



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Α΄ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«Νεοπλασματική Νόσος στον Άνθρωπο: Έρευνα και Κλινικοπαθολογοανατομική
Προσέγγιση στα Πλαίσια της Εξατομικευμένης Ιατρικής (Διάγνωση και Στοχευμένη
Θεραπεία)»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΕΦΡΙΝΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Αντωνία Κατερίνα Πλιάκου

ΑΘΗΝΑ
ΙΟΥΝΙΟΣ 2023

Περιεχόμενα

1. Περίληψη

1.1. Περίληψη Ελληνική

1.2. Περίληψη Αγγλική

2. Εισαγωγή

3. Εφρίνες και υποδοχείς εφρινών.

3.1. Κατηγοριοποίηση

3.2. Δομικά χαρακτηριστικά υποδοχέων εφρινών.

3.3. Δομικά χαρακτηριστικά εφρινών

4. Σηματοδότηση

4.1. Μηχανισμοί σηματοδότησης

4.1.1. Εμπρόσθια σηματοδότηση

- Ligand-εξαρτημένη σηματοδότηση
- In cis σηματοδότηση
- Ligand-ανεξάρτητη σηματοδότηση
- Παρακρινείς και αυτοκρινείς μηχανισμοί σηματοδότησης

4.1.2. Αντίστροφη σηματοδότηση

- Εφρίνες Β
- Σηματοδότηση εξαρτημένη από την πρόσδεση στον υποδοχέα
- Σηματοδότηση ανεξάρτητη από την πρόσδεση στον υποδοχέα
- Εφρίνες Α

4.2. Αποτελέσματα σηματοδότησης

4.2.1. Οργάνωση/Μορφογένεση ιστών

- Ανάπτυξη νευρώνων
- Συναπτική πλαστικότητα
- Συγκρότηση βλαστοκυττάρων εντερικού επιθηλίου
- Ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των εντερικών βλαστοκυττάρων
- Κρανιοπρωσοπική και μυοσκελετική ανάπτυξη
- Ρύθμιση και διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων

4.2.2. Επούλωση ιστών

- 4.2.3. Λειτουργία ανοσοποιητικού συστήματος
- 4.2.4. Ιογενείς λοιμώξεις
- 4.2.5. Διατήρηση ομοιόστασης-Ρύθμιση ινσουλίνης
- 4.2.6. Διαμόρφωση πόνου
- 4.2.7. Αγγειογένεση

5. Συμμετοχή των υποδοχέων εφρινών και των εφρινών στον καρκίνο

5.1. Προαγωγή ογκογένεσης

5.2. Ογκοκατασταλτικές ιδιότητες

5.3. Νεοαγγειογένεση όγκου

- Νεοαγγειογένεση σε υποξικό περιβάλλον
- Αγγειογενής μιμητισμός

5.4. Μικροπεριβάλλον όγκου

- Eϋh και TILs(Tumor infiltrating cells)
- Ανοσοκαταστολή
- Ανοσοεπιτήρηση
- Επιθηλιακή μεσεγχυματική μετάβαση

6. Συμμετοχή των Eϋh και των εφρινών στον καρκίνο του μαστού

6.1. Ο ρόλος των Eϋh και των εφρινών στην φυσιολογική διαμόρφωση του ιστού

- Φυσιολογική έκφραση των Eϋh και των εφρινών στο επιθήλιο του μαστού
- Μορφογένεση ιστού
- Ομοιόσταση μαστικών βλαστοκυττάρων
- Ανοικοδόμηση αγγείων στον μαστό

6.2. Επιδημιολογικά στοιχεία και κατηγοριοποίηση του καρκίνου του μαστού

6.3. Η συμβολή των Eϋh και εφρινών στην παθογένεια και εξέλιξη του καρκίνου του μαστού

6.3.1. EϋhA2

- Η ογκογόνος δράση του EϋhA2 στον καρκίνο του μαστού και η σχέση του με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια
- Συμμετοχή στην αγγειογένεση
- Αγγειογένεση μέσω εξωσωμάτων
- Κυτταροσκελετική κατάρρευση και διήθηση

- Προγνωστική αξία
 - TNBC
 - HER(+) καρκίνος του μαστού
 - ER(+) καρκίνος του μαστού
- 6.3.2. Epha4
- Η σχέση του με το μικροπεριβάλλον του όγκου
 - TNBC
- 6.3.3. Epha5
- 6.3.4. Epha6
- 6.3.5. Epha7
- 6.3.6. Epha10
- Συσχέτιση με λεμφαδενικές μεταστάσεις
 - Σχέση ισομερών του Epha10 με τον καρκίνο του μαστού
 - Συσχέτιση με ανοσολογικές αποκρίσεις
 - Συνεργιστική δράση με την πρωτεΐνη Gli3
 - TNBC
- 6.3.7. EphaB2
- 6.3.8. EphaB4
- Προ-ογκογονικές και αντι-ογκογονικές δράσεις στον καρκίνο του μαστού
 - Συμμετοχή στην αγγειογένεση
 - Συμμετοχή στα βλαστοκύτταρα του μαστού
 - Συμμετοχή στην διατάραξη του κυτταροσκελετού
 - HER2(+), ER(+) και TNBC
- 6.3.9. EphaB6
- Σηματοδοτικές οδοί
 - TNBC
- 6.3.10. Εφρίνη B1

7. Στόχευση των υποδοχέων εφρινών στον καρκίνο του μαστού

7.1. Αντισώματα

7.1.1. Epha2

7.1.2. Epha10

- 7.2. Ανοσοθεραπεία
 - 7.2.1. ErhA2
 - 7.2.2. ErhA10
- 7.3. Σύζευξη πεπτιδίων, αντισωμάτων ή εφρινών με κυτταροτοξικούς παράγοντες
 - 7.3.1. ErhA2
 - 7.3.2. ErhA10
 - 7.3.3. ErhB4
 - 7.3.4. ΕφρίνηB4
- 7.4. Μικρά μόρια αναστολείς
 - 7.4.1. Παν-Erh αναστολείς
 - 7.4.2. ErhA2
 - 7.4.3. ErhB4
- 7.5. Έμμεση στόχευση
 - 7.5.1. Αναστολέας Src κινάσης στο πλαίσιο συνθετικά θανατηφόρων ιδιοτήτων
 - 7.5.2. Αντισώματα που στοχεύουν τις πρωτεΐνες ADAM
 - 7.5.3. Ανταγωνιστές FXR
- 7.6. Ανταγωνιστικά πεπτίδια
 - 7.6.1. ErhA2
 - 7.6.2. ErhB2
 - 7.6.3. ErhB4
- 7.7. Παράγωγα φυσικών προϊόντων
- 7.8. Εξωσώματα χορήγησης φαρμάκων
- 7.9. miRNAs
- 8. Επίλογος
- 9. Βιβλιογραφικές αναφορές

1. Περίληψη

1.1. Περίληψη Ελληνική

Στην παρουσία διπλωματική εργασία διερευνάται ο κεντρικός ρόλος του συστήματος E_{rh}/εφρινών στον καρκίνο του μαστού και τις δυνατότητές του ως θεραπευτικού στόχου. Η μελέτη ξεκινά με την επισκόπηση της οικογένειας E_{rh} και εφρινών, παρουσιάζοντας τα δομικά χαρακτηριστικά τους και τους διαφορετικούς μηχανισμούς σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένης της ligand-εξαρτημένης και της ligand-ανεξάρτητης σηματοδότησης, ενώ στη συνέχεια σταχυολογούνται οι διαφορετικές φυσιολογικές λειτουργίες του συστήματος στον νευρικό και συναπτικό σχηματισμό, τη συναρμολόγηση ιστών, τον πολλαπλασιασμό των βλαστοκυττάρων, τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού.

Επιπλέον, εμβαθύνει στις επιπτώσεις της δυσρύθμισης των υποδοχέων, των εφρινών, καθώς και της μεταξύ τους σχέσης στον καρκίνο, εστιάζοντας στους ρόλους της στην προώθηση ή την καταστολή της εξέλιξης του όγκου. Εξετάζονται μηχανισμοί όπως η νεοαγγειογένεση, η αγγειογενής μίμηση και η αγγειογένεση σε συνθήκες υποξίας, παράλληλα με τις επιδράσεις της στο μικροπεριβάλλον του όγκου, τα λεμφοκύτταρα που διεισδύουν στον όγκο, την ανοσία του καρκίνου και τη σύνδεση των υποδοχέων E_{rh} και των εφρινών με τη διαδικασία της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης.

Περαιτέρω, η διπλωματική εργασία διερευνά τις συγκεκριμένες επιπτώσεις του συστήματος E_{rh}/εφρινών στον καρκίνο του μαστού, λαμβάνοντας υπόψη την επιδημιολογία της νόσου, την ετερογένεια που την χαρακτηρίζει και τους φυσικούς ρόλους του συστήματος στην ανάπτυξη των μαστικών αδένων. Παρέχει μια εις βάθος ανάλυση των ρόλων των μεμονωμένων υποδοχέων E_{rh} στον καρκίνο του μαστού και προχωρά στην εξερεύνηση μιας ποικιλίας προσεγγίσεων για την καταπολέμηση του καρκίνου του μαστού στοχεύοντας ειδικά τους υποδοχείς E_{rh}. Αυτές οι προσεγγίσεις περιλαμβάνουν μια ολοκληρωμένη σειρά πιθανών παρεμβάσεων, όπως αντισώματα που μπορούν επιλεκτικά να συνδεθούν με τους υποδοχείς E_{rh} και να διαταράξουν τις οδούς σηματοδότησης τους. Επιπλέον, εξετάζονται τεχνικές ανοσοθεραπείας, οι οποίες αποσκοπούν στην αξιοποίηση της δύναμης του ανοσοποιητικού συστήματος να

αναγνωρίζει και να εξαλείφει τα καρκινικά κύτταρα του μαστού που εκφράζουν υποδοχείς Eph. Άλλες μέθοδοι περιλαμβάνουν την αναστολή μέσω μικρών μορίων, που αναστέλλουν την περιοχή κινάσης ή δεσμεύονται στην εξωκυτταρική περιοχή των υποδοχέων καθώς και αναστολείς που στοχεύουν επιγενετικά ένζυμα σημαντικά για την έκφραση των Eph και τη σχεδίαση πεπτιδίων που έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς Eph μπλοκάροντας τη δραστηριότητά τους, είτε ενεργοποιώντας την εσωτερική τους, μειώνοντας έτσι την ανάπτυξη και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Ακόμη, πολλά υποσχόμενες τεχνικές περιλαμβάνουν τη χρήση συζευγμένων πεπτιδίων ή αντισωμάτων και εξωσωμάτων για στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων, τη χρήση παραγωγών φυσικών προϊόντων, miRNAs και τέλος, αναφέρεται η δυνατότητα έμμεσης στόχευσης υποδοχέων Eph λόγω της συνθετικής θνησιμότητας ή της αλληλεπίδρασής τους με άλλα μόρια. Αυτές οι καινοτόμες στρατηγικές στόχευσης υπόσχονται πολλά για την πρόωση της θεραπείας του καρκίνου του μαστού, ανοίγοντας νέες οδούς προσέγγισης εξατομικευμένων θεραπειών που μπορούν να βελτιώσουν τα αποτελέσματα των ασθενών, ελαχιστοποιώντας παράλληλα τις δυσμενείς επιπτώσεις στους υγιείς ιστούς.

1.2. Περίληψη Αγγλική

The dissertation titled "Targeting Eph receptors in breast cancer" explores the pivotal role of the Eph/ephrin system in breast cancer and its potential as a therapeutic target. The study begins by providing an overview of the Eph and ephrin family, discussing their structural characteristics and different signaling mechanisms, including ligand-dependent and ligand-independent signaling. The diverse functions of the Eph/ephrin system in neural and synaptic formation, tissue assembly, stem cell proliferation, immune system regulation, and homeostasis preservation are explored.

Furthermore, it delves into the implications of the Eph/ephrin system in cancer, focusing on its roles in promoting or suppressing tumor progression. It examines mechanisms such as neoangiogenesis, vascular mimicry, and angiogenesis under hypoxic conditions, along with its effects on the tumor microenvironment, tumor-infiltrating lymphocytes, cancer

immunity and the connection of Eph receptors and ephrins with the process of epithelial-mesenchymal transition.

Further, the dissertation explores the specific implications of the Eph/ephrin system in breast cancer, considering its epidemiology, heterogeneous subtypes and its natural roles in mammary gland development. It provides an in-depth analysis of the roles of individual Eph receptors in breast cancer and proceeds to explore a diverse range of approaches for combating breast cancer by specifically targeting Eph receptors. These approaches encompass a comprehensive array of potential interventions such as antibodies that can selectively bind to Eph receptors and disrupt their signaling pathways. Additionally immunotherapy techniques are examined, which aim to harness the power of the immune system to recognize and eliminate breast cancer cells expressing Eph receptors. Other mechanisms include the design of small molecule inhibitors, which inhibit the kinase or the extracellular domain of the receptors as well as targeting epigenetic enzymes important for Eph expression and the development of peptides that interact with Eph receptors, either by blocking their activity or triggering their internalization, thereby impairing the growth and survival of breast cancer cells. More promising techniques include the use of conjugated peptides or antibodies and exosomes for targeted drug delivery, along with the use of natural product derivatives, miRNAs and lastly indirectly targeting Eph receptors due to their synthetic lethality or interaction with other molecules. These innovative targeting strategies hold great promise for advancing breast cancer treatment and augment moving closer to personalized therapies that can improve patient outcomes while minimizing the adverse effects on healthy tissues..

2. Εισαγωγή

Η έκφραση και οι πολύπλευρες αλληλεπιδράσεις των υποδοχέων εφρινών διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην φυσιολογική ανάπτυξη του οργανισμού κατά την εμβρυογένεση, όπου και εκφράζονται κυρίως, χωρίς ωστόσο να εκλείπουν από τον οργανισμό και κατά την ενήλικη ζωή. Συμμετέχουν σε πλήθος φυσιολογικών διεργασιών του οργανισμού ενορχηστρώνοντας την οργάνωση των ιστών μέσα από την στενή ρύθμιση της μετανάστευσης, της προσκόλλησης και της απώθησης των κυττάρων.

Σημαντική είναι η συνεισφορά τους στην αγγειογένεση, την διατήρηση ομοιοστατικών μηχανισμών και του ανοσοποιητικού συστήματος και φυσικά στο νευρικό σύστημα κατά την καθοδήγηση της ανάπτυξης νευραξόνων, την δημιουργία συναπτικών συνδέσεων και την συναπτική πλαστικότητα.

Η ευρεία έκφραση των υποδοχέων Eρh και των εφρινών σε διάφορους κυτταρικούς τύπους καθιστά αναμενόμενη την εμπλοκή τους σε πλήθος ασθενειών και διαταραχών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, ως απόρροια της απορρύθμισης της σηματοδότησης τους. Οι λειτουργίες των υποδοχέων Eρh κυμαίνονται από την προαγωγή έως την καταστολή της εξέλιξης του καρκίνου ανάλογα με το υπό εξέταση πλαίσιο, ωστόσο αλλαγές στα πρότυπα έκφρασης, τη δραστηριότητα ή την αλληλενέργεια με διασταυρούμενα σηματοδοτικά μονοπάτια, δύναται να διαταράξουν τις φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες, οδηγώντας σε ανώμαλο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αγγειογένεση, μετανάστευση και διήθηση - χαρακτηριστικά της εξέλιξης του καρκίνου.

Η κατανόηση των φυσικών ρόλων των υποδοχέων Eρh στην ανάπτυξη των μαστικών αδένων, συμβάλλει στην απόκτηση πολύτιμων γνώσεων σχετικά με τη συμμετοχή τους στην παθογένεια του καρκίνου του μαστού. Υπό φυσιολογικές συνθήκες οι υποδοχείς Eρh εμπλέκονται στην καθοδήγηση της μετανάστευσης και της τοποθέτησης των μαστικών επιθηλιακών κυττάρων, με απώτερο σκοπό την σωστή διακλάδωση και οργάνωση του αδενικού ιστού. Ωστόσο, στον καρκίνο του μαστού, η αλλοιωμένη έκφραση και σηματοδότηση των υποδοχέων Eρh διαταράσσει αυτές τις διαδικασίες και έχει συσχετιστεί με την εξέλιξη του όγκου, την αγγειογένεση, την φαρμακευτική αντίσταση και την κακή πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

Λόγω του υψηλού επιπολασμού και της ετερογένειας αυτής της νόσου σε ιστολογικό και μοριακό επίπεδο, κρίνεται αναγκαία η εύρεση συγκεκριμένων βιοδεικτών και γενετικών ανωμαλιών, στις οποίες θα βασίζεται μια πιο εξατομικευμένη θεραπευτική προσέγγιση. Το σύστημα Eρh/εφρινών παρουσιάζει έναν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο στον καρκίνο του μαστού λόγω των διακριτών προτύπων έκφρασης και των λειτουργικών του επιπτώσεων. Οι στρατηγικές στόχευσης περιλαμβάνουν τόσο έμμεσες, λόγω συνθετικής θνησιμότητας και αλληλεπίδρασης με άλλα μόρια, όσο και άμεσες προσεγγίσεις, όπως

αντισώματα, ανοσοθεραπεία, πεπτιδία, παράγωγα φυσικών ενώσεων, miRNAs, αναστολείς και τη χρήση συζευγμένων πεπτιδίων ή αντισωμάτων για την εκλεκτική παροχή κυτταροτοξικών ουσιών σε καρκινικά κύτταρα.

Συμπερασματικά, η στόχευση αυτού του μονοπατιού αντιπροσωπεύει μια πολλά υποσχόμενη οδό για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών, που θα παρέχουν την ικανότητα παρέμβασης στην ανώμαλη σηματοδότηση και χειραγώγησης των μηχανισμών που λειτουργούν προαγωγικά στον καρκίνο, επηρεάζοντας σημαντικά τα αποτελέσματα των ασθενών. Επομένως, η ολοκληρωμένη κατανόηση των πολύπλοκων ρόλων και αλληλεπιδράσεων των υποδοχέων Erh, μαζί με την ανάπτυξη καινοτόμων και στοχευμένων θεραπευτικών παρεμβάσεων, είναι κρίσιμης σημασίας για την προώθηση της θεραπείας του καρκίνου του μαστού και ανοίγει το πεδίο για την εξερεύνηση νέων δρόμων εξατομικευμένης ιατρικής προκειμένου να βελτιωθεί η πρόγνωση και η ποιότητα ζωής για άτομα που πάσχουν από καρκίνο του μαστού.

3. Εφρίνες και υποδοχείς εφρινών.

3.1. Κατηγοριοποίηση.

Οι υποδοχείς εφρινών (Erh receptors) αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά το 1987, κατά τη διάρκεια μιας εξέτασης για νέες ογκογόνες κινάσες τυροσίνης. Ο όρος Erh προκύπτει από την κυτταρική σειρά από την οποία απομονώθηκε για πρώτη φορά το cDNA τους: «Erythropoietin producing hepatocellular carcinoma cell line».⁸⁷ Η οικογένεια των υποδοχέων εφρινών (Erh receptors) συνιστά την μεγαλύτερη οικογένεια υποδοχέων τυροσινικής κινάσης (RTK)^{92,87,67,72,17} και τα μέλη της υποδιαιρούνται σε δύο ευρύτερες κατηγορίες A και B^{92,50,87,72}, διάκριση η οποία βασίζεται στην ομολογία αλληλουχίας τους^{92,17} καθώς και στην ικανότητα πρόσδεσής τους με δυο διακριτές κατηγορίες ligands (προσδεμάτων εφρινών)^{92,72,17}.

Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί εννέα ErhA υποδοχείς και πέντε ephrinA ligands καθώς και πέντε ErhB υποδοχείς και τρεις ephrinB ligands¹⁹, κατ'επέκταση οι υποδοχείς ErhA περιλαμβάνουν εννέα μέλη (ErhA1–ErhA8 και ErhA10), τα οποία ενεργοποιούνται από πέντε διαφορετικούς ligands ephrinA, ενώ οι υποδοχείς ErhB περιλαμβάνουν πέντε μέλη (ErhB1–ErhB4 και ErhB6), στους οποίους προσδένονται τρεις ligands

ephrinB.^{50,72,53,26} Ωστόσο έχουν εντοπισθεί δυο εξαιρέσεις τόσο από την μια ,όσο και από την άλλη κατηγορία. Ο EphA4 υποδοχέας ο οποίος διαθέτει ικανότητα πρόσδεσης και με τους ephrinB2 και ephrinB3, εκτός από τους ephrinA ligands και ο υποδοχέας EphB2 , που συμπληρωματικά με την ικανότητα σύνδεσής του στους ephrinB ligands , μπορεί να συνδεθεί και με τους ephrinA2⁷⁴ , ephrinA4 και ephrinA5.¹⁹

3.2. Δομικά χαρακτηριστικά υποδοχέων εφρινών.

Οι EphA και EphB αποτελούν κατηγορία υποδοχέων τυροσινικής κινάσης (RTK) και μοιράζονται μια παρόμοια δομική διαμόρφωση. Είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και συνεπώς περιλαμβάνουν ένα εξωκυτταρικό, ένα διαμεμβρανικό και ένα ενδοκυτταρικό τμήμα⁸⁷. Στο εξωκυτταρικό N-τερματικό τμήμα εντοπίζεται μια περιοχή πρόσδεσης εφρινών (ligand binding domain) και μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη(Cys domain), ακολουθούμενη από δύο επαναλαμβανόμενες περιοχές φιμπρονεκτίνης τύπου III. Στη συνέχεια, μια μεμονωμένη διαμεμβρανική περιοχή με διατηρημένα κατάλοιπα τυροσίνης⁵⁰ η οποία έχει σημαντική λειτουργία στην διαδικασία της μεταγωγής σήματος⁶⁷, ακολουθείται από το ενδοκυτταρικό τμήμα, στο οποίο περιλαμβάνεται μια παραμεμβρανική περιοχή (juxtamembrane domain, JM), η οποία είναι σημαντική για την ενεργοποίηση του υποδοχέα, μια περιοχή κινάσης, ένα στείρο μοτίβο άλφα (Sterile alpha motif domain, SAM) τομέα αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, το οποίο απαιτείται για τον ολιγομερισμό του υποδοχέα, και ένα C-τερματικό μοτίβο που περιλαμβάνει θέση δέσμευσης περιοχής PDZ.^{87,50,74,19} Ωστόσο και οι δύο διακριτές κατηγορίες υποδοχέων εφρινών διαθέτουν μέλη, τους υποδοχείς EphA10 και EphB6, με έλλειψη δραστηριότητας κινάσης , λόγω έλλειψης καταλοίπων απαραίτητων για την καταλυτική ενεργότητα^{67,50,20,19}, αποτέλεσμα της συναρμογής/εναλλακτικής συρραφής ⁶⁷, προσφέροντας έτσι έναν επιπλέον μηχανισμό ρύθμισης δέσμευσης και εξασθένισης της μεταγωγής σήματος των ενεργών ετεροσυμπλόκων υποδοχέων.³⁷

3.3. Δομικά χαρακτηριστικά εφρινών.

Σε αντίθεση με την πανομοιότυπη δομή των υποδοχέων , οι εφρίνες της κατηγορίας A παρουσιάζουν δομική διαφορά με εκείνες της κατηγορίας B, η οποία εντοπίζεται στον τρόπο σύνδεσής τους με την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου. Οι εφρίνες A

συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη μέσω μιας άγκυρας γλυκοσυλφωσφατιδυλινοσιτόλης (GPI), ενώ οι εφρίνες B αποτελούν διαμεμβανικές πρωτεΐνες που περιέχουν μια διατηρημένη εξωκυτταρική περιοχή σύνδεσης του N-τερματικού τμήματος του υποδοχέα (Receptor binding domain:RBD), μια διαμεμβρανική περιοχή και μια C-τερματικό κυτταροπλασματικό τμήμα που περιλαμβάνει ένα μοτίβο δέσμησης PDZ, με το τελευταίο να είναι μεγάλης σημασίας στην αμφίδρομη σηματοδότηση του συστήματος Eph/Ephrin.^{67,37,87,19}

4. Σηματοδότηση

4.1. Μηχανισμοί σηματοδότησης..

Λόγω του γεγονότος πως οι εφρίνες είναι προσδεμένες στην κυτταρική μεμβράνη, σε αντίθεση με άλλους RTKs, όπου οι ligands τους είναι διαλυτοί ή απομονωμένοι εντός της εξωκυττάριας μήτρας³⁷, οι Eph υποδοχείς ενεργοποιούνται κατά κανόνα μέσω της επαφής κυττάρου-κυττάρου. Κατά την επαφή αυτή το τμήμα πρόσδεσης ligand του υποδοχέα (ligand binding domain) δεσμεύεται στο τμήμα πρόσδεσης υποδοχέα του ligand (receptor binding domain) με αποτέλεσμα την αμφίδρομη ενεργοποίηση καταρακτών σηματοδότησης στο κυτταρόπλασμα και των δύο εμπλεκόμενων κυττάρων, διαδικασία που ονομάζεται αμφίδρομη σηματοδότηση (bidirectional signaling). Η μεταγωγή σήματος προς το κύτταρο που διαθέτει τον υποδοχέα ονομάζεται εμπρόσθια σηματοδότηση (forward signaling) , ενώ η μεταγωγή σήματος προς το κύτταρο που διαθέτει τον ligand αποκαλείται αντίστροφη σηματοδότηση (reverse signaling)^{37,72,87,58}. Η τελική έκβαση του σήματος ενδέχεται να είναι ίδια ή διαφορετική ανάλογα με το κυτταρικό πλαίσιο.³⁷ Για παράδειγμα κύτταρα που εκφράζουν EphB2 και την εφρίνη B1, εμφανίζουν ασυμμετρία στις αποκρίσεις τους. Αναλύοντας τις αλλαγές στη φωσφορυλίωση τυροσίνης που προκαλείται από την επαφή κυττάρου-κυττάρου, εντοπίζονται πολυάριθμες πρωτεΐνες-στόχοι που εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως η προσκόλληση, η πολικότητα και οι αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου. Αυτά τα συμβάντα σηματοδότησης διαφέρουν μεταξύ των κυττάρων που εκφράζουν EphB2 και εκείμων που εκφράζουν την εφρίνη B1, με τις πρωτεΐνες προσαρμογής να εμφανίζουν αυξημένη φωσφορυλίωση στα κύτταρα EphB2, ενώ οι πρωτεΐνες εστιακής προσκόλλησης εμφανίζουν υψηλότερη φωσφορυλίωση στα κύτταρα ephrin-B1. Ωστόσο,

ορισμένες θέσεις φωσφορυλίωσης εμφανίζουν παρόμοια διαμόρφωση και στους δύο τύπους κυττάρων. Συνολικά, προτείνεται ότι τα δίκτυα σηματοδότησης που ακολουθούν την επαφή μεταξύ των κυττάρων εμφανίζουν τόσο ειδικούς για τα κύτταρα όσο και κοινούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς.⁴⁷

4.1.1.1.Εμπρόσθια σηματοδότηση.

➤ *Ligand-εξαρτημένη σηματοδότηση.*

Οι υποδοχείς εφρινών δεν ενεργοποιούνται με τον συνήθη μηχανισμό ενεργοποίησης των RTK υποδοχέων, αλλά απαιτούν προηγούμενη συμπλοκοποίηση (clusters) εφρινών προκειμένου να επαχθεί μεταγωγή σήματος. Οι ανενεργοί υποδοχείς κατανέμονται διάσπαρτοι στην επιφάνεια του κυττάρου, εμφανίζοντας μειωμένη δραστηριότητα κινάσης, εκτός και αν η έκφρασή τους είναι σημαντικά αυξημένη⁶⁵, καθώς σε υψηλά επίπεδα έκφρασης προάγεται συσσώρευση ακόμη και πριν από την αλληλεπίδραση υποδοχέα/εφρίνης³⁷. Έπειτα από την ενεργοποίησή τους, εμφανίζονται σύμπλοκα υποδοχέων στην επιφάνεια του κυττάρου, ορατά με ομοεστιακό μικροσκόπιο, τα οποία μάλιστα δύναται να αποτελούνται από ποικίλους τύπους υποδοχέων, RTK αλλά και μη RTK, που αλληλοενεργοποιούνται. Παραδείγματα αποτελούν οι ErbB2, EGF, FGF, VEGF, RYK, ο υποδοχέας χημειοκίνης CXCR4 και ο υποδοχέας NMDA.^{87,65,8} Σε αντίθεση λοιπόν με τους υπόλοιπους RKT υποδοχείς, όπου μετά από διμερισμό ενεργοποιούνται, η βιολογική δραστηριότητα των υποδοχέων εφρινών εξαρτάται από την ύπαρξη υψηλής πυκνότητας ligands,⁶⁵ αφού απαιτούνται κατ' ελάχιστον δύο υψηλής συγγένειας ετερομερή, που περιλαμβάνουν έναν υποδοχέα και έναν ligand, τα οποία συνδυάζονται με σκοπό την δημιουργία ενός δακτυλικής δομής, ανώτερης τάξης τετραμερούς που αλληλεπιδρά και με τα δύο κύτταρα, επιτρέποντας την αμφίδρομη σηματοδότηση. Μάλιστα βιοχημικές και κυτταρικές μετρήσεις αποδεικνύουν πως βαθμός συμπλοκοποίησης καθορίζει την ισχύ του προκύπτοντος σήματος.^{19,50} Η σηματοδότηση λοιπόν ξεκινά μετά την δημιουργία των ολιγομερών και της ακόλουθης ενεργοποίησης της δραστηριότητας κινάσης.¹⁹ Σχηματίζονται αρχικά ετερομερή ή τετραμερή από τα εξωκυττάρια τμήματα των υποδοχέων και των εφρινών γύρω από έναν υδρόφοβο βρόγχο G-H (G-H loop) του ligand και στην συνέχεια παραμένουν στον υδρόφοβο συνδετικό θύλακα του υποδοχέα^{67,37}. Εντός του συμπλέγματος αυτού, οι θέσεις του υποδοχέα και

του ligand επιτρέπουν διάφορες αλληλεπιδράσεις σηματοδότησης. Για παράδειγμα, μπορεί να ενεργοποιηθεί η περιοχή κινάσης του υποδοχέα μετά από έκθεση των θέσεων φωσφορυλίωσης, συμπεριλαμβανομένων των υπολειμμάτων σερίνης και τυροσίνης. Διαμορφωτικές αλλαγές μετά την πρόσδεση των ligands στους υποδοχείς οδηγούν στην αυτοφωσφορυλίωση των υπολειμμάτων τυροσίνης στο παραμεμβρανικό τμήμα και στην περιοχή κινάσης του υποδοχέα, με αποτέλεσμα αυξημένη δραστηριότητα κινάσης και τρανσφωσφορυλίωση άλλων υπολειμμάτων τυροσίνης που χρησιμεύουν ως θέσεις σύνδεσης για άλλους τελεστές σηματοδότησης όπως κινάσες, φωσφατάσες, παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης, GTPases, όπως πρωτεΐνες Rho και Ras⁶⁹ και πρωτεΐνες προσαρμογής⁹. Οι πρωτεΐνες προσαρμογής περιέχουν τομείς Src Homology 2 (SH2) και τομείς πρόσδεσης φωσφοτυροσίνης (phosphotyrosine binding domains PTB) επιτρέποντας έτσι την μεταγωγή σήματος μέσω πλήθους σηματοδοτικών μονοπατιών όπως τα PI3K-AKT, JAK/STAT, RAS/MAPK, FAK.³⁷

➤ *In cis αλληλεπίδραση.*

Πρόσθετη πολυπλοκότητα δημιουργεί η ικανότητα in cis αλληλεπιδράσεων μεταξύ υποδοχέων και εφρινών που συν-εκφράζονται πάνω στην μεμβράνη του ίδιου κυττάρου, ρυθμίζοντας την φωσφορυλίωση του υποδοχέα⁶⁵, με τελική έκβαση της αλληλεπίδρασης αυτής την αναστολή της εμπρόσθιας σηματοδότησης.^{87,50,9}

➤ *Ligand-ανεξάρτητη σηματοδότηση.*

Σημειωτέον, σε ορισμένες περιπτώσεις, η φωσφορυλίωση των υπολειμμάτων σερίνης στην περιοχή της κινάσης του υποδοχέα μπορεί επίσης να συμβεί ανεξάρτητα από τη δέσμευση ligand, όπως παρατηρείται στον υποδοχέα EphA2.⁶⁷ Η ligand-ανεξάρτητη σηματοδότηση λαμβάνει χώρα ειδικά σε περιπτώσεις όπου οι υποδοχείς υπερεκφράζονται, όπως για παράδειγμα σε καρκινικά κύτταρα. Απουσία της εφρίνης A1, ο υποδοχέας EphA2 ενεργοποιείται από αυξητικούς παράγοντες στον ορό, όπως την πρωτεΐνη Akt η οποία φωσφορυλιώνει ένα κατάλοιπο σερίνης (Ser897), οδηγώντας σε αυξημένη κυτταρική πολικότητα, μετανάστευση και διήθηση.^{87,37,9} Επιπλέον παράδειγμα ligand-ανεξάρτητης σηματοδότησης αποτελούν οι περιπτώσεις των EphB2, EphB3 όπου ρυθμίζουν την τοποθέτηση κυττάρων στο εντερικό επιθήλιο μέσω της πρωτεΐνης PI3K.³⁷

➤ *Παρακρινείς και αυτοκρινείς μηχανισμοί σηματοδότησης.*

Επιπλέον, πρόσθετη πολυπλοκότητα επιφυλάσσει η απελευθέρωση λειτουργικών, διαλυτών ligands μέσω της αποβολής εκτοτομένων των εφρινών και των υποδοχέων τους, υποδηλώνοντας την παρουσία παρακρινών και αυτοκρινών μηχανισμών σηματοδότησης.³⁷ Πιο συγκεκριμένα πρωτεάσες μπορούν και σχίζουν τους υποδοχείς αλλά και τις εφρίνες είτε στο εξωκυτταρικό, διαμεμβρανικό, είτε στο ενδοκυτταρικό τους τμήμα, ανεξάρτητα από το αν είναι δεσμευμένοι ή αδέσμευτοι. Η επίδραση των πρωτεασών είναι σημαντική αφενός για τον διαχωρισμό των υποδοχέων/εφρινών και την ακόλουθη απώθηση των δύο κυττάρων και αφετέρου καθώς τα δημιουργούμενα πρωτεολυτικά θραύσματα σηματοδοτούν στον εξωκυττάριο χώρο, στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα. Οι εφρίνες A για παράδειγμα διασπώνται στο C-τελικό άκρο τους από μεταλλοπρωτεάσες (MMPs), απελευθερώνοντας διαλυτά, μονομερή εφρινών που δύναται να ενεργοποιήσουν τους EphA υποδοχείς με παρακρινή τρόπο.⁹

Φαίνεται λοιπόν πως εκτός από τις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις και ομαδοποιήσεις μεταξύ διαφόρων μελών της οικογένειας των εφρινών και των υποδοχέων εφρινών, υπάρχουν επίσης αλληλεπιδράσεις, τόσο εξαρτημένες, όσο και ανεξάρτητες από ligands, με άλλους RKTs και με μόρια προσκόλλησης κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-εξωκυττάριας μήτρας.³⁷

4.1.2. Αντίστροφη σηματοδότηση.

