μέσω των επιπέδων πι-γλυκοπρωτεΐνης στα κύτταρα αποδέκτες [42].

Ένας καινούργιος άξονας χημειοαντοχής μελετήθηκε από την ομάδα του Shen. Υποθεραπευτικές δόσεις χημειοθεραπείας μπορούν δυστυχώς να πυροδοτήσουν την απελευθέρωση εξωσωμάτων τα οποία φέρουν τα miR-9-5p, miR-195-5p, and miR-203a-

3p. Και τα 3 αυτά miRNAs παρεμποδίζουν ταυτόχρονα την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα One Cut Homeobox 2 (ONECUT2) με αποτέλεσμα την μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την μετατροπή των καρκινικών κυττάρων σε βλαστικά καρκινικά κύτταρα. Αυτός ο νέος άξονας επιβεβαιώνεται τόσο σε μοντέλα ξеноμοσχευμάτων αλλά και σε δείγματα ασθενών που έλαβαν προεγχειρητική χημειοθεραπεία [43].

### **Γ. miR-451 και ορμονοεξαρτώμενος καρκίνος του μαστού**

Οι επιδράσεις των οιστρογόνων στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού διαμεσολαβούνται μέσω των υποδοχέων ER $\alpha$ ,  $\beta$ , τις παραλλαγές τους λόγω εναλλακτικού ματίσματος καθώς και οιστρογονικούς υποδοχείς συζευγμένους με G διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Ένα 70% των καρκίνων του μαστού ανήκει σε αυτή την κατηγορία αλλά δυστυχώς το 40 % των ασθενών υποτροπιάζει παρά την χορήγηση ορμονοθεραπείας Η ταμοξιφαίνη είναι το φάρμακο το οποίο έχει μελετηθεί διεξοδικότερα. Οι Penn Muluhngwi et al θέλησαν να εμβαθύνουν περισσότερο στα miRNAs που παρεμβαίνουν στην δράση της ταμοξιφαίνης. Το ενδιαφέρον συγκεντρώνει το miR-451 στόχος του οποίου είναι η πρωτεΐνη κρίωμα 14-3-3ζ η οποία συμμετέχει στα σηματοδοτικά μονοπατια HER2, MAPK διότι ταυτόχρονα σχετίζεται με την ανάπτυξη αντοχής τόσο στην ταμοξιφαίνη αλλά και σε χημειοθεραπευτικά σχήματα. Το miR-451 αποτελεί ένα ογκοκατασταλτικό miRNA και τα επίπεδά του ανευρίσκονται αυξημένα στον ορμονοανθεκτικό καρκίνο του μαστού [44].

### **Δ. Εξωσωματικά miRNAs, αυτοφαγία και HER2 καρκίνος**

Τα εξωσωματικά miRNAs ασκούν την δράση τους και μέσω μονοπατιών αυτοφαγίας. Σε HER2+καρκίνους του μαστού, η αντοχή στο μονοκλωνικό αντίσωμα Trastuzumab μπορούσε να αντιστραφεί μέσω αύξησης του miR-567 διά της εξωσωματικής μεταφοράς. Στόχος του miR-567 είναι η πρωτεΐνη αυτοφαγίας Atg5. Το εύρημα αυτό το επιβεβαίωσαν in vitro και in vivo η ομάδα των Han et al [45]. Επιπλέον η ομάδα των Zhang προσέθεσε στην παραπάνω εξίσωση και την δράση των miR-1246, miR-155 στην αντίσταση έναντι του trastuzumab [46].

## **E. Εξωσωματικά miRNAs και τριπλά αρνητικά καρκίνος του μαστού**

Σε πολύ επιθετικούς υπότυπους όπως ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού, έχουν παρατηρηθεί ομάδες ασθενών που παρά την δυσμενή πρόγνωση διατηρούν σχετικά ικανοποιητικά ποσοστά επιβίωσης. Ένας προγνωστικός και προβλεπτικός βιοδείκτης είναι το εξωσωματικό miR-770. Χημειοευαίσθητα κύτταρα στην δοξορουβικίνη εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σύγκριση με ανθεκτικές στην θεραπεία περιπτώσεις. Επιπλέον τα εξωσώματα των ασθενών με την ευνοϊκότερη πορεία μεταφέρουν το miR-770 μέσω ενδοκρινούς και παρακρινούς οδού στα γειτονικά καρκινικά κύτταρα. Εάν απομονώσουμε αυτή την κατηγορία εξωσωμάτων και τα επωάσουμε με κυτταρικές σειρές από τριπλά αρνητικό καρκίνου του μαστού χημειοανθεκτικές στην δοξορουβικίνη τότε η αντοχή υποστρέφεται κατά ένα μεγάλο βαθμό καθώς και η ικανότητα των κυττάρων αυτών να μεταναστεύουν συστηματικώς δημιουργώντας μεταστατικές εστίες. Ο στόχος του miR-770 έχει ταυτοποιηθεί ως η σταθμίνη-1 (STMN-1) που μετέχει στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού μέσω μικροσωληνίσκων. Η επίπτωση στην απόπτωση και στην επιβίωση των κυττάρων από την δράση του miR-770 παύει να ισχύει όταν πειραματικώς επανεισάγουμε την σταθμίνη-1 στα κύτταρα. Ίσως στο μέλλον, διά της υγρής βιοψίας και αυτής της ελάχιστα επεμβατικής διαδικασίας (επί της ουσίας θα πρόκειται για μία απλή αιμοληψία) να μπορούμε να ξεχωρίσουμε τους ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού με ευνοϊκή πρόβλεψη και να λαμβάνουμε τις ανάλογες αποφάσεις για την βέλτιστη διαχείρισή τους [47].

## **ΣΤ. Εξωσωματικά miRNAs και ABC υποδοχείς**

Έχουμε αναφερθεί εκτενώς σε παραπάνω ενότητα στην δυνατότητα οριζόντιας μεταφοράς χημειοανθεκτικότητας μέσω της λειτουργίας των μεταφορέων τύπου ABC. Είναι φυσικό να υποθέσουμε και δεν θα μπορούσε άλλωστε ένα τόσο πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων να μην επηρεάζεται από miRNAs. Το εξωσωματικό miR-451 επηρεάζει άμεσα το γονίδιο ABCB1 άρα και τα επίπεδα του μεταφορέα πι-γλυκοπρωτεΐνης (p-glycoprotein). Ο άξονας αυτός συνεπάγεται στην ανάπτυξη αντοχής στην δοξορουβικίνη διότι τα καρκινικά κύτταρα ελαττώνουν τα επίπεδα του miR-451 μέσω επιλεκτικής αποβολής δια των εξωσωμάτων. Η ίδια η χορήγηση χημειοθεραπείας φαίνεται να συνδέεται με την έκκριση ειδικών εξωσωμάτων και να είναι η γενεσιουργός αιτία αυτού του

φαινομένου [48]. Το miR-451 δεν είναι το μοναδικό που ελέγχει την έκφραση της πιγλυκοπρωτεΐνης και μάλιστα διαφορετικά miRNAs έχουν εντελώς αντίθετα αποτελέσματα. Το miR-195 αυξάνει την ευαισθησία στην αδριαμυκίνη, το miR-200c στην επιρουβικίνη, ενώ το miR-298 αυξάνει την αντίσταση στην δοξορουβικίνη όλα μέσω επιρροής στο γονίδιο ABCB1 [49].

## **Z. Εξωσώματα, miRNAs και μικροπεριβάλλον του όγκου**

Κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη και διασπορά της χημειοαντίστασης (εγγενούς αλλά και επίκτητης) διαδραματίζει η ετερογένεια των κυττάρων του καρκίνου του μαστού. Σπάνιοι κλώνοι με ιδιότητες βλαστικών κυττάρων (cancer stem cells, CSCs) επιβιώνουν της κάθε προσπάθειας εξολόθρευσης του καρκίνου και στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται με συνέπεια ο καρκίνος να υποτροπιάζει. Εκτός από τα de novo καρκινικά στελεχιαία κύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα αποκτούν τον παραπάνω φαινότυπο μέσω της επιθηλιομεσεγχυματογενούς μετατροπής. Η όλη διαδικασία βασίζεται σε επιγενετικά φαινόμενα όπως μέσω οριζόντιας μεταφοράς miRNAs διά των εξωσωμάτων. Σειρές ανθεκτικές σε δοξορουβικίνη και πακλιταξέλη απελευθερώνουν στην κυκλοφορία εξωσώματα εφοδιασμένα με miR-155. Χημειοευαίσθητα κύτταρα αποκτούν CSC-ιδιότητες αφότου έρθουν σε επαφή με τα εξωσώματα και αναπτύσσουν χημειοαντοχή. Επίσης όταν καλλιεργούνται σε τρισδιάστατες συνθήκες μπορούν και σχηματίζουν δομές (αγγλική ορολογία- mammospheres) χαρακτηριστικές των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Ακόμη, μέσω ανοσοϊστοχημείας ανιχνεύονται στην επιφανειά αυτών των κυττάρων οι δείκτες CD44+/CD24-/ALDH1+ που αντικατοπτρίζουν το λεγόμενο stemness δηλαδή την επάρκεια τους να συμπεριφέρονται ως βλαστικά. Το miR-155 απενεργοποιεί τον παράγοντα C/EBP-β (CCAAT/enhancer binding protein beta) αρνητικό ρυθμιστή της δράσης του παράγοντα TGF-β και τον μεταγραφικό παράγοντα FOXO3a (Forkhead box O3) ογκοκατασταλτικό και ανοσορυθμιστικό γονίδιο. Με την διπλή αυτή στόχευση ευοδώνεται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η επίκτητη ανάπτυξη χημειοαντοχής. Το miR-155 μπορεί να αξιοποιηθεί τόσο σαν προβλεπτικός βιοδείκτης αλλά και σαν θεραπευτικός στόχος [50].