Η αντίστροφη σηματοδότηση λαμβάνει χώρα στα κύτταρα που εκφράζουν στην επιφάνειά τους τις εφρίνες τύπου A και τύπου B, μέσω διαφορετικών μηχανισμών για κάθε κατηγορία εφρινών.¹⁹ Οι εφρίνες στερούνται εγγενούς καταλυτικής δράσης και η αντίστροφη σηματοδότηση επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης των σχετικών κινασών τυροσίνης και της άμεσης δέσμευσης των ενδοκυτταρικών στόχων.⁴⁷

➤ Εφρίνες B

➤ *Σηματοδότηση εξαρτημένη από την πρόσδεση στον υποδοχέα.*

Έπειτα από την δημιουργία του έτερο-τετραμερούς μεταξύ των εφρινών B με το γλυκοσυλιωμένο LBD των EphB υποδοχέων, η διαμεμβρανική και κυτταροπλασματική

περιοχή των εφρινών B υποβάλλεται σε διαμορφωτικές αλλαγές προκειμένου να επιτραπεί η φωσφορυλίωσή τους από πρωτεΐνες της οικογένειας Src κινασών^{19,37,87}, όπως η Fyn²⁵, αλλά και από τους υποδοχείς PDGF και FGF¹⁹. Η φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης στις περιοχές αυτές επιτρέπει ακολούθως την πρόσδεση πρωτεϊνών που περιλαμβάνουν ένα SH2 τμήμα, όπως για παράδειγμα η Grb4^{37,25}, οδηγώντας σε κυτταροσκελετική αναδιαμόρφωση.¹⁹

Ένα ενδιαφέρον εύρημα είναι η ικανότητα των κυττάρων να προσελκύουν Erh υποδοχείς και ιδίως Ehb2, σε εξωκυτταρικά κυστίδια που ονομάζονται εξωσώματα^{87,78}. Τα κυστίδια αυτά παρέχουν την δυνατότητα επικοινωνίας μεταξύ απομακρυσμένων κυττάρων μιμούμενα την επαφή κυττάρου-κυττάρου.⁸⁷

➤ *Σηματοδότηση ανεξάρτητη από την πρόσδεση στον υποδοχέα.*

Το C-τελικό PDZ άκρο των εφρινών B έχει την δυνατότητα να συνδεθεί με αρκετές πρωτεΐνες που περιέχουν το μοτίβο PDZ, όπως η PTP-BL (protein tyrosine phosphatase),^{37,50} ανεξάρτητα από την πρόσδεσή τους στον υποδοχέα.^{19,87} Η πρόσδεση αυτή λειτουργεί ως μηχανισμός ρύθμισης της σηματοδότησης, αφού έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένιση του αντίστροφου σήματος.³⁷

➤ *Εφρίνες A*

Αν και οι εφρίνες A στερούνται ενδοκυτταρικής περιοχής ικανής για φωσφορυλίωση και κατ' επέκταση στρατολόγηση σηματοδοτικών μορίων-εξαρτώμενων από φωσφορυλίωση, έχει βρεθεί πως συμπλοκοποιημένη η εφρίνη A5 για παράδειγμα προσελκύει την κινάση Fyn προάγοντας την ενεργοποίηση της β1-ιντεγκρίνης και της ERK, αυξάνοντας την κυτταρική προσκόλληση.³⁷ Λόγω του ρόλου της σηματοδότησης των Ehb/εφρινών στην κυτταρική μετανάστευση, η υπόθεση πως σχετίζονται με τις ιντεγκρίνες, είχε γίνει από νωρίς.⁸ Πράγματι, η αντίστροφη σηματοδότηση επαγόμενη από τις εφρίνες A μπορεί να ρυθμίζει λοιπόν την κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση μέσω των ιντεγκρινών, ωστόσο εκτός από τις ιντεγκρίνες, αντίστροφη σηματοδότηση είναι πιθανό να προκληθεί και μέσω αλληλεπίδρασης με άλλα μόρια όπως είναι τα TrkB, p75NTR και την προσκολλημένη στην μεμβράνη μεταλλοπρωτεάση ADAM10, όπου όλα τα παραπάνω επηρεάζουν την αξονική θέση του κυττάρου. Επιπλέον

όπως έχει ήδη αναφερθεί οι εφρίνες A αλληλεπιδρούν *in cis* με τους υποδοχείς εφρινών τύπου A στην περιοχή φιμπρονεκτίνης III, μειώνοντας την φωσφορυλίωση των υποδοχέων και κατευνάζοντας τελικά την σηματοδότηση.^{19,50}

4.2. Αποτελέσματα σηματοδότησης.

Οι υποδοχείς E_{rh} και οι εφρίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε μεγάλο εύρος βιολογικών διαδικασιών, ελέγχοντας διάφορες αναπτυξιακές διεργασίες, όπως τον καρδιαγγειακό και σκελετικό σχηματισμό, την καθοδήγηση των αξόνων και τη διαμόρφωση των ιστών. Εκφράζονται ευρέως στους διαφορετικούς ιστούς ενός εμβρύου και εμπλέκονται στην κατεύθυνση της κυτταρικής μετανάστευσης και της προσκόλλησης κατά τη διάρκεια της γαστρίωσης, της σωματογένεσης⁶ και της οργάνωσης των ιστών που επιτυγχάνεται μέσω του διαχωρισμού ή του διαβαθμισμένου διαχωρισμού των κυττάρων και της διατήρησης οργανωμένων προτύπων εντός των ιστών^{74,58}. Αν και η έκφρασή τους είναι γενικά χαμηλότερη στους ενήλικους ιστούς σε σύγκριση με τα εμβρυϊκά στάδια, οι υποδοχείς E_{rh} και οι εφρίνες εξακολουθούν να παίζουν ρόλο στους ενήλικες, καθώς συμβάλλουν στην ομοίωση των βλαστοκυττάρων, διατηρώντας την πλαστικότητα και τη δυνατότητα αναγέννησης των ενήλικων ιστών και οργάνων.⁶

4.2.1. Οργάνωση/ Μορφογένεση ιστών.

➤ *Ανάπτυξη νευρώνων*

Οι υποδοχείς E_{rh} παίζουν κρίσιμους ρόλους σε διάφορες πτυχές της οργάνωσης των ιστών, ένας από αυτούς αφορά την εμπλοκή τους στην καθοδήγηση των αξόνων (*axon guidance*). Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, οι νευρώνες αναπτύσσονται και μεταναστεύουν προς τα κύτταρα-στόχους τους, απαιτώντας μια ισορροπία ελκτικών και απωθητικών σημάτων ώστε να διασφαλιστεί η σωστή εύρεση του μονοπατιού τους, η οποία εξασφαλίζεται μέσα από αλληλεπιδράσεις των E_{rh}/εφρινών.^{58,74}

➤ *Συναπτική πλαστικότητα.*

Η σηματοδότηση των E_{rh}B υποδοχέων συμμετέχει στη ρύθμιση της συναπτικής πλαστικότητας μέσω αυξημένης ροής ασβεστίου και μεγαλύτερο άνοιγμα του καναλιού, κατόπιν της ενεργοποίησής τους. Μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει ότι η έλλειψη E_{rh}Bs

οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα συναπτικών NMDARs (N-methyl-D-aspartate receptors), επηρεάζοντας τη συνολική έκφραση και τη συναπτική πλαστικότητα. Επιπλέον, η σηματοδότηση των EphB συμβάλλει στη συναπτική στρατολόγηση υποδοχέων AMPARs (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors) επηρεάζοντας έτσι τη συναπτική πλαστικότητα, τη μάθηση και το σχηματισμό μνήμης.⁹³ Ταυτόχρονα, ρυθιστής της συναπτικής πλαστικότητας μέσω εμπρόσθιας και αντίστροφης σηματοδότησης είναι και ο EphA4, επηρεάζοντας τον σχηματισμό της δενδριτικής σπονδηλικής στήλης.⁸

➤ *Συγκρότηση βλαστοκυττάρων εντερικού επιθηλίου*

Το εντερικό επιθήλιο αποτελεί το γνωστότερο παράδειγμα ενήλικου ιστού του οποίου η αρχιτεκτονική ελέγχεται από τη σηματοδότηση των Eph/εφρίνης, η οποία δημιουργεί κυτταρικά διαμερίσματα και καθοδηγεί τη διατεταγμένη μετανάστευση.⁵⁸ Οι υποδοχείς EphB2 και B3 εκφράζονται στα κύτταρα Paneth του κάτω μέρους των κρυπτών και φθίνουν ανεβαίνοντας, ενώ η έκφραση των εφρινών B1 και B2 ακολουθεί αντίθετη πορεία. Ένα προτυπο έκφρασης καταλυτικής σημασίας για την ορθή οργάνωση και λειτουργία του εντέρου. Όταν τα κύτταρα Paneth που εκφράζουν υψηλά επίπεδα EphB, έρχονται σε επαφή με κύτταρα που εκφράζουν την εφρίνη B ψηλότερα της κρύπτης, επαγεται τοπικά η δραστηριότητα της μεταλλοπρωτεϊνάσης ADAM10, η οποία ακολούθως ενεργοποιεί τη διάσπαση της E-καντερίνης, σπάζοντας τις συνδέσεις των προσκολλημένων κυττάρων , βοηθώντας έτσι στη συγκράτηση των κυττάρων Paneth στη βάση της κρύπτης.⁸⁷

➤ *Ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των εντερικών βλαστοκυττάρων.*

Εκτός από την επίδραση τους στην αρχιτεκτονική του εντερικού επιθηλίου, Οι EphB ρυθμίζουν επίσης τον πολλαπλασιασμό των εντερικών βλαστοκυττάρων μέσω εμπρόσθιας σηματοδότησης. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων από τις εφρίνες ενεργοποιεί ενδοκυτταρικούς καταρράκτες σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων των GTPases Rho και Ras, της κινάσης FAK(focal adhesion kinase), JAK (Janus kinase) και PI3K, οι οποίοι συμβάλλουν στον σχηματισμό συνάψεων, στη σταθεροποίηση συνδέσμων , στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την κυτταρική προσκόλληση. Η αντίστροφη σηματοδότηση, μέσω αλληλεπίδρασης των εφρινών με τα μόρια Src, Erk, Rac, AKT, paxillin και p75 επηρεάζει επίσης την κυτταρική προσκόλληση, τη

μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό, διαδραματίζοντας ρόλο στις επιθυμητές κυτταρικές αποκρίσεις.⁶⁹

➤ *Κρανιοπροσωπική και μυοσκελετική ανάπτυξη.*

Πολλαπλά μόρια Erh / εφρινών παίζουν κρίσιμους ρόλους στην κρανιοπροσωπική και μυοσκελετική ανάπτυξη, συμμετέχοντας στην καθοδήγηση μεταναστευτικών κυττάρων της κρανιακής νευρικής ακρολοφίας (NCCs:neural crest cells) που σχηματίζουν τον σκελετό του σπλαχνικού κρανίου. Η σηματοδότηση Erh/εφρινών παίζει επίσης ρόλο στη σκελετική ανάπτυξη πέρα από την κρανιοπροσωπική μορφογένεση. Ο ErhB4 και η εφρίνηB2, που εκφράζονται από οστεοβλάστες και οστεοκλάστες αντίστοιχα, δρουν ως ρυθμιστές της ομοιόστασης των οστών, σηματοδοτώντας αμφίδρομα και παίζοντας ρόλο στη σκελετική ανάπτυξη, την ομοιόσταση και την επισκευή του σκελετού⁷ και ρυθμίζοντας την ισορροπία μεταξύ της οστικής απορρόφησης από τους οστεοκλάστες και του σχηματισμού οστού από τους οστεοβλάστες.¹⁹

➤ *Ρύθμιση και διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων.*

Η παρουσία υποδοχέων Erh και εφρινών σε μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα MSCs (mesenchymal stroma/stem cells) έχει αναδειχθεί σημαντική, ειδικά στα BM-MSCs (bone marrow mesenchymal stroma/stem cells). Έρευνες έχουν δείξει ότι η αναστολή αυτής της σηματοδότησης οδηγεί σε μειωμένη κυτταρική ανάπτυξη και αυξημένο κυτταρικό θάνατο, ενώ επιπλέον μπορεί να επηρεάσει τη μορφολογία των κυττάρων και τη διαφοροποίησή τους. Οι αλληλεπιδράσεις Erh/εφρινών ρυθμίζουν την προσκόλληση και τον σχηματισμό εστιακών συμφύσεων, ενώ εμπλέκονται επίσης στη δυνατότητα διαφοροποίησης των MSCs σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές όπως οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα.¹

4.2.2.Επούλωση ιστών.

Οι ErhA4, ErhB1 και εφρίνη B1 εκφράζονται στην επιφάνεια ελεύθερων, κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων και κατά την ενεργοποίησή τους, λαμβάνουν χώρα αλληλεπιδράσεις Erh/εφρίνης μεταξύ αιμοπεταλίων που έρχονται σε επαφή, οδηγώντας

σε συνάθροιση εξαρτώμενη από ιντεγκρίνη, φωσφορυλίωση της ιντεγκρίνης $\alpha\text{Ib}\beta\text{3}$ και επακόλουθη σύνδεσή της με μυσίνη, διαδικασία που ενισχύει τη σταθερότητα του θρόμβου και αποτρέπει την πρόωρη διάλυσή του.⁵⁸ Στο πλαίσιο της επιδιόρθωσης των οστών, ο E ρ hB4 και η εφρίνη B1 έχουν βρεθεί ότι είναι σημαντικά κατά τον σχηματισμό του κάλου. Η υπερέκφραση του E ρ hB4 ενισχύει τη διαδικασία της ενδοχονδρικής οστεοποίησης, που είναι ο σχηματισμός οστού μέσα σε ένα εκμαγείο χόνδρου, ενώ αναστέλλει τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών. Σε ό,τι αφορά την εφρίνηB1, η απώλειά της καθυστερεί τον σχηματισμό κάλου, ευνοώντας τον ασβεστοποιημένο χόνδρο, ενώ η εφρίνηB2 αλληλεπιδρά με κύτταρα που εκφράζουν κολλαγόνο τύπου 2, ένα βασικό συστατικό της εξωκυτταρικής μήτρας που εμπλέκεται επίσης στην αποκατάσταση των οστών.⁷

4.2.3.Λειτουργία ανοσοποιητικού συστήματος.

Οι υποδοχείς E ρ h και οι εφρίνες εκφράζονται στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και εμπλέκονται στην ενεργοποίησή τους, στην μεταφορά τους, καθώς και στην απόπτωση και θετική/αρνητική επιλογή των T-κυττάρων στο θύμο αδένα.

Το mRNA τους ανιχνεύεται στον θύμο αδένα και στον σπλήνα, με τον E ρ hB6 να δείχνει ιδιαίτερα υψηλή έκφραση στον θύμο αδένα. Σε επίπεδο πρωτεΐνης, ο E ρ hB6 εκφράζεται τόσο στα περιφερειακά CD4+ όσο και στα CD8+ T-κύτταρα στον άνθρωπο, με υψηλότερο ποσοστό στα άωρα T-κύτταρα.⁹⁶ Ερευνητές έχουν εξετάσει επίσης την παρουσία των E ρ hB2 και της εφρίνηςB2 σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων του ανοσοποιητικού και βρέθηκε πως τα T-κύτταρα εκφράζουν και τον υποδοχέα E ρ hB2 και την εφρίνηB2 . Τα B-κύτταρα εμφανίζουν ελάχιστη έκφραση και των δύο, ενώ τα μονοκύτταρα/μακροφάγα εκφράζουν την εφρίνη B2.⁹⁹

Οι υποδοχείς E ρ h και οι εφρίνες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ενεργοποίηση των T-κυττάρων, ιδιαίτερα ο E ρ hB6. Όταν διεγείρονται από τις εφρίνεςB (B1-3), οι υποδοχείς E ρ hB συνεντοπίζονται με το σύμπλεγμα υποδοχέα T-κυττάρων και ξεκινούν την ενεργοποίηση των T-κυττάρων. Αυτή η ενεργοποίηση οδηγεί σε σηματοδότηση μέσω της οδού MAPK, πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων, έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως IFN- γ (IFN γ) και του παράγοντα TNFa (Tumor necrosis factor alpha) και

κυτταροτοξική δραστηριότητα. Η ενεργοποίηση του Ehb6 σε ανθρώπινα T-κύτταρα προάγει την έκφραση των δεικτών ενεργοποίησης των T-κυττάρων και την έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών.^{82,96} Η απουσία του Ehb6 σε ποντίκια οδηγεί σε μειωμένες αποκρίσεις T-κυττάρων και μειωμένες ανοσολογικές αντιδράσεις.⁹⁶ Η εφρίνηB2 βρέθηκε επίσης να ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων και να ρυθμίζει την έκφραση του δείκτη ενεργοποίησης μέσω ενεργοποίησης των οδών MAPK και συγκεκριμένα των p38 MAPK και p44/42 MAPK. Συνολικά, η εφρίνηB2 ενισχύει επιλεκτικά τις λειτουργίες δραστικών T-κυττάρων μέσω συνδιέγερσης κατά τα πρώιμα στάδια ενεργοποίησης.⁹⁹

Οι υποδοχείς Ehb όχι μόνο επάγουν ανοσολογικές αποκρίσεις αλλά και ρυθμίζουν την μεταφορά ανοσοκυττάρων. Ο EhbA2, που εκφράζεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα, μεσολαβεί στην προσκόλληση των λεμφοκυττάρων στα τοιχώματα των αγγείων μέσω εμπρόσθιας σηματοδότησης, ένα κρίσιμο βήμα προκειμένου ύστερα να εξαγγειωθούν και να μεταφερθούν στους ιστούς. Μελέτες *in vitro* καταδεικνύουν ότι η σηματοδότηση EhbA2, που πυροδοτείται από τη δέσμευση της εφρίνης A1, αυξάνει την έκφραση των πρωτεϊνών προσκόλλησης. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). Αυτές οι πρωτεΐνες συνδέονται με τις ιντεγκρίνες λευκοκυττάρων, διευκολύνοντας έτσι την προσκόλληση των λεμφοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αντιστρόφως, δέσμευση του EhbA2 με την εφρίνηA1 στα T κύτταρα επάγει την αντίστροφη σηματοδότηση, προάγοντας την προσκόλληση των T-κυττάρων στο VCAM-1 και το ICAM-1. Ωστόσο, απαιτείται ακόμη περαιτέρω έρευνα για να διερευνηθούν αυτές οι αλληλεπιδράσεις σε πιο πολύπλοκα συστήματα και να κατανοηθεί καλύτερα η δυναμική της προσκόλλησης των λεμφοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα.⁸²

Άλλα ευρήματα υποδηλώνουν ότι ορισμένοι Ehb ρυθμίζουν την ισχύ σηματοδότησης TCR (T-cell receptor) και παίζουν ρόλο στη θετική ή αρνητική επιλογή θυμοκυττάρων. Ορισμένοι υποδοχείς Ehb μπορούν να ενισχύσουν την ισχύ της σηματοδότησης των TCR, επηρεάζοντας δυνητικά την επιβίωση και τον θάνατο των T-κυττάρων.⁹⁶

4.2.4.Ιογενείς λοιμώξεις

Οι υποδοχείς E α h και οι εφρίνες εκφράζονται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ιογενή λοίμωξη και την ανοσολογική απόκριση. Συχνά συνεκφράζονται στα ίδια κύτταρα. Το επιθήλιο, το οποίο χρησιμεύει ως φραγμός κατά της μόλυνσης, και το ενδοθήλιο, που καθοδηγεί τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, εκφράζουν υποδοχείς E α h και εφρίνες. Μελέτες προτείνουν ότι αυτά τα μόρια ρυθμίζουν την προσκόλληση κυττάρου-κυττάρου και μπορούν να επηρεάσουν τη διαπερατότητα των ενδοθηλιακών και επιθηλιακών φραγμών, ιδιαίτερα σε φλεγμονώδεις καταστάσεις. Η σηματοδότηση εφρίνης-E α h, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, επηρεάζει επίσης το ανοσοποιητικό σύστημα ρυθμίζοντας την ενεργοποίηση και διακίνηση των ανοσοκυττάρων. Μπορεί να προσελκύσει, να ενεργοποιήσει και να προωθήσει την προσκόλληση των κυττάρων του ανοσοποιητικού, καθώς και να επηρεάσει τη μετανάστευση τους μέσω του αγγειακού ενδοθηλίου. Οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες και τα μόρια που σχετίζονται με τα παθογόνα μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση των υποδοχέων E α h και των εφρινών. Επιπλέον, οι υποδοχείς E α h και οι εφρίνες χρησιμεύουν ως υποδοχείς εισόδου και καθορίζουν τους ιστούς που μπορούν να μολυνθούν από αρκετούς ιούς με περίβλημα, οι οποίοι χρησιμοποιούν ιικές γλυκοπρωτεΐνες του περιβλήματός τους, με αποτέλεσμα σύντηξη μεμβράνης ή μετάδοση σήματος που προκαλεί ενδοκυττάρωση του ιικού σωματιδίου.²⁷

4.2.5.Διατήρηση ομοιόστασης- Ρύθμιση ινσουλίνης.

Η επικοινωνία μεταξύ των ενδοκρινικών β κυττάρων του παγκρέατος είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση της έκκρισης ινσουλίνης. Ο υποδοχέας E α hA5 και η εφρίνη A5 που προσδένεται σε αυτόν συνεκφράζονται στα β κύτταρα, έτσι όταν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα είναι χαμηλά, η μεταγωγή εμπρόσθιας σηματοδότησης μέσω του υποδοχέα E α hA5 αναστέλλει την απελευθέρωση ινσουλίνης. Όμως, όταν τα επίπεδα γλυκόζης αυξάνονται, ο υποδοχέας E α hA5 αποφωσφορυλιώνεται, επιτρέποντας την αντίστροφη σηματοδότηση της εφρίνης A5 ,με αποτέλεσμα την έκκριση ινσουλίνης.^{58,68}

4.2.6. Διαμόρφωση πόνου.

Στο πλαίσιο της ρύθμισης του πόνου, οι υποδοχείς Erh και οι εφρίνες έχουν μελετηθεί εκτενώς λόγω της επίδρασής τους στη σηματοδότηση του πόνου στον νωτιαίο μυελό, όπου μεταδίδονται πληροφορίες πόνου. Αυτά τα συστήματα σηματοδότησης έχει βρεθεί ότι ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των ιοντοτρόπων υποδοχέων NMDA, οι οποίοι είναι κρίσιμοι για την παθητική μετάδοση και ανάπτυξη χρόνιου πόνου. Οι οδοί σηματοδότησης ErhB2/εφρίνης B2 αλλά και ErhB1/εφρίνης B1 έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζουν τη συναπτική πλαστικότητα στον ιππόκαμπο αλληλεπιδρώντας με τους υποδοχείς NMDA και συγκεκριμένα μέσω της φωσφορυλίωσης της υπομονάδας NR2B από Src.

Οι εφρίνες B συμβάλλουν στην περιφερική ευαισθητοποίηση και τη ρύθμιση του πόνου μέσω της δράσης των MAPKs και της οδού PI3K σε περιφερικά νευρικά κύτταρα. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων ErhB με την ErhB1-Fc προκαλεί αλλοδυνία και πόνο, συνοδευόμενη από ενεργοποίηση περιφερικών και νωτιαίων MAPKs. Αντίστοιχα, η αναστολή του υποδοχέα ErhB με ErhB1-Fc μειώνει τον πόνο και αναστέλλει την ενεργοποίηση του MAPK. Η οδός PI3K, που συχνά ενεργοποιείται παράλληλα με την οδό MAPK, εμπλέκεται στην περιφερική ευαισθητοποίηση και υπεραλγησία, με την ενεργοποίηση του υποδοχέα ErhB να ρυθμίζει την οδό PI3K.⁹¹

4.2.7. Αγγειογένεση

Το σύστημα σηματοδότησης Erh/εφρινών έχει καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση της αγγειογένεσης, συναρμολόγησης, αναδιαμόρφωσης και σταθεροποίησης των αιμοφόρων αγγείων, διαδικασίες που απαιτούν τόσο ελκτικές, όσο και απωθητικές αποκρίσεις που προκαλούνται από την ενεργοποίηση Erh/εφρινών.⁷⁴ Ο υποδοχέας ErhA2 εκφράζεται σε αγγειογενετικά κύτταρα και συμβάλλει στην αγγειογένεση και την αγγειακή διαπερατότητα, κυρίως μέσω αλληλεπίδρασης με την εφρίνη A1, που εκφράζεται επίσης σε ενδοθηλιακά κύτταρα, και με την εμπλοκή του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF (vascular endothelial growth factor).⁹ Ενώ οι υποδοχείς ErhA εντοπίζονται στο αρτηριακό επιθήλιο, οι υποδοχείς της οικογένειας ErhB, με κύριο εκπρόσωπο τον ErhB4, εκφράζονται κατά προτίμηση σε φλεβικά ενδοθηλιακά κύτταρα και η εφρίνηB2, με την οποία συνδέεται ο ErhB4, βρίσκεται στα

αρτηριακά ενδοθηλιακά κύτταρα.^{9,95,106} Οι αλληλεπιδράσεις τους είναι κρίσιμες για την αρτηριακή-φλεβική ανάπτυξη και τη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων ενδοθηλιακών-τοιχογραφικών κυττάρων. Η εφρίνη B2 στα περικύτταρα προάγει τη συσχέτισή τους με ενδοθηλιακά κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα EphB, μια αλληλεπίδραση απαραίτητη για τη σταθεροποίηση των αιμοφόρων αγγείων. Επιπλέον, έχει φανεί πως ο VEGF ενισχύει την έκφραση της εφρίνης B2 (upregulation), η οποία με την σειρά της είναι απαραίτητη για την ενδοκύτωση του VEGF μέσω κλαθρίνης, διαδικασία σημαντική για την μεταγωγή αγγειογενετικού σήματος.^{9,95,77} Η θεμελιώδης σημασία τους στην αγγειογένεση αποδεικνύεται από την εμβρυική θνησιμότητα σε knock-out ποντίκια, λόγω της ελαττωματικής αγγειακής αναδιαμόρφωσης και της βλάβης της λειτουργίας τοιχογραφικών κυττάρων.³⁷ Από την άλλη η εφρίνη B2 ανταγωνίζεται τον αυξητικό παράγοντα PDGF (Platelet derived growth factor), προωθώντας την ωρίμανση των λείων μυϊκών κυττάρων στα αρτηριακά τοιχώματα.⁹⁵ Επιπλέον, η εφρίνη B2 που εκφράζεται από φλεγμονώδη κύτταρα επηρεάζει την αλληλεπίδρασή τους με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, πιθανών επηρεάζοντας την συμπεριφορά και την λειτουργία και των δύο τύπων κυττάρων κατά την διάρκεια της φλεγμονώδους αντίδρασης.⁹ Τέλος, ένας ακόμη ρόλος του συστήματος EphB4/εφρίνης B2 είναι η αποφυγή της σύντηξης φλεβών και αρτηριών ιδιαίτερα σε περιοχές με μεγάλη πυκνότητα τριχοειδών όπου βρίσκονται σε κοντινή απόσταση ^{74,106}

5. Συμμετοχή των υποδοχέων εφρινών και των εφρινών στον καρκίνο.

Αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων Eph συμβαίνουν σε όλους σχεδόν τους τύπους καρκίνου, με την μεταποιημένη έκφρασή τους να συνδέεται με το στάδιο και την πρόγνωση της νόσου. Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι Ephs και οι εφρίνες συμβάλλουν στην εξέλιξη του όγκου χαρακτηρίζονται από πολυπλοκότητα και ακόμα δεν είναι πλήρως κατανοητοί.⁸⁷ Δρουν άλλοτε κατασταλτικά και άλλοτε προαγωγικά στην ογκογένεση^{6,2} και εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, στην προσκόλληση, τη μετανάστευση, την διήθηση των καρκινικών κυττάρων, την αγγειογένεση του όγκου,⁸⁷ και επίσης στις αλληλεπιδράσεις όγκου-μικροπεριβάλλοντος και στη ρύθμιση της ανοσίας του όγκου.⁴⁵ Οι Eph και οι εφρίνες εμπλέκονται στην ανάπτυξη μιας ποικιλίας κακοήθων νεοπλασμάτων, συμπεριλαμβανομένων των καρκινωμάτων του πνεύμονα, του

προστάτη, του παχέος εντέρου, του παγκρέατος, των ωοθηκών, του θυρεοειδούς, της γλώσσας και των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων, γλοιωμάτων, μελανωμάτων⁶, στο κακόηθες μεσοθηλίωμα, καρκίνωμα ωοθηκών, τραχήλου της μήτρας, στο σάρκωμα Karosi καθώς και στον καρκίνο του μαστού⁵⁵.

5.1. Προαγωγή ογκογένεσης.

Οι υποδοχείς EphA2, EphA3, EphA4, EphA7, EphA10, EphB2 και EphB4 έχει βρεθεί ότι μπορούν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση και την εξέλιξη όγκων, ιδιαίτερα στον καρκίνο του μαστού και στο γλοιοβλάστωμα⁶. Ο EphA2 για παράδειγμα υπερεκφράζεται στον καρκίνο του μαστού και σχετίζεται με κακή πρόγνωση, ενισχύοντας την ογκογόνο σηματοδότηση του RTK ErbB2 (HER2),⁶ την αυτονομία σε οιστρογόνα, την αντίσταση στην ταμοξιφένη και προωθώντας την κυτταρική ανάπτυξη, διήθηση και αντίσταση στην ανοικία.⁴⁴ Μείωση της έκφρασης τους ή μπλοκάροντας την μεταγωγή σήματος χρησιμοποιώντας siRNA ή EphA2-Fc υποδοχείς, οδηγεί σε μειωμένη διήθηση, αυξημένο κυτταρικό θάνατο και μειωμένη ανάπτυξη του όγκου σε ποικίλα μοντέλα καρκίνου. Επίσης η ligand-επαγόμενη ενδοκυττάρωση με την λιγάση ουβικουιτίνης c-Cbl (Casitas B-lineage lymphoma) που οδηγεί στην αποικοδόμησή του υποδοχέα φάνηκε επίσης να αναστέλλει την διηθητικότητα του όγκου.⁴⁴ Απώλειά του στο επιθήλιο του μαστού σε ποντίκια βρέθηκε να επιβραδύνει την ανάπτυξη και τη μετάσταση του όγκου.^{6,2} Οι Eph A4, A7, A10 και B2 επίσης φαίνεται ότι υπερεκφράζονται στον καρκίνο του μαστού, με τους ασθενείς που τους υπερεκφράζουν να έχουν χειρότερη πρόγνωση.^{6,2} Ο EphA3 έχει ογκογόνο ρόλο στο γλοιοβλάστωμα, αφού ενώ εκφράζεται ασθενώς στον υγιή εγκέφαλο, στα βλαστοκύτταρα του γλοιοβλαστώματος εκφράζεται σε αφθονία. Η πτώση του EphA3 οδηγεί σε διαφοροποίηση των κυττάρων όγκου και απόπτωση.⁶ Ο EphB4 σε υψηλά επίπεδα έκφρασης σχετίζεται με προχωρημένο στάδιο, υψηλό ιστολογικό βαθμό κακοήθειας στον καρκίνο του μαστού⁶ και χαμηλότερη συνολική επιβίωση⁵⁵, ειδικά όταν η υψηλή έκφραση συνοδεύεται από απουσία της εφρίνης B2, επιτρέπεται η ligand-ανεξάρτητη σηματοδότηση και παρακάμπτονται έτσι οι ογκοκατασταλτικές του ικανότητες.²

5.2. Ογκοκατασταλτικές ιδιότητες.

Όπως είδη αναφέρθηκε, ανάλογα με το κυτταρικό πλαίσιο, οι υποδοχείς εφρινών και οι εφρίνες δύναται να λειτουργούν με τρόπο που είτε προωθεί την ογκογένεση, είτε την καταστέλλει. Έτσι στην βάση αυτών των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων ο υποδοχέας ErhB4, που προηγουμένως είδαμε να σχετίζεται με προχωρημένη νόσο εάν τα επίπεδα έκφρασής του είναι υψηλά, σε άλλη περίπτωση μπορεί να δρα ογκοκατασταλτικά. Συγκεκριμένα, παρουσία της συγγενούς του εφρίνης B2 ενεργοποιείται και λειτουργεί με ογκοκατασταλτικό τρόπο,² προκαλώντας αντιογκογενετική σηματοδότηση σε καρκινικά κύτταρα μαστού, η οποία περιλαμβάνει την Abl τυροσινική κινάση και την Cdk πρωτεΐνη προσαρμογέα, με τελική έκβαση την καταστολή της ανάπτυξης, μετανάστευσης και διήθησης των καρκινικών κυττάρων.^{6,58} Ο ErhB2 έχει επίσης βρεθεί να διαδραματίζει έναν ρόλο στην αυτοφαγία και την απόπτωση στα πλαίσια του καρκίνου του μαστού, που πιθανόν να λειτουργούν ως ογκοκατασταλτικοί μηχανισμοί, καθώς η έκφρασή του σε μέτρια επίπεδα σε φυσιολογικούς και καλοήθους μαστικούς ιστούς έχει ογκοκατασταλτικά αποτελέσματα. Είναι λοιπόν εμφανές πως ο ErhB2 έχει διπλή φύση και ο ρόλος του εξαρτάται από την συν-έκφραση εφρινών.³⁰ Ο ErhA2 επίσης, παρόλο που έχει συσχετιστεί έντονα με τον καρκίνο, είναι πιθανό να έχει και αντιογκογόνες ιδιότητες καθώς ποντίκια με έλλειψη του φάνηκε να είναι πιο ευπαθή σε χημικά επαγόμενη καρκινογένεση δέρματος. Άλλοι υποδοχείς που έχει φανεί πως υποεκφράζονται (downregulated), υποδηλώνοντας την ογκοκατασταλτική τους δράση είναι οι ErhA1, ErhB2, B3 και B4 στον CRC (Colorectal cancer)⁶ Επιπλέον τα γονίδια των υποδοχέων ErhA3, A7 και B6 έχει φανεί να έχουν υποστεί επιγενετική σιώπηση σε διάφορους καρκίνους, όπως και ο υποδοχέας ErhA5, του οποίου το γονίδιο στον καρκίνο του μαστού αποσιωπάτε επιγενετικά μέσω υπερμεθυλίωσης, γεγονός που πιθανόν να συμβάλλει στην διαμόρφωση ενός διηθητικού φαινοτύπου κατά την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού.³⁴

5.3. Νεοαγγειογένεση όγκου.

Η ανάπτυξη συμπαγών όγκων εξαρτάται υπέρμετρα από την ικανότητα στρατολόγησης αιμοφόρων αγγείων, τα οποία τροφοδοτούν τον όγκο με αυξητικούς παράγοντες και

οξυγόνο απαραίτητο για την επιβίωση και την ανάπτυξή του. Επιπλέον, αυτά τα αγγεία παρέχουν στα καρκινικά κύτταρα ένα σημείο εισόδου στην κυκλοφορία προκειμένου να δώσουν απομακρυσμένες μεταστάσεις.¹⁰⁶ Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως οι υποδοχείς εφρινών και οι εφρίνες κατέχουν σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση του αγγειακού συστήματος κατά την εμβρυική ηλικία αλλά και κατά την ενήλικη ζωή. Εμπλέκονται επίσης και στην νεοαγγειογένεση στα πλαίσια του καρκίνου, με ρόλους αμφιλεγόμενους και εξαρτημένους από το κάθε μέλος της πρωτεϊνικής οικογένειας, αλλά και από το εκάστοτε είδος καρκίνου. Ενδέχεται ένας υποδοχέας να διαδραματίζει αντιαγγειογενετικό ρόλο σε έναν τύπο καρκίνου και να προωθεί την αγγειογένεση σε έναν άλλον.