Τα στρωματικά κύτταρα στο μικροπεριβάλλον του όγκου, όπως ήδη έχει αναφερθεί, δεν είναι απλοί παρατηρητές κατά την διάρκεια της ογκογένεσης και της προόδου της

νόσου. Αντιθέτως, αποτελούν αναντικατάστατο σύμμαχο των καρκινικών κυττάρων και παράγουν και τα ίδια εξωσώματα που ευεργετούν τον καρκίνο του μαστού. Η ομάδα των Mirjam C et al επιδίωξε να ρίξει περισσότερο φως σε αυτή την διαδικασία. Το αξιοσημείωτο σε αυτήν την υπόθεση είναι πως παρατηρούμε την επίδραση των εξωσωμάτων τόσο στην παρακρινή (paracrine) αλλά και στην συνδετοκρινή οδό (juxtacrine). Σε πρώτη φάση τα στρωματικά κύτταρα ενισχύουν την έκφραση μιας GTPάσης της οικογένειας Rho, την RAB27B η οποία συνδέεται με την παραγωγή εξωσωμάτων. Μέσω αυτής της οδού, τα στρωματικά κύτταρα μεταφέρουν εντός των εξωσωμάτων RNA υπό την μορφή 5-τριφωσφορικού RNA. Το συγκεκριμένο μόριο, διά της παρακρινής οδού αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα φυσικής ανοσίας αναγνώρισης μοτίβων (Pattern recognition receptor) RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Ο συγκεκριμένος υποδοχέας αναγνωρίζει RNA και εμπλέκεται στην σηματοδότηση κατά τις ιικές λοιμώξεις. Ταυτόχρονα τα καρκινικά κύτταρα αυξάνουν την έκφραση του μεμβρανικού υποδοχέα NOTCH3 (Neurogenic locus notch homolog protein 3) του οποίου ο προσδέτης είναι το μόριο JAG1 (Jagged Canonical Notch Ligand 1) στην επιφάνεια των στρωματικών κυττάρων (συνδετοκρινής οδός). Τα δύο μονοπάτια συγκλίνουν (converge) με αποτέλεσμα να ενισχυθεί η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) ευοδώνοντας το λεγόμενο Tumor- promoting inflammation (φλεγμονή που προάγει τον όγκο). Επίσης τα καρκινικά κύτταρα απέκτησαν ιδιότητες βλαστικών κυττάρων, μία παράμετρος η οποία καταγράφηκε δια της μετρήσεως του υποπληθυσμού κυττάρων CD44<sup>+</sup> CD24<sup>low</sup> τα οποία δυστυχώς εμφανίζουν σε μεγάλο βαθμό ανοχή στην χημειοθεραπεία [51].

Στην προηγούμενη διαδικασία αναφερθήκαμε στον ρόλο των RNA ως ενδογενών αγωνιστών των υποδοχέων φυσικής ανοσίας. Τα RNA που συσκευάζονται στα εξωσώματα των στρωματικών κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν πυροδοτούν ανοσιακή απάντηση διότι προστατεύονται από αναγνώριση λόγω ένωσης τους με πρωτεΐνες που δεσμεύουν RNA (RNA binding proteins). Ένα τέτοιο RNA είναι το RN7SL1 (RNA Component Of Signal Recognition Particle 7SL1) το οποίο βρίσκεται σε σύμπλοκο με την πρωτεΐνη SRP9/14(signal recognition particle 9/14). Στον καρκίνο του μαστού, τα νεοπλασματικά κύτταρα ενεργοποιούν την οδό NOTCH καθώς και το ογκογονίδιο MYC (Master Regulator of Cell Cycle Entry and Proliferative Metabolism) στα στρωματικά κύτταρα που τα πλαισιώνουν. Στην συνέχεια μέσω της πολυμεράσης III αυξάνονται τα



μετάγραφα του RN7SL1 αλλάζοντας την στοιχειομετρία του μορίου. Πλέον το RN7SL1 είναι σε περίσσεια σε σχέση με την SRP9/14 και αυτή η αθωράκιστη (unshielded) μορφή του καταλήγει εντός των στρωματικών εξωσωμάτων. Ο μηχανισμός οριζόντιας μεταφοράς χημειοαντίστασης μέσω σηματοδότησης του υποδοχέα RIG-I μπορεί να συνδεθεί με τις αλλαγές στην στοιχειομετρία των RNA προσδετών εντός των στρωματικών κυττάρων [52].

Τα εξωσώματα μπορούν και αλληλεπιδρούν και με άλλα μέλη της υπεροικογένειας STAT έχοντας όμως τελείως διαφορετικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Οι O' Brien et al χαρτογράφησαν το προφίλ των miRNAs στα εξωσώματα και στα κύτταρα του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού. Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 384 miRNAs που διαφέρουν σε σχέση με τον φυσιολογικό μαστικό ιστό και επιβεβαιώθηκε για ακόμη μία φορά ότι το φορτίο των εξωσωμάτων δεν είναι καθόλου τυχαίο αλλά άμεσα συνυφασμένο με την προέλευση του εκάστοτε κυττάρου. Επιπλέον, την μεγαλύτερη διαταραχή εμφάνιζαν miRNAs προερχόμενα από μία περιοχή του χρωμοσώματος 14 (14q32). Οι συγγραφείς εστίασαν στα επίπεδα του miR-134 (παρουσίαζε την μικρότερη έκφραση) του οποίου στόχος είναι ο μεταγραφικός παράγοντας STAT5B (signal transducer and activator of transcription 5B) κύριος ρυθμιστής της έκφρασης του σαπερονίου Heat Shock protein 90 (HSP90) το οποίο επηρεάζει την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη BCL2 ( B-cell lymphoma2) προσδίδοντας στα καρκινικά κύτταρα αντίσταση στην σισπλατίνη και σε φάρμακα ενάντια του σαπερονίου HSP90. Όταν λοιπόν κυτταρικές σειρές από τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού επωάστηκαν με εξωσώματα που μετέφεραν miR-134, μειώθηκε η ικανότητα των κυττάρων για διήθηση και διασπορά αλλά και η χημειοαντίσταση στους αναστολείς HSP90 (μόρια 17-AAG, PH-H71), ενώ παράλληλα μειώθηκαν αισθητά τα επίπεδα της BCL2 [53].

Ο παράγοντας STAT3 υπερεκφράζεται σε όσους ασθενείς έλαβαν νεοεπικουρική χημειοθεραπεία με δοξορουβικίνη και πακλιταξέλη και εμφάνισαν υποτροπή ή πρόοδο νόσου. Η ενεργοποίησή του δεν προέρχεται από de novo μετάλλαξη αλλά εξωσώματα διασπείρουν σε γειτονικά κακοήθη κύτταρα μαστού τα miR-378d και miR-378-3d τα οποία ενεργοποιούν το STAT3 μέσω του παράγοντα EZH2 (zeste homolog 2) Η αντίσταση υποστρέφει σε ξενομοσχεύματα ποντικών ύστερα από χορήγηση του EZH2 αναστολέα ταζεμετοστάτη συγχρόνως με την χημειοθεραπεία [54].

Οι Gao et al επέλεξαν να αναλύσουν περαιτέρω τα σήματα των εξωσωμάτων των ινοβλαστών σχετιζόμενων με καρκίνο. Το εξωσωματικής προελεύσεως miR-22 παράγεται

από ινοβλάστες που εκφράζουν στην επιφάνειά τους CD63 και ενοχοποιείται για την ανάπτυξη αντοχής στην ταμοξιφαίνη επειδή απενεργοποιεί το ογκοκατασταλτικό γονίδιο PTEN και τον υποδοχέα οιστρογόνων ERα. Ο συγκεκριμένος άξονας μπορούσε να υποστραφεί είτε μέσω anti-CD63 αντισωμάτων ή antagomir του miR-22 [55]. Στο ίδιο μήκος κύματος και οι παρατηρήσεις των Luo et al οι οποίοι ταυτοποίησαν το γονίδιο χημειοαντοχής S100A6 (S100 calcium binding protein A6) του οποίου η έκφραση αδρανοποιείται από το miR-21-5p [56].