Για παράδειγμα η αντίστροφη σηματοδότηση, επαγόμενη από τον Ehb2 σε όγκους εγκεφάλου, αναστέλλει τον σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων, προάγοντας την ανάπτυξη περιφερειακών αγγείων αντί της διακλαδούμενης αγγειογένεσης και μειώνει την αγγειακή διαπερατότητα του όγκου. Αντίθετα στον καρκίνο του μαστού ενεργοποιεί την εφρίνη B2 που εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, προάγοντας την αγγείωση του όγκου, διεγείροντας έτσι την διήθηση, την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων.^{58,37} Η εφρίνηB1 επίσης έχει βρεθεί σε υψηλότερα ποσοστά σε ιστούς ηπατοκυτταρικού καρκινώματος σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς, όπου οδηγεί σε αύξηση του μεγέθους του όγκου και της αγγείωσής του. Με αυξημένη αγγείωση καθώς και μεταστάσεις έχει συσχετιστεί και η εφρίνηB2 στο επιθετικό μελάνωμα.¹⁰⁹ Ο υποδοχέας Ehb4, από την οικογένεια των Ehb's, επίσης εκφράζεται σε αιμοφόρα αγγεία όγκων, σε υποξικές συνθήκες και συμμετέχει στη νεοαγγείωση του όγκου επάγοντας αντίστροφη σηματοδότηση μετά από σύνδεση με την εφρίνη B2. Η μεταγωγή σήματος οδηγεί σε αύξηση και αγγείωση του όγκου, όπως έχει βρεθεί σε καρκίνους του μαστού. Η συμμετοχή του συστήματος αυτού στην αγγειογένεση επιβεβαιώνεται πειραματικά στο μελάνωμα, από το γεγονός πως η διαλυτή μορφή της εξωκυτταρικής περιοχής του Ehb4 διαταράσσει την αγγειογένεση του όγκου αποτρέποντας τη δέσμευση των υποδοχέων Ehb των κυττάρων όγκου, με την εφρίνη B2 των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επιπρόσθετα, η αναγκαιότητα της αντίστροφης σηματοδότησης της εφρίνηςB2 για την αγγειογένεση του όγκου αλλά και για το μέγεθός του φαίνεται σε ποντίκια με μεταλλάξεις της εφρίνηςB2 σε

κύτταρα γλοιώματος, τα οποία εμφάνισαν μειωμένο μέγεθος όγκου και πυκνότητα αγγείων. Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν τον κρίσιμο ρόλο της εφρίνηςB2 και του EphB4 στην εξέλιξη του όγκου και στην αγγειακή στρατολόγηση.²²

Άλλες περιπτώσεις που μπορεί ένας υποδοχέας Eph να έχει νεοαγγειογενετικό ρόλο αποτελεί ο γαστρικός καρκίνος για παράδειγμα όπου έχει μελετηθεί η συμμετοχή του EphA3, ο οποίος επηρεάζει την έκφραση του VEGF, μορίου απαραίτητου για την νεοαγγειογένεση. Σε μια συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές γαστρικού καρκίνου και βρέθηκε πως με μείωση της έκφρασης του υποδοχέα EphA3 (knockout) μειώνεται και η έκκριση VEGF, προτείνοντας την συμβολή του EphA3 στην ρύθμιση του σχηματισμού νέων αγγείων. Διερευνήθηκαν επίσης οι υποκείμενοι μηχανισμοί με τους οποίους ο EphA3 προάγει την νεοαγγειογένεση και βρέθηκε πως η μειωμένη έκφραση EphA3 (knockout) οδηγεί σε μειωμένη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης STAT3, η οποία είναι γνωστό πως εμπλέκεται στην ανοδική ρύθμιση του VEGF.⁵⁷

Δύο άλλα μόρια που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ζωτικής σημασίας για τον όγκο αλληλεπίδραση μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι η εφρίνηA1 και ο EphA2.⁴⁹ Η λειτουργία και οι αλληλεπιδράσεις του EphA2/εφρίνης A1 είναι πολυποίκιλες και εξαρτώνται από τον υπο εξέταση τύπο κυττάρου.¹⁰ Το σύστημα EphA2/εφρίνηA1 εκφράζεται στο σχετικό με τον όγκο ενδοθήλιο, πλήθους καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου μαστού, αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα, πλακώδες καρκίνωμα, γαστρικό καρκίνωμα, παχέος εντέρου, διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα νεφρού και στο σάρκωμα Kaposi.⁴⁴ Μελέτες υποδεικνύουν ότι όταν ο EphA2 είναι σε ανεπάρκεια στα ενδοθηλιακά κύτταρα του ξενιστή, οδηγεί σε μειωμένο σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων όγκου και μεταστατική εξάπλωση. Αυτό υποδηλώνει ότι ο EphA2 παίζει ρόλο στην προώθηση της αγγειογένεσης και της μετάστασης του όγκου. Επιπλέον, τα ενδοθηλιακά κύτταρα που δεν έχουν EphA2 παρουσιάζουν μειωμένη μετανάστευση και συναρμολόγηση ως απόκριση σε σήματα από την εφρίνηA1 ή τον VEGF τα οποία είναι σημαντικά μόρια που εμπλέκονται στην αγγειογένεση. Αυτή η εξασθενημένη απόκριση προκαλείται, τουλάχιστον εν μέρει, από τη δυσρύθμιση των οδών σηματοδότησης που περιλαμβάνουν PI3K, πρωτεΐνες Van και Rac1 GTPase. Αυτά τα μονοπάτια σηματοδότησης είναι απαραίτητα για τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και

το σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων. Περαιτέρω έρευνες αποκάλυψαν ότι τα υπολείμματα φωσφορυλιωμένης τυροσίνης στον EphA2 αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες όπως τις υπομονάδες Vav GEF και p85 του PI3K, υποδηλώνοντας ότι η φωσφορυλίωση τυροσίνης παίζει κρίσιμο ρόλο στη μεταγωγή σήματος EphA2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Παρομοίως, οι πρωτεΐνες Vav2 και Vav3, οι οποίες εμπλέκονται στο μονοπάτι σηματοδότησης Vav-Rac, έχει βρεθεί ότι συμβάλλουν σε αγγειακά ελαττώματα και διαταραγμένη αγγειογένεση του όγκου όταν αποκλείονται σε ποντίκια. Αυτό υποστηρίζει την ιδέα ότι η σηματοδότηση Vav-Rac είναι ζωτικής σημασίας για τη νεοαγγείωση που προκαλείται από τον EphA2. Από την άλλη πλευρά, η εφρίνη A1, η οποία εκφράζεται τόσο από κύτταρα όγκου όσο και από ενδοθηλιακά κύτταρα, έχει συσχετιστεί με νεοαγγείωση και εξέλιξη του όγκου σε μοντέλα ποντικών και ανθρώπινα δείγματα. Διάφοροι παράγοντες, όπως ο TNF- α , ο VEGF και ο HIF, μπορούν να προκαλέσουν την έκφραση της εφρίνης A1.^{22,10}

Τέλος, εκτός από το ρόλο τους στην αγγειογένεση, έχει προταθεί ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορούν να παράγουν «αγγειοκρινικά» σήματα, τα οποία επηρεάζουν τη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων ανεξάρτητα από τη λειτουργία του αγγείου. Παράγοντες δηλαδή που προέρχονται από ενδοθηλιακά κύτταρα, που ρυθμίζονται από τον EphA2 και την εφρίνηA1, ρυθμίζουν την ανάπτυξη του όγκου. Η Slit2 είναι μια πρωτεΐνη που προωθεί την αγγειογένεση μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού mTORC2/Rac και Akt. Απώλεια του EphA2 και της εφρίνηςA1 οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή Slit2 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και προαγωγή της αγγειογένεσης. Αντίθετα παρουσία του EphA2 και της εφρίνηςA1 η αγγειογενετική ικανότητα της Slit2 αναστέλλεται και έτσι αναστέλλει την ανάπτυξη και την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων. Στον ανθρώπινο καρκίνο του μαστού, τα υψηλά επίπεδα EphA2 και τα χαμηλά επίπεδα Slit2 στο ενδοθήλιο του όγκου σχετίζονται με κακή επιβίωση του ασθενούς. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι ο EphA2 δεν παίζει ρόλο μόνο στην αγγειογένεση επαγόμενη από τον όγκο αλλά λειτουργεί και στην αγγειοκρινή ρύθμιση της εξέλιξης και της κινητικότητας του όγκου.^{10,22}

➤ *Νεοαγγειογένεση σε υποξικό περιβάλλον.*

Η υποξία είναι μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα οξυγόνου στους ιστούς και συχνά χαρακτηρίζει συμπαγείς όγκους. Ως απάντηση στην υποξία, ενεργοποιούνται μεταγραφικοί παράγοντες HIFs (Hypoxia inducible transcription factors) οι οποίοι εκκινούν την ανάπτυξη αγγειακών δικτύων. Οι υποδοχείς EphB όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω, εκφράζονται φυσιολογικά στην βάση των εντερικών κρυπτών, όπου είναι ενεργοποιημένο το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt, όμως σε υποξικό περιβάλλον μειώνεται η έκφραση β-κατενίνης/TCF-4 και οδηγεί σε μείωση της έκφρασης των υποδοχέων, υποδηλώνοντας μια σχέση ανάμεσα στις υποξικές συνθήκες και στην ρύθμιση των υποδοχέων εφρινών B.¹⁰⁶ Η εφρίνη A1 επίσης έχει φανεί να σχετίζεται με απαντήσεις σε υποξικές συνθήκες, αφού αυξορρυθμίζεται^{10,106}. Η αυξορύθμισή της συμβαίνει άμεσα από τον HIF-2α αλλά και έμμεσα μέσω αυξορύθμισης του VEGF επαγόμενη από HIF-2α. Αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ της εφρίνης A1, του VEGF και του HIF-2α δημιουργεί έναν βρόγχο ανατροφοδότησης που συνεισφέρει στην πολύπλοκη διαδικασία της αγγειογένεσης στο υποξικό μικροπεριβάλλον του όγκου.¹⁰

➤ *Αγγειογενής μιμητισμός.*

Ο αγγειογενής μιμητισμός είναι ένας εναλλακτικός μεταστατικός μηχανισμός που παρατηρείται σε ορισμένους όγκους και βασίζεται στην πλαστικότητα των καρκινικών κυττάρων. Σε αντίθεση με την παραδοσιακή αγγειογένεση, στην οποία οι όγκοι διεγείρουν την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων, στην αγγειογενετική μίμηση τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα σχηματίζουν αγγειακά δίκτυα ώστε να αποκτήσουν τη δική τους παροχή αίματος.^{37,59} Ο αγγειογενής μιμητισμός χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά στο μελάνωμα και η ενεργοποίηση του EphA2 έχει ταυτοποιηθεί ως γεγονός που λαμβάνει χώρα κατά την έναρξη της διαδικασίας. Η ενεργοποίηση του EphA2 εκκινεί μονοπάτια σηματοδότησης που περιλαμβάνουν FAK, PI3K, ERK1/2, MT1-MMP, MMP2, λαμινίνες και καντερίνες. Μετά την δέσμευση της εφρίνης A1, ο υποδοχέας ενεργοποιείται και με την σειρά του ενεργοποιεί το μονοπάτι PI3K/ERK1/2 μέσω της κινάσης FAK και έχει ως αποτέλεσμα την αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας ουσίας ECM (Extra cellular matrix), υποβοηθούμενη από την αυξορύθμιση της MT1-MMP (Membrane type 1

metalloproteinase 2) και την ακόλουθη ενεργοποίηση της MMP2 (Matrix metalloproteinase 2)^{4,37}. Αυτές οι διεργασίες οδηγούν σε αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας μήτρας, μετανάστευση, διήθηση και επαγωγή ενός αγγειογόνου φαινοτύπου στα κύτταρα.³⁷ Παρόλο που αρχικά εντοπίστηκε στο μελάνωμα, είναι πλέον γνωστό πως συμβαίνει σε πολλούς επιθετικούς, διηθητικούς και μεταστατικούς καρκίνους.²³ Παρατηρείται για παράδειγμα και στον καρκίνο του μαστού, όπου συμβάλει ο EphA2, αλληλεπιδρώντας με την VE-καντερίνη (Vascular endothelial) συνοδευόμενος από υπερέκφραση της πρωτεΐνης HER2(Human epidermal growth factor 2).⁵⁹ Η VE-καντερίνη αλληλεπιδρά με τον EphA2, ρυθμίζει τον εντοπισμό της στην μεμβράνη του κυττάρου και σε συνδέσεις προσκόλλησης κυττάρου- κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αγγειογενούς μίμησης (VM) και ελέγχει την ικανότητά της να φωσφορυλιώνεται μέσω αλληλεπίδρασης με την εφρίνη A1.⁴⁹ Για τον καρκίνο του μαστού μάλιστα έχουν γίνει προσπάθειες ανάπτυξης φαρμάκων που αναστέλλουν τον αγγειογενή μιμητισμό. Μια ομάδα ερευνητών διερεύνησε την επίδραση των PARP αναστολέων στην αναστολή του αγγειογενή μιμητισμού στον τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού, βρίσκοντας επιτυχώς τρεις αναστολείς που βλάπτουν τον μηχανισμό μέσω αναστολής του μεταγραφικού παράγοντα Nf-kB, ο οποίος συνδράμει στην αγγειογένεση και την φλεγμονή.²³

5.4. Μικροπεριβάλλον όγκου.

Το μικροπεριβάλλον του όγκου αποτελεί ένα πολύπλοκο σύστημα με ανώμαλες συνθήκες και διαδραματίζει κομβικό ρόλο στην ανάπτυξη, εξέλιξη, μετάσταση και αντίσταση στη θεραπεία του όγκου. Χαρακτηρίζεται από αλλαγές των μορίων εντός της εξωκυττάριας ουσίας, των αιμοφόρων και λεμφοφόρων αγγείων και μεταλλαγμένων κυτταρικών φαινοτύπων, συμπεριλαμβανομένων των TAM (tumor associated macrophages). Το μικροπεριβάλλον του όγκου περιλαμβάνει καρκινικά και μη κύτταρα, αγγεία, πρωτεΐνες και ένζυμα και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις ρυθμίζουν την πορεία του όγκου.¹⁰⁶ Εντός αυτού του πολύπλοκου συστήματος ξενιστή-όγκου, τα καρκινικά κύτταρα στρατολογούν αγγεία και χειραγωγούν την εξωκυττάρια ουσία μέσω της παραγωγής και έκκρισης κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων.¹⁰⁶ Οι υποδοχείς εφρινών δεν εκφράζονται μόνο στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, αλλά και στην επένδυση των αιμοφόρων

αγγείων, στους ινοβλάστες και σε φλεγμονώδη κύτταρα που διεισδύουν στον ιστό του όγκου.^{106,14}

➤ *Eph και TILS (Tumor infiltrating cells)*

Τα TILs, τα οποία περιλαμβάνουν κυρίως τα Τ-κύτταρα, Β-κύτταρα και NK (natural killers) κύτταρα και το μικροπεριβάλλον του όγκου παίζουν ρόλο στην ανοσοδιαφυγή του όγκου, η κατανόηση του μικροπεριβάλλοντος λοιπόν βοηθά στον εντοπισμό ανοσοκατασταλτικών οδών. Το μικροπεριβάλλον του όγκου μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε τέσσερις τύπους με βάση την παρουσία TILs και την έκφραση PD-L1.

- Ο τύπος I (PD-L1+ και TILs) εμφανίζει προσαρμοστική ανοσολογική αντίσταση και ανταποκρίνεται καλά στη θεραπεία με αντι-PD-1/PD-L1.
- Ο τύπος II (PD-L1- χωρίς TILs) υποδηλώνει ανοσολογική παραμέληση.
- Ο τύπος III (PD-L1+ χωρίς TILs) υποδηλώνει ενδογενή επαγωγή.
- Ο τύπος IV (PD-L1- με TILs) υποδεικνύει ανοσολογική ανοχή μέσω άλλων ανασταλτικών οδών.⁵⁴

Υποδοχείς Eph εντοπίζονται σε καρκινικά κύτταρα, αλλά και σε στρωματικά και μυελοειδή κύτταρα εντός του περιβάλλοντος των όγκων, τα οποία επηρεασμένα από τους όγκους υποστηρίζουν διάφορες διεργασίες προς όφελος του καρκίνου, όπως την προαγωγή της ανάπτυξής τους, αγγειογένεση, μετάσταση και την ανοσολογική διαφυγή.⁴⁵ Τέτοια κύτταρα είναι τα TAMs (Tumor associated macrophages), MDSCs (Myeloid-derived suppressor cells) και τα MSCs (Mesenchymal stem cells) τα οποία έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την δράση των Τ-λεμφοκυττάρων και να προωθούν τελικά την επιβίωση του όγκου.⁶ Οι αλληλεπιδράσεις των υποδοχέων Eph και εφρινών μπορεί να διευκολύνουν την αναστολή των Τ-κυττάρων, είτε να καταλήγουν στην αποστολή διεγερτικών, διαδραματίζοντας κρίσιμο ρόλο σε ό,τι αφορά την κατεύθυνση των Τ-κυττάρων στην καταπολέμηση ή ανοχή του όγκου.⁸² Η διέγερση της εφρίνης A1 για παράδειγμα προάγει την χημειοταξία των CD4+ και CD8+ Τ-κυττάρων, σε απόκριση σε ορισμένες χημειοκίνες όπως την CXCL12 και την CCL19. Ο EphA1, που εκφράζεται τόσο σε CD4+ όσο και σε CD8+ Τ-κύτταρα, διευκολύνει τη μετανάστευση αυτών των Τ-κυττάρων, στρατολογώντας μια σειρά μορίων σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων της τύπου-FAK κινάσης Pyk2, της Src κινάσης Lck, της Rho-GEF Vav1 και της PI3K. Ο EphA4, αν και δεν εκφράζεται

σε CD8+ T κύτταρα, προάγει τη μετανάστευση των CD4+ T κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης των κινασών Vav1 και Src κινάσης Lck και Fyn, πιθανώς μέσω διμερισμού με τον EphA1. Επιπλέον, ενώ η συσχέτιση μεταξύ των υποδοχέων EphA και της διακίνησης T-κυττάρων είναι καλά τεκμηριωμένη, υπάρχουν στοιχεία που υποδηλώνουν ότι οι υποδοχείς EphB ρυθμίζουν τη μετανάστευση των μονοκυττάρων. Η εκφραζόμενη στα ενδοθηλιακά κύτταρα εφρίνηB2, αλληλεπιδρά με τον EphB4 που εκφράζεται στα μονοκύτταρα, αναστέλλοντας την χημειοταξία και τη μετανάστευση τους στα ενδοθηλιακά, ενώ παίζει επίσης κρίσιμο ρόλο στην αγγειογένεση μέσω της ρύθμισης της σηματοδότησης VEGFR και μπορεί να επηρεάσει τη διακίνηση μονοκυττάρων μέσω των αγγείων των όγκων. Ως φαίνεται, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ EphA/εφρίνης A1 σε λεμφοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να παίζουν ρόλο στη διείσδυση των λεμφοκυττάρων στους όγκους, αντίστοιχα οι αλληλεπιδράσεις EphB/εφρίνηςB2 μπορεί να έχουν παρόμοιες λειτουργίες σε μονοκύτταρα και μακροφάγα που σχετίζονται με όγκους.⁸²

➤ *Ανοσοκαταστολή*

Η δραστηριότητα του EphA2 στον καρκίνο του παγκρέατος αποκλείει τα T-κύτταρα και συσχετίζεται με την ανοσοκαταστολή, ενώ knockout του EphA2 ενισχύει την ανοσολογική απόκριση με αυξημένη ευαισθησία ιντερφερονών και φλεγμονωδών μονοπατιών, μειώνει τον αριθμό των ανοσοκατασταλτικών MDSCs και TAMs και βελτιώνει την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και την ανοσοθεραπεία.⁶

Ο EphA10 καταστέλλει τον θάνατο προκαλούμενο από T-κύτταρα και αυξάνει την έκφραση PD-L1(Programmed Cell Death Ligand 1) στον καρκίνο του μαστού, ο οποίος προσδένεται σε υποδοχείς των T-κυττάρων οδηγώντας στην εξουδετέρωση τους και τελικά στην ανοχή του όγκου. Η απομάκρυνση του EphA10 ενισχύει τη δραστηριότητα των T-κυττάρων CD8+ και οδηγεί στον θάνατο των καρκινικών κυττάρων, ενώ μειώνει την ανάπτυξη του όγκου.⁶

Ο EphA4 εκφράζεται στο μικροπεριβάλλον του όγκου και παίζει ρόλο στην ανάπτυξη και την μετάσταση στον καρκίνο του μαστού. Η διαγραφή του EphA4 σε όγκους που χαρακτηρίζονται από αξιοσημείωτη διήθηση MDSCs κυττάρων και παραγωγή της

κυτοκίνης G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) που προωθεί τον πολλαπλασιασμό των μυελωιδών κυττάρων, οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή της κυτοκίνης και των αποτελεσμάτων της. Τα MDSCs είναι ανώριμα μυελοειδή κύτταρα που χαρακτηρίζονται από την ικανότητα να καταστέλλουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις, έτσι η έκφραση του EhbA4 συνδράμει στην ανοσοκαταστολή στον καρκίνο του μαστού.⁴⁵

Ο EhbB4 εμπλέκεται στη ρύθμιση τόσο των εγγενών όσο και των προσαρμοστικών συστατικών του ανοσοποιητικού συστήματος σε καρκίνους κεφαλής και τραχήλου. Μια πρόσφατη μελέτη διαπίστωσε ότι ο EhbB4 και η εφρίνη B2 εκφράζονται τόσο σε κύτταρα του όγκου, όσο και σε ορισμένα στρωματικά κύτταρα, με τον EhbB4 να έχει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης, ειδικά σε TAMs και ρυθμιστικά T-κύτταρα (T-regs) που εκφράζουν το FoxP3, τα οποία T-regs, όπως τα M2-TAMs, μπορούν να έχουν ανοσοκατασταλτική δράση στους όγκους. Σε ένα μοντέλο ακανθοκυτταρικού καρκινώματος κεφαλής και τραχήλου σε ποντίκια, η αναστολή της αλληλεπίδρασης μεταξύ EhbB4 και εφρίνης B2, μείωσε τη στρατολόγηση των Tregs και M2-TAM σε όγκους και οδήγησε σε σημαντική αύξηση του αριθμού των M1-TAM και στην ενεργοποίηση των T κυττάρων CD4+ και CD8+. Ο αποκλεισμός του EhbB4 ειδικά σε CD4+ T κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη ενεργοποίηση STAT3 και πολλαπλασιαστικούς δείκτες στα Tregs. Επιπλέον, η αναστολή του EhbB4, είτε μόνη της είτε συνδυαστικά με ακτινοθεραπεία, ανέστειλε σημαντικά την ανάπτυξη του όγκου. Είναι ενδιαφέρον ότι η αναστολή EhbB4 με ακτινοθεραπεία οδήγησε σε μετατόπιση στην πόλωση των TAM προς έναν προφλεγμονώδη, αντικαρκινικό φαινότυπο.⁴⁵

Οι υψηλές συγκεντρώσεις ορισμένων εφρινών, όπως της εφρίνης B1 και η B2, μπορούν να αναστείλουν την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων, μέσω της σηματοδότησης EhbB2 και EhbB4 αντίστοιχα, επάγοντας την παραγωγή ανοσοκατασταλτικών παραγόντων και μειώνοντας την ενεργοποίηση κυτοκινών.⁴⁵ Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποδοχέων Ehb και των εφρινών σε μεσεγχυματικά στρωματικά/βλαστικά κύτταρα (MSCs) οδηγούν λοιπόν στην έκφραση ανοσοκατασταλτικών παραγόντων όπως ο TGFb1, η 2,3-διοξυγενάση της ινδολεαμίνης και συνθάση νιτρικού οξειδίου. Αυτοί οι παράγοντες προάγουν την ανοσοδιαφυγή του

όγκου καταστέλλοντας την ενεργοποίηση των T-κυττάρων και διευκολύνοντας την ανοσολογική ανοχή.⁸²

➤ *Ανοσοεπιτήρηση*

Σε δείγματα ουροθηλιακών καρκινωμάτων βρέθηκε πως η συνέκφραση των EryA3 και PD-L1 σχετίζεται με την παρουσία CD8+ T-κυττάρων, η παρουσία των οποίων υποδηλώνει μια ενεργή ανοσολογική απόκριση κατά του όγκου. Ωστόσο η έκφραση του EryA3 μαζί με εφρίνες B έχει αρνητική έκβαση, όπως μειωμένα ποσοστά επιβίωσης. Οι υποδοχείς εφρινών λοιπόν ανάλογα με το πλαίσιο μπορεί να συμβάλλουν είτε στην ανοσοεπιτήρηση, είτε στην ανοσοκαταστολή του καρκίνου.⁴⁵

Η ενεργοποίηση του EryB6 για παράδειγμα προάγει τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων και την έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως της IFN γ (interferon gamma) και της TNF α (tumor necrosis factor-alpha). Αυτές οι κυτοκίνες, μαζί με την αυξημένη έκφραση των δεικτών ενεργοποίησης των T-κυττάρων (CD25, CD69), συμβάλλουν στην ανάπτυξη κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων (CTL: cytotoxic T lymphocytes) ικανών να στοχεύουν και να καταπολεμούν καρκινικά κύτταρα.⁸² Ο υποδοχέας EryB6 διαδραματίζει ενεργό ρόλο στη συνδιέγερση των T κυττάρων. Στην περίπτωση υποβέλτιστης διέγερσης του υποδοχέα των T-κυττάρων (TCR: T-cell receptor), η ενεργοποίηση του υποδοχέα EryB6 από την εφρίνηB2 ή από αντισώματα anti-B6, μπορεί να αντισταθμίσει αυτή την ανεπάρκεια. Η ενεργοποίηση του EryB6 οδηγεί σε ενεργοποίηση του p38MAPK που σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την παραγωγή κυτοκινών. Ως αποτέλεσμα τα T-κύτταρα πολλαπλασιάζονται και παράγουν διάφορες κυτοκίνες που προωθούν την ανοσολογική απόκριση και ρυθμίζουν την φλεγμονή, όπως IFN- γ , IL-6, IL-10, TGF- β , TNF- α και GM-CSF. Η σηματοδότηση του υποδοχέα EryB6 επίσης αναστέλλει το JNK (c-Jun N-terminal kinase) μονοπάτι που ενεργοποιείται από τον TCR, εμποδίζοντας την έκκριση IL-2 και CD-25 και αποτρέποντας την απόπτωση. Συνολικά, η συνδιέγερση EryB6 στα T-κύτταρα προάγει την κλωνική επέκταση και τη λεπτή ρύθμιση των επιπέδων παραγωγής IL-2.¹⁴

Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν τους διαφορετικούς ρόλους των υποδοχέων Ery σε κύτταρα που διεισδύουν στον όγκο και τον αντίκτυπό τους στην εξέλιξη του όγκου, τις

ανοσολογικές αποκρίσεις και τις θεραπευτικές στρατηγικές. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για την πλήρη κατανόηση των ειδικών λειτουργιών των διαφορετικών υποδοχέων Eph στο μικροπεριβάλλον του όγκου και τις δυνατότητές τους ως στόχους για τη θεραπεία του καρκίνου.⁴⁵

➤ *Επιθηλιακή μεσεγχυματική μετάβαση.*

Η επιθηλιακή μεσεγχυματική μετάβαση, EMT (epithelial mesenchymal transition) αποτελεί μια πολύπλοκη βιολογική διαδικασία με σημαντικό ρόλο σε πλήθος φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων. Περιλαμβάνει τον μετασχηματισμό επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματοειδή κύτταρα, τα οποία είναι πιο κινητικά και διηθητικά. Η EMT είναι απαραίτητη κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, όπου συμβάλλει στον σχηματισμό ιστών και στην ανάπτυξη οργάνων, ωστόσο εμφανίζεται και σε ασθένειες, όπως ο καρκίνος, διευκολύνοντας την διήθηση των καρκινικών κυττάρων και τη μετάσταση. Χαρακτηριστικό στοιχείο της EMT είναι η απώλεια επιθηλιακών χαρακτηριστικών, όπως οι επαφές κυττάρου-κυττάρου και η πολικότητα και η απόκτηση μεσεγχυματικών χαρακτηριστικών μέσω αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση.¹⁰⁶ Τα κύτταρα επίσης χάνουν επιθηλιακούς δείκτες, όπως την E-καντερίνη και αποκτούν μεσεγχυματικούς δείκτες, όπως την N-καντερίνη και την Snail).⁴¹ Στην περίπτωση του καρκίνου, η EMT συνδέεται άμεσα με αυξημένη επιθετικότητα, διηθητικότητα και αντίσταση στη θεραπεία και κατά την διάρκειά της προσδίδονται ιδιότητες βλαστοκυττάρων στα καρκινικά κύτταρα. Ο υποδοχέας EphA4 αυξορυθμίζεται κατά τη διάρκεια της EMT σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού, μια διαδικασία που σχετίζεται με αυξημένη κακοήθεια, διήθηση και αντίσταση στη θεραπεία. Η έκφραση του EphA4 σε καρκινικά βλαστοκύτταρα CSC (cancer stem cells) μαστού κατά τη διάρκεια της EMT βρέθηκε ότι μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου μεταξύ των CSC και των μακροφάγων που σχετίζονται με όγκους TAMs (tumor associated macrophages), τα οποία είναι γνωστό ότι προάγουν την ανοσοκαταστολή και συσχετίζονται με κακή πρόγνωση.⁴⁵ Η σηματοδότηση της εφρίνηςB1 οδηγεί στην απώλεια σφιχτών συνδέσμων καθώς ανταγωνίζεται τη μικρή GTPase, Cdc42 για την συσχέτιση με την πρωτεΐνη ικρίωματος Par-6 συμπλόκου πολικότητας. Οι δυναμικές αλλαγές στην έκφραση της E-καντερίνης, επηρεάζουν την ενεργοποίηση και τη λειτουργία του EphA2. Σε καλοήθη

επιθηλιακά κύτταρα, η E-καντερίνη διατηρεί τον EphA2 σε θέσεις επαφής κυττάρου-κυττάρου. Ωστόσο, σε καρκίνους του μαστού που είναι αρνητικοί στην E-καντερίνη, ο EphA2 εντοπίζεται σε ανακατέματα (ruffles) της μεμβράνης. Σε μεταστατικούς ιστούς όπου η έκφραση της E-καντερίνης αποκαθίσταται, ο EphA2 ενεργοποιείται ξανά.⁴⁹ Η έκφραση του EphA2 προωθεί την EMT και στον γαστρικό καρκίνο. Σε μια έρευνα αποκαλύφθηκε ότι η έκφρασή του ήταν σημαντικά υψηλότερη σε ιστούς γαστρικού καρκίνου συγκριτικά με τον παρακείμενο φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο και αυξημένοι ήταν και οι μεσεγχυματικοί δείκτες (N-καντερίνη, Snail,β-κατενίνη) συνοδευόμενοι από μείωση της E-καντερίνης. Επιπλέον βρέθηκε πως υπερέκφραση του EphA2 προάγει την EMT μέσω της οδού σηματοδότησης Wnt/β-κατενίνης με τελική έκβαση την απόκτηση μεσεγχυματικού φαινοτύπου, αυξημένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μετανάστευση και κυτταρική διήθηση.⁴¹

Εκτός από προωθητικούς ρόλους στην EMT και κατ' επέκταση στην εξέλιξη, διήθηση και μετάσταση του καρκίνου, η σηματοδότηση Eph/εφρινών μπορεί να λειτουργήσει και αποτρεπτικά. Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα οι EphBs/εφρίνες B, παίζουν κρίσιμο ρόλο στον έλεγχο της τοποθέτησης διαφορετικών τύπων κυττάρων κατά μήκος του άξονα κρύπτης-λάχνης στο εντερικό επιθήλιο και στον περιορισμό της ανάμειξης πολλαπλασιαστικών και διαφοροποιημένων πληθυσμών κυττάρων. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της απώθησης που ασκείται στα θετικά για EphB κύτταρα από κύτταρα σε περιοχές που είναι αρνητικές για την εφρίνη B. Η ογκοκατασταλτική λειτουργία των EphBs/εφρινών στον καρκίνο του εντέρου επιτυγχάνεται μέσω ενός μηχανισμού που διαμεσολαβείται από την E-καντερίνη. Η σηματοδότηση Eph/εφρινών ελέγχει τη διαμερισματοποίηση των κυττάρων στους εντερικούς επιθηλιακούς ιστούς ρυθμίζοντας τον σχηματισμό συμφύσεων με βάση την E-καντερίνη. Οι υποδοχείς EphB αλληλεπιδρούν με την E-καντερίνη και τη μεταλλοπρωτεϊνάση ADAM10 σε θέσεις προσκόλλησης κυττάρου-κυττάρου. Κατά την ενεργοποίηση των υποδοχέων μετά την αλληλεπίδραση με εφρίνη B1 θετικά κύτταρα αποβάλλεται η E-καντερίνη από την ADAM10.⁴⁹ Αυτή η αποβολή έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της κυτταρικής προσκόλλησης μέσω E-καντερίνης και μπορεί να διαταράξει τις διακυτταρικές συνδέσεις μεταξύ των καρκινικών κυττάρων. Η μειωμένη προσκόλληση κυττάρου-κυττάρου που προκαλείται από τη διάσπαση της E-καντερίνης

εμποδίζει τη μετανάστευση και τη διάδοση των καρκινικών κυττάρων στους περιβάλλοντες ιστούς, συμβάλλοντας στην καταστολή της ανάπτυξης και της μετάστασης του όγκου. Επιπλέον, ο Ehb3 προάγει τη μεσεγχυματική-επιθηλιακή μετάβαση (MET) απενεργοποιώντας τόσο το CrkL όσο και το Rac1, ανακατανέμοντας την E-καντερίνη και τη β-κατενίνη και αποκαθιστώντας τις συνδέσεις επιθηλιακών κυττάρων-κυττάρων. Αυτή η λειτουργία του Ehb3 στην MET μπορεί να συμβάλει στην καταστολή του όγκου.⁴⁹

Ακόμη ένα παράδειγμα για συμμετοχή των Ehb στην καταστολή της EMT αποτελεί η παρακάτω μελέτη, η οποία διερεύνησε τον ρόλο του Ehb2 στη ρύθμιση της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT) σε κύτταρα που προέρχονται από ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν siRNA για να μειώσουν την έκφραση του Ehb2 και παρατήρησαν μορφολογικές αλλαγές που μοιάζουν με το EMT στα κύτταρα. Η απώλεια του Ehb2 οδήγησε σε μείωση του επιθηλιακού δείκτη E-καντερίνη (CDH1) και ανοδική ρύθμιση του μεσεγχυματικού δείκτη φιβρονεκτίνης (FN), καθώς και σε αυξημένη έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων που επάγουν την EMT, ZEB1 και ZEB2. Συσώρευση στοιχείων υποδηλώνουν πως κατά την EMT τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν ιδιότητες καρκινικών βλαστοκυττάρων. Έτσι, οι ερευνητές εξέτασαν και το σχηματισμό σφαιρών όγκου, οι οποίες αντιπροσωπεύουν κύτταρα με ιδιότητες βλαστοκυττάρων. Βρήκαν ότι η απώλεια του Ehb2 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του σχηματισμού σφαιρών όγκου, υποδηλώνοντας την πιθανή εμπλοκή του στην απόκτηση χαρακτηριστικών καρκινικών βλαστοκυττάρων. Είναι ενδιαφέρον ότι τα πρότυπα έκφρασης των δεικτών Ehb2 και EMT διέφεραν μεταξύ των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε προσκολλημένη μορφή και εκείνων που σχηματίζουν σφαίρες όγκου. Οι σφαίρες όγκου έδειξαν υψηλότερη έκφραση του Ehb2 και μειωμένη έκφραση των δεικτών EMT σε σύγκριση με κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε προσκολλημένη μορφή. Αυτό υποδηλώνει ότι το Ehb2 μπορεί να παίζει ρόλο στη ρύθμιση των διεργασιών EMT και της προσκόλλησης κυττάρου-κυττάρου. Συνολικά, η μελέτη υποδηλώνει ότι ο Ehb2 εμπλέκεται στην καταστολή της EMT στα υπό εξέταση κύτταρα, η οποία θα μπορούσε να συμβάλει στην αναστολή της ανάπτυξης του όγκου και στην απόκτηση κακοήθων χαρακτηριστικών. Ωστόσο, είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη ότι οι επιδράσεις του Ehb2

μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με τις συγκεκριμένες γενετικές παραλλαγές και το κυτταρικό πλαίσιο.⁴³

6. Συμμετοχή των E_{rh} και των εφρινών στον καρκίνο του μαστού.

6.1. Ο ρόλος των E_{rh} και των εφρινών στην φυσιολογική διαμόρφωση του ιστού.

➤ *Φυσιολογική έκφραση των E_{rh} και των εφρινών στο επιθήλιο του μαστού.*

Ορισμένα μέλη της οικογένειας των E_{rh} και των εφρινών εκφράζονται διαφορετικά σε αυτό το όργανο. Ο υποδοχέας E_{rh}B4 εκφράζεται στα μυοεπιθηλιακά κύτταρα, η εφρίνη B2 εντοπίζεται στα κύτταρα του αυλού (luminal cells), ενώ ο E_{rh}A2 εκφράζεται στα TEBS (terminal end buds)¹¹ και η έκφρασή τους επηρεάζεται από τα οιστρογόνα και ποικίλλει κατά τη διάρκεια του κύκλου του οίστρου.^{92,73,11} Ο υποδοχέας E_{rh}B4 εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα του μυοεπιθηλίου, του αυλού (luminal cells) και του πόρου (ductal cells) κατά την εφηβεία και την ωοθυλακική φάση του κύκλου του οίστρου σε ποντίκια και ανθρώπους. Η έκφραση του E_{rh}B4 ελέγχεται οιστρογονικά, ο οποίος έλεγχος πιθανότατα ασκείται τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταμεταγραφικό επίπεδο. Η έκφραση του E_{rh}A2 στο επιθήλιο του μαστού ελέγχεται επίσης οιστρογονικά και ρυθμίζεται αρνητικά^{3,11} από τα οιστρογόνα και το c-myc (c-myelocytomatosis oncogene product). Η εφρίνη B2, συγγενής για τον E_{rh}B4, παρουσιάζει παρόμοιο, όμως λιγότερο αυστηρό ορμονικό έλεγχο στην έκφρασή του.³

➤ *Μορφογένεση ιστού.*

Η επιθηλιακή μονάδα του μαστικού αδένου είναι οργανωμένη σε ένα εκτεταμένο διακλαδισμένο δίκτυο που αποτελείται από εκκριτικά και επιθηλιακά κύτταρα του πόρου, μυοεπιθηλιακά κύτταρα, προγονικά κύτταρα και βλαστοκύτταρα του μαστού.⁷³ Ο σχηματισμός αυτών των διακλαδισμένων αγωγών, γνωστών ως διακλαδούμενη μορφογένεση, ρυθμίζεται από ενδοκρινείς ορμόνες και τοπικές παρακρινείς αλληλεπιδράσεις και περιλαμβάνει την συμμετοχή των E_{rh} και των εφρινών.⁹² Οι υποδοχείς E_{rh}A2 και E_{rh}B4 εκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού και ρυθμίζονται κατά τη διάρκεια διαφορετικών σταδίων του κύκλου ζωής του μαστικού αδένου. Η ορμονική κατάσταση των οιστρογόνων, της προγεστερόνης, της αυξητικής ορμόνης και της προλακτίνης συντονίζει τα αναπτυξιακά συμβάντα κατά την εφηβεία,

τους κύκλους του οίστρου και την ανάπτυξη κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, της γαλουχίας και της κύησης.⁷³ Υπάρχουν αναδυόμενες ενδείξεις που υποδηλώνουν ότι μέλη των υποδοχέων E_h και εφρίνες, είτε άμεσα είτε μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλα μονοπάτια σηματοδότησης, εμπλέκονται στον έλεγχο της μορφογένεσης των μαστικών αδένων.³ Ο E_hA2 κατέχει ενεργό ρόλο στην διαδικασία της διακλαδωτικής μορφογένεσης των TEBs εντός του μαστικού αδένα. Ο E_hA2, προάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διακλάδωση ως απόκριση στον αυξητικό παράγοντα ηπατοκυττάρων HGF (Hepatocellular growth factor).¹¹ Παραδείγματα ορισμένων οδών σηματοδότησης με τα οποία διασταυρώνονται οι E_h υποδοχείς αποτελούν οι αλληλεπιδράσεις τους με σύμπλοκα κυτταρικής προσκόλλησης, όπως η E- καντερίνη, η οποία αποτελεί ρυθμιστή της έκφρασής τους, επηρεάζοντας έτσι την αγκύρωση των επιθηλιακών κυττάρων στην οποία συμβάλλουν οι E_hA και την καθοδηγούμενη κυτταρική μετανάστευση στην οποία συμβάλλουν οι υποδοχείς E_hB και οι εφρίνες B. Οι E_h και οι εφρίνες αλληλεπιδρούν επίσης με συμπλέγματα εστιακής προσκόλλησης, τα οποία είναι απαραίτητα για την ακριβή ρύθμιση της προσκόλλησης και της αποκόλλησης της βασικής μεμβράνης κατά τα στάδια δυναμικής ανάπτυξης του μαστικού αδένα. Η έκφρασή τους παρατηρείται κυρίως κατά την εφηβεία και τον οιστρικό κύκλο, ενώ μειώνεται κατά την εγκυμοσύνη και την γαλουχία.³

Εξίσου σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η ισορροπημένη έκφραση και αλληλεπίδραση E_hB4 και εφρίνης B2. Για τον σκοπό της διερεύνησης του ρόλου της μεταξύ τους σηματοδότησης στην διαμόρφωση του ιστού, μια ομάδα ερευνητών προχώρησε στην δημιουργία δύο διαγονιδιακών σειρών ποντικών, όπου η μία γραμμή ποντικού υπερεκφράζει τη φυσιολογική πρωτεΐνη εφρίνηB2, ενώ η άλλη φέρει μια μεταλλαγμένη μορφή της που στερείται ορισμένων αμινοξέων. Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη αναμένεται να επάγει προς τα εμπρός σηματοδότηση αλλά δεν είναι σε θέση να προκαλέσει αντίστροφη σηματοδότηση. Αυτά τα διαγονιδιακά ποντίκια χρησιμοποιήθηκαν για να συγκριθούν τα αποτελέσματα της υπερδιεγερμένης εμπρόσθιας σηματοδότησης με ή χωρίς ταυτόχρονη αντίστροφη σηματοδότηση και φάνηκε πως αμφότερες οι διαγονιδιακές σειρές ποντικών εμφάνισαν αλλοιωμένη ανάπτυξη του επιθηλίου του μαστού. Κατά τη διάρκεια της οιστρογονικά επαγόμενης φάσης ανάπτυξης στην εφηβεία και οι δύο σειρές έδειξαν

καθυστέρηση στην ανάπτυξη του μαστικού επιθηλίου και χαμηλή δραστηριότητα διακλάδωσης, λόγω της υπερδιέγερσης της εμπρόσθιας σηματοδότησης. Ομοίως, κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, η υπερέκφραση της φυσιολογικής εφρίνης B2 οδήγησε σε πρώιμη διαφοροποίηση του επιθηλίου του μαστού, ενώ η έκφραση της μεταλλαγμένης είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη και καθυστερημένη ανάπτυξη του επιθηλίου. Αντίθετες επιδράσεις παρατηρήθηκαν επιπρόσθετα και κατά τη διάρκεια της γαλουχίας, όπου τα διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν τη φυσιολογική εφρίνη B2 εμφάνισαν καλά οργανωμένους μαστικούς αδένες με προεξέχουσα εκκριτική δραστηριότητα, ενώ τα μεταλλαγμένα διαγονιδιακά ποντίκια είχαν διαταραγμένη αρχιτεκτονική ιστού και μειωμένη εκκριτική δραστηριότητα. Τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η αμφίδρομη ή αντίστροφη σηματοδότηση είναι απαραίτητη για τη λειτουργική μορφογένεση του μαστικού επιθηλίου και η ανεξέλεγκτη εμπρόσθια σηματοδότηση επηρεάζει την οργάνωση και τη λειτουργία του ιστού.³⁹

➤ *Ομοίσταση μαστικών βλαστοκυττάρων.*

Η σηματοδότηση Ehf/εφρίνης παίζει ρόλο στην ομοίσταση των μαστικών βλαστοκυττάρων και στη ρύθμιση της δεξαμενής βλαστοκυττάρων/προγονικών κυττάρων. Οι Ehf και οι εφρίνες εμπλέκονται στον έλεγχο της θέσης των βλαστοκυττάρων, στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των προγονικών κυττάρων, της διαφυγής και της μετανάστευσής τους. Η αντίστροφη σηματοδότηση της εφρίνης B2 παίζει ρόλο στην διατήρηση της πολικότητας των κυττάρων και της θέσης των βλαστοκυττάρων στον μαστικό αδένα¹¹ και η απορυθμισμένη έκφρασή της έχει αποδειχθεί ότι παρεμβαίνει στη ρύθμιση της θέσης των βλαστοκυττάρων και μπορεί να συμβάλει στην καρκινογένεση του μαστού διαταράσσοντας την ομοίστασή τους και προάγοντας την ανάπτυξη καρκινικών βλαστοκυττάρων.⁷³ Στην κατανομή, συντήρηση, αναγέννηση και διαφοροποίηση των μαστικών βλαστοκυττάρων παίζει ρόλο και η σηματοδοτική οδός Wnt/ β -κατενίνης, μέσω ρύθμισης των Ehf/εφρινών. Η έκφραση των υποδοχέων και των εφρινών επηρεάζεται από μεταγραφικούς παράγοντες Tcf, των οποίων η ενεργότητα εξαρτάται από την διαθεσιμότητα κυτταροπλασματικής β -κατενίνης, που ελέγχεται τελικά από την Wnt.³

➤ *Ανοικοδόμηση αγγείων στον μαστό.*

Η αναδιαμόρφωση των αγγείων είναι μια κρίσιμη πτυχή της ανάπτυξης και της λειτουργίας του μαστικού αδένου, που περιλαμβάνει αγγειογενετική επέκταση και υποχώρηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και απαιτεί συντονισμό μεταξύ του μαστικού ενδοθηλίου, του παρεγχύματος και των στρωματικών συστατικών ώστε να ικανοποιηθούν οι μεταβαλλόμενες απαιτήσεις του αδένου. Ο EphB4 και η εφρίνη B2, παίζουν σημαντικό ρόλο στην αγγειακή ανάπτυξη και τη νεοαγγείωση. Μεσολαβούν στην επικοινωνία μεταξύ της αρτηριακού και της φλεβικού ενδοθηλίου και εμπλέκονται στην καθοδήγηση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν EphB4, παρατηρήθηκαν ακανόνιστες και αποδιοργανωμένες αγγειακές δομές στους μαστικούς αδένες, υποδεικνύοντας ότι η μη προγραμματισμένη έκφραση του EphB4 μπορεί να επηρεάσει την αγγειακή αρχιτεκτονική. Συνολικά, η επικοινωνία και ο συντονισμός μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων του μαστού και άλλων συστατικών του μαστικού αδένου είναι ζωτικής σημασίας για τη σωστή αναδιαμόρφωση των αγγείων κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του μαστικού αδένου. Οι Eph και οι εφρίνες παίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία και η απορρύθμισή τους μπορεί να διαταράξει τη φυσιολογική αγγειακή αρχιτεκτονική.³

Σε μελέτες που διεξήχθησαν σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερέκφραζαν την φυσιολογική εφρίνηB2 ή που εξέφραζαν μια μεταλλαγμένη εκδοχή της, παρατηρήθηκαν αγγειακές διαφορές που υπογραμμίζουν τη σημασία της αντίστροφης σηματοδότησης της εφρίνηςB2 σε μη ενδοθηλιακά κύτταρα για τη σωστή οργάνωση των αιμοφόρων αγγείων, με τον ακριβή μηχανισμό πίσω από τις παρατηρούμενες φαινοτυπικές διαφορές να είναι ωστόσο, ακόμα ασαφής. Σε εκείνα που υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη παρατηρήθηκε ένα πολυστρωματικό δίκτυο τριχοειδών αγγείων να περιβάλλει τις εκκριτικές κυψελίδες και προτάθηκε πως η υπερέκφραση της πρωτεΐνης προάγει την αγγειογένεση, χωρίς να εμπλέκεται στην αγγειακή ιστολογική αρχιτεκτονική. Από την άλλη η έκφραση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης οδήγησε σε υπεράριθμα τριχοειδή αγγεία, μερικά από τα οποία είχαν τυφλά άκρα. Δεν είναι βέβαιο αν οι διαφορές οφείλονται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων ή αν διαμεσολαβούνται από άλλους τύπους κυττάρων όπως μυοεπιθηλιακά ή στρωματικά κύτταρα. Στο μοντέλο των διαγονιδιακών

ζώνων η διαταραγμένη διάταξη των μυοεπιθηλιακών κυττάρων μπορεί να διευκολύνει την επαφή μεταξύ των επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων προάγοντας έτσι επιδράσεις στο ενδοθήλιο του μαστού ή η διαγονιδιακή έκφραση μπορεί να επηρεάζει έμμεσα την αγγειογένεση επάγοντας την έκφραση αγγειογενετικών παραγόντων στο ίδιο το επιθήλιο ή στο μυοεπιθήλιο.³⁹

6.2. Επιδημιολογικά στοιχεία και κατηγοριοποίηση του καρκίνου του μαστού.

Το 2020, υπολογίζεται ότι διαγνώστηκαν 2,3 εκατομμύρια περιπτώσεις καρκίνου του μαστού παγκοσμίως, με αποτέλεσμα περίπου 685.000 θανάτους. Τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης (>80 ανά 100.000 γυναίκες) παρατηρήθηκαν στην Αυστραλία/Νέα Ζηλανδία, τη Δυτική Ευρώπη, τη Βόρεια Αμερική και τη Βόρεια Ευρώπη, ενώ τα χαμηλότερα ποσοστά (<40 ανά 100.000) βρέθηκαν στην Κεντρική Αμερική, την Ανατολική και Μέση Αφρική και τη Νότια-Κεντρική Ασία. Η Βόρεια Αμερική και η Δυτική Ευρώπη κατατάσσονται στην 5η και 6η θέση ως προς τον αριθμό των θανάτων. Η επιβάρυνση του καρκίνου του μαστού συγκεντρώνεται σε γυναίκες ηλικίας 50 ετών και άνω, με πάνω από το 70% των περιπτώσεων και το 81% των θανάτων να σημειώνονται σε αυτήν την ηλικιακή ομάδα. Ο καρκίνος του μαστού ήταν ο πιο διαγνωσμένος καρκίνος στις γυναίκες στις περισσότερες χώρες, ακολουθούμενος από τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Ήταν επίσης η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο σε πολλές χώρες, ακολουθούμενη από τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και τον καρκίνο του πνεύμονα. Ο αριθμός των κρουσμάτων προβλέπεται να αυξηθεί σε πάνω από 3 εκατομμύρια ετησίως έως το 2040.⁵

Ο καρκίνος του μαστού είναι μια πολύπλοκη και ετερογενής νόσος, με παραλλαγές που παρατηρούνται ιστολογικό και σε μοριακό επίπεδο. Μπορεί να ταξινομηθεί σε διαφορετικούς υποτύπους με βάση τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης: luminal A, luminal B, HER2 enriched και Basal-like καρκίνο του μαστού (BLBC). Κάθε υποτύπος έχει ξεχωριστά χαρακτηριστικά και προγνωστικά αποτελέσματα. Η έκταση του καρκίνου παραδοσιακά αξιολογείται χρησιμοποιώντας το σύστημα σταδιοποίησης TNM, το οποίο αξιολογεί το μέγεθος του όγκου, τη συμμετοχή των λεμφαδένων και την παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων. Πιο πρόσφατα έχουν ενσωματωθεί η ιστολογική βαθμολόγηση και μοριακά δεδομένα για τη διαμόρφωση πέντε προγνωστικών ομάδων:

0 (για in situ καρκίνους του μαστού), I, II, III και IV. Η κατανόηση αυτών των υποτύπων, ταξινομήσεων και προγνωστικών ομάδων είναι απαραίτητη για τον εξατομικευμένο σχεδιασμό θεραπείας και τη βελτίωση των αποτελεσμάτων στη διαχείριση του καρκίνου του μαστού.⁶³

6.3. Η συμβολή των Eρh και εφρινών στην παθογένεια και εξέλιξη του καρκίνου του μαστού.

Ο καρκίνος του μαστού είναι εμφανές πως αποτελεί σημαντική πρόκληση για την υγεία παγκοσμίως, με σοβαρό αντίκτυπο στη ζωή των γυναικών. Στο επόμενο κεφάλαιο θα διερευνηθούν τα μονοπάτια σηματοδότησης, οι μοριακές αλληλεπιδράσεις και οι λειτουργικές συνέπειες που σχετίζονται με τους υποδοχείς εφρινών και κυρίως με τους EρhA2, EρhA4, EρhA5, EρhA10, EρhB2, EρhB4, EρhB6, καθώς και τους ligand της εφρίνης προκειμένου να αποκαλυφθούν οι πολύπλοκοι μηχανισμοί που διέπουν τη συμβολή τους στην παθογένεια και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού και την επίδρασή τους στην ανάπτυξη του όγκου, την αγγειογένεση, την διήθηση, τη μετάσταση και τις θεραπευτικές αποκρίσεις. Οριοθετώντας τους συγκεκριμένους ρόλους κάθε υποδοχέα Eρh και εφρίνης, φιλοδοξούμε να αποκαλύψουμε νέους θεραπευτικούς στόχους και προγνωστικούς δείκτες που μπορεί να ανοίξουν το δρόμο για πιο ακριβείς και αποτελεσματικές παρεμβάσεις στη διαχείριση του καρκίνου του μαστού.

Εντοπίζονται βασικές διαφορές στα πρότυπα έκφρασης των υποδοχέων Eρh και των εφρινών μεταξύ των φυσιολογικών κυττάρων του μαστού και των καρκινικών κυττάρων. Σύμφωνα με τα ευρήματα μιας μελέτης σε κυτταρικές σειρές μαστού (MCF-10A, MCF-7 και MDA-MB-231), με στόχο την συσχέτιση των προφίλ έκφρασης mRNA με φυσιολογικούς και καρκινικούς φαινότυπους, αυξορυθμίζονται σε μεταγραφικό επίπεδο κυρίως οι υποδοχείς και εφρίνες τύπου A, ο EρhB2 και η εφρίνηB3. Αντίθετα, η καθοδική ρύθμιση είναι πιο κοινή μεταξύ των υποδοχέων και των εφρινών τύπου B. Ενώ αναγνωρίζεται ότι τα επίπεδα mRNA μπορεί να μην συσχετίζονται πάντα άμεσα με τα επίπεδα πρωτεΐνης, αυτή η διαφορική έκφραση υποδηλώνει μια λειτουργική συσχέτιση μεταξύ των υποδοχέων και των συγγενών ligands τους, που μπορεί να επηρεάζει δυννητικά την ογκογένεση και τη διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων. Συνολικά,

αυτά τα ευρήματα ρίχνουν φως στις πιθανές διαγνωστικές και προγνωστικές επιπτώσεις των προφίλ έκφρασης Eρh/εφρινών σε καρκινικά κύτταρα μαστού, γεγονός που δικαιολογεί περαιτέρω λειτουργική ανάλυση.³³

6.3.1.EρhA2

Ο EρhA2 έχει λάβει σημαντική προσοχή στην έρευνα για τον καρκίνο του μαστού, παρουσιάζοντας υψηλή έκφραση σε περίπου 40% των κακοηθειών και έχει σχετιστεί με χειρότερη πρόγνωση, ογκογένεση, διήθηση και μετάσταση.^{6, 14} Η υψηλή έκφραση EρhA2 έχει επίσης συσχετιστεί κλινικοπαθολογικά με μεγαλύτερο μέγεθος όγκου, προχωρημένο στάδιο και λεμφαδενικές μεταστάσεις. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η έκφραση EρhA2 μπορεί να χρησιμεύσει ως πιθανός βιοδείκτης για την πρόβλεψη της επιθετικότητας και της πρόγνωσης του καρκίνου του μαστού. Έχουν παρατηρηθεί αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα EρhA2 σε διηθητικά πορογενή καρκινώματα μαστού σε σχέση με φυσιολογικούς ιστούς, υπερπλασίες και ινοαδενώματα μέσω ανάλυσης μεγάλων συνόλων δεδομένων μικροσυστοιχιών ιστών. Επίσης έχουν αναλυθεί και τα επίπεδα mRNA EρhA2 και έχουν βρεθεί υψηλά και άμεσα συνδεδεμένα με πτωχότερη συνολική επιβίωση.^{15,16} Σε αντίθεση με αυτά τα ευρήματα και με τα υψηλά επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης του EρhA2, μια έρευνα διαπίστωσε χαμηλά επίπεδα σε μεταγραφικό επίπεδο σε καρκινικά κύτταρα μαστού σε σχέση με παρακείμενους ιστούς. Αυτή η αντίθεση μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης και του mRNA πιθανόν να οφείλεται στην αυξημένη σταθερότητα της πρωτεΐνης στα καρκινικά κύτταρα.⁵³

Ο ρόλος του EρhA2 στην προαγωγή του καρκίνου μπορεί να αποδοθεί στην δραστηριότητα κινάσης του και στην μεταγωγή σήματος μέσω εμπρόσθιας σηματοδότησης. Στο συμπέρασμα αυτό κατέληξε μια έρευνα στην οποία χρησιμοποιήθηκαν μορφές «ελαττωματικών» υποδοχέων να διερευνηθεί ο ρόλος της δραστηριότητας φωσφορυλίωσης/κινάσης του υποδοχέα EρhA2 στην εξέλιξη του όγκου. Οι μεταλλαγμένοι υποδοχείς είτε δεν είχαν κυτταροπλασματική περιοχή, είτε έφεραν σημειακή μετάλλαξη, με αποτέλεσμα να είναι ανίκανοι να φωσφορυλιωθούν και κατ'επέκταση να μετάγουν σήμα, όπως επιβεβαιώθηκε από τις *in vitro* δοκιμές κινάσης. Στη συνέχεια διεξήχθησαν πειράματα *in vivo* με χρήση συγγενικών ποντικών,

αποκαλύπτοντας ότι οι όγκοι που εξέφραζαν μεταλλαγμένο EprA2 είχαν μικρότερο μέγεθος σε σύγκριση με τους όγκους ελέγχου. Το μειωμένο μέγεθος του όγκου αποδόθηκε σε αύξηση της απόπτωσης, χωρίς να υπάρχει σημαντική διαφορά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι ο αποκλεισμός της εμπρόσθιας σηματοδότησης EprA2 αναστέλλει την εξέλιξη του όγκου προάγοντας την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων.³¹

- *Η ογκογόνος δράση του EprA2 στον καρκίνο του μαστού και η σχέση του με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια.*

Στον καρκίνο του μαστού, κατά κανόνα η εφρίνηA1 ρυθμίζεται προς τα κάτω, ενώ από την άλλη πλευρά, ο EprA2 υπερεκφράζεται σημαντικά. Αυτό το πρότυπο έκφρασης συσχετίζεται με πιο διεισδυτικά και ογκογόνα κύτταρα καρκίνου του μαστού.¹⁰ Η υπερέκφραση αυτή έχει σχετιστεί με την ανάπτυξη, την διήθηση των καρκινικών κυττάρων και την αντίσταση στην ανοικία, μια διαδικασία που συνήθως πυροδοτεί την απόπτωση κατά την κυτταρική αποκόλληση.⁴⁴ Η επαγόμενη από την εφρίνηA1 εμπρόσθια σηματοδότηση του υποδοχέα φαίνεται να μεταδίδει ογκοκατασταλτικό σήμα, πράγμα που φαίνεται από την επίδραση της εφρίνηςA1-Fc, που οδηγεί σε μείωση της φωσφορυλίωσης του Erk, ενός μορίου σηματοδότησης που σχετίζεται με την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό και κρατά τα κύτταρα μη επεμβατικά.⁹² Απουσία της εφρίνης A1 ωστόσο, ο EprA2 παρουσιάζει ligand-ανεξάρτητη δραστηριότητα κινάσης, αντί της ογκοκατασταλτικής λειτουργίας που έχει η αλληλεπίδραση εφρίνηςA1/EprA2, αλληλεπιδρώντας με διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια ,προάγοντας την εξέλιξη του όγκου.⁵¹

Η οδός Ras-Raf-MAPK εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Η ανεξάρτητη από ligand ενεργοποίηση του EprA2 συνδέεται με την οδό Ras-Raf-MAPK και η ενεργοποίησή της συμβάλλει στην αυξημένη κυτταρική ανάπτυξη, διήθηση και μετάσταση. Το μονοπάτι κινάσης PI3/Akt ρυθμίζει διάφορες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής επιβίωσης, ανάπτυξης και μεταβολισμού. Ο EprA2 προάγει τη σηματοδότηση κατόντη μέσω αυτής της οδού, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή της στην ανάπτυξη και την επιβίωση του όγκου.

Τα RSK1/2, μέλη της οικογένειας κινασών RSK, προάγουν τη μετάσταση όγκου μέσω της φωσφορυλίωσης του EphA2 στην Ser-897.⁵¹

Οι υποδοχείς Eph στα καρκινικά κύτταρα είναι συχνά υποφωσφορυλιωμένοι παρά την υπερέκφρασή τους, πιθανώς λόγω αυξημένης δραστηριότητας της φωσφοτυροσινικής φωσφατάσης ή απώλειας E-καντερίνης. Η απώλεια των επαφών κυττάρου-κυττάρου στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να αποτρέψει την αλληλεπίδραση με ενδογενείς ligand εφρίνης, οδηγώντας σε εξασθενημένη ενεργοποίηση των υποδοχέων Eph. Ως εκ τούτου, η ογκογόνος δράση των υποδοχέων Eph φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από τη δέσμευση ligand εφρίνης.⁹² Η απώλεια ή παρουσία της E-καντερίνης, έχει αντίκτυπο στην ενεργοποίηση και λειτουργία του EphA2, καθώς εμπλέκεται στη ρύθμιση του εντοπισμού του. Σε καλοήγη επιθηλιακά κύτταρα, η E-καντερίνη παίζει ρόλο στη διατήρηση του EphA2 στις θέσεις επαφής κυττάρου-κυττάρου. Ωστόσο, σε καρκίνους μαστού, από τους οποίους απουσιάζει η E-καντερίνη, διαταράσσεται ο εντοπισμός του EphA2 από την μεμβράνη του κυττάρου. Είναι ενδιαφέρον ότι σε μεταστατικούς ιστούς όπου αποκαθίσταται η έκφραση της E-καντερίνης, ο EphA2 ενεργοποιείται ξανά. Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν τη δυναμική σχέση μεταξύ της E-καντερίνης και του EphA2 σε διαφορετικά στάδια εξέλιξης του καρκίνου του μαστού.⁴⁹

Η ανεξάρτητη από ligand δράση του EphA2 υπογραμμίζεται και από έναν άλλον μηχανισμό που περιλαμβάνει διέγερση των καρκινικών κυττάρων από τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα EGF και ακολούθως σύνδεση του EphA2 και εφεξίνης, καταλήγοντας στην προαγωγή της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων καθώς σχηματίζονται προεξοχές εμπλουτισμένες με κορτακίνη⁴⁹, μια πρωτεΐνη που παίζει ρόλο στην οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και συμμετέχει σε διαδικασίες όπως η κυτταρική μετανάστευση. Ο EphA2 συμμετέχει στην ρύθμιση αυτού του μονοπατιού που σχετίζονται με την διάταξη του κυτταροσκελετού της ακτίνης, επηρεάζοντας έτσι την κίνηση των κυττάρων και τελικά την μετανάστευσή τους στον καρκίνο του μαστού. Ο EphA2 ενεργοποιεί την εφεξίνη4, ενός παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEF), η οποία ακολούθως ενεργοποιεί την GTPαση RhoG, της οικογένειας Rho. Η ενεργοποίηση του RhoG οδηγεί στη στρατολόγηση των τελεστών του ELMO2 και Dock4,

σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα με το EphA2 στα προπορευόμενα άκρα των μεταναστευτικών κυττάρων καρκίνου του μαστού.^{11,49}

➤ *Συμμετοχή στην αγγειογένεση.*

Βάση μελετών η παρουσία ή η απουσία του EphA2 στο μικροπεριβάλλον του όγκου επιδρά στην ανάπτυξη του, τη μικροαγγειακή πυκνότητα και την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να μεθίστανται. Η εμφύτευση καρκινικών κυττάρων του μαστού στον μαστικό αδένα ποντικών που στερούνται EphA2 έχει ως αποτέλεσμα μείωση του μεγέθους του όγκου, της μικροαγγειακής πυκνότητας και των μεταστάσεων στους πνεύμονες. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η απώλεια EphA2 στο μικροπεριβάλλον του όγκου βλάπτει το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων και περιορίζει την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να εξαπλωθούν. Η αγγειογένεση λοιπόν του όγκου εξαρτάται από την σηματοδότηση του υποδοχέα EphA2 στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα.⁹² Στον αγγειακό λείο μυ, η ενεργοποίηση του EphA2 αναστέλλει την οδό Rac1 GTPαση/PAK, προκαλώντας συστολή των περιαγγειακών υποστηρικτικών κυττάρων και επιτρέποντας στα ενδοθηλιακά κύτταρα να ανταποκρίνονται σε αγγειογενετικά σημάδια. Αντίθετα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η ενεργοποίηση EphA2 διεγείρει την ενεργοποίηση Rac1 GTPαση που εξαρτάται από την PI3K, προάγοντας τη μετανάστευση των κυττάρων και τη συναρμολόγηση αγγείων.^{14,10} Όταν η εφρίνηA1 δεσμεύεται στον EphA2, οδηγεί στη φωσφορυλίωση συγκεκριμένων υπολειμμάτων τυροσίνης στον υποδοχέα EphA2, τα οποία χρησιμεύουν ως θέσεις πρόσδεσης για άλλες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των παραγόντων ανταλλαγής Vav2 και Vav3, καθώς και της ρυθμιστικής υπομονάδας p85 του PI3K. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις και τα γεγονότα φωσφορυλίωσης συμβάλλουν στην ενεργοποίηση του Rac1 και προάγουν τη μετανάστευση, τη συναρμολόγηση και την ενσωμάτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων στα αιμοφόρα αγγεία του όγκου.⁹² Εναλλακτικά, αγγειογόνοι παράγοντες στο μικροπεριβάλλον του όγκου, όπως ο VEGF και ο TNF-α, μπορούν να προκαλέσουν έκφραση της εφρίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα και να οδηγήσουν σε αλληλεπιδράσεις υποδοχέα/εφρίνης μεταξύ γειτονικών ενδοθηλιακών κυττάρων διευκολύνοντας τη βλάστηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, τη μετανάστευση και το σχηματισμό τριχοειδών σωλήνων.¹⁴

➤ *Αγγειογένεση μέσω εξωσωμάτων.*

Τα εξωσώματα προέρχονται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και μπορούν να φέρουν μόρια σηματοδότησης που προάγουν την αγγειογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου. Μια ομάδα ερευνητών διαπίστωσε ότι τα εξωσώματα που παράγονται από καρκινικά κύτταρα του μαστού με υψηλό μεταστατικό δυναμικό ήταν εμπλουτισμένα με EphA2. Αυτά τα εξωσώματα μπορούν να μεταφέρουν τον EphA2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Απώλεια του EphA2 σε καρκινικά κύτταρα με υψηλό μεταστατικό δυναμικό μείωσε την ικανότητα των εξωσωμάτων τους να προάγουν το σχηματισμό ενδοθηλιακών κυτταρικών σωλήνων και την αγγειογένεση. Αντίθετα, η υπερέκφραση του EphA2 στα εξωσώματα ενίσχυσε τις αγγειογενετικές τους επιδράσεις. Επιπλέον, η μελέτη δείχνει ότι απαραίτητη για την αγγειογένεση είναι η δραστηριότητα κινάσης, αφού η αναστολή της σε καρκινικά κύτταρα μαστού οδήγησε σε εξωσώματα ανίκανα να προάγουν το σχηματισμό σωλήνων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η αγγειογένεση προάγεται μέσω εμπρόσθιας σηματοδότησης με ενεργοποίηση της οδού AMPK-HIF1-α. Τέλος, εκτός από την προαγωγή αγγειογένεσης, τα εξωσώματα ενισχύουν τη μετάσταση στους πνεύμονες, όπως αποδεικνύεται από την αυξημένη ένταση φθορισμού και τον αριθμό των μεταστατικών εστιών στους πνεύμονες στο πλαίσιο της μελέτης.⁴⁰

➤ *Κυτταροσκελετική κατάρρευση και διήθηση.*

Στον καρκίνο του μαστού, ο EphA2 παίζει σημαντικό ρόλο και στην διήθηση των καρκινικών κυττάρων, ιδιαίτερα στο διεισδυτικό βασικοειδές καρκίνωμα του μαστού. Ένας σημαντικός μηχανισμός περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση μεταξύ EphA2 και MT1-MMP, με εκτεταμένα στοιχεία να δείχνουν ότι οι περικυτταρικές κολλαγονολυτικές λειτουργίες της MT1-MMP είναι απαραίτητες για την διήθηση στον ιστό και την ανάπτυξη διαφορετικών τύπων κακοήθων κυττάρων. Αντί για την τυπική αλληλεπίδραση με την εφρίνηA1, το MT1-MMP διασπά απευθείας το EphA2 στον τομέα FN-III 1 στα ίδια σύμπλοκα κυτταρικής επιφάνειας, πυροδοτώντας την εσωτερίκευση των συμπλεγμάτων σηματοδότησης των υποδοχέων και οδηγώντας σε αυξημένη ενεργοποίηση του RhoA, με αποτέλεσμα την κυτταρική απώθηση, κυτταροσκελετική κατάρρευση και τη μετάβαση

από τη συλλογική διήθηση στην διήθηση ενός κυττάρου.^{37, 11} Αυτή η διαδικασία διαφέρει από τις εκείνες που προκαλούνται μετά από αλληλεπίδραση με εφρίνη, οι οποίες περιλαμβάνουν πρωτεΐνες ADAM. Η διάσπαση του EphA2 από την MT1-MMP συμβαίνει ανεξάρτητα από τη δραστηριότητα της κινάσης EphA2. Ωστόσο, τόσο οι δραστηριότητες του EphA2 όσο και της κινάσης Src είναι απαραίτητες για την ενδοκυτταρική κίνηση των συμπλοκών σηματοδότησης και την προώθηση της διήθησης ενός κυττάρου.³⁷

➤ *Προγνωστική αξία.*

Η υψηλή έκφραση EphA2 συσχετίζεται με χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης και αυξημένη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την αγγειογένεση. Τα επίπεδα EphA2 είναι αυξημένα σε ιστούς ανθεκτικούς στα φάρμακα και ανοσοϊστοχημική χρώση αποκαλύπτει υψηλότερη έκφραση EphA2 στον μεταστατικό καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με τον μη μεταστατικό, ενώ υψηλότερα είναι και τα επίπεδα εξωσωμάτων EphA2 σε ασθενείς με μετατάσεις⁴⁰, τα οποία εξωσώματα έχουν συσχετιστεί και με την μετάδοση χημειοανθεκτικότητας σε κύτταρα ευαίσθητα στη γεμισιταβίνη στον καρκίνο του μαστού.³⁶ Επιπλέον, σε συγκεκριμένους μοριακούς υποτύπους, όπως το TNBC, η υψηλή έκφραση EphA2 συσχετίστηκε και πάλι με χειρότερη πρόγνωση αναφορικά με την συνολική επιβίωση και επιβίωση χωρίς νόσο.⁵³ Σε άλλη μελέτη υψηλότερα επίπεδα έκφρασης EphA2 παρατηρήθηκαν σε μια υποομάδα ασθενών με συχνότερη υποτροπή της νόσου.⁴² Αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώνουν την κλινική αξία του EphA2 και υποδηλώνουν ότι η έκφρασή του μπορεί να χρησιμεύσει ως προγνωστικός δείκτης στον καρκίνο του μαστού και να παρέχει πληροφορίες για πιθανές θεραπευτικές στρατηγικές που τον στοχεύουν.