Ο μυελός των οστών χρήζει ιδιαίτερης αναφοράς επειδή το μικροπεριβάλλον του αποτελεί το πλέον συχνό σημείο μετάστασης στον καρκίνο του μαστού αλλά και γιατί συγχρόνως καρκινικά κύτταρα μπορούν και εισέρχονται σε μία κατάσταση λήθαργου (dormancy) υποβοηθούμενα από τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα. Αυτή η ευνοϊκή για την επιβίωση των κυττάρων φωλιά (niche) απαιτεί επικοινωνία μεταξύ του καρκίνου και του στρώματος. Έως και 26% των ασθενών με πρώιμο στάδιο καρκίνου του μαστού εμφανίζουν μικρομεταστάσεις κατά την διάρκεια του πρώτου χειρουργείου. Ο ρόλος των κυτοκινών, όπως για παράδειγμα ο άξονας CXCR4–CXCL12, έχει αναλυθεί εκτενώς σε άλλες ανασκοπήσεις. Υπό την οπτική των εξωσωμάτων, το miR-23b (προερχόμενο από εξωσώματα των μεσεγχυματογενών βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών -MSCs) διέθετε την ικανότητα να προγραμματίζει τα κύτταρα αποδέκτες του καρκίνου του μαστού και να επάγει χημειοανθεκτικότητα και dormancy [57].

Η μελέτη των Bliss et al έρχεται να συμπληρώσει τα προηγούμενα ευρήματα επικεντρώνοντας ακόμα περισσότερο στο περιεχόμενο των εξωσωμάτων των MSCs. Καταρχάς είναι πολύ ενδιαφέρον το γεγονός ότι η χημειοαντοχή επάγεται μόνο όταν τα καρκινικά κύτταρα του μαστού δέχονται την επιρροή MSC- εξωσωμάτων προερχόμενα από τα ονομαζόμενα primed MSCs (που έχουν έρθει σε προηγούμενο στάδιο σε επαφή με νεοπλασματικά κύτταρα) και όχι από naive-MSC εξωσώματα (που δεν έχουν έρθει ποτέ σε επαφή με νεοπλασματικά κύτταρα). Δεύτερον, οι συγγραφείς επέλεξαν να αναλύσουν κυρίως τα miR-222, miR-223 η προέλευση των οποίων είναι τα εξωσώματα των MSCs. Τα καθορισμένα miRNAs συμμετέχουν στην δημιουργία διακυττάρων συνάψεων μεταξύ βλαστικών και καρκινικών κυττάρων, στην αύξηση της πι-γλυκοπρωτεΐνης με συνεπακόλουθη την επαγωγή χημειοαντοχής στην καρβοπλατίνη και στην είσοδο των καρκινικών κυττάρων σε αυτή την κατάσταση λήθαργο [58].

Μία διαφορετική αλλά άκρως διαφωτιστική προσέγγιση επέλεξαν οι Walker et al με το να αναλύσουν το προφίλ των εξωσωμάτων που απελευθερώνονται από τα μακροφάγα του μυελού των οστών που πλαισιώνουν τον καρκίνο του μαστού. Συνοπτικά τα μακροφάγα σχετιζόμενα με τον όγκο χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τα M1 μακροφάγα τα οποία σχετίζονται με ευνοϊκότερη πρόγνωση και τα M2 που επί της ουσίας υποστηρίουν διαρκώς την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Στο στρώμα του μυελού των οστών κυρίως συναντάμε M2 μακροφάγα. Υπάρχει η δυνατότητα να τα διεγείρουμε μέσω του υποδοχέα φυσικής ανοσίας Toll-like receptor 4. Αφότου ο φαινότυπος υποστραφεί σε M1 μακροφάγα τότε αυτά εκκρίνουν εξωσώματα τα οποία επάγουν την ενεργοποίηση του παράγοντα NF-kB. Ο παράγοντας αυτός είναι κύριος ρυθμιστής (master regulator) στην επαγωγή σημάτων φλεγμονώδους διεργασίας. Ακολούθως της ενεργοποίησης του συγκεκριμένου μονοπατιού τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα εξέρχονται της κατάστασης ληθάργου και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται και πάλι άρα γίνονται ευάλωτα στην χημειοθεραπεία [59].

Στις παραπάνω μελέτες η εκάστοτε ερευνητική ομάδα μελετάει ορισμένες πτυχές του άξονα επικοινωνίας μεταξύ στρώματος και καρκίνου. Ωστόσο τα στρωματικά κύτταρα μπορούν να ανταλλάσσουν μηνύματα και μεταξύ τους προκειμένου να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Εξωσώματα από μεσεγχυματογενή βλαστικά κύτταρα μεταφέρουν miRNAs, TGF- $\beta$  και την πρωτεΐνη συμπληρώματος C1q σε κύτταρα μυελοειδούς προελεύσεως με αποτέλεσμα αυτά να μετατρέπονται σε τύπου 2 μακροφάγα σχετιζόμενα με τον όγκο χαρακτηριζόμενα από την έκφραση CD206 και την έκκριση ιντερλευκίνης-10 στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Αυτή η λειτουργία δεν μπορεί να επιτευχθεί με την επώαση εξωσωμάτων του όγκου [60].

## **H. Εξωσώματα, miRNAs και κυκλίνες**

Οι κυκλίνες (A έως H) διαδραματίζουν εξέχοντα ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Ειδικότερα η κυκλίνη G2 (CGN2) συμπεριφέρεται ως ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο και τα επίπεδα της έχουν βρεθεί ελαττωμένα στον καρκίνο του μαστού. Εξωσωματικό miR-1246 προερχόμενο από κύτταρα καρκίνου του μαστού έχουν ως άμεσο στόχο την κυκλίνη G2. Όταν φυσιολογικά μαστικά κύτταρα επωάστηκαν με το miR-1246, απέκτησαν χημειοαντοχή στην γεμισαμπίνη, την επιρουβική και την δοσεταξέλη. Εάν

πειραματικώς μεταλλάξουμε την αλληλουχία seed στην 3' αμετάφραστη περιοχή στο μόριο της κυκλίνης G2, η οποία αναγνωρίζεται μέσω συμπληρωματικότητας από το miR-1246, τότε η χημειοαντοχή υποστρέφει [61]. Οι Bony et al ερεύνησαν περαιτέρω τον ρόλο του εξωσωματικού miR-503. Σε αυτή την περίπτωση όμως προέλευση των εξωσωμάτων είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Στόχος του miR-503 είναι οι κυκλίνες CCND2 και CCND3, εύρημα που καθιερώνει φέρνει στο προσκήνιο τα ενδοθηλιακά κύτταρα ως επίσης έναν από τους συμμάχους του καρκίνου στο μικροπεριβάλλον του όγκου [62,63].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ LNCRNAS (LONG-NON-CODING RNAS)

Τα lncRNAs είναι μία τάξη μορίων RNA μεγαλύτερα των 200 νουκλεοτιδίων. Όταν πρωτοανακαλύφθηκαν είχαν λανθασμένα θεωρηθεί ως αδρανή μόρια χωρίς βιολογική λειτουργία ενώ ακόμη και το ίδιο τους το όνομα είναι παραπλανητικό καθώς έχουν βρεθεί ορισμένα lncRNAs με δυνατότητα να εκφράζουν πεπτιδία με ενδεχόμενη βιολογική δράση. Η πολυμεράση II είναι υπεύθυνη για την μεταγραφή τους και ανάλογα με την προελευσή τους στο γονιδίωμα ταξινομούνται περαιτέρω σε διαγονιδιακά lncRNAs (ανάμεσα σε δύο γονίδια), intronic lncRNAs (προερχόμενα από ιντρόνια), overlapping lncRNAs (προκύπτουν από αλληλοεπικαλυπτόμενες αλληλουχίες μεταξύ δύο γονιδίων) και antisense lncRNAs (μεταγράφονται στην κατεύθυνση 3'-5') [64-66].

Όσον αφορά την λειτουργία τους, δρουν αναγωνιστικά με τα miRNAs καθώς εμφανίζουν συμπληρωματικότητα βάσεων, στην διεθνή βιβλιογραφία αυτή η δράση παρομοιάζεται με "σφουγγάρι" καθώς ένα lncRNA μπορεί και "απορροφά" πολλαπλά miRNAs. Επίσης μια δεύτερη ικανότητα τους είναι η αλληλεπίδραση με υποκινητές γονιδίων και ο απευθείας έλεγχος της μεταγραφής. Τέλος τα lncRNA παρουσιάζουν ποικίλες τρισδιάστατες δομές και μπορούν να προσδένονται με πρωτεΐνες επηρεάζοντας την λειτουργία τους [67,68].