➤ *TNBC*

Σε περιπτώσεις τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού (TNBC), ο EphA2 αυξορυθμίζεται.³³ Όπως μάλιστα καταδεικνύει μια μελέτη, ο EphA2 εμφανίζει υψηλή έκφραση στο 50% των περιπτώσεων. Η ίδια μελέτη αποκάλυψε ότι η υψηλή έκφραση EphA2 συσχετίστηκε με την ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων του όγκου (Ki-67), υποδεικνύοντας τον πιθανό ρόλο του EphA2 στην ανάπτυξη του όγκου. Επιπλέον, οι ασθενείς με υπερέκφραση EphA2 εμφάνισαν μικρότερη συνολική επιβίωση και επιβίωση χωρίς νόσο σε σύγκριση με εκείνους με χαμηλή έκφραση. Συμπερασματικά η

υψηλή έκφραση E_{rh}A2 αποτελεί ισχυρό και ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για ασθενείς με TNBC.⁸ Την αυξορύθμιση του E_{rh}A2 στους ιστούς καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με τους παρακαρκινικούς ιστούς συμπεραίνει κι άλλη έρευνα, η οποία ανέλυσε τα πρότυπα έκφρασης του E_{rh}A2 σε διαφορετικούς υποτύπους καρκίνου του μαστού και παρατήρησε ότι ήταν ιδιαίτερα αυξημένα στον TNBC. Αυτό υποδηλώνει ότι ο E_{rh}A2 μπορεί να έχει συγκεκριμένες επιπτώσεις στην εξέλιξη και τη συμπεριφορά ορισμένων υποτύπων καρκίνου του μαστού.⁵³

Η εφρίνηA1 κατόπιν της σύνδεσής της με τον E_{rh}A2 έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη και την διήθηση των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Οδηγεί στη φωσφορυλίωση του E_{rh}A2 στην παραμεμβρανική περιοχή και στην αποφωσφορυλίωση στην S897, η οποία αναστέλλει τη μετανάστευση των κυττάρων. Ωστόσο η έκφραση της εφρίνηςA1 συνήθως χάνεται στον καρκίνο του μαστού, επιτρέποντας στον E_{rh}A2 να λειτουργεί ως προαγωγέας του όγκου, προωθώντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό προάγοντας την αποικοδόμηση του p27KIP1 και απελευθερώνοντας την αναστολή του Cdk2/CycinE1/2. Το E_{rh}A2 αλληλεπιδρά επίσης με την κινάση εστιακής προσκόλλησης (FAK), το SHP-2 και τις πρωτεΐνες προσαρμογής Src, οι οποίες προάγουν την ανάπτυξη και την προσκόλληση των κυττάρων. Η απώλεια της εφρίνηςA1 μπορεί να συμβάλει στην υψηλότερη μεταστατική ικανότητα του TNBC σε σύγκριση με άλλους τύπους καρκίνου του μαστού. Προκλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι εξαναγκασμένη έκφραση της εφρίνηςA1 μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη και τη μετάσταση όγκου σε μοντέλα καρκίνου του μαστού.¹⁰⁴ Εκτός από την αποκατάσταση της σηματοδότησης της εφρίνηςA1, απώλεια της λειτουργίας E_{rh}A2 σε μοντέλα ποντικών TNBC έχει επίσης ως αποτέλεσμα τη μείωση του σχηματισμού και της ανάπτυξης όγκου. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η απουσία του ligand διευκολύνει την ογκογόνο σηματοδότηση από τον E_{rh}A2.⁹⁴ Η φωσφορυλίωση του υποδοχέα E_{rh}A2, δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την εκδήλωση των ογκογόνων του ιδιοτήτων στα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Πειράματα *in vitro* που χρησιμοποιούν κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού υψηλής μεταστατικότητας, έχουν δείξει μειωμένα επίπεδα φωσφορυλίωσης του υποδοχέα E_{rh}A2, ωστόσο αν και παράδοξο, αυτά τα κύτταρα εξακολουθούν να παρουσιάζουν υψηλή δραστηριότητα κινάσης E_{rh}A2. Αυτό υποδηλώνει ότι η φωσφορυλίωση του

υποδοχέα μπορεί να μην είναι απαραίτητη για να προσδώσει δραστηριότητα κινάσης και να προωθήσει την ανάπτυξη του όγκου. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι η διέγερση καρκινικών κυττάρων του μαστού που υπερεκφράζουν EρhA2 με την εφρίνηA1-Fc, αυξάνει τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα. Αυτή η αυξημένη φωσφορυλίωση συνοδεύεται από μείωση της ολικής έκφρασης EρhA2 και μείωση της κακοήθειας των καρκινικών κυττάρων, πιθανόν μέσω της δέσμευσης της c-Cbl, μιας πρωτεΐνης που εμπλέκεται στην αποικοδόμηση των κινασών τυροσίνης υποδοχέα. Αυτό υποδηλώνει ότι η φωσφορυλίωση του υποδοχέα μπορεί να δράσει ως αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης EρhA2 σε ορισμένες περιπτώσεις.⁴⁴

➤ *HER2(+)* καρκίνος μαστού.

Σε ασθενείς με HER2-θετικό καρκίνο του μαστού υψηλότερα επίπεδα EρhA2 επίσης συσχετίζονται με μείωση της συνολικής επιβίωσης και επιβίωσης χωρίς νόσο. Η αυξημένη έκφραση EρhA2 δηλαδή μπορεί να σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση σε αυτόν τον συγκεκριμένο υποτύπο καρκίνου του μαστού.^{10,107}

Σε μια έρευνα φάνηκε πως μειωμένη έκφραση EρhA2 σε κύτταρα όγκου MMTV-Neu, οδηγεί σε εξασθενημένο σχηματισμό όγκου και διεισδυτικότητα. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν μια τεχνική παρεμβολής RNA (RNAi) για να μειώσουν την έκφραση EρhA2 σε εγκατεστημένα κύτταρα όγκου MMTV-Neu και εμφανίστηκαν βραδύτεροι ρυθμοί ανάπτυξης, μειωμένα επίπεδα του p-Erk, ενός ρυθμιστή του πολλαπλασιασμού στο μοντέλο MMTV-Neu και μειωμένη διεισδυτικότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως ποντίκια με έλλειψη EρhA2 εμφάνισαν μείωση της υπερπλασίας του επιθηλίου του μαστού και ανέπτυξαν όγκους με μειωμένη συχνότητα, υποδεικνύοντας ότι ο EρhA2 απαιτείται για την ογκογένεση καρκίνου του μαστού. Επίσης απώλεια του EρhA2 ανέστειλε σημαντικά την πνευμονική μετάσταση. Ο EρhA2 βρέθηκε επιτελεί ρόλους τόσο στα καρκινικά κύτταρα όσο και στο μικροπεριβάλλον του ξενιστή. Η ανεπάρκεια EρhA2 μείωσε τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και επιπλέον η αγγειογένεση του όγκου μειώθηκε σημαντικά όταν τα κύτταρα MMTV-Neu μεταμοσχεύθηκαν σε περιβάλλον ξενιστή με έλλειψη EρhA2. Για τη διερεύνηση των επιδράσεων της υπερέκφρασης EρhA2 σε κύτταρα που υπερεκφράζουν επίσης το ανθρώπινο ErbB2 διεξήχθησαν πειράματα σε

ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα μαστού και φάνηκε πως η υπερέκφραση του EphA2 ενίσχυσε την ανάπτυξη των κυττάρων, αυξήθηκε το μέγεθος των μεμονωμένων αποικιών περαιτέρω και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων ήταν σχεδόν τρεις φορές υψηλότερος σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, όπως υποδεικνύεται από την παρουσία της πυρηνικής πρωτεΐνης Ki67.¹⁷ Η ίδια μελέτη διαπίστωσε ότι ο EphA2 και ο ErbB2 αλληλεπιδρούν φυσικά μεταξύ τους, σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα. Αυτή η αλληλεπίδραση συμβαίνει φυσικά και δεν απαιτεί συγκεκριμένα εξωτερικά σήματα. Όταν συνεκφράζονται ή όταν ο ErbB2 υπερεκφράζεται, ο EphA2 φωσφορυλιώνεται από τη δράση της κινάσης του ErbB2. Η αναστολή της κινάσης του ErbB2 μειώνει τη φωσφορυλίωση τόσο του EphA2 όσο και του ErbB2. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ο EphA2 εμπλέκεται στο μονοπάτι σηματοδότησης του ErbB2 και υποδηλώνουν ότι ο EphA2 παίζει ρόλο στη ρύθμιση των κυτταρικών διεργασιών που προκαλούνται από το ErbB2.¹⁷ Επιπλέον ο EphA2 μπορεί να ενισχύσει την ογκογόνο σηματοδότηση του erbB2 (HER2). Συγκεκριμένα, απώλεια του EphA2 στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού, οδηγεί σε αξιοσημείωτη μείωση στην ανάπτυξη του όγκου και στη μετάσταση, υποδηλώνοντας τη δυνητική σημασία της στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού.⁶ Ο EphA2 αλληλεπιδρά φυσικά και λειτουργικά με τον ErbB2, ενεργοποιώντας μονοπάτια σηματοδότησης που προάγουν τον όγκο, όπως το MAPK και το Rho, ακόμη και απουσία ligands. . Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν έντονα ότι ο EphA2 παίζει έναν ανεξάρτητο από ligand, προ-ογκογονικό ρόλο στον HER2-θετικό καρκίνο.⁹⁴

Ο EphA2 βρέθηκε επίσης ότι προσδίδει αντίσταση στη θεραπεία που στοχεύει τον HER2, σε καρκινικά κύτταρα του μαστού και σε όγκους ξеноμοσχευμάτων, επιβεβαιώνοντας ότι ο EphA2 αλληλεπιδρά με άλλες οδούς σηματοδότησης για να επηρεάσει την ογκογένεση του επιθηλίου του μαστού.¹¹ Φαίνεται πως παίζει ρόλο τόσο στην εγγενή όσο και στην επίκτητη αντίσταση στην τραστουζουμάμπη (Herceptin).¹⁸ Αυτή η αντίσταση αποδίδεται στην ενεργοποίηση της Src και στην επακόλουθη ενίσχυση των οδών σηματοδότησης PI3K/Akt και MAPK. Επομένως, η διερεύνηση παραγόντων στόχευσης EphA2 στον ανθεκτικό στην τραστουζουμάμπη καρκίνο του μαστού θεωρείται λογική προσέγγιση. ^{94,6} Σε μια μελέτη βρέθηκε πως υπερέκφραση του EphA2 ενίσχυσε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προσέφερε αντίσταση στην τραστουζουμάμπη, ενώ η έκφραση μιας

καταλυτικά ανενεργής μορφής EphA2 ή κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού με χαμηλά επίπεδα EphA2 είχαν μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αυξημένη ευαισθησία στην θεραπεία. Ο μηχανισμός με τον οποίο ο EphA2 συμβάλλει στην θεραπευτική αντίσταση περιλαμβάνει τη διατήρηση της σηματοδότησης μέσω PI3K/Akt και MAPK. Η αναστολή του EphA2 μείωσε τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων Akt και Erk σε κύτταρα ανθεκτικά στην τραστουζουμάμπη και διαπιστώθηκε επίσης ότι αναστολείς που στοχεύουν αυτές τις οδούς αποκαθιστούν την ευαισθησία στην τραστουζουμάμπη σε ανθεκτικά κύτταρα. Επιπλέον, διερευνήθηκε η ενεργοποίηση του EphA2 σε κύτταρα ανθεκτικά στην τραστουζουμάμπη και η σχέση της με την κινάση Src. Παρατηρήθηκε ότι η παρατεταμένη θεραπεία με τραστουζουμάμπη αύξησε τη φωσφορυλίωση της κινάσης Src και στη συνέχεια ενεργοποίησε τον EphA2. Η αναστολή της κινάσης Src αποκατέστησε μερικώς την ευαισθησία σε τραστουζουμάμπη των ανθεκτικών κυττάρων, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή της στην αντίσταση στη θεραπεία.¹⁰⁷ Σε μια άλλη μελέτη όπου μελετούνταν η φωσφορυλίωση του EphA2 και άλλων πρωτεϊνών σε απόκριση σε θεραπείες αντι-HER2, παρατηρήθηκε ότι κατά την αναστολή του HER2, υπήρξε αύξηση στη φωσφορυλίωση της τυροσίνης ορισμένων πεπτιδίων. Η αυξημένη φωσφορυλίωση πιθανόν να οφείλεται σε αυξημένη αυτοκαταλυτική δραστηριότητα ή σε αυξορύθμιση της δραστηριότητας κινάσης, υποδεικνύοντας μια προσαρμοστική απόκριση που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ειδικών κινασών, συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων της οικογένειας FAK1, PKCδ και Eph. Προτάθηκε ότι η σηματοδοτική πλαστικότητα των καρκινικών κυττάρων παρέχει τη δυνατότητα προσαρμοστικής απόκρισης κινάσης, που ενεργοποιήθηκε μετά από διαφορετικές θεραπείες που είχαν κοινό στόχο. Η ενεργοποίηση συγκεκριμένων κινασών, συμπεριλαμβανομένης του EphA2, σχετίζεται με την προσαρμοστική απόκριση και μπορεί να συμβάλει στην αντίσταση στα φάρμακα για τον καρκίνο.⁸¹

➤ *ER (+) καρκίνος μαστού.*

Αυξημένη ρύθμιση σε σχέση με υγιείς ιστούς παρατηρείται και σε θετικούς σε υποδοχείς οιστρογόνων καρκίνους του μαστού.³³ Ο EphA2 έχει επίσης εμπλακεί στην ανεξαρτησία από ορμόνες και στην αντίσταση στη θεραπεία με ταμοξιφαίνη. Προκαλεί έναν ανεξάρτητο από οιστρογόνα και ανθεκτικό στην ταμοξιφαίνη φαινότυπο ανάπτυξης σε

κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού που εκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνου.(ER)¹¹ Σε προκλινικά μοντέλα καρκίνου του μαστού ER+, ανθεκτικά στην ταμοξιφαίνη, έχει βρεθεί ότι η διπλή στόχευση του Epha2 και του υποδοχέα ER με χρήση ταμοξιφαίνης αποκαθιστά την ευαισθησία. Αυτό υποδηλώνει ότι ο Epha2 παίζει ρόλο στην αντίσταση στην ταμοξιφαίνη στον θετικό σε ορμονικούς υποδοχείς καρκίνο του μαστού.⁹⁴ Τα επίπεδα έκφρασης του Epha2 σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στη θεραπεία και με την συνολική πρόοδο της νόσου, αφού υψηλά επίπεδα στα καρκινικά κύτταρα του μαστού προάγουν την εξέλιξη του όγκου ενισχύοντας την ανάπτυξη, την διήθηση και την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στη θεραπεία με ταμοξιφαίνη.⁴⁴

6.3.2.Epha4

Η έκφραση του υποδοχέα Epha4 είναι αυξημένη στον καρκίνο του μαστού και αυτή η ανοδική ρύθμιση σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση. Ο Epha4, συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι παίζει ρόλο στην προώθηση του πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και της διήθησης των καρκινικών κυττάρων του μαστού μέσω της οδού σηματοδότησης του αυξητικού παράγοντα TGFβ(transforming growth factor-β).^{2,6} Μια μελέτη αποκάλυψε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της αυξημένης έκφρασης RNA του Epha4 και μειωμένης συνολικής και χωρίς υποτροπές επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Επίσης παρατηρήθηκαν αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα σε διηθητικά πορογενή καρκινώματα μαστού σε σχέση με φυσιολογικούς ιστούς, υπερπλασίες και ινοαδενώματα μέσω ανάλυσης μεγάλων συνόλων δεδομένων μικροσυστοιχιών ιστών. Η έκφραση του Epha4 δεν έχει μελετηθεί όσο επισταμένα όσο άλλοι υποδοχείς Epha στον καρκίνο του μαστού, ωστόσο προτείνεται ότι παίζει ρόλο στην ογκογένεση και την εξέλιξη της νόσου.¹⁵

➤ *Η σχέση του με το μικροπεριβάλλον του όγκου.*

Σε μοντέλα ποντικών, κύτταρα υψηλά σε CD90/Epha4 παρατηρήθηκαν στην περίμετρο των όγκων του μαστού και συσχετίστηκαν με υψηλή πυκνότητα διεισδυτικών μακροφάγων που σχετίζονται με όγκους, TAMs. Τα συγκεκριμένα TAMs ήταν M2 πολωμένα, που ως γνωστών συσχετίζονται με κακή πρόγνωση και καταστέλλουν τις αντικαρκινικές ανοσοαποκρίσεις. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των CD90+ κυττάρων όγκου και των TAM διευκολύνθηκε από την ενεργοποίηση του Epha4 μέσω της σύνδεσης με

εφρίνες τύπου A που εκφράζουν τα TAMs, με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω ενεργοποίησης της κινάσης Src, φωσφορυλάσης Cγ1 και NF-κβ και την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών στο διαμέρισμα καρκινικών βλαστοκυττάρων, CSC (cancer stem cells). Επιπλέον, η έκφραση Epha4 στο TME βρέθηκε να είναι σημαντική για την ανάπτυξη και τη μετάσταση των όγκων του μαστού ποντικών, 4T1. Τα 4T1 κύτταρα παρουσιάζουν σημαντική διήθηση μυελοειδών κυττάρων και παράγουν την κυτοκίνη G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), που διεγείρει τον μυελοπολλαπλασιασμό και οδηγεί σε διήθηση όγκου από MDSCs (myeloid derived suppressor cells) τα οποία προάγουν την ανάπτυξη του όγκου και καταστέλλουν ανοσολογικές αποκρίσεις. Η απουσία του Epha4 στο TME οδήγησε σε καθυστερημένη ανάπτυξη των όγκων, μειώνοντας την παραγωγή της G-CSF και τις επιπτώσεις της. Προτείνεται ότι ο Epha4 ενισχύει την παραγωγή IGF-1 μέσω της ενεργοποίησης του JAK-STAT και τα επίπεδα IGF-1 ήταν χαμηλότερα σε ποντίκια με έλλειψη Epha4. Η χορήγηση IGF-1 ξεπέρασε τα αποτελέσματα της διαγραφής Epha4.⁴⁵

➤ *TNBC*

Σε μια μελέτη σημειώθηκε υπερέκφραση του Epha4 48,1% των περιπτώσεων TNBC που εξετάστηκαν, με αξιοσημείωτη αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης Epha4 σε κυτταρικές σειρές TNBC σε σύγκριση με φυσιολογικά κύτταρα μαστού. Παρατηρήθηκε επίσης μια τάση (αν και στατιστικά ασήμαντη) μεταξύ της υψηλής του έκφρασης και των περιπτώσεων TNBC που συνοδεύονταν από μετάσταση στους λεμφαδένες, ωστόσο δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του και της συνολικής ή χωρίς νόσο επιβίωσης σε ασθενείς με TNBC. Συνολικά, η υπερέκφραση Epha4 μπορεί να σχετίζεται με μετάσταση στους λεμφαδένες στο TNBC, αλλά η σημασία της ως προγνωστικός παράγοντας για την επιβίωση δεν είναι σαφώς τεκμηριωμένη.⁶⁴ Επιπλέον έχει αναφερθεί πως υπερέκφραση του Epha4 προκαλούμενη από TGF-β, προάγει τη μετανάστευση στα κύτταρα MDA-MB-231, ενώ σε κύτταρα MCF-7 (ER+) και BT-474(ER+,PR+,HER2+) ο TGF-β οδηγεί σε μειωμένη έκφραση του Epha4 και δεν έχει καμία επίδραση στην μετανάστευσή τους. Ο Epha4 θα μπορούσε να είναι λοιπόν μια πιθανή στοχευμένη θεραπεία σε TNBC ή BLBC.⁶³

6.3.3.ErhA5

Στον ErhA5 έχει αποδοθεί πιθανή ογκοκατασταλτική λειτουργία, βάση αναλύσεων του προφίλ έκφρασης του mRNA του, που αποκάλυψαν την υπορρύθμιση του στο καρκινικό έναντι του φυσιολογικού επιθηλίου του ανθρώπινου μαστού. Ωστόσο, δεν υπάρχουν πειραματικά στοιχεία που να αποδεικνύουν αυτόν τον ανασταλτικό ρόλο.⁷³ Η υπορρύθμιση αυτή προκαλείται πιθανώς από μη φυσιολογική μεθυλίωση του προαγωγέα/υποκινητή του γονιδίου του.^{18,67,2}

Η μελέτη που έδειξε την σχέση μεταξύ υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου και κλινικοπαθολογικών παραμέτρων στον καρκίνο του μαστού ανέλυσε δείγματα ιστών από όγκους του μαστού και αντίστοιχων φυσιολογικών ιστών και διαπίστωσε ότι η έκφραση ErhA5 ήταν χαμηλότερη στους καρκινικούς ιστούς σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς. Παρατηρήθηκε μια θετική συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης της CpG νήσου και της μεταγραφικής σίγησης του ErhA5 σε σημαντικό ποσοστό καρκινικών δειγμάτων, υποδηλώνοντας ότι είναι ένα κοινό επιγενετικό συμβάν στον καρκίνο του μαστού. Μεταξύ των ευρημάτων αξιοσημείωτη είναι η σχέση της επιγενετικής σίγασης του ErhA5 και του αυξημένου βαθμού κακοήθειας, της ύπαρξης λεμφαδενικών μεταστάσεων και των καρκίνων του μαστού με θετική έκφραση υποδοχέων προγεστερόνης. Παράμετροι όπως η ηλικία κατά την διάγνωση, το στάδιο του όγκου και η θετικότητα σε υποδοχείς ER και HER2 δεν έδειξαν να σχετίζονται με την μεθυλίωση ErhA5. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η μεθυλίωση ErhA5 μπορεί να είναι ένας πιθανός δείκτης για τη διάκριση κακοήθων ιστών του μαστού, την πρόβλεψη της πρόγνωσης και την κατανόηση της ανάπτυξης και εξέλιξης του καρκίνου του μαστού.³⁴

6.3.4.ErhA6

Μια μελέτη με στόχο να διερευνήσει την έκφραση και την κλινική σημασία του ErhA6 στον καρκίνο του μαστού, διαπίστωσε ότι τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του ErhA6 και της πρωτεΐνης ήταν σημαντικά υψηλότερα στους ιστούς του καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με τους γειτονικούς μη καρκινικούς ιστούς. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση αποκάλυψε ότι η έκφραση ErhA6 σχετίζεται θετικά με υψηλότερους ιστολογικούς βαθμούς κακοήθειας και με την υπερέκφραση HER-2, ενώ έχει αρνητική σχέση με

θετικότητα ER και PR. Η έκφραση Erah6 συνδέθηκε επίσης με συγκεκριμένους υποτύπους καρκίνου του μαστού, ιδιαίτερα με τον HER-2 εμπλουτισμένο υποτύπο. Επίσης ασθενείς με υψηλή έκφραση Erah6 είχαν χαμηλότερο συνολικό ποσοστό επιβίωσης σε σύγκριση με εκείνους με χαμηλή έκφραση. Η πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι η έκφραση Erah6, το στάδιο TNM και οι υπότυποι καρκίνου του μαστού ήταν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για τη συνολική επιβίωση. Ο Erah6 λοιπόν μπορεί να χρησιμεύσει ως πιθανός θεραπευτικός στόχος, ειδικά σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού που υπερεκφράζουν τον HER-2 και δεν έχουν υποδοχείς στεροειδών.¹⁰⁵

6.3.5.Erah7

Μια μελέτη αποκάλυψε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της αυξημένης έκφρασης mRNA του Erah7 και της μειωμένης συνολικής επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Η έκφραση της πρωτεΐνης του Erah7, αποκαλύφθηκε με ανάλυση μεγάλων συνόλων δεδομένων μικροσυστοιχιών ιστών, ήταν επίσης αυξημένη σε διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μαστού σε σχέση με τον φυσιολογικό μαστό/υπερπλασίες ή το ινοαδένωμα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο Erah7 είναι ένας κλινικά σημαντικός στόχος παρέμβασης στον καρκίνο του μαστού.¹⁶

6.3.6.Erah10

Η έκφραση του Erah10 έχει συνδεθεί με λεμφαδενικές μεταστάσεις στον καρκίνο του μαστού και παρόλο που είναι ένας υποδοχέας με έλλειψη δραστηριότητας κινάσης θεωρείται ότι αλληλεπιδρά με τον Erah7.^{6,50} Εργαστηριακές μελέτες παρατηρούν ότι ο Erah10 ασκεί αντι-αποπτωτικά αποτελέσματα αναστέλλοντας τον υποδοχέα Erah7, υποστηρίζοντας την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων.⁶⁷ Επίσης συνεντοπίζεται στον κυτταρικό πυρήνα με τον Erah7, οδηγώντας δυνητικά στην ενεργοποίηση γονιδίων που εμπλέκονται στην εξάπλωση του καρκίνου του μαστού.² Συγκεκριμένα, μια μελέτη διερεύνησε την παρουσία και την αλληλεπίδραση των διαφόρων ισομερών των Erah7 και Erah10 σε διάφορες κυτταρικές σειρές που προέρχονται από φυσιολογικό ιστό μαστού, μη διεισδυτικά κύτταρα καρκινώματος, κύτταρα διηθητικού καρκινώματος και τεχνητά τροποποιημένα λιγότερο διηθητικά κύτταρα καρκινώματος μαστού. Πειράματα συν-ανοσοκαθίξεσης επιβεβαίωσαν τη φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ των υποδοχέων

σε όλες τις κυτταρικές σειρές όπου βρέθηκαν να εκφράζονται, αλλά τα αλληλεπιδρώντα ισομερή διέφεραν μεταξύ των κυτταρικών σειρών. Η χρώση με ανοσοφθορισμό αποκάλυψε πως οι υποδοχείς συν-εντοπίζονται σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Στα μη διηθητικά καρκινικά κύτταρα MCF7 και οι δυο υποδοχείς χρωματίστηκαν έντονα, κυρίως στην κυτταρική περιφέρεια, υποδηλώνοντας τον συν-εντοπισμό τους στην κυτταρική μεμβράνη και υποστηρίζοντας κατ' επέκταση τη φυσική τους αλληλεπίδραση όπως αποδεικνύεται από τη συν-ανοσοκαθίζηση. Στα διηθητικά καρκινικά κύτταρα MDA-MB-231-PC ο συν-εντοπισμός των υποδοχέων παρατηρήθηκε στην κυτταρική μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα και σε ορισμένες περιπτώσεις βρέθηκαν και στον πυρήνα, υποδηλώνοντας την πιθανή εμπλοκή τους στη μεταγραφική ρύθμιση. Ωστόσο, υπήρχαν επίσης απομονωμένα στίγματα σε ορισμένα μέρη του κυτταροπλάσματος, υποδεικνύοντας ότι δεν συνεντοπίζονται πάντα. Στα λιγότερο διηθητικά κύτταρα MDA-MB-231-B6 οι υποδοχείς ήταν παρόντες σε χαμηλότερες ποσότητες στη μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα. σε σύγκριση με τα κύτταρα MDA-MB-231-PC. Τα δεδομένα αυτά παρέχουν πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις και τοποθετήσεις των EphA7 και EphA10 στα κύτταρα του μαστού, ενδεχομένως σημαντικές για την κατανόηση του πιθανού ρόλου τους στην διεισδυτική και μεταστατική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων.⁴⁶

➤ *Συσχέτιση με λεμφαδενικές μεταστάσεις.*

Μια μελέτη με στόχο να αναλύσει τη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης EphA10 και των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων στον καρκίνο του μαστού, εστιάζοντας συγκεκριμένα στη μετάσταση στους λεμφαδένες και στην εξέλιξη του σταδίου της νόσου, διαπίστωσε ότι η έκφραση του mRNA του EphA10 αλλά και τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης του, όπως προσδιορίστηκε με χρώση ανοσοϊστοχημείας, σε καρκινικούς ιστούς συσχετίστηκαν θετικά με τη λεμφαδενική μετάσταση. Η στατιστική ανάλυση αποκάλυψε ότι η έκφραση EphA10, τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταφραστικό επίπεδο, ήταν ανεξάρτητη από την ηλικία, το φύλο, την ιστολογική ταξινόμηση και το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου, δείχνοντας ωστόσο, σημαντική συσχέτιση με τη λεμφαδενική μετάσταση και την εξέλιξη σταδίου της νόσου. Η μελέτη υπογραμμίζει τον πιθανό ρόλο του EphA10 στη βιολογική λειτουργία του καρκίνου του μαστού και

υποδηλώνει ότι θα μπορούσε να αποτελέσει στόχο για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων.⁶⁰ Άλλη έρευνα με στόχο να διερευνηθεί τα πρότυπα έκφρασης των ισομερών E_{rh}A10 και τις βιολογικές τους λειτουργίες στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου του μαστού συμπέρανε σε μοντέλο ξενομοσχεύματος πως οι όγκοι που εκφράζουν χαμηλότερα επίπεδα E_{rh}A10 είχαν μεγαλύτερες περιόδους επιβίωσης και μειωμένη μετάσταση στους λεμφαδένες.⁵²

➤ *Σχέση των ισομερών του E_{rh}A10 με τον καρκίνο του μαστού.*

Τα δυο ισομερή προκύπτουν από εναλλακτικό splicing του γονιδίου E_{rh}A10 και το E_{rh}A10s ισομερές περιγράφεται ως εκκρινόμενη πρωτεΐνη με έναν μόνο τομέα του υποδοχέα. Στο πλαίσιο αυτής της μελέτης διαπιστώθηκε με χρώση ανοσοϊστοχημείας ότι η πρωτεΐνη E_{rh}A10 υπερεκφράζεται στο κυτταρόπλασμα των επεμβατικών δειγμάτων σε σύγκριση με τα καλοήγη δείγματα, σε όλους τους υποτύπους καρκίνου του μαστού, ανεξάρτητα από την ορμονική τους κατάσταση. Η υψηλότερη έκφραση του E_{rh}A10 συσχετίστηκε με τη διεύρυνση του μεγέθους του όγκου και την εξέλιξη του σταδίου της νόσου με βάση το σύστημα TNM και οι ασθενείς με υψηλότερη χρώση υποδοχέα E_{rh}A10 είχαν φτωχότερη συνολική και χωρίς νόσο επιβίωση. Αντιθέτως, το E_{rh}A10s ήταν μειωμένο σε επεμβατικά δείγματα και υψηλότερη έκφρασή του συνδέθηκε με καλύτερη συνολική και χωρίς νόσο επιβίωση. Ερευνήθηκαν περαιτέρω οι βιολογικές λειτουργίες των E_{rh}A10s και E_{rh}A10 στον καρκίνο του μαστού και βρέθηκε ότι το E_{rh}A10s αναστέλλει τη μετανάστευση και την διήθηση των κυττάρων και συμβάλλει στην κατανομή και τη σταθερότητα της β-κατενίνης στην κυτταρική μεμβράνη. Η υπερέκφραση E_{rh}A10s οδηγεί σε μείωση της ολικής έκφρασης της β-κατενίνης και της φωσφορυλιωμένης της μορφής στο κυτταρόπλασμα και συσώρευση της στην κυτταρική μεμβράνη. Ωστόσο, απουσία εφρίνηςA5 αναστέλλεται η μείωση της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα, υποδηλώνοντας την σημασία της αλληλεπίδρασης E_{rh}A10s/εφρίνηςA5. Η συσώρευση E_{rh}A10 στο κυτταρόπλασμα σχετίζεται με αυξημένες διηθητικές ικανότητες των κυττάρων, ενώ το knockout E_{rh}A10 έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη διηθητική και μεταναστευτική διάθεση, παράλληλα με μείωση της φωσφορυλίωσης της E-καντερίνης, υποδηλώνοντας λοιπόν την στενή του σχέση με τη φωσφορυλίωση της E-καντερίνης.⁵²

➤ *Συσχέτιση με ανοσολογικές αποκρίσεις.*

Η εξαρτώμενη από την επαφή κυττάρου-κυττάρου έκφραση των Epha2, Epha4 και Epha10 σε κυτταροκαλιέργειες καρκίνου του μαστού σε καλλιέργεια σχετίζεται με αυξημένη έκφραση της PD-L1, μιας ανοσοκατασταλτικής πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με την PD-1 των T-κυττάρων για να αναστέλλει τη φλεγμονώδη αντίδραση και να προάγει την ανοσοδιαφυγή του όγκου. Και οι τρεις υποδοχείς έχει φανεί να υφίστανται φωσφορυλίωση τυροσίνης, συμπεριλαμβανομένου του Epha10, που στερείται δραστηριότητα κινάσης. Αυτό υποδηλώνει πιθανή συσχέτιση με άλλη φωσφοπρωτεΐνη ή διασταυρούμενη ενεργοποίηση από άλλο υποδοχέα Eph. Περαιτέρω πειράματα διαγραφής των Epha2, Epha4 και Epha10 σε καρκινικά κύτταρα του μαστού αποκάλυψαν ότι μόνο ο Epha10 ήταν απαραίτητος για την αυξορύθμιση του PD-L1. Η διαγραφή του Epha10 σε καρκινικά κύτταρα μαστού ποντικού 4T1 είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη ανάπτυξη όγκου, συνοδευόμενη από αυξημένα CD8⁺ T κύτταρα, ενεργοποίηση T-κυττάρων και απόπτωση κυττάρων όγκου. Η αναστολή ανάπτυξης του όγκου εξαρτιόταν συγκεκριμένα από την ανοσοαπόκριση, καθώς δεν παρατηρήθηκε σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια.^{45, 6}

➤ *Συνεργιστική δράση με την πρωτεΐνη Gli3.*

Τα αποτελέσματα μιας μελέτης που αποσκοπούσε να εξετάσει την πιθανή συνεργιστική δράση των Epha10 και Gli3 στην κακοήγη εξέλιξη του καρκίνου του μαστού, έδειξαν ότι τόσο ο Epha10 όσο και ο Gli3 εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό σε διεισδυτικούς ιστούς και διηθητικό καρκίνωμα μαστού και συσχετίζονται με κακή πρόγνωση. Η καταστροφή του Epha10 ή του Gli3 κατέστειλε τον πολλαπλασιασμό, την διήθηση και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και προτείνεται ότι οι Epha10 και Gli3 διαδραματίζουν κρίσιμους ρόλους ως προαγωγείς του όγκου και έχουν πιθανή χρηστική αξία ως στόχοι για την έγκαιρη διάγνωση και πρόληψη καρκίνου του μαστού. Το πιθανό συνεργατικό αποτέλεσμα στην επιθετική φύση της νόσου των δύο μορίων επιβεβαιώνεται απ' το ότι και τα δύο εμφάνισαν υψηλό βαθμό έκφρασης σε επεμβατικούς ιστούς και καρκινικά κύτταρα, οι εκφράσεις τους συσχετίστηκαν θετικά με τη σοβαρότητα του διηθητικού καρκινώματος, όπως υποδεικνύεται από παράγοντες όπως ο ιστολογικός βαθμός, η