Ο Zheng και οι συνεργάτες του προσπάθησαν να εξηγήσουν την ανάπτυξη χημειοαντοχής στο μονοκλωνικό αντίσωμα Trastuzumab, βασικό μας όπλο στην αντιμετώπιση του HER2+ καρκίνου του μαστού. Αρχικά απομόνωσαν εξωσώματα από ανθεκτικούς κλώνους και ανέδειξαν τα υψηλά επίπεδα του AGAP2-AS1 (ArfGAP with GTPase Domain, Ankyrin Repeat and PH Domain2- antisense RNA 1 provided). Η είσοδος του AGAP2-AS1 στα εξωσώματα εξαρτάται από την δράση της hnRNPA2B1 (HETEROGENEOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN A2/B1). Όταν παρεμποδίζεται ή αποσιωπάται το AGAP2-AS1 στα εξωσώματα τότε τα κύτταρα επανέρχονται στην πρώιμη κατάσταση χημειοευασθησίας στο Trastuzumab [69]. Παρεμβαλλόμενο στον άξονα απόπτωσης Bcl2-BAX, το lncRNA-SNHG14 (Small Nucleolar RNA Host Gene 14) που περιέχεται στα εξωσώματα επηρεάζει και αυτό την ανάπτυξη αντοχής στο Trastuzumab [70].

Όπως ακριβώς και με τα miRNAs η πηγή των lncRNAs μπορεί να είναι το στρώμα του όγκου. Είναι γνωστό πως ο μεταβολισμός των καρκινικών κυττάρων του μαστού προσαρμόζεται διαρκώς στις ανάγκες του νεοπλάσματος. Πρώτος ο Warburg διεπίστωσε ότι τα καρκινικά κύτταρα προτιμούν την φαινομενικά ασύμφορη αερόβια γλυκόλυση για την

παραγωγή ενέργειας. Σαν παραπροϊόν του μεταβολισμού, το γαλακτικό εξέρχεται των καρκινικών κυττάρων και επάγει την απελευθέρωση εξωσωμάτων από τα στρωματικά μακροφάγα. Τα εξωσώματα των μακροφάγων έχουν αυξημένα επίπεδα HISLA (HIF-1 $\alpha$ -stabilizing long noncoding RNA) ένα lncRNA το οποίο εμποδίζει την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης PHD2 (Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2) με τον παράγοντα HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia –inducible factor 1 $\alpha$ ) με αποτέλεσμα αυτός να μην καταστρέφεται και να επάγεται η χημειοαντίσταση των καρκινικών κυττάρων. Τα επίπεδα HISLA στα εξωσώματα των στρωματικών μακροφάγων ίσως θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως προβλεπτικός βιοδείκτης στο μέλλον [71].

Το lncRNA-UCA1 (urothelial cancer associated –1) αποτελεί και αυτό φορτίο των εξωσωμάτων των νεοπλασματικών κυττάρων και ευθύνεται για την ανάπτυξη χημειοαντοχής στην ταμοξιφαίνη. Μία από τις δράσεις του είναι η θετική ρύθμιση του μεταβολικού μονοπατιού mTOR (mammalian target of rapamycin) καθώς παράλληλα λειτουργεί ως “σφουγγάρι” του miR-18a του οποίου στόχος είναι ο παράγοντας HIF-1 $\alpha$ . Όταν τον lncRNA-UCA1 ανταγωνίζεται με το miR-18a, αυξάνονται τα επίπεδα του HIF-1 $\alpha$  και επάγεται η αντίσταση στην ταμοξιφαίνη [72].

Ένα επίσης lncRNA που εμπλέκεται στην υποστροφή αντίστασης στην δοξορουβικίνη είναι το H19. Στην εργασία των Wang δεν πραγματοποιήθηκε ανάλυση *in silico* των στόχων του αλλά αποδείχθηκε η ενσωμάτωσή του στα εξωσώματα και η ιδιότητα του να αυξάνει την απόπτωση των κυττάρων στόχων έπειτα από την χορήγηση δοξορουβικίνης καθώς και να μειώνει την ικανότητα των κυττάρων να σχηματίζουν αποικίες *in vitro* [73].

Το lncRNA-NEAT1 (Nuclear Paraspeckle Assembly Transcript 1) εμποδίζει το miR-141-3p. Το miR-141-3p υπό κανονικές συνθήκες αποσιωπεί τον παράγοντα KLF12 (Kruppel-like factor 12 protein) ο οποίος μετά την δράση των εξωσωμάτων είναι ελεύθερος να μπλοκάρει την δράση του p21, δημιουργώντας έτσι ένα πολύπλοκο δίκτυο αντίστασης στην σισπλατίνη και την πακλιταξέλη [74].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΚΥΚΛΙΚΟ NONCODING RNA

Τα κυκλικά non-coding RNAs (circRNAs) είναι μία άλλη μεγάλη κατηγορία μορίων της οποίας ο ρόλος αναδείχθηκε στις αρχές της προηγούμενης δεκαετίας παράλληλα με την ανάπτυξη πιο προηγμένων τεχνικών αλληλούχισης (high throughput RNA-seq) [75]. Πρόκειται για κλειστούς βρόχους RNA (RNA loops) που προκύπτουν ύστερα από ανάστροφο μάτισμα (back-splicing) όπου μία downstream δότρια περιοχή DNA ενώνεται με μία upstream δέκτρια-recipient περιοχή. Είχαν παρατηρηθεί με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο από την δεκαετία του 1970 και στην αρχή είχαν λανθασμένα θεωρηθεί RNA ιοί. CircRNAs έχουν κλωνοποιηθεί από όλες τις τάξεις ευκαρυωτικών οργανισμών αλλά για πολλές δεκαετίες η επιστημονική κοινότητα δεν είχε ασχοληθεί με τον μηχανισμό δράσης τους. Η πλήρης ανάλυση της λειτουργίας τους ξεπερνά τους σκοπούς της παρούσας αφηγηματικής ανασκόπησης, ωστόσο επιγραμματικά αναφέρεται πως δρουν ως miRNA όπως και ως πρωτεΐνικα “σφουγγάρια”. Επιπλέον επηρεάζουν μεταγραφικούς παράγοντες, το μάτισμα του mRNA, περιέχουν θέσεις πρόσδεσης ριβοσωμάτων (IRES-internal ribosome entry sites), κωδικοποιούν πεπτίδια αλλά ενέχουν και ρόλο ικριώματος, διευκολύνοντας την συναρμολόγηση πολυπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων [76,77].

Το circRNA-UBE2D2 συσκευάζεται σε εξωσώματα και με τον μηχανισμό σφουγγαριού -sponging παρακωλύοντας την δράση του miR-200a-3p με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων ER-a και προκαλώντας αντίσταση στην ταμοξιφαίνη [78].

Έναν ακόμη τέτοιο άξονα μελέτησε η ομάδα του Wu. Το circRNA MMP11(matrix metalloproteinase 11) ρυθμίζει το miR-153-3p το οποίο με τη σειρά του ρυθμίζει την πρωτεΐνη ANLN (anillin) η οποία συμμετέχει στην θέσπιση χημειοαντοχής στο lapatinib τον αναστολέα τυροσινικής κινάσης κάτωθεν (downstream) του HER2 [79]. Οι anti-HER2 θεραπείες από την άλλη φαίνεται να επηρεάζονται από την ανταγωνιστική δράση του circRNA HIPK3 (homeodomain interacting protein kinase 3) [80]. Αντιλαμβανόμαστε λοιπόν ότι πολλαπλά κυκλικά RNA μπορούν και επηρεάζουν το ίδιο μονοπάτι έχοντας όμως εντελώς διαφορετικούς στόχους.

Στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού το circCREIT ανευρίσκεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα και σχετίζεται με αντίσταση στην δοξορουβικίνη. Η δεσμεύουσα RNA πρωτεΐνη DHX9 (DExH-Box Helicase 9) εμποδίζει το backsplicing και την συναρμολόγησή του και ακυρώνει την δράση ικριώμα -scaffold για το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα PKR (protein

kinase R) και της E3 λιγάσης HACE1( HECT Domain And Ankyrin Repeat Containing e3 Ubiquitin protein ligase 1) Το δίκτυο αυτό μπορεί να αξιοποιηθεί και θεραπευτικά αφού το circCREIT μπορεί και επινέμεται μέσω εξωσωμάτων [81].



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΜΤDNA

Η πρώτη απόπειρα απόδειξης οριζόντιας μεταφοράς χημειοαντίστασης μέσω εξωσωματικού μιτοχονδριακού DNA πραγματοποιήθηκε από τους Sansone et al. Ολόκληρο το mtDNA απομονώθηκε σε εξωσώματα από ασθενείς με μεταστατικό και ανθεκτικό στην ορμονοθεραπεία καρκίνο του μαστού. Η κατηγορία αυτή των ασθενών παρουσιάζει υποτροπές πολλά χρόνια ύστερα από την φαινομενική υποστροφή του όγκου καθώς ο πληθυσμός των κυττάρων που επιβιώνει ύστερα από την ορμονοθεραπεία διαθέτει χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων και παραμένει σε μία κατάσταση ληθάργου. Συνήθως αυτό συνεπάγεται και με την απώλεια των μιτοχονδριακών γονιδίων οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Για λόγους που η επιστημονική κοινότητα δεν έχει πλήρως αποσαφηνίσει, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν και “ξυπνούν” έχοντας ανακτήσει το παλαιότερο μεταβολικό τους προφίλ. Από τους συγκεκριμένους ασθενείς δημιουργήθηκαν ξενομοσχεύματα (xenographs) σε ποντίκια. Είναι άκρως εντυπωσιακό πως η πηγή προέλευσης των mtDNA-εξωσωμάτων είναι από το στρώμα του όγκου και πιο συγκεκριμένα από τους ινοβλάστες σχετιζόμενους με καρκίνο (cancer-associated-fibroblasts). Όταν εισέρχεται το μιτοχονδριακό DNA εντός των κυττάρων του όγκου πυροδοτεί την παραγωγή ενέργειας μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης ανεξάρτητα από τον υποδοχέα οιστρογόνων (oestrogen receptor independent oxidative phosphorylation). Η σημαντική αυτή ανακάλυψη εξηγεί πως τα καρκινικά κύτταρα τροποποιούν τον μεταβολισμό τους υπό την επιρροή του στρώματος [82].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΛΟΙΠΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΧΗΜΕΙΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ

### A. Εξωσώματα και σερβαϊβίνη

Η χημειοθεραπεία μπορεί και επηρεάζει το φορτίο των εξωσωμάτων. Η επιθετική κυτταρική σειρά MDAMB231 παράγει εξωσώματα ανάλογα με την θεραπεία που χορηγούμε. Η πακλιταξέλη ανήκει σε μία κατηγορία φαρμάκων που εμποδίζουν την ομαλή λειτουργία των μικροσωληνίσκων. Τα εξωσώματα που παράχθηκαν έπειτα από χορήγηση πακλιταξέλης παρουσιάζουν πολύ αυξημένη έκφραση σερβαϊβίνης (survivin), γεγονός που δεν παρατηρήθηκε με τους υπόλοιπους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Όταν μάλιστα τα εξωσώματα επωάστηκαν μαζί με ινοβλάστες και χημειοευαίσθητες κυτταρικές σειρές κατάφεραν την οριζόντια μεταφορά χημειοαντίστασης η οποία εκπίπτει διά της αποσιώπησης της σερβαϊβίνης με την μέθοδο siRNA επικυρώνοντας έτσι την προβλεπτική αξία της παρατήρησης αυτής. Μετρώντας δηλαδή την σερβαϊβίνη στα εξωσώματα στον ορό τους ασθενούς μπορούμε να αντλήσουμε πληροφορίες σχετικά με την χημειοαντοχή των νεοπλασματικών κυτάρων στην πακλιταξέλη [83].

### B. Εξωσώματα και αντοχή στους αναστολείς CDK4/6 (Cyclin-dependent kinase 4 and 6)

Οι κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες 4/6 συμμετέχουν στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου με πρωταγωνιστικό ρόλο την μετάβαση του κυττάρου από την φάση G1 στην φάση S. Οι αναστολείς τους με κύριο εκπρόσωπο το palbociclib αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι στην αντιμετώπιση του ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου του μαστού. Ένας τρόπος ανάπτυξης χημειοαντίστασης διεκπεραιώνεται μέσω της υπερέκφρασης της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 6. Ρυθμιστής της όλης διαδικασίας φαίνεται πως είναι το miR-432-5p το οποίο μεταφέρεται μέσω εξωσωμάτων και καταστέλλει την σηματοδότηση μέσω του παράγοντα TGF-β. Τα κύρια γονίδια που επηρεάζονται είναι τα TGFBR3 (Transforming Growth Factor Beta Receptor 3) και SMAD4 (Mothers against decapentaplegic homolog 4). Η αντίσταση ωστόσο στο palbociclib μπορεί να αντιστραφεί τόσο in vitro αλλά και in vivo μέσω της διακοπής χορήγησης του φαρμάκου [84].

Ορός 40 ασθενών με ορμονοεξαρτώμενο καρκίνο του μαστού αναλύθηκε πριν την χορήγηση Palbociclib και ορμονοθεραπείας καθώς και 3 μήνες έπειτα από την έναρξη των εν λόγω θεραπειών. Στη συνέχεια αναλύθηκε το προφίλ mRNA των εξωσωμάτων στην κάθε κατηγορία. Διαπιστώθηκε πως όσοι ασθενείς εμφάνιζαν πρόοδο νόσου είχαν υψηλά επίπεδα CDK6 όπως αναμενόταν αλλά και TK1 (thymidine kinase 1) και CKDK9. Οι δύο αυτοί εξωσωματικοί δείκτες μπορούν και αυτοί να συνυπολογιστούν σε ότι αφορά την χημειοαντίσταση σε αναστολείς CDK4/6 [85].

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Είναι φανερό ότι η πρόοδος της μοριακής βιολογίας και των τεχνικών απομόνωσης και μελέτης των εξωσωμάτων έχει ήδη σημειώσει αλματώδη πρόοδο τα τελευταία χρόνια. Παράλληλα παρατηρούμε μία έκρηξη πληροφορίας γύρω από το περιεχόμενο των εξωσωμάτων υποβοηθούμενη από προηγμένες βάσεις δεδομένων βιοπληροφορικής.

Ευελπιστούμε ότι στο άμεσο μέλλον ο συγκερασμός των δύο πεδίων θα επιφέρει επανάσταση στο πεδίο της ογκολογίας . Τα εξωσώματα και το φορτίο τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ελάχιστα επεμβατικοί δείκτες έγκαιρης διάγνωσης, πρόγνωσης, πρόβλεψης μέσω εφαρμογής τεχνικών υγρής βιοψίας και τα αποτελέσματά τους να επηρεάσουν την διαχείριση του ασθενούς

Επιπλέον, ζούμε στην αυγή της εποχής της επέλασης της τεχνητής νοημοσύνης η οποία φαίνεται να προσδίδει μία πολλά υποσχόμενη νέα δυναμική στην θεραπεία του καρκίνου. Ίσως το επόμενο βήμα της ιατρικής ακριβείας είναι ο σχεδιασμός με μεθόδους deep learning εξωσωμάτων με τον βέλτιστο ιστικό τροπισμό και φορτίο το οποίο θα καθορίζεται από το γενετικό και επιγενετικό προφίλ του κάθε ασθενούς αλλά και από τα χαρακτηριστικά του όγκου.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.
2. Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J. et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* 5, 66 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
3. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*. 2019;321(3):288–300. doi:10.1001/jama.2018.19323
4. Łukasiewicz S, Czeczelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers (Basel)*. 2021 Aug 25;13(17):4287. doi: 10.3390/cancers13174287. PMID: 34503097; PMCID: PMC8428369.
5. Emran TB, Shahriar A, Mahmud AR, Rahman T, Abir MH, Siddiquee MF, Ahmed H, Rahman N, Nainu F, Wahyudin E, Mitra S, Dhama K, Habiballah MM, Haque S, Islam A, Hassan MM. Multidrug Resistance in Cancer: Understanding Molecular Mechanisms, Immunoprevention and Therapeutic Approaches. *Front Oncol*. 2022 Jun 23;12:891652. doi: 10.3389/fonc.2022.891652. PMID: 35814435; PMCID: PMC9262248.
6. Dai, J., Su, Y., Zhong, S. et al. Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Sig Transduct Target Ther* 5, 145 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00261-0>
7. Tai YL, Chen KC, Hsieh JT, Shen TL. Exosomes in cancer development and clinical applications. *Cancer Sci*. 2018 Aug;109(8):2364-2374. doi: 10.1111/cas.13697. Epub 2018 Jul 13. PMID: 29908100; PMCID: PMC6113508.
8. Harding C, Stahl P. Transferrin recycling in reticulocytes: pH and iron are important determinants of ligand binding and processing. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983 Jun 15;113(2):650-8. doi: 10.1016/0006-291x(83)91776-x. PMID: 6870878.
9. Soltész, B.; Buglyó, G.; Németh, N.; Szilágyi, M.; Pös, O.; Szemes, T.; Balogh, I.; Nagy, B. The Role of Exosomes in Cancer Progression. *Int. J. Mol. Sci*. 2022, 23, 8. <https://doi.org/10.3390/ijms23010008>