μετάσταση στους λεμφαδένες και το προχωρημένο στάδιο TNM και η καταστολή είτε του E_{rh}A10 είτε του Gli3 οδήγησε σε μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, της διήθησης και της μετανάστευσης. Σημειώτέων, ότι όταν καταστάθηκαν ταυτόχρονα, η ανασταλτική επίδραση στις κακοήθεις συμπεριφορές ήταν ακόμη μεγαλύτερη.⁷¹

➤ *TNBC*

Μια μελέτη διαπίστωσε ότι ο E_{rh}A10 εκφράζεται σε διάφορους υποτύπους καρκίνου του μαστού, συμπεριλαμβανομένου του TNBC, αλλά όχι στους περισσότερους φυσιολογικούς ιστούς. Η έκφρασή του είναι ανεξάρτητη της έκφρασης ER,PR και HER-2, αφού αναλύθηκε σε ιστολογικά δείγματα διαφόρων υποτύπων καρκίνου του μαστού και βρέθηκε ότι εκφράζεται ειδικά στα καρκινικά κύτταρα κάθε υποτύπου (luminal A, luminal B, HER2-enriched και TNBC). Αυτό δείχνει ότι το E_{rh}A10 μπορεί να είναι ένας πολλά υποσχόμενος στόχος Έτσι ο E_{rh}A10 μπορεί να αποτελεί έναν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο στον καρκίνο του μαστού, ιδιαίτερα για το TNBC, για το οποίο επί του παρόντος δεν διατίθενται αποτελεσματικά εξειδικευμένα φάρμακα. Η μελέτη διερεύνησε επίσης την επίδραση της σηματοδότησης E_{rh}A10 στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Παρατηρήθηκε ότι η διέγερση με ligands E_{rh}A10 προήγαγε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα καρκινικά κύτταρα καρκίνου του μαστού που εξέφραζαν έκτοπα E_{rh}A10 και σε κύτταρα TNBC που εξέφραζαν φυσικά τον E_{rh}A10. Προκειμένου να αξιολογηθεί περαιτέρω η δυνατότητα στόχευσης E_{rh}A10, αναπτύχθηκε ένα μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-E_{rh}A10, το οποίο δεσμεύτηκε ειδικά σε αυτόν αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όταν συγχορηγήθηκε με ligands υψηλής συγγένειας (εφρίνες A3,A4 και A5) σε κύτταρα TNBC και σε εκείνα που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα. Επιπλέον, διερευνήθηκε ο μοριακός μηχανισμός στον οποίο βασίζεται ο πολλαπλασιασμός που προκαλείται από τον E_{rh}A10 και βρέθηκε ότι ενδέχεται να παίζει ρόλο η φωσφορυλίωση της p38, μιας πρωτεΐνης που εμπλέκεται στην οδό MAPK.⁶¹

6.3.7.E_{rh}B2

Η έκφραση του υποδοχέα E_{rh}B2 στον καρκίνο του μαστού έχει συσχετιστεί με δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες. Η υψηλότερη έκφραση του E_{rh}B2 σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο απομακρυσμένων μεταστάσεων και υποτροπής μετά τη θεραπεία. Ωστόσο, η

συσχέτιση μεταξύ έκφρασης EhbB2 και επιβίωσης διαφέρει ανάλογα με την ληφθείσα θεραπεία. Σε ασθενείς που λαμβάνουν συστηματική θεραπεία, η υψηλότερη έκφραση του EhbB2 συσχετίζεται με καλύτερη επιβίωση, ενώ σε ασθενείς που δεν λαμβάνουν συστηματική θεραπεία, δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση. Η έκφραση του EhbB2 σχετίζεται επίσης με διαφορετικούς υποτύπους καρκίνου του μαστού, υψηλότερα, για παράδειγμα, επίπεδα έκφρασής του σχετίζονται σημαντικά με φτωχή επιβίωση χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις (DMFS) στους υπότυπους luminal A και luminal B, ενώ δεν έχουν παρατηρηθεί αξιοσημείωτες διαφορές στα ποσοστά επιβίωσης στους βασικοειδείς ή θετικούς για HER-2 υποτύπους. Επιπλέον, έχουν εξεταστεί τα επίπεδα έκφρασης των ligands του EhbB2 και η συσχέτισή τους με την επιβίωση των ασθενών. Οι εφρίνες B1 και B2, έδειξαν συσχέτιση μεταξύ αυξημένης έκφρασης και μικρότερου χρόνου DMFS. Η έκφραση εφρίνης B2 επίσης σχετίστηκε με μικρότερο χρόνο επιβίωσης χωρίς υποτροπές (RFS) σε όλους τους υπότυπους εκτός από τον βασικοειδή, ενώ υπερέκφραση της εφρίνης B1 και A5 σχετίστηκε με μεγαλύτερο χρόνο RFS και η αυξημένη παρουσία εφρίνης B1 με αυξημένη συνολική επιβίωση σε ασθενείς με υποτύπο luminal B και καθαρούς λεμφαδένες.³⁰

Ένα πρόσθετο επίπεδο πολυπλοκότητας στην πρόγνωση του ασθενούς εισαγάγει ο κυτταρικός εντοπισμός του EhbB2. Μια μελέτη αποκάλυψε ότι ο EhbB2 υπήρχε τόσο στην κυτταρική μεμβράνη όσο και στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων, όμως ο μεμβρανώδης EhbB2 συσχετίστηκε με καλύτερη πρόγνωση, ενώ ο κυτταροπλασματικός εντοπισμός του συσχετίστηκε με μικρότερη επιβίωση χωρίς νόσο.⁴² Σε μια έρευνα η πρωτεϊνική του έκφραση στα καρκινώματα του μαστού και στα παρακείμενα επιθηλιακά κύτταρα ήταν κυρίως κυτταροπλασματική. Από τους 94 όγκους που αναλύθηκαν, μόνο 1% ήταν αρνητικό, ενώ το 51% έδειξε ισχυρή έκφραση του EhbB2 και η υψηλή έκφρασή του συσχετίστηκε με φτωχή συνολική και χωρίς ασθένεια επιβίωση. Ωστόσο, δεν βρέθηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης EhbB2 και του κλινικού σταδίου ή της ιστολογικής διαφοροποίησης των όγκων. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ο EhbB2 μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκινώματος του μαστού και θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμεύσει ως προγνωστικός δείκτης για τα αποτελέσματα των ασθενών.⁹⁷

Στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, έχει παρατηρηθεί αλληλεπίδραση του Ehb2 με τον TGF-β3, η οποία έχει βρεθεί να σχετίζεται με την επαγωγή της EMT.⁴³ Η έκφραση του Ehb2 ρυθμίζεται από την σηματοδότηση TGF-β, ο οποίος είναι κρίσιμος για τη μετανάστευση και τη διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων του μαστού και μπορεί να ανασταλεί από την πρωτεΐνη p53. Παρόλο που τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του Ehb2 συσχετίζονται με χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, φαίνεται πως ο ρόλος του σε διαφορετικά στάδια των καρκινικών κυττάρων του μαστού είναι ασαφής και αντιφατικός. Μια πιθανή πρόταση είναι ότι ο Ehb2 διεγείρει μια διαδικασία που ονομάζεται αυτοφαγία, η οποία μπορεί να έχει διαφορετικά αποτελέσματα ανάλογα με το πλαίσιο. Σε μη διεισδυτικά κύτταρα η αυτοφαγία προάγει την απόπτωση. Ωστόσο, σε καρκινικά κύτταρα όπου η απόπτωση είναι μπλοκαρισμένη, η επαγόμενη από τον Ehb2 αυτοφαγία μπορεί να έχει έναν ρόλο υπέρ της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων, προάγοντας την διήθηση.^{67,2,55} Στο πλαίσιο μιας μελέτης η υπερέκφραση του Ehb2 προκάλεσε αυτοφαγία σε καρκινικά κύτταρα του μαστού, αυξάνοντας τη μετατροπή του LC3-I σε LC3-II, ενός δείκτη αυτοφαγίας και την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την αυτοφαγία όπως τα ATG5 και ATG12. Παράλληλα ωστόσο, η υπερέκφρασή του προκάλεσε αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο σε καρκινικά κύτταρα μαστού. Η επαγωγή της έκφρασης Ehb2 οδήγησε σε αύξηση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου, όπως αποδεικνύεται από τη χρώση με Annexin V, την ενεργοποίηση κασπασών και τη μειωμένη έκφραση των αντι-αποπτωτικών γονιδίων. Βρέθηκε επιπλέον πως η υπερέκφραση του Ehb2 προωθεί την δυνατότητα διήθησης των καρκινικών αφού η έκφραση των προ-επεμβατικών γονιδίων MMP2 και MMP9 αυξορυθμίστηκε. Ο Ehb2, λοιπόν, παίζει σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του μαστού ρυθμίζοντας την αυτοφαγία, την απόπτωση και κατ' επέκταση την αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων και την διήθηση.²⁴ Τέλος, μελέτες έχουν δείξει ότι εξωσώματα που περιέχουν Ehb2, που υπερεκφράζεται στον καρκίνο του μαστού, μπορούν να διεγείρουν την αντίστροφη σηματοδότηση της εφρίνηςB, προάγοντας την αγγειογένεση του όγκου.³⁶

6.3.8.Ehb4

Έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση του υποδοχέα Ehb4 σε σημαντικό ποσοστό των όγκων του ανθρώπινου μαστού, με έως και 58% των περιπτώσεων να εμφανίζουν αυξημένα

επίπεδα έκφρασης.^{73,51} Μια μελέτη, συγκεκριμένα, παρατήρησε αξιοσημείωτη αρνητική συσχέτιση μεταξύ της αυξημένης έκφρασης του Ehb4 και της συνολικής και χωρίς υποτροπές επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Τα επίπεδα Ehb4 βρέθηκαν να είναι αυξημένα σε δείγματα ανθρώπινου καρκίνου του μαστού, ενώ η αναστολή του αποδεδειγμένα αναστέλλει την επιβίωση του καρκίνου, τη μετανάστευση και την διήθηση *in vitro* και την ανάπτυξη όγκου σε ζωικά μοντέλα, υπογραμμίζοντας τη σημασία του Ehb4 στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού.^{15,16} Τα επίπεδα έκφρασής του βρέθηκαν να είναι υψηλότερα σε μια υποομάδα ασθενών, άλλης έρευνας, με χειρότερη κλινική έκβαση, υποστηρίζοντας περαιτέρω την κλινική σημασία του στον καρκίνο του μαστού.⁴² Σε άλλη έρευνα ο Ehb4 βρέθηκε ότι εκφράζεται τόσο στους καρκινικούς ιστούς όσο και στα παρακείμενα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα του πόρου. Μεταξύ των όγκων που αναλύθηκαν, το μεγαλύτερο ποσοστό εξέφραζε τον υποδοχέα, με το 35% να δείχνει ισχυρή έκφραση. Η έκφραση του υποδοχέα βρέθηκε να αυξάνεται ανάλογα με το κλινικό στάδιο και τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας των καρκινωμάτων. Επιπλέον, η χρώση μεμβράνης Ehb4 βρέθηκε να σχετίζεται θετικά με ανευπλοειδία DNA και αυξημένο κλάσμα φάσης S. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν τον πιθανό ρόλο του Ehb4 στην εξέλιξη του καρκινώματος, ιδιαίτερα σε σχέση με τα χαρακτηριστικά του όγκου.⁹⁷ Ενώ η αυξημένη έκφραση Ehb4 έχει συσχετιστεί με διάφορους κακοήθειες, μια μελέτη ανέφερε μειωμένη έκφραση Ehb4 σε διηθητικό ανθρώπινο καρκίνο του μαστού.¹⁴

Με χρήση πολυκλωνικού αντισώματος και ανοσοιστοχημεία σε κυτταρικές σειρές MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231 και HCC1954, έχει επιβεβαιωθεί η θετικότητα για Ehb4, ανεξάρτητα από την παρουσία Her2. Έτσι, αξίζει να αναφερθεί πως η συστηματικά αυξημένη έκφρασή του, τον καθιστά έναν ελκυστικό δείκτη για την απεικόνιση του καρκίνου του μαστού, ειδικά σε περιπτώσεις που δεν υπερεκφράζουν HER2. Διάφοροι παράγοντες όπως αντισώματα ή πεπτιδία διερευνώνται, τόσο για τη στόχευση υποδοχέων Ehb στα πλαίσια θεραπείας του καρκίνου όπως θα αναφερθεί στη συνέχεια, αλλά και για σκοπούς εικονικής καθοδήγησης. Τα πεπτιδία προσφέρουν πλεονεκτήματα όπως χαμηλή τοξικότητα, αποτελεσματική διείσδυση στους ιστούς και χαμηλό κόστος, ενώ τα αντισώματα παρέχουν υψηλή εξειδίκευση στα κύτταρα του όγκου και μπορούν να τροποποιηθούν για ενισχυμένη ειδικότητα. Μελέτες έχουν οπτικοποιήσει με επιτυχία

όγκους χρησιμοποιώντας αντισώματα αντι-ErhB4 για στοχευμένη απεικόνιση σε μοντέλα ποντικών. Ανιχνευτές υπέρυθρου φθορισμού με αντισώματα ErhB4 έχουν επίσης αναπτυχθεί για στοχευμένη απεικόνιση όγκου. Επιπλέον, διερευνώνται μικρά μόρια για απεικόνιση PET και τα απταμερή RNA που στοχεύουν υποδοχείς Erh έχουν δείξει την δυνατότητά τους για θεραπευτικούς και απεικονιστικούς σκοπούς.²⁵

➤ *Προ-ογκογονικές και αντι-ογκογονικές δράσεις στον καρκίνο του μαστού.*

Οι επιδράσεις του ErhB4 στον καρκίνο του μαστού μπορεί να είναι τόσο προ-ογκογονικές όσο και αντι-ογκογονικές. Οι αντι-ογκογονικές επιδράσεις του ErhB4 και της σύνδεσής του με την εφρίνηB2 μεσολαβούνται από την ενεργοποίηση της οδού Abl-Crk και τη μείωση της ρύθμισης της πρωτεΐνης MMP-2.^{50,51,58,6,49,22} Η διέγερση του ErhB4 από την εφρίνηB2 και η ενεργοποίησή της οδηγεί στην αναστολή της βιωσιμότητας των κυττάρων, του πολλαπλασιασμού, της κινητικότητας και της διήθησης τους. Τα εν λόγω ευρήματα υποδηλώνουν ότι η οδός εφρίνηςB2/ErhB4 παίζει κατασταλτικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού.⁴⁹ Σε σύμπτωση με αυτό το δεδομένο, η υψηλή έκφραση της εφρίνηςB2 σε όγκους του μαστού συσχετίζεται με όγκους χαμηλότερου βαθμού κακοήθειας και καλύτερη πρόγνωση των ασθενών. Επιπλέον η έκφρασή της *in vitro* αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση.⁶ Σε πειράματα που περιλάμβαναν τη χρήση διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν διαφορετικές μορφές της εφρίνηςB2 και του ογκογονιδίου NeuT για να αξιολογηθεί το ογκογόνο τους δυναμικό, διαπιστώθηκε ότι η υπερέκφραση της μεταλλαγμένης μορφής της εφρίνηςB2 είχε ως αποτέλεσμα ταχεία ανάπτυξη όγκου και υψηλό μεταστατικό δυναμικό, παρόμοια με τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης ErhB4. Αντίθετα, η έκφραση της φυσικής μορφής της εφρίνηςB2 είχε ελάχιστες επιδράσεις στην λανθάνουσα κατάσταση του όγκου και στη διεισδυτικότητα. Η μελέτη υπογραμμίζει τη σημασία της αντίστροφης σηματοδότησης της ErhB4/εφρίνηςB2 στον έλεγχο της εξέλιξης του όγκου, καθώς η καταστολή αυτής της οδού σηματοδότησης ευνόησε την ανάπτυξη του όγκου.³⁹

Από την άλλη, ο ErhB4 λειτουργεί προαγωγικά στον καρκίνο του μαστού μέσω ligand ανεξάρτητης φωσφορυλίωσης, που σημαίνει ότι η ενεργοποίησή του μπορεί να συμβεί χωρίς την παρουσία του φυσιολογικού εταίρου σηματοδότησης του, της εφρίνηςB2.^{50,51}

Υπάρχουν ουσιαστικά στοιχεία που υποστηρίζουν τον EphB4 ως ογκογονίδιο προάγοντας τον όγκο. Υπερεκφράζεται στην πλειονότητα των κυτταρικών σειρών του καρκίνου του μαστού και η σίγασή του με χρήση siRNA αυξάνει την ευαισθησία στον παράγοντα TRAIL (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand)⁶ μειώνει τον πολλαπλασιασμό και αυξάνει την απόπτωση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*,⁷³ αναστέλλοντας έτσι την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, τη μετανάστευση, την διήθηση και την ανάπτυξη του όγκου.²² Αντίθετα η εφρίνηB2, ανιχνεύεται ελάχιστα ή καθόλου. Η αποκατάσταση της επαγόμενης από ligand ενεργοποίησης του υποδοχέα με ανασυνδυασμένη εφρίνηB2 έχει ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση στην κυτταρική επιβίωση. Έτσι φαίνεται πως η ligand-ανεξάρτητη σηματοδότησης του EphB4, σε συνδυασμό με την απώλεια της αντίστροφης σηματοδότησης της εφρίνηςB2, διευκολύνει την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού.^{11,18} Επιπλέον πειράματα που διεξήχθησαν σε διαγονιδιακά ποντίκια, που εξέφραζαν μια μεταλλαγμένη μορφή της εφρίνηςB2 στον μαστικό αδένα, έδειξαν ότι η μεταλλαγμένη μορφή διέκοψε την ανάπτυξη και συσχετίστηκε με αυξημένο σχηματισμό πρωτοπαθούς όγκου και μετάσταση στους πνεύμονες ή στο ήπαρ. Αντίθετα, η έκφραση της πλήρους μήκους εφρίνηςB2 δεν άλλαξε σημαντικά την λανθάνουσα κατάσταση του όγκου και προκάλεσε μόνο μέτρια μετάσταση στους πνεύμονες.¹¹

➤ Συμμετοχή στην αγγειογένεση.

Ο EphB4 και η εφρίνηB2 παίζουν ρόλο στην αγγειογένεση του όγκου. Εκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα εξασφαλίζοντας την επικοινωνία μεταξύ αρτηριακού και φλεβικού ενδοθηλίου και σε μη-ενδοθηλιακά κύτταρα, καθοδηγώντας τα ενδοθηλιακά και επίσης εμπλέκονται στην χωρική ενεργοποίηση εσωτερίκευσης του VEGF και στη νεοαγγείωση, η οποία είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του όγκου, την παροχή θρεπτικών ουσιών και τη μεταστατική εξάπλωση.⁷³

Η ισορροπία μεταξύ αντίστροφης και εμπρόσθιας σηματοδότησης του EphB4 και της εφρίνηςB2 είναι ζωτικής σημασίας για τη ρύθμιση της αγγειογένεσης και της μετάστασης στον μαστικό αδένα. Απουσία της εφρίνηςB2 παρατηρούνται αγγειακά ελαττώματα και ανώμαλη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων στον καρκίνο του μαστού που

μπορούν να συμβάλουν στην εξέλιξή του. Μελέτες έχουν δείξει ότι υψηλά επίπεδα εφρίνηςB2 σχετίζονται με αυξημένη αγγείωση, ωστόσο τα αγγεία αυτά παρότι υπεράριθμα, διατηρούν την οργάνωσή τους. Αντίθετα, σε μοντέλα ποντικών που υπερεκφράζουν μεταλλαγμένη μορφή της εφρίνηςB2 παρατηρήθηκαν ανωμαλίες στην αγγείωση, καθώς και μεταστατικός φαινότυπος. Η λειτουργία του Ehb4 επίσης επηρεάζει την αγγειογένεση του όγκου, καθώς όγκοι στους οποίους απουσίαζε η περιοχή κινάσης του Ehb4 είχαν μεγαλύτερου μεγέθους αιμοφόρα αγγεία και περιεκτικότητα αίματος, πράγμα που πιθανόν να σχετίζεται με το ότι η εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα έχει χημειοτακτικές ιδιότητες και διεγείρει την διήθηση, επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων.⁴⁹ Επιπλέον διαλυτή μορφή του Ehb4 μπορεί να διαταράσσει την αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων του όγκου που εκφράζουν τον υποδοχέα και του θετικού ενδοθηλίου στην εφρίνηB2 αναστέλλοντας την αγγειογένεση του όγκου. Η ιδέα αυτή υποστηρίζεται από μελέτες όπου υπερεκφράστηκε ένας υποδοχέας Ehb4, που στερείται της εξωκυττάριας περιοχής, διατηρώντας όμως το ενδοκυτταρικό τμήμα. Η υπερέκφρασή του είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη ανάπτυξη και αγγείωση σε όγκους του μαστού, που πιθανόν να οφείλεται στην ενεργοποίηση της αντίστροφης σηματοδότησης που προκαλείται από την εφρίνη B2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα του ξενιστή.⁹²

➤ *Συμμετοχή στα βλαστοκύτταρα του μαστού.*

Ο Ehb4 και η εφρίνηB2 πιθανόν να εμπλέκονται στην οριοθέτηση, τη συντήρηση και τη διαφοροποίηση των μαστικών βλαστικών κυττάρων. Διαφορές στην έκφραση Ehb4 και εφρίνης θα μπορούσε δυνητικά να ευνοήσει την απελευθέρωση, τη μετανάστευση και την διασπορά των αρχικών μεταλλαγμένων βλαστοκυττάρων, τα οποία εμπλέκονται στον σχηματισμό ογκογενών καρκινικών κυττάρων.³ Για παράδειγμα η έκτοπη έκφραση του Ehb4 στον μαστικό αδένα, διαταράσσει την κανονική διαδικασία ενέλιξης του μαστικού αδένα μετά τη γαλουχία. Αυτή η διαταραχή μπορεί να οδηγήσει στην ενίσχυση των βλαστικών κυττάρων του καρκίνου του μαστού, τα οποία είναι κύτταρα με την ικανότητα να ξεκινούν και να διατηρούν όγκους¹⁸, τη μειωμένη λανθάνουσα κατάσταση του όγκου και την παρουσία μεταστάσεων στους πνεύμονες.¹¹ Η απορυθμισμένη έκφραση της

εφρίνηςB2 παρεμβαίνει επίσης στη ρύθμιση της θέσης των βλαστοκυττάρων και οδηγεί σε μετατόπιση της οδού διαφοροποίησής τους.⁴⁹

➤ *Συμμετοχή στην διατάραξη του κυτταροσκελετού.*

Η εφρίνηB2 πιθανόν να ασκεί επιτηρητική λειτουργία, ελέγχοντας τις αποκρίσεις στην ενεργοποίηση του EphB4. Η απορυθμισμένη σηματοδότηση EphB4/εφρίνηςB2 μπορεί να επηρεάσει τις διαδικασίες προσκόλλησης κυττάρου και πολικότητας που προκαλούνται από την E-καντερίνη, αφού υπερέκφραση του EphB4 ή μεταλλαγμένης εφρίνηςB2 οδηγεί σε καθοδική ρύθμιση και κυτταροπλασματικό εντοπισμό της E-καντερίνης, προάγοντας δυνητικά την κινητικότητα και την διεισδυτικότητα των κυττάρων, τα οποία είναι χαρακτηριστικά των επιθετικών καρκινικών κυττάρων.⁷³ Μεταλλάξεις στην κυτταροπλασματική περιοχή της εφρίνηςB2 οδήγησαν σε μειωμένη έκφραση της E-καντερίνης και αυξημένη πυρηνική β-κατενίνη σε όγκους που προέρχονται από το επιθήλιο του μαστού.¹¹

➤ *HER2(+),ER(+) και TNBC*

Η υπερέκφραση μόνο του EphB4 σε ορισμένα διαγονιδιακά ποντίκια δεν οδήγησε σε όγκους του μαστού. Ωστόσο, όταν αυτά τα ποντίκια διασταυρώθηκαν με διαγονιδιακά ποντίκια MMTV-c-erbB2, υπήρξε μείωση στον λανθάνοντα χρόνο του όγκου και αυξημένη ανάπτυξη μεταστάσεων στους πνεύμονες στα διπλά διαγονιδιακά ζώα σε σύγκριση με τα μεμονωμένα διαγονιδιακά ποντίκια c-erbB2. Αυτό υποδηλώνει ότι η μη προγραμματισμένη έκφραση του EphB4 μπορεί να συμβάλει στην καθιέρωση ενός επιθετικού φαινοτύπου όγκου.³ και ότι δρα συνεργατικά με τον HER2(neu)⁵⁸ Η υπερέκφραση του EphB4 ενισχύει τη δράση ογκογονιδίων, όπως το HER2 (neu), κατά την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού και απώλεια ή η αναστολή του EphB4 αποδείχθηκε ότι μειώνει την επιβίωση, τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, τη μετανάστευση, την διήθηση, το μέγεθος του όγκου και την αγγείωση στα καρκινικά κύτταρα του μαστού.^{11,18} Ο υποδοχέας EphB4 επίσης αναφέρεται ως μία από τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με την προσαρμοστική ανθεκτικότητα στο πλαίσιο των θεραπειών anti-HER2. Η φωσφορυλίωση του πεπτιδίου p-Tyr του EphB4 δείχνει μια θετική τάση αύξησης μετά από μη αποπτωτικές θεραπείες, όπως χορήγηση ARRY (αναστολέας HER2) και τραστουζουμάμπη, γεγονός

που υποδηλώνει την ενεργοποίησή του ως απόκριση σε αυτές τις θεραπείες.⁸¹ Σε μια μελέτη διερευνήθηκε ο ρόλος του Ehb4 στην αντοχή στα φάρμακα στον HER2 θετικό καρκίνο του μαστού. Διαπιστώθηκε ότι η έκφραση Ehb4 είναι ιδιαίτερα αυξημένη ιδιαίτερα στον βασικοειδή και εμπλουτισμένο με HER2 υποτύπου, ενώ υψηλότερα επίπεδα Ehb4 σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση και προαγωγή του πολλαπλασιασμού και της ανάπτυξης των HER2 θετικών καρκινικών κυττάρων του μαστού. Η ενεργοποίηση του Ehb4 συμβάλλει στην αντίσταση έναντι του Lapatinib, ενός αναστολέα HER2/EGFR, ενώ η καταστολή του Ehb4 αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων στη θεραπεία. Αυτός ο μηχανισμός αντίστασης περιλαμβάνει την μέσω Ehb4 ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης SHP2/GAB1-MEK/ERK. Οι SHP2 και GAB1 είναι πρωτεΐνες που, όταν ενεργοποιούνται από τον Ehb4, οδηγούν στην ενεργοποίηση της οδού MEK/ERK, που τελικά οδηγεί την ανάπτυξη και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Η αναστολή της οδού MEK/ERK ενίσχυσε την αποτελεσματικότητα του Lapatinib σε κύτταρα που υπερεκφράζουν τον Ehb4. Ομοίως η αναστολή των SHP2 ή GAB1 αποκατέστησε την ευαισθησία στο Lapatinib. Κατά την διεξαγωγή πειραμάτων προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση της συνδυαστικής ή μεμονωμένης αναστολής των υποδοχέων Ehb4 και HER2, συμπεράθηκε πως ο ταυτόχρονος αποκλεισμός του HER2 και του Ehb4 έχει ισχυρό θεραπευτικό αποτέλεσμα, καταστέλλοντας τη δραστηριότητα της οδού ERK1/2 και μειώνοντας τα επίπεδα πρωτεΐνης c-MYC, αναστέλλοντας τελικά την ανάπτυξη του όγκου και προάγοντας τον κυτταρικό θάνατο. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα αυτό εμφυτεύοντας κύτταρα όγκου από την κυτταρική σειρά HCC1954 TetO-Ehb4 shRNA σε ποντίκια και χορηγώντας τους φάρμακα. Η σειρά HCC1954 TetO-Ehb4 shRNA είναι μια τροποποιημένη κυτταρική σειρά που μπορούσε να ελεγχθεί χρησιμοποιώντας δοξυκυκλίνη για τη ρύθμιση της έκφρασης του Ehb4, χρησιμοποιώντας έναν γενετικό διακόπτη που ονομάζεται TetO. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συνδυαστική θεραπεία της δοξυκυκλίνης και της λαπατινίμπης ανέστειλε σημαντικά την ανάπτυξη του όγκου, οδηγώντας σε σημαντική μείωση στα φωσφορυλιωμένα σήματα ERK1/2, μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης c-MYC και τελικά απόπτωση των κυττάρων, σε σύγκριση με μονομερείς θεραπείες, οι οποίες είχαν μόνο μέτρια επίδραση στη μείωση του φωσφορυλιωμένου ERK1/2. Αυτά τα

ευρήματα υπογραμμίζουν τη σημασία του Ehb4 ως δυνητικού θεραπευτικού στόχου για την καταπολέμηση της αντοχής στα φάρμακα στον HER2 θετικό καρκίνο του μαστού.²⁹

Ο Ehb4 παίζει ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα οιστρογόνου άλφα (ER-a) και της μεταγραφικής δραστηριότητας στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, όπως αποδεικνύει μια μελέτη. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν siRNA για να αποσιωπήσουν τον Ehb4 σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και εξέτασαν τις επιπτώσεις της σίγασής του στη δραστηριότητα και την έκφραση του ER-a. Ανέλυσαν επίσης τις καταστάσεις φωσφορυλίωσης των Akt και ERK1/2, κατόντη τελεστών του Ehb4, για να κατανοήσουν τους πιθανούς μηχανισμούς σηματοδότησης που εμπλέκονται. Η αποσιώπηση του Ehb4 είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη έκφραση του γονιδίου ER-a pS2 και οδήγησε σε μείωση των επιπέδων πρωτεΐνης ER-a στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού MCF-7, BT-474 και T-47D. Οι ερευνητές παρατήρησαν σημαντική μείωση στην έκφραση του mRNA του ER-a μετά τη σίγαση του Ehb4, υποδηλώνοντας ότι ο Ehb4 ρυθμίζει την έκφραση ER-a σε μεταγραφικό επίπεδο. Επιπλέον, βρήκαν μια μείωση στο επίπεδο φωσφορυλίωσης του Akt, υποδεικνύοντας μια πιθανή εμπλοκή της οδού PI3K/Akt στο μονοπάτι σηματοδότησης Ehb4-ER-a. Η μελέτη παρέχει πολύτιμες γνώσεις σχετικά με τη σχέση μεταξύ Ehb4 και ER-a και υπογραμμίζει τη σημασία του Ehb4 ως πιθανό θεραπευτικό στόχο στον ER-a θετικό καρκίνο του μαστού. (MCF-7: ER+,PR+,T-47D: ER+,PR+, BT-474: HER2+)⁸⁰

Η παρατεταμένη ενεργοποίηση του Ehb4 από εφρίνηB2-Fc αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη σε κυτταρικές σειρές MDA-MB-231, υποδεικνύοντας την κατασταλτική δράση της σηματοδότησης της εφρίνηςB2/Ehb4 και στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού.⁶³

6.3.9.Ehb6

Η έκφραση του Ehb6 είναι παρούσα σε φυσιολογικούς μαστικούς αδένες και σε μη επεμβατικές κυτταρικές σειρές όγκου μαστού, αλλά ρυθμίζεται προς τα κάτω ή απουσιάζει σε κυτταρικές σειρές διηθητικού μεταστατικού καρκίνου του μαστού.⁵⁰ Στον διηθητικό και μεταστατικό καρκίνο του μαστού, υπορρυθμίζεται ή απουσιάζει εντελώς επίπεδο λόγω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου Ehb6. Κατά συνέπεια, ο Ehb6 φαίνεται

να παίζει σημαντικό ρόλο στην καταστολή της ανάπτυξης του διηθητικού και μεταστατικού καρκίνου^{73,51} και έχει προταθεί ως βιοδείκτης για την ανίχνευση και τη διάγνωση του καρκίνου του μαστού.²

Παρόλο που ο Ehb6 έχει θεωρηθεί ως ογκοκατασταλτικό σε μοντέλα κυτταρικής σειράς, έχει επίσης συσχετιστεί με μειωμένη επιβίωση σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού.⁵⁰ Σε ανάλυσή της έκφρασης mRNA σε σύνολα δεδομένων ασθενών αποκαλύφθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ αυξημένου Ehb6 και φτωχότερης συνολικής και χωρίς υποτροπές επιβίωσης στον καρκίνο του μαστού.^{15,18,42} Αυτή η διχογνωμία ίσως σχετίζεται με την ligand-ανεξάρτητη και ligand-εξαρτημένη σηματοδότηση αλλά σημαίνει και ότι τα μοντέλα κυτταρικών σειρών πρέπει να επιλέγονται προσεκτικά και να χρησιμοποιούνται πολλαπλές κυτταρικές σειρές έτσι ώστε να αποδίδουν με ακρίβεια τις τάσεις στην ανθρώπινη ασθένεια.¹⁸

➤ *Σηματοδοτικές οδοί.*

Ο Ehb6 διακρίνεται από την στέρηση δραστηριότητας κινάσης^{89,73,50}, λόγω έξι τροποποιήσεων αμινοξέων στην περιοχή κινάσης του.⁷³ Λόγω της έλλειψης καταλυτικής του δραστηριότητας, η φωσφορυλίωσή του παρέχεται εξωγενώς, είτε από άλλους υποδοχείς Ehb , είτε από πρωτεΐνες της οικογένειας Src σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. Στα κύτταρα MDA-MB-231, η αλληλεπίδραση μεταξύ Ehb6 και c-Cbl βρέθηκε ότι εξαρτάται από τη διέγερση της εφρίνηςB2⁸⁹ με την οποία παρουσιάζει υψηλή συγγένεια δέσμευσης.⁷³ Όταν καρκινικά κύτταρα μαστού που εκφράζουν τον Ehb6 διεγερθούν με την εφρίνηB2, ο Ehb6 σχηματίζει ετεροδιμερή με τον Ehb4, με αποτέλεσμα την τρανσφωσφορυλίωσή του⁷³ και την ενίσχυση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Abl, μιας πρωτεΐνης που παίζει ρόλο στις κυτταροσκελετικές αναδιατάξεις, την κυτταρική προσκόλληση και την επεμβατικότητα και δεσμεύεται στην πρωτεΐνη c-Cbl, η οποία είναι μια πρωτεΐνη προσαρμογής, που συνδέει τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας με τις πρωτεΐνες σηματοδότησης μέσα στο κύτταρο.⁸⁹ Η μεταγωγή σήματος μέσω του σχηματισμού ετεροδιμερών με άλλους υποδοχείς μπορεί να επιτευχθεί και με τον υποδοχέα Ehb1 και πρόσφατα στοιχεία δείχνουν πως γίνεται και με τον EhbA2, επιδεικνύοντας μια αλληλεπίδραση μεταξύ των υποδοχέων τύπου A και τύπου B, η οποία

ήταν προηγουμένως άγνωστη.^{73,50} Μάλιστα, ο EphB6 έχει βρεθεί ότι παρεμβαίνει στην σηματοδότηση του EphA2, ενισχύοντας την απόπτωση στα κύτταρα MCF-7(ER+,PR+)¹ εξουδετερώνοντας την αντίσταση στην ανοικεία και αποτρέποντας τη φωσφορυλίωση της S897, ένα κρίσιμο συμβάν για την ligand-ανεξάρτητη ογκογόνο σηματοδότηση που μεσολαβείται από τον EphA2.⁴ Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της c-Cbl στην σηματοδότηση EphB6 η έκφραση της c-Cbl αποσιωπήθηκε με shRNA (short hairpin RNA) και βρέθηκε πως υπήρχε ανικανότητα φωσφορυλίωσης της Abl από τον EphB6 κατόπιν της δέσμευσης του με την εφρίνηB2. Επίσης μια μεταλλαγμένη μορφή του EphB6 δεν κατάφερε να αλληλεπιδράσει με την c-Cbl, ούτε να δώσει το έναυσμα για την φωσφορυλίωση της Abl. Αυτό επιβεβαιώνει ότι η φωσφορυλίωση του EphB6 που προκαλείται από τον EphB4 είναι κρίσιμη για την αλληλεπίδρασή του με την c-Cbl και την επακόλουθη ενεργοποίηση της Abl. Η αποσιώπηση της c-Cbl ανέστειλε την κυτταρική προσκόλληση και την εξάπλωση των κυττάρων που απαιτούν πολυμερισμό ακτίνης.⁸⁹ Η φυσιολογική έκφραση του EphB6 λοιπόν, μεσολαβεί στην συγκολλητική δύναμη των καρκινικών κυττάρων του μαστού φωσφορυλιώνοντας το c-Cbl, το οποίο ενεργοποιεί το Abl, ένα βασικό μόριο για τη σταθερότητα του κυτταροσκελετού,⁶⁷ προάγοντας τελικά την πρόσφυση έναντι της κινητικότητας.⁷³

Επίσης ο EphB6 διευκολύνει την προσκόλληση καρκινικών κυττάρων στην φιμπρονεκτίνη της εξωκυττάριας ουσίας ακόμα και απουσία εφρίνηςB2. Στις προσκολλητικές του ιδιότητες πιθανόν να δρα συνεργατικά και με άλλους υποδοχείς όπως τον EphB4, αφού όταν υπερεκφράστηκε στα κύτταρα ευνοήθηκε η προσκόλλησή τους. Ο Ephb4 βρέθηκε να είναι απαραίτητος για την φωσφορυλίωση του EphB6 σε απόκριση του ligand του, καθώς όταν ο EphB4 αναστάληκε από το PP2 (έναν αναστολέα Src κινάσης) καταστάληκε η φωσφορυλίωση του EphB6. Ο EphB6 βρέθηκε επίσης να παίζει ρόλο στην πρόκληση μορφολογικών αλλαγών στα καρκινικά κύτταρα του μαστού μέσω αναδιατάξεων του κυτταροσκελετού της ακτίνης.⁸⁹

Ο EphB6 φαίνεται επίσης να έχει επίδραση στον καρκίνο του μαστού ρυθμίζοντας την έκφραση συγκεκριμένων miRNAs. Η επιμόλυνση καρκινικών κυττάρων του μαστού MDA-MB-231 με EphB6 έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε αλλαγές στα προφίλ miRNA αυτών των κυττάρων. Τα επιμολυσμένα με EphB6 κύτταρα εμφάνισαν αλλοιωμένα πρωτεομικά

προφίλ και φαινοτυπικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένης της μειωμένης διεισδυτικότητας και της μειωμένης ικανότητας σχηματισμού εστιών σε μαλακό άγαρ. Κάποια miRNA ρυθμίστηκαν προς τα πάνω και άλλα προς τα κάτω σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. Μεταξύ των ανοδικά ρυθμιζόμενων miRNAs ήταν τα miR-100, miR-23a, miR-16 και miR-24, τα οποία επικυρώθηκαν χρησιμοποιώντας qPCR σε πραγματικό χρόνο και mRNA-στόχοι αυτών αποτελούν τα SMARCC1, eIF2C4, eIF4EBP2, FKBP5, FKBP1A, TRIB1, TRIB3, BMPR2 και BMPR1A, που βρέθηκαν να ρυθμίζονται προς τα κάτω σε επιμολυσμένα με Ehb6 κύτταρα. Αυτά τα στοχευόμενα mRNA σχετίζονται με διάφορες διαδικασίες και έχουν εμπλακεί σε ανθρώπινους καρκίνους.¹² Οι παρατηρούμενες αλλαγές στα προφίλ miRNA και η μείωση της ρύθμισης των mRNA-στόχων που σχετίζονται με διαδικασίες που σχετίζονται με τον καρκίνο υποδηλώνουν ότι το Ehb6 μπορεί να έχει κατασταλτική επίδραση στον καρκίνο του μαστού.