10. Ifergan I, Scheffer GL, Assaraf YG. Novel extracellular vesicles mediate an ABCG2-dependent anticancer drug sequestration and resistance. *Cancer Res.* 2005 Dec 1;65(23):10952-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2021. PMID: 16322243.
11. Ifergan I, Goler-Baron V, Assaraf YG. Riboflavin concentration within ABCG2-rich extracellular vesicles is a novel marker for multidrug resistance in malignant cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Feb 27;380(1):5-10. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.12.168. Epub 2009 Jan 10. PMID: 19138668.
12. Goler-Baron V, Assaraf YG. Structure and function of ABCG2-rich extracellular vesicles mediating multidrug resistance. *PLoS One.* 2011 Jan 24;6(1):e16007. doi: 10.1371/journal.pone.0016007. PMID: 21283667; PMCID: PMC3025911.
13. Pokharel D, Padula MP, Lu JF, Jaiswal R, Djordjevic SP, Bebawy M. The Role of CD44 and ERM Proteins in Expression and Functionality of P-glycoprotein in Breast Cancer Cells. *Molecules.* 2016 Mar 1;21(3):290. doi: 10.3390/molecules21030290. PMID: 26938523; PMCID: PMC6273996.
14. Pokharel D, Wijesinghe P, Oenarto V, Lu JF, Sampson DD, Kennedy BF, Wallace VP, Bebawy M. Deciphering Cell-to-Cell Communication in Acquisition of Cancer Traits: Extracellular Membrane Vesicles Are Regulators of Tissue Biomechanics. *OMICS.* 2016 Aug;20(8):462-9. doi: 10.1089/omi.2016.0072. PMID: 27501296.
15. Goler-Baron V, Sladkevich I, Assaraf YG. Inhibition of the PI3K-Akt signaling pathway disrupts ABCG2-rich extracellular vesicles and overcomes multidrug resistance in breast cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2012 May 15;83(10):1340-8. doi: 10.1016/j.bcp.2012.01.033. Epub 2012 Feb 8. PMID: 22342288.
16. Chen Y, Wang L, Zhu Y, Chen Z, Qi X, Jin L, Jin J, Hua D, Ma X. Breast cancer resistance protein (BCRP)-containing circulating microvesicles contribute to chemoresistance in breast cancer. *Oncol Lett.* 2015 Dec;10(6):3742-3748. doi: 10.3892/ol.2015.3806. Epub 2015 Oct 14. PMID: 26788201; PMCID: PMC4665209.
17. Ma X, Chen Z, Hua D, He D, Wang L, Zhang P, Wang J, Cai Y, Gao C, Zhang X, Zhang F, Wang T, Hong T, Jin L, Qi X, Chen S, Gu X, Yang D, Pan Q, Zhu Y, Chen Y, Chen D, Jiang L, Han X, Zhang Y, Jin J, Yao X. Essential role for TrpC5-containing extracellular vesicles in breast cancer with chemotherapeutic resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Apr 29;111(17):6389-94. doi: 10.1073/pnas.1400272111. Epub 2014 Apr 14. PMID: 24733904; PMCID: PMC4035923.

18. Wang T, Ning K, Lu TX, Sun X, Jin L, Qi X, Jin J, Hua D. Increasing circulating exosomes-carrying TRPC5 predicts chemoresistance in metastatic breast cancer patients. *Cancer Sci.* 2017 Mar;108(3):448-454. doi: 10.1111/cas.13150. PMID: 28032400; PMCID: PMC5378269.
19. Ning K, Wang T, Sun X, Zhang P, Chen Y, Jin J, Hua D. UCH-L1-containing exosomes mediate chemotherapeutic resistance transfer in breast cancer. *J Surg Oncol.* 2017 Jun;115(8):932-940. doi: 10.1002/jso.24614. Epub 2017 Mar 23. PMID: 28334432.
20. Yang SJ, Wang DD, Li J, Xu HZ, Shen HY, Chen X, Zhou SY, Zhong SL, Zhao JH, Tang JH. Predictive role of GSTP1-containing exosomes in chemotherapy-resistant breast cancer. *Gene.* 2017 Aug 5;623:5-14. doi: 10.1016/j.gene.2017.04.031. Epub 2017 Apr 21. PMID: 28438694.
21. Ciravolo V, Huber V, Ghedini GC, Venturelli E, Bianchi F, Campiglio M, Morelli D, Villa A, Della Mina P, Menard S, Filipazzi P, Rivoltini L, Tagliabue E, Pupa SM. Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy. *J Cell Physiol.* 2012 Feb;227(2):658-67. doi: 10.1002/jcp.22773. PMID: 21465472.
22. Martinez VG, O'Neill S, Salimu J, Breslin S, Clayton A, Crown J, O'Driscoll L. Resistance to HER2-targeted anti-cancer drugs is associated with immune evasion in cancer cells and their derived extracellular vesicles. *Oncoimmunology.* 2017 Aug 11;6(12):e1362530. doi: 10.1080/2162402X.2017.1362530. PMID: 29209569; PMCID: PMC5706614.
23. Alawin OA, Ahmed RA, Dronamraju V, Briski KP, Sylvester PW.  $\gamma$ -Tocotrienol-induced disruption of lipid rafts in human breast cancer cells is associated with a reduction in exosome heregulin content. *J Nutr Biochem.* 2017 Oct;48:83-93. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.06.013. Epub 2017 Jul 10. PMID: 28797930.
24. Kavanagh EL, Lindsay S, Halasz M, Gubbins LC, Weiner-Gorzel K, Guang MHZ, McGoldrick A, Collins E, Henry M, Blanco-Fernández A, O Gorman P, Fitzpatrick P, Higgins MJ, Dowling P, McCann A. Protein and chemotherapy profiling of extracellular vesicles harvested from therapeutic induced senescent triple negative breast cancer cells. *Oncogenesis.* 2017 Oct 9;6(10):e388. doi: 10.1038/oncsis.2017.82. PMID: 28991260; PMCID: PMC5668881.

25. Hung Y, Wang YL, Lin YZ, Chiang SF, Wu WR, Wang SC. The exosomal compartment protects epidermal growth factor receptor from small molecule inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Feb 26;510(1):42-47. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.12.187. Epub 2019 Jan 23. PMID: 30683316.
26. Lee R, Feinbaum R, Ambros V. The *c. Elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small rnas with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843 –54.
27. Corcoran C, Friel AM, Duffy MJ, Crown J, O'Driscoll L. Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer. *Clin Chem.* 2011 Jan;57(1):18-32. doi: 10.1373/clinchem.2010.150730. Epub 2010 Nov 8. PMID: 21059829.
28. Takahashi RU, Miyazaki H, Ochiya T. The Roles of MicroRNAs in Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2015 Apr 9;7(2):598-616. doi: 10.3390/cancers7020598. PMID: 25860815; PMCID: PMC4491673.
29. Bockhorn J., Dalton R., Nwachukwu C., Huang S., Prat A., Yee K., Chang Y.F., Huo D., Wen Y., Swanson K.E., et al. MicroRNA-30c inhibits human breast tumour chemotherapy resistance by regulating TWF1 and IL-11. *Nat. Commun.* 2013;4 doi: 10.1038/ncomms2393.
30. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Nov 26;99(24):15524-9. doi: 10.1073/pnas.242606799. Epub 2002 Nov 14. PMID: 12434020; PMCID: PMC137750.
31. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005 Aug 15;65(16):7065-70. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1783. PMID: 16103053.
32. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, et al. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9: 654–659.
33. Jaiswal R, Luk F, Gong J, Mathys JM, Grau GE, Bebawy M. Microparticle conferred microRNA profiles--implications in the transfer and dominance of cancer traits. *Mol*



- Cancer. 2012 Jun 8;11:37. doi: 10.1186/1476-4598-11-37. PMID: 22682234; PMCID: PMC3499176.
34. Chen WX, Liu XM, Lv MM, Chen L, Zhao JH, Zhong SL, Ji MH, Hu Q, Luo Z, Wu JZ, Tang JH. Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs. *PLoS One*. 2014 Apr 16;9(4):e95240. doi: 10.1371/journal.pone.0095240. PMID: 24740415; PMCID: PMC3989268.
35. Wei Y, Lai X, Yu S, Chen S, Ma Y, Zhang Y, Li H, Zhu X, Yao L, Zhang J. Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Sep;147(2):423-31. doi: 10.1007/s10549-014-3037-0. Epub 2014 Jul 10. PMID: 25007959.
36. Chen WX, Cai YQ, Lv MM, Chen L, Zhong SL, Ma TF, Zhao JH, Tang JH. Exosomes from docetaxel-resistant breast cancer cells alter chemosensitivity by delivering microRNAs. *Tumour Biol*. 2014 Oct;35(10):9649-59. doi: 10.1007/s13277-014-2242-0. Epub 2014 Jun 27. PMID: 24969560.
37. Mao L, Li J, Chen WX, Cai YQ, Yu DD, Zhong SL, Zhao JH, Zhou JW, Tang JH. Exosomes decrease sensitivity of breast cancer cells to adriamycin by delivering microRNAs. *Tumour Biol*. 2016 Apr;37(4):5247-56. doi: 10.1007/s13277-015-4402-2. Epub 2015 Nov 10. PMID: 26555545.
38. Jia Z, Zhu H, Sun H, Hua Y, Zhang G, Jiang J, Wang X. Adipose Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomal microRNA-1236 Reduces Resistance of Breast Cancer Cells to Cisplatin by Suppressing SLC9A1 and the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *Cancer Manag Res*. 2020 Sep 22;12:8733-8744. doi: 10.2147/CMAR.S270200. PMID: 33061571; PMCID: PMC7519869.
39. Yu DD, Wu Y, Zhang XH, Lv MM, Chen WX, Chen X, Yang SJ, Shen H, Zhong SL, Tang JH, Zhao JH. Exosomes from adriamycin-resistant breast cancer cells transmit drug resistance partly by delivering miR-222. *Tumour Biol*. 2016 Mar;37(3):3227-35. doi: 10.1007/s13277-015-4161-0. Epub 2015 Oct 2. PMID: 26432333.
40. Zhong S, Chen X, Wang D, Zhang X, Shen H, Yang S, Lv M, Tang J, Zhao J. MicroRNA expression profiles of drug-resistance breast cancer cells and their exosomes. *Oncotarget*. 2016 Apr 12;7(15):19601-9. doi: 10.18632/oncotarget.7481. PMID: 26910922; PMCID: PMC4991404.

41. Chen WX, Xu LY, Qian Q, He X, Peng WT, Zhu YL, Cheng L. Analysis of miRNA signature differentially expressed in exosomes from adriamycin-resistant and parental human breast cancer cells. *Biosci Rep.* 2018 Nov 15;38(6):BSR20181090. doi: 10.1042/BSR20181090. PMID: 30201690; PMCID: PMC6240718.
42. Wang B, Zhang Y, Ye M, Wu J, Ma L, Chen H. Cisplatin-resistant MDA-MB-231 Cell-derived Exosomes Increase the Resistance of Recipient Cells in an Exosomal miR-423-5p-dependent Manner. *Curr Drug Metab.* 2019;20(10):804-814. doi: 10.2174/1389200220666190819151946. PMID: 31424364.
43. Shen M, Dong C, Ruan X, Yan W, Cao M, Pizzo D, Wu X, Yang L, Liu L, Ren X, Wang SE. Chemotherapy-Induced Extracellular Vesicle miRNAs Promote Breast Cancer Stemness by Targeting ONECUT2. *Cancer Res.* 2019 Jul 15;79(14):3608-3621. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-4055. Epub 2019 May 22. PMID: 31118200; PMCID: PMC8972808.
44. Kreger BT, Johansen ER, Cerione RA, Antonyak MA. The Enrichment of Survivin in Exosomes from Breast Cancer Cells Treated with Paclitaxel Promotes Cell Survival and Chemoresistance. *Cancers (Basel).* 2016 Dec 9;8(12):111. doi: 10.3390/cancers8120111. PMID: 27941677; PMCID: PMC5187509.
45. Han M, Hu J, Lu P, Cao H, Yu C, Li X, Qian X, Yang X, Yang Y, Han N, Dou D, Zhang F, Ye M, Yang C, Gu Y, Dong H. Exosome-transmitted miR-567 reverses trastuzumab resistance by inhibiting ATG5 in breast cancer. *Cell Death Dis.* 2020 Jan 22;11(1):43. doi: 10.1038/s41419-020-2250-5. PMID: 31969559; PMCID: PMC6976584.
46. Zhang Z, Zhang L, Yu G, Sun Z, Wang T, Tian X, Duan X, Zhang C. Exosomal miR-1246 and miR-155 as predictive and prognostic biomarkers for trastuzumab-based therapy resistance in HER2-positive breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2020 Dec;86(6):761-772. doi: 10.1007/s00280-020-04168-z. Epub 2020 Oct 17. PMID: 33068176.
47. Li Y, Liang Y, Sang Y, Song X, Zhang H, Liu Y, Jiang L, Yang Q. MiR-770 suppresses the chemo-resistance and metastasis of triple negative breast cancer via direct targeting of STMN1. *Cell Death Dis.* 2018 Jan 11;9(1):14. doi: 10.1038/s41419-017-0030-7. PMID: 29323124; PMCID: PMC5849036.
48. Chen WX, Zhong SL, Ji MH, Pan M, Hu Q, Lv MM, Luo Z, Zhao JH, Tang JH. MicroRNAs delivered by extracellular vesicles: an emerging resistance mechanism

- for breast cancer. *Tumour Biol.* 2014 Apr;35(4):2883-92. doi: 10.1007/s13277-013-1417-4. Epub 2013 Nov 22. PMID: 24272085.
49. Yu S, Wei Y, Xu Y, Zhang Y, Li J, Zhang J. Extracellular vesicles in breast cancer drug resistance and their clinical application. *Tumour Biol.* 2016 Mar;37(3):2849-61. doi: 10.1007/s13277-015-4683-5. Epub 2016 Jan 21. PMID: 26797784.
50. Santos JC, Lima NDS, Sarian LO, Matheu A, Ribeiro ML, Derchain SFM. Exosome-mediated breast cancer chemoresistance via miR-155 transfer. *Sci Rep.* 2018 Jan 16;8(1):829. doi: 10.1038/s41598-018-19339-5. PMID: 29339789; PMCID: PMC5770414.
51. Boelens MC, Wu TJ, Nabet BY, Xu B, Qiu Y, Yoon T, Azzam DJ, Twyman-Saint Victor C, Wiemann BZ, Ishwaran H, Ter Brugge PJ, Jonkers J, Slingerland J, Minn AJ. Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways. *Cell.* 2014 Oct 23;159(3):499-513. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.051. PMID: 25417103; PMCID: PMC4283810.
52. Nabet BY, Qiu Y, Shabason JE, Wu TJ, Yoon T, Kim BC, Benci JL, DeMichele AM, Tchou J, Marcotrigiano J, Minn AJ. Exosome RNA Unshielding Couples Stromal Activation to Pattern Recognition Receptor Signaling in Cancer. *Cell.* 2017 Jul 13;170(2):352-366.e13. doi: 10.1016/j.cell.2017.06.031. PMID: 28709002; PMCID: PMC6611169.
53. O'Brien K, Lowry MC, Corcoran C, Martinez VG, Daly M, Rani S, Gallagher WM, Radomski MW, MacLeod RA, O'Driscoll L. miR-134 in extracellular vesicles reduces triple-negative breast cancer aggression and increases drug sensitivity. *Oncotarget.* 2015 Oct 20;6(32):32774-89. doi: 10.18632/oncotarget.5192. PMID: 26416415; PMCID: PMC4741729.
54. Yang Q, Zhao S, Shi Z, Cao L, Liu J, Pan T, Zhou D, Zhang J. Chemotherapy-elicited exosomal miR-378a-3p and miR-378d promote breast cancer stemness and chemoresistance via the activation of EZH2/STAT3 signaling. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021 Apr 6;40(1):120. doi: 10.1186/s13046-021-01901-1. PMID: 33823894; PMCID: PMC8022546.
55. Yang Q, Zhao S, Shi Z, Cao L, Liu J, Pan T, Zhou D, Zhang J. Chemotherapy-elicited exosomal miR-378a-3p and miR-378d promote breast cancer stemness and chemoresistance via the activation of EZH2/STAT3 signaling. *J Exp Clin Cancer*

- Res. 2021 Apr 6;40(1):120. doi: 10.1186/s13046-021-01901-1. PMID: 33823894; PMCID: PMC8022546.
56. Luo T, Liu Q, Tan A, Duan L, Jia Y, Nong L, Tang J, Zhou W, Xie W, Lu Y, Yu Q, Liu Y. Mesenchymal Stem Cell-Secreted Exosome Promotes Chemoresistance in Breast Cancer via Enhancing miR-21-5p-Mediated S100A6 Expression. *Mol Ther Oncolytics*. 2020 Oct 20;19:283-293. doi: 10.1016/j.omto.2020.10.008. PMID: 33294586; PMCID: PMC7689030.
57. Walker ND, Patel J, Munoz JL, Hu M, Guiro K, Sinha G, Rameshwar P. The bone marrow niche in support of breast cancer dormancy. *Cancer Lett*. 2016 Sep 28;380(1):263-71. doi: 10.1016/j.canlet.2015.10.033. Epub 2015 Nov 3. PMID: 26546045.
58. Bliss SA, Sinha G, Sandiford OA, Williams LM, Engelberth DJ, Guiro K, Isenalumhe LL, Greco SJ, Ayer S, Bryan M, Kumar R, Ponzio NM, Rameshwar P. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Stimulate Cycling Quiescence and Early Breast Cancer Dormancy in Bone Marrow. *Cancer Res*. 2016 Oct 1;76(19):5832-5844. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1092. Epub 2016 Aug 28. PMID: 27569215.
59. Walker ND, Elias M, Guiro K, Bhatia R, Greco SJ, Bryan M, Gergues M, Sandiford OA, Ponzio NM, Leibovich SJ, Rameshwar P. Exosomes from differentially activated macrophages influence dormancy or resurgence of breast cancer cells within bone marrow stroma. *Cell Death Dis*. 2019 Jan 25;10(2):59. doi: 10.1038/s41419-019-1304-z. PMID: 30683851; PMCID: PMC6347644.
60. Biswas S, Mandal G, Roy Chowdhury S, Purohit S, Payne KK, Anadon C, Gupta A, Swanson P, Yu X, Conejo-Garcia JR, Bhattacharyya A. Exosomes Produced by Mesenchymal Stem Cells Drive Differentiation of Myeloid Cells into Immunosuppressive M2-Polarized Macrophages in Breast Cancer. *J Immunol*. 2019 Dec 15;203(12):3447-3460. doi: 10.4049/jimmunol.1900692. Epub 2019 Nov 8. PMID: 31704881; PMCID: PMC6994919.
61. Li XJ, Ren ZJ, Tang JH, Yu Q. Exosomal MicroRNA MiR-1246 Promotes Cell Proliferation, Invasion and Drug Resistance by Targeting CCNG2 in Breast Cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44(5):1741-1748. doi: 10.1159/000485780. Epub 2017 Dec 6. PMID: 29216623.
62. Bovy N, Blomme B, Frères P, Dederen S, Nivelles O, Lion M, Carnet O, Martial JA, Noël A, Thiry M, Jérusalem G, Josse C, Bours V, Tabruyn SP, Struman I.