➤ *TNBC*

Η έκφραση του Ehb6 μειώνεται σε όγκους καρκίνου του μαστού, αλλά διατηρείται καλύτερα στο TNBC σε σύγκριση με άλλους υποτύπους. Τα κύτταρα TNBC που έχουν υποστεί EMT και έχουν χάσει την έκφραση του Ehb6 παρουσιάζουν αυξημένη κινητικότητα και μειωμένες επαφές κυττάρου-κυττάρου, ωστόσο αποκατάσταση της έκφρασής του σε κύτταρα TNBC καταστέλλει την κινητικότητά τους και προάγει τον σχηματισμό συμπαγών αποικιών με στενές επαφές κυττάρου-κυττάρου. Ο Ehb6 επιδεικνύει ενεργό ρόλο στην καταστολή του EMT, όπως αποδεικνύεται από την ικανότητά του να αλλάζει τη μορφολογία των κυττάρων TNBC και να μειώνει την πυρηνική παρουσία της β-κατενίνης. Ο Ehb6 μειώνει επίσης την έκφραση της βιμεντίνης, ενός δείκτη EMT και της N-καντερίνης στα κύτταρα TNBC, ωστόσο, δεν επηρεάζει την έκφραση του επιθηλιακού δείκτη E-καντερίνη. Ο Ehb6 έχει αποδειχθεί επίσης ότι αυξάνει τη δραστηριότητα έναρξης όγκου στα κύτταρα TNBC. Ενισχύει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στις σφαίρες όγκων, οι οποίες σχηματίζονται κυρίως από κύτταρα που εκκινούν όγκους (TICs: tumor inducing cells), επιταχύνοντας την επέκταση των κυττάρων και ενισχύοντας την έκφραση του EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) και του μεταγραφικού παράγοντα OCT4 (octamer-binding transcription factor), που σχετίζονται με τη δραστηριότητα TIC. Η σίγαση του OCT4 μειώνει σημαντικά την επέκταση των

κυττάρων των ογκοσφαιριδίων και η σίγαση του EhbB6 σε κύτταρα TNBC μειώνει την έναρξη του όγκου, την ανάπτυξή του και τη συχνότητα TIC σε ποντίκια. Η κυτταροπλασματική οδός σηματοδότησης του EhbB6 με σκοπό τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε ογκοσφαιρίδια περιλαμβάνει την αλληλεπίδρασή του με την πρωτεΐνη προσαρμογέα GRB2 και την ενεργοποίηση της οδού RAS-RAF-MEK-ERK, οδηγώντας σε φωσφορυλίωση ERK. Η σηματοδότηση ERK ενισχύει την έκφραση του OCT4 και προάγει την πολυδυναμικότητα στα ανθρώπινα κύτταρα. Η αναστολή της ενεργοποίησης ERK με αναστολείς MEK ή η σίγαση του ERK2 αναιρεί τις πολλαπλασιαστικές αποκρίσεις και την έκφραση OCT4 που προκαλείται από τον EhbB6. Ο EhbB6 παίζει επίσης ρόλο στη μείωση της αντίστασης των όγκων TNBC στα αντικαρκινικά φάρμακα. Η θεραπεία όγκων που εκφράζουν EhbB6 με δοξορουβικίνη, που χρησιμοποιείται στη θεραπεία με TNBC, οδηγεί σε ισχυρή αναστολή του όγκου, αντίθετα η σίγαση του EhbB6 ενισχύει την αντίσταση των όγκων TNBC στη δοξορουβικίνη.⁸⁸ Τέλος, ο υποδοχέας EPHB6 ενισχύει τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από τον DR5 (Death receptor 5) σε κύτταρα TNBC. Ο EhbB6 ενεργοποιεί μια GTPάση που ονομάζεται DRP1(Dynamin-1), η οποία είναι υπεύθυνη για τον κατακερματισμό των μιτοχονδρίων. Λόγω του κατακερματισμού των μιτοχονδρίων αυξάνεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species) και μειώνεται το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Τα αποτελέσματα αυτά μαζί με τον EhbB6, ενισχύουν την αποτελεσματικότητα του DR5 (Death receptor 5), ενός υποδοχέα που εμπλέκεται στον κυτταρικό θάνατο οδηγώντας στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3. Η ενεργοποίηση της DRP1 και ο κατακερματισμός των μιτοχονδρίων εξαρτώνται από την ενεργοποίηση του ERK2, καθώς οι κινάσες ERK φωσφορυλιώνουν την σερίνη 616 της DRP1. Συνοπτικά, αυτή η μελέτη καταδεικνύει ότι ο EhbB6 ενισχύει την απόπτωση με τη μεσολάβηση DR5 σε κύτταρα TNBC ενεργοποιώντας το μονοπάτι σηματοδότησης ERK2-DRP1, με αποτέλεσμα τον μιτοχονδριακό κατακερματισμό. Αυτός ο νέος μηχανισμός παρέχει πληροφορίες για τη ρύθμιση των αποπτωτικών οδών και τις πιθανές επιπτώσεις για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων καθώς μειωμένη έκφραση του EhbB6 στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να συμβάλει στην επιβίωσή τους προστατεύοντάς τα από την ανοσολογική εξάλειψη που προκαλείται από την ενεργοποίηση του DR5.¹¹⁹

6.3.10.Εφρίνη B1

Έχει εξεταστεί και η έκφραση της εφρίνης B1 σε ιστούς καρκίνου του μαστού, αποκαλύπτοντας ότι ανιχνεύεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και όχι στην κυτταρική μεμβράνη. Είναι ενδιαφέρον ότι τα υψηλά επίπεδα εφρίνης B1 συνδέονται με τη μετάσταση στους λεμφαδένες και την έκφραση του υποδοχέα HER-2, υποδεικνύοντας τη δυνητική σημασία της στην εξάπλωση και την πρόγνωση του καρκίνου. Επιπλέον, η υπερέκφραση εφρίνης B1 παρατηρείται συχνότερα σε τριπλά αρνητικούς καρκίνους του μαστού. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η εφρίνης B1 μπορεί να διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στη μετάσταση και την πρόγνωση του καρκίνου του μαστού, πιθανώς μέσω αλληλεπιδράσεων με το HER-2 και άλλα μονοπάτια σηματοδότησης, τονίζοντας την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών δράσης της.⁹⁸

7. Στόχευση των υποδοχέων εφρινών στον καρκίνο του μαστού.

7.1. Αντισώματα.

7.1.1.EphA2

Μια προσέγγιση για τη στόχευση των υποδοχέων EphA2 περιλαμβάνει τη χρήση ενός μονοκλωνικού αντισώματος mAb (Monoclonal antibody) που ενεργοποιεί τον EphA2. Παραδόξως, αυτό το αντίσωμα προάγει την εσωτερίκευση των υποδοχέων EphA2 και την επακόλουθη αποδόμησή τους, οδηγώντας στην αναστολή της κακοήθους κυτταρικής συμπεριφοράς. Κατά την δοκιμή του σε ζωντανούς οργανισμούς, σε μοντέλο ξενομοσχεύματος, το αντίσωμα αναστέλλει αποτελεσματικά την ανάπτυξη του όγκου.⁴⁴

Το DS-8895a είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που ενισχύει την εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταροτοξικότητα, ADCC (Antibody dependent cell cytotoxicity) και αναστέλλει την ανάπτυξη όγκου σε μοντέλα ποντικών με ξενομοσχεύματα καρκίνου του μαστού θετικά στον EphA2.¹⁰⁴ Το DS-8895a αρχικά προήλθε από ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού και τροποποιήθηκε περαιτέρω προκειμένου να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητά του. Το αντίσωμα μπορεί να συνδεθεί τόσο στον πλήρους μήκους υποδοχέα όσο και σε διασπασμένες μορφές EphA2. Σε εργαστηριακές μελέτες, το DS-8895a έδειξε μερική αναστολή της ενεργοποίησης του EphA2 σε καρκινικά κύτταρα του μαστού και ανασταλτικές επιδράσεις στην ανάπτυξη του όγκου σε ποντίκια που εμφυτεύτηκαν με

κύτταρα θετικά στον EphA2.⁵⁶ Για να βελτιωθεί η δραστηριότητά του, το DS-8895a εξανθρωπίστηκε και απο-φουκοζυλιώθηκε, γεγονός που ενισχύει την ικανότητά του να επάγει ADCC, έναν μηχανισμό με τον οποίο τα ανοσοκύτταρα σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα. Αυτό το τροποποιημένο αντίσωμα έχει δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε προκλινικές μελέτες.^{56,9}

7.1.2.EphA10

Σε μια μελέτη εφαρμόστηκε η τεχνολογία της «πρωτεομικής αντισωμάτων» η οποία συνδυάζει μια βιβλιοθήκη αντισωμάτων φάγων και την ανάλυση μικροσυστοιχιών ιστών, με σκοπό την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών και στοχευμένων φαρμάκων. Συγκρίνοντας τα προφίλ έκφρασης πρωτεϊνών των καρκινικών κυττάρων του μαστού και των φυσιολογικών κυττάρων, εντόπισαν διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες και απομόνωσαν επιτυχώς μονοκλωνικά αντισώματα εναντίον τους.⁶² Αξιολογώντας τον EphA10 ως πιθανό στόχο φαρμάκου, διαπιστώθηκε ότι εκφράζεται και στους τέσσερις υποτύπους καρκίνου του μαστού, ενώ παράλληλα παρουσιάζει ειδικότητα έκφρασης σε πρωτεϊνικό επίπεδο, καθώς διαπίστωσαν ότι στους φυσιολογικούς ιστούς εκφράζεται μόνο στους όρχεις και σε κανέναν άλλον από τους ιστούς που εξετάστηκαν. Αυτή η ειδικότητα επιβεβαιώθηκε περαιτέρω σε επίπεδο mRNA χρησιμοποιώντας qRT-PCR. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ο EphA10 είναι ένα εξαιρετικά ειδικό αντιγόνο όγκου και θα μπορούσε να είναι ένας πολλά υποσχόμενος θεραπευτικός στόχος για τον καρκίνο του μαστού, ιδιαίτερα στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, ο οποίος επί του παρόντος δεν διαθέτει αποτελεσματικά μοριακά στοχευμένα φάρμακα. Στο πλαίσιο της μελέτης αναπτύχθηκε ένα μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-EphA10 (mAb) και μελετήθηκαν η κατανομή και τα αντικαρκινικά αποτελέσματά του σε ένα μοντέλο ποντικού με όγκους που εκφράζουν EphA10. Βρέθηκε, με χρήση *in vivo* απεικόνισης, ότι ο φθορισμός από το αντι-EphA10 mAb συγκεντρώνεται στους καρκινικούς ιστούς των ποντικών που έλαβαν θεραπεία με το αντι-EphA10 mAb, αλλά όχι σε αυτούς που έλαβαν το mAb ελέγχου. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η ανάπτυξη του όγκου καταστέλλεται σημαντικά και δόσοεξαρτώμενα στα ποντίκια που έλαβαν αντι-EphA10 mAb σε σύγκριση με τα ποντίκια ελέγχου. Σημειώνεται πως η χορήγηση του mAb δεν προκάλεσε σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες ή απώλεια σωματικού βάρους. Συνολικά, τα

αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι ο EphA10 είναι ένας δυνητικά πολλά υποσχόμενος θεραπευτικός στόχος για τη θεραπεία των καρκίνων του μαστού, ειδικά του τριπλά αρνητικού.^{62,61}

Τα ευρήματα άλλης μελέτης παρέχουν πολύτιμη υποστήριξη για την ενίσχυση της αντινεοπλασματικής ανοσίας στον TNBC στοχεύοντας τον EphA10 χρησιμοποιώντας θεραπευτικά mAbs. Οι ερευνητές σε αυτή τη μελέτη δημιούργησαν και επικύρωσαν mAbs που στοχεύουν το EphA10 χρησιμοποιώντας τεχνολογία υβριδώματος. Ανοσοποίησαν ποντίκια με την εξωκυτταρική περιοχή του ανθρώπινου EphA10 και έλαβαν τρεις υποψήφιους κλώνους (#4, #8 και #9) με υψηλή αντιγονική ειδικότητα και σταθερότητα δέσμησης για τον EphA10. Σε *in vivo* πειράματα ποντικίων με όγκους που εκφράζουν huEphA10 (human), η θεραπεία με τον αντι-EphA10 κλώνο #4 είχε ως αποτέλεσμα σημαντική και δοσοεξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης του όγκου σε σύγκριση με τη θεραπεία ελέγχου με IgG. Επιπλέον αυξήθηκε η διήθηση και η δραστηριότητα των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων (CTL) στον όγκο, υποδεικνύοντας ενισχυμένη αντικαρκινική ανοσία. Επιπρόσθετα, η μελέτη εξέτασε τις ιδιότητες εσωτερίκευσης των αντισωμάτων προκειμένου να εντοπιστεί κάποιο υποψήφιο για σύζευξη με κυτταροτοξικά φάρμακα. Ο κλώνος #9 φάνηκε να είναι ο βέλτιστος υποψήφιος, ο οποίος έδειξε δοσοεξαρτώμενη εσωτερίκευση, μέσω της ενδοκυττάρωσης σε κύτταρα που εκφράζουν τον EphA10. Η υπολογιστική μοντελοποίηση προέβλεψε την περιοχή στην οποία εντοπίζεται ο επίτοπος που αναγνωρίζεται από τον κλώνο #9 στο αντιγόνο EphA10, παρέχοντας πληροφορίες για το σχεδιασμό θεραπευτικών παραγόντων με βάση τη δομή.²¹

Μια ακόμη προσέγγιση είναι η δημιουργία ενός διειδικού αντισώματος, BsAb (Bispecific antibody) συνδυάζοντας δύο διαφορετικά θραύσματα scFv που προέρχονται από αντισώματα αντι-EphA10 και αντι-CD3. Οι συγκεκριμένοι ερευνητές στόχευσαν να αναπτύξουν ένα διειδικό αντίσωμα ικανό να συνδέεται ταυτόχρονα με τον EphA10 και την CD3, μια πρωτεΐνη που εκφράζεται στα Τ-κύτταρα. Το διάσωμα αποτελεί παράγωγο αντισώματος που εκφράζεται σε *Escherichia coli*, από το οποίο παραλαμβάνεται και έπειτα καθαρίζεται. Απομονώθηκαν δυο διαμορφώσεις, ένα μονομερές και ένα ετεροδιμερές, όπου μεταξύ των δύο, η δεσμευτική δραστηριότητα του ετεροδιμερούς ήταν

ισχυρότερη, όπως αποκαλύφθηκε με την χρήση κυτταρομετρίας ροής. Για την αξιολόγηση της κυτταροτοξικής τους δράσης, τα διασώματα και ένα αντι-ErhA10 scFv mAb προστέθηκαν σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων του μαστού MDA-MB-435 και μη-διεγερμένων περιφερικών μονοπύρηνων αιμοποιητικών κυττάρων, PBMC (Peripheral blood mononuclear cells) που λειτούργησαν ως τελεστικά κύτταρα. Τα διασώματα είχαν μια δοσοεξαρτώμενη επίδραση στην ικανότητα θανάτωσης των καρκινικών κυττάρων από τα T-κύτταρα σε σύγκριση με το αντι-ErhA10 scFv mAb και επιπλέον το ετεροδιμερές εμφάνισε μεγαλύτερη κυτταροτοξική αποτελεσματικότητα από το μονομερές σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Η μελέτη προτείνει ότι τα διασώματα που αναγνωρίζουν τόσο ErhA10 όσο και CD3 έχουν πιθανές εφαρμογές στη θεραπεία του καρκίνου, ιδιαίτερα για καρκίνους του μαστού που εκφράζουν ErhA10, συμπεριλαμβανομένου του TNBC.⁴⁸

Στην ίδια λογική, σε μια άλλη έρευνα κατασκευάστηκε ένα BsAb που στοχεύει τα ErhA10 και CD3 και αποδείχθηκε ότι στοχεύει αποτελεσματικά τα θετικά σε ErhA10 καρκινικά κύτταρα, επιδεικνύοντας αντικαρκινική δράση με τη μεσολάβηση των T-κυττάρων. Τόσο η μονομερής όσο και η ετεροδιμερής μορφή του BsAb (ErhA10/CD3) έδειξαν ειδική δέσμευση στα αντιγόνα ErhA10 και CD3, υποδεικνύοντας ότι η δραστηριότητα σύνδεσης κάθε περιοχής διατηρήθηκε μετά τη μετατροπή διπλής ειδικής μορφής. Και οι δύο μορφές έδειξαν ισχυρή και ειδική κυτταροτοξικότητα έναντι καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν ErhA10, με εκείνη της ετεροδιμερούς μορφής να είναι υψηλότερη, ειδικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις αντισωμάτων και χαμηλές αναλογίες PBMC τελεστών προς κύτταρα στόχους. Η διέγερση από το BsAb ενίσχυσε την παραγωγή Th1 κυτοκινών (IFN- γ , IL-2 και TNF- α) από τα PBMC κατόπιν αλληλεπίδρασης με κύτταρα που εκφράζουν τα αντιγόνα ErhA10 και CD3, με το ετεροδιμερές BsAb να οδηγεί σε ενισχυμένη παραγωγή IL-2 σε σύγκριση με το μονομερές BsAb και αντισώματα ελέγχου. Τέλος, σε μοντέλο ξενομοσχεύματος ποντικού, το ετεροδιμερές BsAb (ErhA10/CD3) ανέστειλε αποτελεσματικά και δοσοεξαρτώμενα την ανάπτυξη όγκων του μαστού που εκφράζουν ErhA10. Η μελέτη υποδηλώνει ότι το διμερές BsAb (ErhA10/CD3) υπόσχεται ως δυνητικός θεραπευτικός παράγοντας για τον θετικό στον ErhA10 καρκίνο του μαστού. Απαιτείται ωστόσο, περαιτέρω βελτιστοποίηση του σχεδιασμού και της αξιολόγησης του φαρμάκου σε κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους.⁸⁵

7.2. Ανοσοθεραπεία.

7.2.1.ErhA2

Τα πεπτίδια που προέρχονται από τον ErhA2 εκτός από τη λειτουργία τους ως άμεσοι θεραπευτικοί στόχοι, έχουν δείξει πολλά υποσχόμενα στην ανοσοθεραπεία για τη θεραπεία του καρκίνου. Τέτοια πεπτίδια έχουν χρησιμοποιηθεί σε ένα εμβόλιο που βασίζεται σε δενδριτικά κύτταρα για το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα και τον καρκίνο του παχέος εντέρου, αναστέλλοντας την ανάπτυξη όγκων που εκφράζουν ErhA2. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα πεπτίδια που προέρχονται από ErhA2 μπορούν να προκαλέσουν ειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις CD8⁺ και CD4⁺ T-κυττάρων, σε ασθενείς με νεφρικό καρκίνωμα. Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι τα CD8⁺ T κύτταρα εμφανίζουν ισχυρότερη αντιδραστικότητα στα πεπτίδια ErhA2 σε αναρρωμένους ασθενείς σε σύγκριση με εκείνους με ενεργή νόσο, υποδηλώνοντας ότι το ανοσοποιητικό σύστημα των καρκινοπαθών αναγνωρίζει ενεργά και στοχεύει επιτόπους που προέρχονται από τον ErhA2. Επιπλέον, η διέγερση PBMCs από ασθενείς με γλοίωμα και υγιείς δότες με δενδριτικά κύτταρα φορτωμένα με πεπτίδια ErhA2 πυροδότησε μια αντιγονοειδική κυτταροτοξική απόκριση T-κυττάρων. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι οι επιτόποι που προέρχονται από ErhA2 υπόσχονται ως πιθανά υποψήφια εμβόλια για κακοήθεις καρκίνους και δικαιολογούν περαιτέρω έρευνα σε κλινικές δοκιμές.⁹²

7.2.2.ErhA10

Μια αναδυόμενη και αποτελεσματική ανοσοθεραπεία, είναι η θεραπεία με βάση τα χιμαιρικά αντιγονικά κύτταρα υποδοχέα T, CAR-T (Chimeric antigen receptor T-cell) καθώς αντλεί την ειδικότητά της από το μεταβλητό θραύσμα μονής αλυσίδας των αντισωμάτων, svFv (single chain variable fragment). Λαμβάνοντας υπόψη την εξειδικευμένη έκφραση του ErhA10 στον καρκίνο, τα αντι-ErhA10 mAbs υποθετικά θα μπορούσαν να εφαρμοστούν στην ανάπτυξη ειδικής για τον ErhA10 θεραπείας CAR-T. Σε μια έρευνα κλωνοποιήθηκε την ανθρώπινη αλληλουχία scFv από ένα αντίσωμα αντι-ErhA10 και δημιουργήθηκαν κύτταρα CAR-T. Πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι τα κύτταρα ErhA10-CAR-T αναγνώρισαν ειδικά και ενεργοποιήθηκαν κατά την αλληλεπίδραση με καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν ErhA10. Η κυτταροτοξικότητα των κυττάρων ErhA10-

CAR-T έναντι των θετικών σε EphA10 κυττάρων καρκίνου του μαστού καταδείχθηκε, υποδεικνύοντας τη δυνατότητά τους να αναστέλλουν την ανάπτυξη του όγκου. Πειράματα *in vivo* χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο ποντικού επιβεβαίωσαν περαιτέρω την αντικαρκινική δράση των EphA10-CAR-T κυττάρων, δείχνοντας μειωμένη ανάπτυξη όγκου και εκτεταμένη διήθηση των EphA10-CAR-T κυττάρων σε όγκους ξενομοσχευμάτων.²¹

7.3. Σύζευξη πεπτιδίων, αντισωμάτων ή εφρινών με κυτταροτοξικούς παράγοντες.

7.3.1.EphA2

Το πρόβλημα των τοξικών παρενεργειών που προκαλούνται από τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, γέννησε την ανάγκη για στοχευμένα συστήματα χορήγησης φαρμάκων που μπορούν επιλεκτικά να φτάσουν στα καρκινικά κύτταρα, ελαχιστοποιώντας παράλληλα τη βλάβη στους υγιείς ιστούς. Στρατηγικές ενεργού στόχευσης, που περιλαμβάνουν τη χρήση συνδετών όπως αντισώματα ή πεπτίδια σε νανοφορείς, έχουν αναδειχθεί ως μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη βελτίωση της αναγνώρισης των κυττάρων-στόχων και την ενίσχυση της παροχής φαρμάκων μέσα στα κύτταρα. Ένα πεπτίδιο που ονομάζεται YSA, προσδιορίζεται ως μιμητικός πεπτιδικός συνδέτης με υψηλή συγγένεια για τον EphA2, ο οποίος υπερεκφράζεται συχνά σε επιθετικές μορφές καρκίνου του μαστού και ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη χορήγηση φαρμάκων σε καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζουν EphA2. Σε μια μελέτη, οι ερευνητές κατασκεύασαν τροποποιημένα λιποσώματα με το πεπτίδιο YSA (YSA-LP) ως στοχευμένο νανοφορέα για τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του μαστού όπου υπερεκφράζεται ο EphA2. Η μελέτη περιελάμβανε τη χρήση ενδοθηλιακών κυττάρων ανθρώπινης ομφαλικής φλέβας, HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) ως μοντέλο για τη νεοαγγείωση του όγκου και των κυττάρων MDA-MB-231 ως μοντέλου για μεταστατικά κύτταρα καρκίνου του μαστού. Τα λιποσώματα YSA-LP κατασκευάστηκαν με επιτυχία και παρουσίασαν επιθυμητά χαρακτηριστικά όπως μικρό μέγεθος, καλή σταθερότητα και υψηλή απόδοση ενθυλάκωσης για έναν φθορίζοντα ανιχνευτή ή του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου δοξορουβικίνη, DOX. Πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι το YSA-LP εμφάνισε ενισχυμένη στοχευμένη παροχή στα κύτταρα όγκου που υπερεκφράζουν τον EphA2 (MDA-MB-231) και στα αγγειογενή ενδοθηλιακά κύτταρα

όγκου (HUVEC) σε σύγκριση με μη στοχευμένα λιποσώματα (LP). Η κυτταρική πρόσληψη του YSA-LP προκλήθηκε από ενδοκυττάρωση με τη μεσολάβηση του υποδοχέα EphA2 και το YSA-LP έδειξε επίσης αυξημένη κυτταροτοξικότητα έναντι των καρκινικών κυττάρων και των αγγειογενετικών ενδοθηλιακών κυττάρων σε σύγκριση με την ελεύθερη δοξορουβικίνη (DOX) και την ενθυλακωμένη με LP DOX. Πειράματα *in vivo* χρησιμοποιώντας ποντίκια που έφεραν όγκους MDA-MB-231 έδειξαν ότι το YSA-LP συσσωρεύτηκε στον καρκινικό ιστό σε μεγαλύτερο βαθμό από το LP και ανέστειλε σημαντικά την ανάπτυξη του όγκου, τη μετάστασή του, ενίσχυσε την απόπτωση και ανέστειλε τη νεοαγγείωση μειώνοντας την έκφραση του CD31. Επιπλέον, το YSA-LP εμφάνισε χαμηλή συστηματική τοξικότητα και καρδιακή βλάβη σε σύγκριση με το ελεύθερο DOX και το ενθυλακωμένο με LP DOX. Συνολικά, το YSA-LP έδειξε πολλά υποσχόμενες δυνατότητες ως σύστημα χορήγησης φαρμάκων για στοχευμένη θεραπεία σε μεταστατικό καρκίνο του μαστού και νεοαγγείωση όγκου.³⁸

Σε άλλη μελέτη, οι ερευνητές στόχευσαν να αναπτύξουν πιο ισχυρά και σταθερά αγωνιστικά πεπτιδία που στοχεύουν τον υποδοχέα EphA2. Ένα πεπτιδίο που ονομάζεται 123B9, αποτελεί βελτιωμένη εκδοχή του YSA και έδειξε βελτιωμένη σταθερότητα και μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής σε σύγκριση με προηγούμενα πεπτιδία. Η διμερής μορφή του πεπτιδίου, (123B9)₂ έδειξε ενεργοποίηση σε όλες τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν, ακόμη και σε πολύ χαμηλές της τάξης των 10 nM, παρουσιάζοντας ενεργοποίησης υποδοχέα παρόμοια με την εφρίνηA1-Fc. Για να αξιολογήσουν το θεραπευτικό δυναμικό του διμερούς πεπτιδίου, το συνέδεσαν με ένα χημειοθεραπευτικό φάρμακο που ονομάζεται πακλιταξέλη (PTX) για να δημιουργήσουν το (123B9)₂-L2-PTX και διερεύνησαν τις επιδράσεις στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, CTCs (Circulating tumor cells) σε δύο διαφορετικά μοντέλα καρκίνου του μαστού. Στο πρώτο μοντέλο, ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του μαστού εισήχθησαν σε ποντίκια και τα ποντίκια υποβλήθηκαν σε θεραπεία είτε με το χημειοθεραπευτικό φάρμακο Abraxane είτε με το (123B9)₂-L2-PTX και διαπιστώθηκε ότι η θεραπεία με (123B9)₂-L2-PTX οδήγησε σε μειωμένη συμμετοχή των λεμφαδένων, μείωση των CTCs και εκ νέου ανάπτυξη του πρωτοπαθούς όγκου σε σύγκριση με τη θεραπεία με Abraxane. Στο δεύτερο μοντέλο, χρησιμοποιήθηκε μια κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού ποντικού και τα ποντίκια

υποβλήθηκαν σε θεραπεία με (123B9)2-L2-PTX. Οι ερευνητές παρατήρησαν σημαντική μείωση της μετάστασης στους πνεύμονες σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και με εκείνα που έλαβαν θεραπεία με Abraxane. Οι μικροσκοπικοί πνευμονικοί όζοι μειώθηκαν επίσης και τα αιμοφόρα αγγεία στους μεταστατικούς όγκους έδειξαν έντονη μείωση στην έκφραση του CD31.⁷⁹

Έχει επίσης αξιολογηθεί η ικανότητα σύνδεσης και η κυτταροτοξικότητα μιας ανοσοτοξίνης που ονομάζεται PE38KDEL-1F12 σε καρκινικά κύτταρα του μαστού που εκφράζουν τον υποδοχέα EphA2. Το PE38KDEL-1F12, αποτελείται από ένα μεταβλητό θραύσμα μονής αλυσίδας (scFv) που στοχεύει τον EphA2 και την τοξίνη PE38KDEL, επίσης γνωστή ως PE (Pseudomonas Exotoxin), μιας βακτηριακής τοξίνης που προέρχεται από την Pseudomonas aeruginosa, που απενεργοποιεί το ριβόσωμα αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση στα κύτταρα. Η ικανότητα σύνδεσης της ανοσοτοξίνης αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας ELISA και κυτταρομετρία ροής, με τα αποτελέσματα να δείχνουν σημαντική δέσμευση της ανοσοτοξίνης στον υποδοχέα EphA2 στην κυτταρική σειρά MDA-MB-231 του καρκίνου του μαστού. Η κυτταροτοξικότητα εξετάστηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία MTT και βρέθηκε ότι η ανοσοτοξίνη σκότωσε αποτελεσματικά και δόσοεξαρτώμενα τα κύτταρα MDA-MB-23, με συνεστιακή μικροσκοπία φάνηκε πως επιτεύχθηκε ταχεία εσωτερίκευση της ανοσοτοξίνης και συμπληρωματικά, η χρώση με αννεξίνη-v/PI επιβεβαίωσε περαιτέρω την επαγωγή απόπτωσης. Στον αντίποδα, η ανοσοτοξίνη έδειξε μικρή δέσμευση και επαγωγή απόπτωσης στην κυτταρική σειρά MCF-7 και στα φυσιολογικά κύτταρα, υποδεικνύοντας την ειδικότητά της για τα καρκινικά κύτταρα του μαστού που υπερεκφράζουν EphA2. Από τα αποτελέσματα αυτά η ανοσοτοξίνη καθίσταται ένα πολλά υποσχόμενο υποψήφιο φάρμακο για περαιτέρω *in vivo* μελέτες.⁷⁵

Σε άλλη μελέτη απομονώθηκε ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού, το F2-27 και δείχθηκε ότι αναγνωρίζει ειδικά τον EphA2. Η ανάλυση κυτταρομετρίας ροής επιβεβαίωσε την έκφραση του EphA2 σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού. Το F2-27 βρέθηκε ότι ενισχύει την αποτελεσματικότητα γονιδιακής μεταγωγής που προκαλείται από έναν ανασυνδυασμένο φορέα αδενοϊού που φέρει ένα γονίδιο αναφοράς σε κυτταρικές σειρές που εκφράζουν