- Endothelial exosomes contribute to the antitumor response during breast cancer neoadjuvant chemotherapy via microRNA transfer. *Oncotarget*. 2015 Apr 30;6(12):10253-66. doi: 10.18632/oncotarget.3520. PMID: 25860935; PMCID: PMC4496353.
63. Schwarzenbach H, Gahan PB. Predictive value of exosomes and their cargo in drug response/resistance of breast cancer patients. *Cancer Drug Resist*. 2020 Mar 19;3(1):63-82. doi: 10.20517/cdr.2019.90. PMID: 35582044; PMCID: PMC9094052.
64. Nojima, T., Proudfoot, N.J. Mechanisms of lncRNA biogenesis as revealed by nascent transcriptomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23, 389–406 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00447-6>
65. Ying Liu, Wei Ding, Wanpeng Yu, Yuan Zhang, Xiang Ao, Jianxun Wang. Long non-coding RNAs: Biogenesis, functions, and clinical significance in gastric cancer. *Molecular Therapy – Oncolytics*. Volume 23, 2021: 458-476, ISSN 2372-7705, <https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.11.005>.
66. Dahariya S, Paddibhatla I, Kumar S, Raghuwanshi S, Palapati A, Gutti RK. Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells. *Mol Immunol*. 2019 Aug;112:82-92. doi: 10.1016/j.molimm.2019.04.011. Epub 2019 May 9. PMID: 31079005.
67. Namee NM, O'Driscoll L. Extracellular vesicles and anti-cancer drug resistance. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2018 Dec;1870(2):123-136. doi: 10.1016/j.bbcan.2018.07.003. Epub 2018 Jul 10. PMID: 30003999.
68. Statello, L., Guo, C.J., Chen, LL. et al. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 96–118 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>
69. Zheng Z, Chen M, Xing P, Yan X, Xie B. Increased Expression of Exosomal AGAP2-AS1 (AGAP2 Antisense RNA 1) In Breast Cancer Cells Inhibits Trastuzumab-Induced Cell Cytotoxicity. *Med Sci Monit*. 2019 Mar 26;25:2211-2220. doi: 10.12659/MSM.915419. PMID: 30910994; PMCID: PMC6446658.
70. Dong H, Wang W, Chen R, Zhang Y, Zou K, Ye M, He X, Zhang F, Han J. Exosome-mediated transfer of lncRNA-SNHG14 promotes trastuzumab chemoresistance in breast cancer. *Int J Oncol*. 2018 Sep;53(3):1013-1026. doi: 10.3892/ijo.2018.4467. Epub 2018 Jul 3. Retraction in: *Int J Oncol*. 2022 Aug;61(2): PMID: 30015837; PMCID: PMC6065402.

71. Chen F, Chen J, Yang L, Liu J, Zhang X, Zhang Y, Tu Q, Yin D, Lin D, Wong PP, Huang D, Xing Y, Zhao J, Li M, Liu Q, Su F, Su S, Song E. Extracellular vesicle-packaged HIF-1 $\alpha$ -stabilizing lncRNA from tumour-associated macrophages regulates aerobic glycolysis of breast cancer cells. *Nat Cell Biol.* 2019 Apr;21(4):498-510. doi: 10.1038/s41556-019-0299-0. Epub 2019 Apr 1. PMID: 30936474.
72. Yousefi H, Maheronnaghsh M, Molaei F, Mashouri L, Reza Aref A, Momeny M, Alahari SK. Long noncoding RNAs and exosomal lncRNAs: classification, and mechanisms in breast cancer metastasis and drug resistance. *Oncogene.* 2020 Jan;39(5):953-974. doi: 10.1038/s41388-019-1040-y. Epub 2019 Oct 10. PMID: 31601996.
73. Wang X, Pei X, Guo G, Qian X, Dou D, Zhang Z, Xu X, Duan X. Exosome-mediated transfer of long noncoding RNA H19 induces doxorubicin resistance in breast cancer. *J Cell Physiol.* 2020 Oct;235(10):6896-6904. doi: 10.1002/jcp.29585. Epub 2020 Jan 29. PMID: 31994191.
74. Zhou D, Gu J, Wang Y, Wu H, Cheng W, Wang Q, Zheng G, Wang X. Long non-coding RNA NEAT1 transported by extracellular vesicles contributes to breast cancer development by sponging microRNA-141-3p and regulating KLF12. *Cell Biosci.* 2021 Apr 5;11(1):68. doi: 10.1186/s13578-021-00556-x. PMID: 33820555; PMCID: PMC8022671.
75. Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu J, Marzluff WF, Sharpless NE. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA.* 2013 Feb;19(2):141-57. doi: 10.1261/rna.035667.112. Epub 2012 Dec 18. Erratum in: *RNA.* 2013 Mar;19(3):426. PMID: 23249747; PMCID: PMC3543092.
76. Zhang XO, Wang HB, Zhang Y, Lu X, Chen LL, Yang L. Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell.* 2014 Sep 25;159(1):134-147. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.001. Epub 2014 Sep 18. PMID: 25242744.
77. Han B, Chao J, Yao H. Circular RNA and its mechanisms in disease: From the bench to the clinic. *Pharmacol Ther.* 2018 Jul;187:31-44. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.01.010. Epub 2018 Feb 14. PMID: 29406246.
78. Hu K, Liu X, Li Y, Li Q, Xu Y, Zeng W, Zhong G, Yu C. Exosomes Mediated Transfer of Circ\_UBE2D2 Enhances the Resistance of Breast Cancer to Tamoxifen by

- Binding to MiR-200a-3p. *Med Sci Monit.* 2020 Aug 5;26:e922253. doi: 10.12659/MSM.922253. PMID: 32756532; PMCID: PMC7431386.
79. Wu X, Ren Y, Yao R, Zhou L, Fan R. Circular RNA circ-MMP11 Contributes to Lapatinib Resistance of Breast Cancer Cells by Regulating the miR-153-3p/ANLN Axis. *Front Oncol.* 2021 Jul 6;11:639961. doi: 10.3389/fonc.2021.639961. PMID: 34295807; PMCID: PMC8290203.
80. Zhang H, Yan C, Wang Y. Exosome-mediated transfer of circHIPK3 promotes trastuzumab chemoresistance in breast cancer. *J Drug Target.* 2021 Nov;29(9):1004-1015. doi: 10.1080/1061186X.2021.1906882. Epub 2021 Jul 29. PMID: 33775192.
81. Wang X, Chen T, Li C, Li W, Zhou X, Li Y, Luo D, Zhang N, Chen B, Wang L, Zhao W, Fu S, Yang Q. CircRNA-CREIT inhibits stress granule assembly and overcomes doxorubicin resistance in TNBC by destabilizing PKR. *J Hematol Oncol.* 2022 Aug 29;15(1):122. doi: 10.1186/s13045-022-01345-w. PMID: 36038948; PMCID: PMC9425971.
82. Sansone P, Savini C, Kurelac I, Chang Q, Amato LB, Strillacci A, Stepanova A, Iommarini L, Mastroleo C, Daly L, Galkin A, Thakur BK, Soplop N, Uryu K, Hoshino A, Norton L, Bonafé M, Cricca M, Gasparre G, Lyden D, Bromberg J. Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Oct 24;114(43):E9066-E9075. doi: 10.1073/pnas.1704862114. Epub 2017 Oct 11. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Nov 13;: PMID: 29073103; PMCID: PMC5664494.
83. Kreger BT, Johansen ER, Cerione RA, Antonyak MA. The Enrichment of Survivin in Exosomes from Breast Cancer Cells Treated with Paclitaxel Promotes Cell Survival and Chemoresistance. *Cancers (Basel).* 2016 Dec 9;8(12):111. doi: 10.3390/cancers8120111. PMID: 27941677; PMCID: PMC5187509.
84. Cornell L, Wander SA, Visal T, Wagle N, Shapiro GI. MicroRNA-Mediated Suppression of the TGF- $\beta$  Pathway Confers Transmissible and Reversible CDK4/6 Inhibitor Resistance. *Cell Rep.* 2019 Mar 5;26(10):2667-2680.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.02.023. PMID: 30840889; PMCID: PMC6449498.
85. Del Re M, Bertolini I, Crucitta S, Fontanelli L, Rofi E, De Angelis C, Diodati L, Cavallero D, Gianfilippo G, Salvadori B, Fogli S, Falcone A, Scatena C, Naccarato

AG, Roncella M, Ghilli M, Morganti R, Fontana A, Danesi R. Overexpression of TK1 and CDK9 in plasma-derived exosomes is associated with clinical resistance to CDK4/6 inhibitors in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2019 Nov;178(1):57-62. doi: 10.1007/s10549-019-05365-y. Epub 2019 Jul 26. PMID: 31346846.