EphA2 σε σύγκριση με τα αντισώματα ελέγχου ή τον φορέα μόνο. Επιπλέον, το F2-27 μέσω μικροσκοπίας φθορισμού, βρέθηκε να παρουσιάζει υψηλή δραστηριότητα εσωτερίκευσης εντός των κυττάρων, υποδεικνύοντας τις δυνατότητές του για αποτελεσματικές θεραπευτικές στρατηγικές που βασίζονται στην εσωτερίκευση. Η μελέτη έδειξε επίσης ότι η παροχή του γονιδίου HSV-TK/GCV μέσω του ανασυνδυασμένου αδενοϊού με τη μεσολάβηση του F2-27 είχε ως αποτέλεσμα αύξηση της ευαισθησίας των καρκινικών κυττάρων στο φάρμακο γκανσικλοβίρη διευκολύνοντας την κυτταροτοξικότητα του έναντι των καρκινικών κυττάρων, με σημαντικά χαμηλότερες τιμές IC50 σε σύγκριση με το αντίσωμα ελέγχου. Επιπλέον, η αναστολή του EphA2 χρησιμοποιώντας shRNA ή θεραπεία με εφρίνηA1 ή F2-27 κατέστειλε σημαντικά την διήθηση σφαιροειδών, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή του EphA2 στην διήθηση των καρκινικών κυττάρων. Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν τη δυνατότητα στόχευσης του EphA2 με F2-27 ως μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση για τον καρκίνο του μαστού.⁸⁶

7.3.2.EphA10

Υπάρχει ένας στόχος να αξιοποιηθεί η δυνατότητα των μικρών παρεμβαλλομένων RNA (siRNA) για τη σίγαση συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων που εμπλέκονται σε ασθένειες όπως ο καρκίνος. Ωστόσο, εμπόδια όπως φυσιολογικοί κυτταρικοί και ανοσολογικοί παράγοντες συχνά εμποδίζουν τα μόρια siRNA να φτάσουν στους στόχους τους. Τα εμπόδια αυτά μπορούν να ξεπεραστούν με τη χρήση νανοτεχνολογίας και το σχεδιασμό μη ιϊκών συστημάτων παροχής θεραπευτικών siRNA. Μεταξύ των ελεγμένων φορέων, τα συστήματα που βασίζονται σε κατιονικά λιποσώματα θεωρούνται τα περισσότερο υποσχόμενα λόγω των κατάλληλων φυσικοχημικών ιδιοτήτων και της βιοσυμβατότητάς τους. Ωστόσο, εξακολουθούν να υπάρχουν προκλήσεις, οι οποίες σε μια έρευνα αντιμετωπίζονται με την τροποποίηση των λιποσωμάτων με ένα ευαίσθητο στο pH λιπίδιο συζευγμένο με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) που είναι σταθερό υπό ουδέτερο pH αλλά απελευθερώνει τον θεραπευτικό παράγοντα σε όξινο περιβάλλον. Η αποτελεσματικότητα των τροποποιημένων λιποσωμάτων ενισχύεται περαιτέρω με την σύζευξη με ένα αντι-EphA10 αντίσωμα προς την δημιουργία ανοσολιποσώματος, καθώς ο υποδοχέας EphA10 υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Πειράματα *in vitro*

χρησιμοποιώντας κύτταρα MCF-7/ADR έδειξαν ότι τα σύμπλοκα λιποσώματος-siRNA συζευγμένα με ένα αντίσωμα αντι-ErhA10 (EPSLR) εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη κυτταρική πρόσληψη και αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης σε σύγκριση με τα μη στοχευμένα λιποσώματα (LR) και τα τροποποιημένα με PEG λιποσώματα (PSLR). Η εισαγωγή του αντισώματος αντι-ErhA10 ενίσχυσε τη συγγένεια δέσμησης του EPSLR σε καρκινικά κύτταρα του μαστού που εκφράζουν ErhA10. Πειράματα ανταγωνιστικής αναστολής επιβεβαίωσαν περαιτέρω τον μηχανισμό ενδοκυττάρωσης που προκαλείται από υποδοχείς Erh και αύξησε τη συσσώρευση EPSLR στα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Η δοκιμασία κυτταροτοξικότητας έδειξε ότι το EPSLR εμφάνισε υψηλότερη κυτταροτοξικότητα έναντι των κυττάρων MCF-7/ADR σε σύγκριση με τα LR και PSLR, η οποία αποδόθηκε στην εσωτερίκευση της EPSLR σε καρκινικά κύτταρα με τη μεσολάβηση του αντισώματος. Τα πειράματα σίγασης γονιδίων έδειξαν ότι το siRNA που χορηγήθηκε από το EPSLR μείωσε αποτελεσματικά την έκφραση της πρωτεΐνης MDR1 (Multi drug resistance 1) σε κύτταρα MCF-7/ADR. Μελέτες *in vivo* βιοκατανομής σε ποντίκια αποκάλυψαν ότι το EPSLR εμφάνισε στοχευμένη συσσώρευση σε όγκους ξενομοσχευμάτων MCF-7/ADR, υποδεικνύοντας τις δυνατότητές του ως αποτελεσματικό σύστημα χορήγησης siRNA για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού.¹⁰¹

Η αντικαρκινική δράση του EPSLR ερευνήθηκε περαιτέρω με σκοπό την ανάπτυξη ενός πολυλειτουργικού συστήματος χορήγησης φαρμάκων για την αντιμετώπιση της αντίστασης σε πολλαπλά φάρμακα στον καρκίνο του μαστού. Το σύστημα αυτό συνδυάζει ευαίσθητα στο pH λιποσώματα φορτωμένα με MDR1-siRNA και με το χημειοθεραπευτικό φάρμακο δοξορουβικίνη (DOX), σε ένα σκεύασμα που ονομάζεται DOX+siRNA/ePL. Τα λιποσώματα έχουν τροποποιηθεί με αντισώματα ErhA10, παρουσιάζοντας ενεργή στοχευσιμότητα και χαρακτηριστικά απόκρισης στο pH. Πειράματα *in vitro* και *in vivo* καταδεικνύουν αυξημένη κυτταρική πρόσληψη, ενισχυμένη μείωση της ρύθμισης της P-γλυκοπρωτεΐνης (P-gp), βελτιωμένη κυτταροτοξικότητα και ειδική για τον όγκο συσσώρευση. Το σύστημα δείχνει πολλά υποσχόμενο ως στρατηγική συν-παράδοσης φαρμάκων για να ξεπεραστεί η αντίσταση σε πολλαπλά φάρμακα στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Η εσωτερίκευση των λιποσωμάτων σε καρκινικά κύτταρα του μαστού αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας συνεστιακή μικροσκοπία λείζερ και

κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα λιποσώματα οδήγησαν επιτυχώς στην κυτταρική πρόσληψη, με την υψηλότερη εσωτερίκευση να παρατηρείται για εκείνα που τροποποιήθηκαν με αντίσωμα EphA10, το οποίο μεσολάβησε στην ενδοκυττάρωση που προκαλείται από υποδοχείς. Τα λιποσώματα ήταν ικανά να παραδώσουν αποτελεσματικά το siRNA στο κυτταρόπλασμα διαφεύγοντας από τα ενδο/λυσosomal ως απόκριση στο όξινο περιβάλλον. Η παρουσία χλωροκίνης δεν εμπόδισε την εσωτερίκευση των λιποσωμάτων και έδειξαν συμπεριφορά απελευθέρωσης siRNA ευαίσθητη στο pH. Επιπλέον δεν εμφάνισαν σημαντική τοξικότητα σε υγιή ποντίκια, όπως υποδεικνύεται από μετρήσεις σωματικού βάρους και ιστολογική ανάλυση. Συνολικά, το σύστημα χορήγησης έδειξε αποτελεσματική συν-απόδοση DOX και MDR1-siRNA σε κύτταρα καρκίνου του μαστού ανθεκτικά στο DOX, εμφάνισε απελευθέρωση που ανταποκρίνεται στο pH, ενισχυμένη κυτταρική πρόσληψη και αποτελεσματική μείωση της έκφρασης της P-gp, υποδηλώνοντας τη δυνατότητά του να υπερνικήσει την αντίσταση σε πολλά φάρμακα στη θεραπεία του καρκίνου.¹⁰²

7.3.3.EphB4

Μια αξιοσημείωτη μελέτη χρησιμοποίησε ένα κυκλικό πεπτίδιο TNYL-RAW συζεύγοντάς το με νανοσφαίρες φορτωμένες με δοξορουβικίνη,^{56,78} οι οποίες εμφάνιζαν ισχυρή φωτοθερμική αγωγιμότητα⁵⁶. Αυτό το σύμπλεγμα επέτρεψε τη στοχευμένη παροχή του χημειοθεραπευτικού παράγοντα σε καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν EphB4 σε ξενομοσχεύματα όγκου ποντικού. Η θεραπεία είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη υποχώρηση των περισσότερων όγκων,^{56,78} που αποδίδεται στον συνδυασμό φωτοθερμικής θέρμανσης που καταστρέφει τα καρκινικά κύτταρα και την τοπική απελευθέρωση της ενθυλακωμένης δοξορουβικίνης.⁵⁶ Εκτός από την παράδοση θεραπευτικών παραγόντων, το πεπτίδιο TNYL-RAW μπορεί να χρησιμεύσει και ως διανομέας παραγόντων απεικόνισης σε ξενομοσχεύματα όγκου ποντικού.⁹

7.3.4.Εφρίνη A4.

Ως θεραπευτικοί στόχοι μπορούν να λειτουργήσουν και οι φυσικοί ligands των Eph υποδοχέων. Η εφρίνηA4 έχει προσδιοριστεί ως νέος στόχος που σχετίζεται με τα TICs. Ένα αντίσωμα, συζευγμένο με την κυτταροτοξική ουσία καλιχεαμυκίνη, που ονομάζεται

PF-06647263 αναπτύχθηκε για να παρέχει ειδικά τον κυτταροτοξικό παράγοντα που καταστρέφει το DNA σε κύτταρα που εκφράζουν εφρίνηA4. Το PF-06647263 αποδείχθηκε ότι μειώνει τη συχνότητα των TIC και προκαλεί υποχώρηση του όγκου σε μοντέλα TNBC και καρκίνου των ωοθηκών σε ξενομοσχεύματα που προέρχονται από ασθενείς. Η έκφραση της εφρίνηςA4 βρέθηκε υψηλότερη στα TIC σε σύγκριση με τα μη ογκογόνα κύτταρα και τους φυσιολογικούς ιστούς και επίσης σε όγκους TNBC η εφρίνηA4 αυξορυθμίζεται σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο. Τα αντισώματα που στοχεύουν την εφρίνηA4 ήταν σε θέση να απελευθερώσουν την καλιχεαμυκίνη, στα κύτταρα που την εκφράζουν, μειώνοντας τη συχνότητα των TIC και προκαλώντας παλινδρόμηση του όγκου σε μοντέλα TNBC. Μελέτες *in vivo* έδειξαν σημαντική μείωση του υποπληθυσμού TIC και υποχώρηση του όγκου σε ξενομοσχεύματα TNBC που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με PF-06647263.²⁶

7.4. Μικρά μόρια αναστολείς.

7.4.1. Παν-Εrh αναστολείς

Με πρότυπη ένωση την UniPR129, ενός ισχυρού ανταγωνιστή εφρινών που ωστόσο παρουσίαζε περιορισμούς όσον αφορά τη φαρμακοκινητική και τις οδούς χορήγησης, οι ερευνητές μιας μελέτης στόχευσαν να αναπτύξουν νέες ενώσεις με βελτιωμένες ιδιότητες και για τον σκοπό αυτό χρησιμοποίησαν ανάλυση σχέσης δομής-δραστηριότητας (SAR) για να σχεδιάσουν και να συνθέσουν δύο πολλά υποσχόμενες ενώσεις: UniPR139 και UniPR502. Τόσο ο UniPR139 όσο και ο UniPR502 βρέθηκαν να δρουν ως παν-αναστολείς των συστημάτων Erh/εφρινών. Αλληλεπιδρούσαν με πολλά μέλη των υποδοχέων ErhA και ErhB, επιδεικνύοντας παρόμοια ισχύ. Ο αναστολέας UniPR502 δεν έδειξε διακριτική διάθεση μεταξύ ErhAs και ErhBs, ενώ ο UniPR139 έκανε ελαφρά διάκριση μεταξύ των δύο υποκατηγοριών, εκφράζοντας μια προτίμηση για την αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς της τάξης A. Και οι δύο αναστολείς παρενέβησαν ανταγωνιστικά, αναστρέψιμα και δοσοεξαρτώμενα στην αλληλεπίδραση μεταξύ Erh/εφρινών, αναστέλλοντας την φωσφορυλίωση, με τον UniPR139 να παρουσιάζει ελαφρώς χαμηλότερη ισχύ σε σύγκριση με τον UniPR502 και τη μητρική ένωση UniPR129. Δεν έδειξαν σημαντικές μη ειδικές κυτταροτοξικές επιδράσεις στα κύτταρα PC3. Ο UniPR139 έδειξε ανασταλτικές επιδράσεις στην *in vitro* αγγειογένεση, χωρίς

σημαντικές κυτταροτοξικές επιδράσεις, ενώ ο UniPR502 προκάλεσε κυτταροτοξικές επιδράσεις στα κύτταρα HUVEC, υποδηλώνοντας ότι η αναστολή του σχηματισμού σωλήνων οφειλόταν σε μη ειδική κυτταροτοξικότητα. Ο UniPR139 ανέστειλε την αγγειογένεση στη δοκιμασία CAM (Chick Chorioallantoic Membrane), ένα *in vivo* μοντέλο νεοαγγείωσης και μείωσε σημαντικά τον σχηματισμό αγγείων που διεγείρεται από τον VEGF. Τέλος, ο αναστολέας UniPR139 ήταν βιοδιαθέσιμος από το στόμα, όπως αποδεικνύεται από τις σχετικές συγκεντρώσεις της ένωσης στο πλάσμα ποντικών μετά από χορήγηση από το στόμα. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι το UniPR139 έχει δυναμικό ως ανταγωνιστής Eph/εφρινών με αντι-αγγειογενετικά αποτελέσματα, καθιστώντας το υποψήφιο για περαιτέρω έρευνα και εν τέλει εξέλιξη σε θεραπευτικό παράγοντα.³⁵

7.4.2.EphA2

Οι κλινικές δοκιμές έχουν επικεντρωθεί στη στόχευση του EphA2 στον καρκίνο του μαστού, με μικρομοριακούς αναστολείς, όπως το Dasatinib, το Ponatinib και το Bosutinib να μελετώνται για την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη λειτουργία του υποδοχέα EphA2. Το Dasatinib, ένας εγκεκριμένος από τον FDA αναστολέας τυροσινικής κινάσης έχει δείξει πολλά υποσχόμενος στη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου που σχετίζονται με τον EphA2, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού.⁹⁴ Είθισται να χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία ορισμένων τύπων λευχαιμίας και λειτουργεί ως αναστολέας πολλαπλών κινασών, όπως των c-KIT, PDGFR και SFK⁶ ωστόσο, έχει δείξει αποτελεσματικότητα στην αναστολή του EphA2^{94,6,51,67} αλλά και του EphB4.⁶⁷ Σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, το Dasatinib έχει παρατηρηθεί ότι μειώνει την έκφραση του EphA2 και μειώνει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του. Αυτό το αποτέλεσμα επιτυγχάνεται με την αναστολή των κινασών της οικογένειας SRC, οι οποίες είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν την έκφραση EphA2.^{51, 67} Επιπλέον, το Dasatinib, μαζί με το εικοσαπεντανοϊκό οξύ, έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στη συσσώρευση της εξαρτώμενης από το ATP- ABCA1 χοληστερόλης (ATP-binding-cassette-sub-family-A-member-1). Αυτή η συσσώρευση αυξάνει την πολικότητα της πλασματικής μεμβράνης και προάγει την απόπτωση σε τριπλά αρνητικά κύτταρα καρκίνου του μαστού (TNBC).⁶ Σε μια δοκιμή φάσης 2 που συνδύαζε το Dasatinib με θεραπεία με δένδριτικά κύτταρα που παρουσίαζαν

πεπτιδία EphaA2, παρατηρήθηκε ποσοστό ανταπόκρισης 67%. Ωστόσο, άλλες δοκιμές ανέφεραν περιορισμένη αποτελεσματικότητα του Dasatinib ως μεμονωμένου παράγοντα σε διάφορους προχωρημένους καρκίνους, ίσως γιατί η αποτελεσματικότητα της αναστολής του EphaA2 μπορεί να εξαρτάται από την προσεκτική επιλογή ασθενών και όγκων που είναι πιο πιθανό να ανταποκριθούν ή γιατί το Dasatinib μπορεί να μην επαρκεί για να εμποδίσει πλήρως τις ογκογόνες επιδράσεις του EphaA2. Ως ανταγωνιστικός αναστολέας κινάσης ATP εμφανίζει περιορισμούς, καθώς ο υποδοχέας EphaA2 προάγει την εξέλιξη του καρκίνου και μέσω μονοπατιών που είναι ανεξάρτητοι από την καταλυτική του δράση. Οι συνεχιζόμενες δοκιμές διερευνούν το Dasatinib και άλλους αναστολείς EphaA2 στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και άλλους συμπαγείς όγκους, ενσωματώνοντας το γενετικό και μοριακό προφίλ για την επιλογή ασθενών.⁹⁴

Ένα άλλο μικρό ανασταλτικό μόριο που αναστέλλει αποτελεσματικά τη λειτουργία EphaA2 στα κύτταρα TNBC, αποτελεί το ALW-II-41-27. Η θεραπεία με ALW-II-41-27 έχει ως αποτέλεσμα δόσοεξαρτώμενη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και μειωμένα επίπεδα c-Myc και κυκλίνης E2, αυξημένα επίπεδα p27/KIP1 και μειωμένη φωσφορυλίωση του υποδοχέα EphaA2 σε κύτταρα TNBC. Ο αναστολέας επιβεβαιώθηκε πως στοχεύει κυρίως τον EphaA2, καθώς όταν χορηγήθηκε σε κύτταρα με έλλειψη EphaA2 δεν εμφάνισε σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη τους σε σχέση με την ένωση ελέγχου NG-25, υποδηλώνοντας πως δεν έχει σημαντικές εκτός στόχου επιδράσεις. Σε κλινικά σχετικά μοντέλα ξеноμοσχευμάτων TNBC, οι όγκοι που υποβλήθηκαν σε θεραπεία εμφάνισαν χαμηλότερη κυτταροβρίθεια, μειωμένο πολλαπλασιασμό και αλλοιωμένη έκφραση πρωτεϊνών σε σύγκριση με όγκους που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ένωση ελέγχου. Είναι σημαντικό ότι οι ερευνητές παρατήρησαν σημαντική μείωση στη φωσφορυλίωση του EphaA2, επικυρώνοντας τη στόχευση του EphaA2 *in vivo*. Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν τη δυνατότητα του EphaA2 ως θεραπευτικού στόχου στο TNBC και καταδεικνύουν την αποτελεσματικότητα του ALW-II-41-27 στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του TNBC *in vitro* και *in vivo*.⁸³

Άλλοι τύποι αναστολέων, είναι οι αναστολείς αποακετυλασών ιστονών, HDACis (Histone deacetylase inhibitors) όπου στοχεύουν επιγενετικά ένζυμα και προκαλώντας επιγενετικές αλλαγές. Ένας νέος αναστολέας HDAC που εντοπίστηκε ονομάζεται WW437

και δείχνει ισχυρή δράση κατά του καρκίνου του μαστού *in vitro* και σε προκλινικά ζωικά μοντέλα. Το WW437 αναστέλλει τον άξονα σηματοδότησης HDACs-EphA2, υποδηλώνοντας ότι η στόχευση αυτού του άξονα μπορεί να είναι μια νέα προσέγγιση στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Το WW437 βρέθηκε ότι αναστέλλει τη δραστηριότητα HDAC και έδειξε συγκεκριμένα φονικά αποτελέσματα στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, ενώ παρουσίαζε μικρή κυτταροτοξικότητα έναντι των μη καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων του μαστού. Το WW437 ανέστειλε σημαντικά τον σχηματισμό αποικίας καρκινικών κυττάρων, προκάλεσε απόπτωση και ανέστειλε τη μετανάστευση, την διήθηση και την αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας στα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Το WW437 βρέθηκε ότι αναστέλλει τη φωσφορυλίωση και την έκφραση του EphA2, καταστέλλοντας συγκεκριμένα την έκφραση των HDAC2 και HDAC4, τα οποία παίζουν βασικό ρόλο στη διατήρηση της έκφρασης EphA2, που μέσω ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης επιβεβαιώθηκε η υπερέκφρασή του στον καρκίνο του μαστού και η συσχέτισή του με τη μετάσταση του όγκου. Το WW437 μείωσε επίσης την έκφραση του Sp1, ενός παράγοντα μεταγραφής του EphA2. Επιπλέον, ο συνδυασμός του WW437 και ενός αναστολέα EphA2 έδειξε συνεργιστική επίδραση στον καρκίνο του μαστού, υποδεικνύοντας μια πιθανή θεραπευτική στρατηγική για προηγμένη θεραπεία του καρκίνου του μαστού.¹⁰³

Πολλές από τις ενώσεις που έχουν αναπτυχθεί με σκοπό την διατάραξη της αλληλεπίδρασης των υποδοχέων Eph και των εφρινών, ενώ έχουν δείξει υποσχόμενα αποτελέσματα στην αναστολή της αγγειογένεσης των όγκων και στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης συμπαγών όγκων, υποφέρουν από την πρωτεολυτική αποικοδόμηση και περιορισμένη εκλεκτικότητα. Ως εκ τούτου, εξερευνώνται νέες ενώσεις που να στοχεύουν τους υποδοχείς Eph. Μέσω εικονικής διαλογής και προσομοιώσεων μοριακής σύνδεσης σε μια μελέτη, μια ένωση που ονομάζεται 3β-υδροξυ-Δ5-χολενικό οξύ (ένωση 4) αναγνωρίστηκε ως πιθανός μικρομοριακός ανταγωνιστής του EphA2. Μέσα από την διεξαγωγή προσομοιώσεων σύνδεσης της ένωσης-υποδοχέα, με σκοπό τον χαρακτηρισμό της στερεοχημικής τους αλληλεπίδρασης, κατέστη δυνατή η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός μιας σειράς συζυγών ενώσεων της ένωσης 4 συζευγμένης με αμινοξέα. Αυτές οι ενώσεις αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αποτρέπουν τη

δέσμευση της εφρίνηςA1 στον υποδοχέα EphA2, να αναστέλλουν τη φωσφορυλίωση του EphA2 στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, να καταστέλλουν την αγγειογένεση στα ενδοθηλιακά κύτταρα και να έχουν γνωστές εκτός στόχου αλληλεπιδράσεις που εμφανίζουν άλλες ενώσεις- παράγωγα του χολικού οξέος. Η μελέτη στόχευε στη διερεύνηση της σχέσης δομής-δραστικότητας (SAR) αυτών των ενώσεων αναλύοντας την ανασταλτική τους δράση και ισχύ και μια ένωση που ονομάζεται N-(3β-υδροξυ-D5-χολεν-24-οϋλ)-L-τροπτοφάνη (UniPR1331) έδειξε δέκα φορές πιο ισχυρή ανασταλτική ισχύ σε σύγκριση με τη μητρική ένωση. Επιπλέον, οι ερευνητές βρήκαν ότι η ένωση UniPR1331 ανέστειλε τη φωσφορυλίωση του EphA2 που προκαλείται από την εφρίνηA1 και παρενέβαινε στις αγγειογενετικές διαδικασίες *in vitro*. Το προφίλ επιλεκτικότητας της ένωσης UniPR1331 αξιολογήθηκε επίσης και βρέθηκε ότι αναστέλλει τη δέσμευση της εφρίνηςA1 σε διάφορους υποδοχείς Eph, υποδηλώνοντας τις πιθανές εφαρμογές της ένωσης UniPR1331 ως ανταγωνιστή υποδοχέα Eph πολλαπλών στόχων για αποτελεσματικότητα κατά του όγκου. Τέλος, εξετάστηκαν οι *in vitro* και *in vivo* φαρμακοκινητικές ιδιότητες της ένωσης UniPR1331 και βρέθηκε ότι έχει υψηλότερη συστημική έκθεση και σταθερότητα σε σύγκριση με άλλες ενώσεις που προέρχονται από λιθοχολικό οξύ.²⁰ Επιπλέον, η ένωση UniPR1331 έχει αξιολογηθεί για την ικανότητά της να διαταράσσει την αλληλεπίδραση του υποδοχέα του VEGF με τον VEGFR2. Προτείνεται ότι η UniPR1331 μιμείται τον VEGF (αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας) δεσμεύοντας και καλύπτοντας τους συνδετικούς θύλακες του στον VEGFR2, ενώ επίσης προκαλεί αλλαγές διαμόρφωσης στην περιοχή πρόσδεσης D2-D3 του VEGFR2. Η ένωση UniPR1331 περιγράφεται ως φάρμακο πολλαπλών στόχων που δρα ως VEGFR2-PPI-i, αναστέλλοντας τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα που εξαρτάται από τον VEGF και ως ran-Eph PPI-i. Συνολικά, η UniPR1331 παρουσιάζει διπλή αντιαγγειογενετική δράση αλληλεπιδρώντας και με τους υποδοχείς VEGFR2 και EphA2, παρεμβαίνοντας έτσι δυνητικά στις οδούς σηματοδότησης που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του όγκου, τη νεοαγγείωση και την αγγειογένεση.⁷⁷

7.4.3.EphB4

Η sanguinarine αποτελεί μια φυσική ένωση που προέρχεται από ορισμένα φυτά και έχει δείξει κυτταροτοξικές και αντικαρκινικές ιδιότητες σε μελέτες σε ζώα, προκαλώντας

απόπτωση, αναστέλλοντας τη μετανάστευση και παρεμβαίνοντας στην αλληλεπίδραση HIF-1α/STAT3 στον καρκίνο του μαστού. Σε υποξικές περιοχές η μετρούμενη μερική πίεση οξυγόνου είναι σημαντικά χαμηλότερη σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό. Τέτοιες περιοχές εντοπίζονται στον καρκίνο του μαστού και σχετίζονται με κακή κλινική ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία. Μια μελέτη στόχευε να διερευνήσει τις επιδράσεις της sanguinarine στην επαγόμενη από υποξία εξέλιξη του καρκίνου του μαστού, εστιάζοντας στον αντίκτυπό της στην έκφραση του Ehb4 και στα μονοπάτια που διαμεσολαβούνται από το HIF-1α. Η sanguinarine βρέθηκε να αναστέλλει την αλληλεπίδραση μεταξύ Ehb4 και p-STAT3, αναστέλλοντας την φωσφορυλίωση του STAT3. Περαιτέρω πειράματα έδειξαν ότι επιτάχυνε την αποικοδόμηση του HIF-1α και ανέστειλε την έκφραση των γονιδίων-στόχων του. Μέσω ανοσοϊστοχημείας, Western blotting και ELISA επιβεβαιώθηκε ότι μείωσε την έκφραση των Ehb4, HIF-1α, p-STAT3-Tyr, CA9 και VEGF, υποδηλώνοντας τις πιθανές της ανασταλτικές επιδράσεις στον υποδοχέα Ehb4 και στον παράγοντα HIF-1α, καθώς και στα σχετικά γονίδια και πρωτεΐνες τους. Σε ένα μοντέλο ποντικού *in vivo*, η sanguinarine μείωσε την ανάπτυξη του όγκου και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η sanguinarine μπορεί να έχει θεραπευτικό δυναμικό στοχεύοντας τον Ehb4 και αναστέλλοντας μονοπάτια που διαμεσολαβούνται από τον HIF-1α.⁸⁴

7.5. Έμμεση στόχευση.

7.5.1.Αναστολέας Src κινάσης στο πλαίσιο συνθετικά θανατηφόρων ιδιοτήτων.

Ο Ehb6 ρυθμίζεται προς τα κάτω σε διάφορους τύπους όγκων, συμπεριλαμβανομένου του TNBC. Εντοπίζοντας γονίδια που είναι συνθετικά θανατηφόρα με κύτταρα που παρουσιάζουν έλλειψη του Ehb6, οι ερευνητές ήλπιζαν να αποκαλύψουν πιθανούς θεραπευτικούς στόχους για τη θεραπεία του TNBC. Βρήκαν ότι η κινάση Src, εμφάνιζε συνθετικά θανατηφόρες ιδιότητες με την έλλειψη Ehb6 και θα μπορούσε ενδεχομένως να αποτελεί θεραπευτικό στόχο σε κύτταρα καρκίνου του μαστού με έλλειψη Ehb6, έτσι χρησιμοποιήθηκαν μικρά μόρια αναστολείς που στοχεύουν την Src για να διερευνηθεί περαιτέρω αυτήν την αλληλεπίδραση. Στο πλαίσιο μιας έρευνας χορηγήθηκαν σε κύτταρα TNBC αυξανόμενες συγκεντρώσεις των αναστολέων Src SU6656 και KX2-391, οι οποίοι κατέστειλαν κατά προτίμηση κύτταρα TNBC με έλλειψη Ehb6, υποδηλώνοντας ότι η

στόχευση Src μπορεί να είναι μια αποτελεσματική προσέγγιση ειδικά για κύτταρα TNBC που στερούνται EhbB6. Διεξήχθησαν *in vivo* πειράματα σε ποντίκια με όγκους TNBC, τα οποία έλαβαν θεραπεία με τον αναστολέα KX2-391 και απεδείχθη πως καταστάληκε πιο αποτελεσματικά η ανάπτυξη όγκων TNBC που δεν εξέφραζαν τον EhbB6. Με χρώση των όγκων με τον δείκτη CD34 αιμοφόρων αγγείων εκτιμήθηκε το επίπεδο νεοαγγείωσης τόσο σε EhbB6-θετικούς όσο και σε αρνητικούς όγκους που αντιμετωπίστηκαν με τον αναστολέα KX2-391, ωστόσο, τα αποτελέσματα δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές στο σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων μεταξύ των δύο τύπων όγκων, υποδεικνύοντας ότι η ενισχυμένη ευαισθησία των κυττάρων TNBC με έλλειψη EhbB6 στον αναστολέα δεν εξαρτιόταν αποκλειστικά από τις αλλαγές στην αγγειογένεση. Αυτό το εύρημα υποστήριξε περαιτέρω την ιδέα ότι η συνθετική θνησιμότητα μεταξύ EhbB6 και Src ήταν υπεύθυνη για τη διαφορική απόκριση στη θεραπεία. Αυτό υποδηλώνει ότι ο EhbB6 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για την επιλογή όγκων TNBC που δεν τον εκφράζουν για θεραπεία με αναστολείς Src, ενώ ασθενείς με υψηλή έκφραση του υποδοχέα θα μπορούσαν να κατευθυνθούν προς άλλες θεραπευτικές επιλογές στο πλαίσιο εξατομικευμένης θεραπευτικής προσέγγισης.⁷⁰

7.5.2. Αντισώματα που στοχεύουν τις πρωτεΐνες ADAM.

Στο πλαίσιο της σηματοδότησης Ehb/εφρινών στον καρκίνο του μαστού, οι θεραπευτικές προσεγγίσεις αντισωμάτων έχουν δείξει υποσχέσεις για έμμεση στόχευση. Η χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων που στοχεύουν και κατευθύνονται ειδικά κατά των ADAM15 και ADAM17 έχουν δείξει πολλά υποσχόμενα στην αναστολή της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων του μαστού, τονίζοντας περαιτέρω τη δυνατότητα των προσεγγίσεων που βασίζονται σε αντισώματα για έμμεση στόχευση της σηματοδότησης Ehb στον καρκίνο του μαστού ρυθμίζοντας τη δραστηριότητα των μελών της οικογένειας ADAM. Τα μονοκλωνικά αντισώματα ενάντια στην περιοχή δέσμευσης υποστρώματος της ADAM10, όπως το αντίσωμα 8C7, έχουν επίσης αποδειχθεί αποτελεσματικά στην παρεμπόδιση της διάσπασης και της εσωτερίκευσης εφρινών. Το αντίσωμα αναστέλλει τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα Ehb και διαταράσσει την κυτταρική απώθηση και τον διαχωρισμό που προκαλείται από την αλληλεπίδραση Ehb/εφρίνης. Η ανασταλτική επίδραση του 8C7 mAb στην αποβολή της εφρίνης με τη

μεσολάβηση του EphB2 υποστηρίζει την αποτελεσματικότητά του στον αποκλεισμό της βιολογικής απόκρισης που προκαλείται από την ADAM10 και στους δύο τύπους υποδοχέων Eph. Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν τη δυνατότητα των θεραπευτικών αντισωμάτων, που στοχεύουν συγκεκριμένα την ADAM10, για διακοπή της σηματοδότησης Eph και των σχετικών κυτταρικών διεργασιών στον καρκίνο του μαστού.⁷⁸

7.5.3.Αγωνιστές FXR

Ορισμένοι αγωνιστές FXR, συμπεριλαμβανομένων των Cilofexor, Nidufexor και Tropifexor, διακόπτουν αυτή την αλληλεπίδραση EphA2-εφρίνηςA1, ενώ άλλοι είναι αναποτελεσματικοί. Το Cilofexor και το Tropifexor ανεστέλλουν επιλεκτικά την αλληλεπίδραση EphA2-ephrin-A1 και εμφανίζουν πολλά υποσχόμενα χαρακτηριστικά δέσμευσης. Μελέτες μοριακής μοντελοποίησης παρέχουν πληροφορίες για την αλληλεπίδραση μεταξύ των αγωνιστών FXR και των υποδοχέων EphA2, υπογραμμίζοντας το Cilofexor ως δυνητικό ανταγωνιστή με ευνοϊκές ιδιότητες. Λειτουργικές δοκιμασίες επιβεβαιώνουν την ικανότητα του Cilofexor να αναστέλλει τη φωσφορυλίωση του EphA2 και να εμποδίζει τη στρογγυλοποίηση των κυττάρων που προκαλείται από την εφρίνη-A1 σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη PC3, υποδηλώνοντας τη δυνατότητά του ως θεραπευτικού παράγοντα.³¹

7.6. Ανταγωνιστικά πεπτίδια.

7.6.1.EphA2

Σε μια μελέτη, σχεδιάστηκε ως δυνητικός ιχνηθέτης, ένα κυκλικό πεπτίδιο που ονομάστηκε SD01 και για τους ερευνητικούς σκοπούς το YSA χρησιμοποιήθηκε ως το πεπτίδιο ελέγχου. Ραδιενεργοί ιχνηθέτες, ¹²⁵I-SD01 και ¹²⁵I-YSA, παρασκευάστηκαν και επέδειξαν σταθερότητα και υδροφιλικότητα. Μελέτες *in vitro* έδειξαν ταχεία δέσμευση και διάσπαση και των δύο ιχνηθετών σε κύτταρα 4T1, με το SD01 να δείχνει ελαφρώς καλύτερη κινητική δέσμευσης. Τα πειράματα δέσμευσης κορεσμού επιβεβαίωσαν την ειδική δέσμευση των ¹²⁵I-SD01 και ¹²⁵I-YSA σε EphA2-θετικά κύτταρα 4T1, με το SD01 να παρουσιάζει υψηλότερη ικανότητα δέσμευσης. Η φωσφοροαυτοακτινογραφία ολόκληρου του σώματος έδειξε υψηλότερη πρόσληψη ραδιενέργειας σε όγκους 4T1

στους οποίους έγινε ένεση ^{125}I -SD01 σε σύγκριση με το ^{125}I -YSA. Τέλος, η ανάλυση βιοκατανομής έδειξε υψηλότερη πρόσληψη όγκου και αναλογίες προς τον φυσιολογικό ιστό για το ^{125}I -SD01 σε σύγκριση με το ^{125}I -YSA 12 ώρες μετά την ένεση. Συνολικά, αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι το SD01 έχει καλύτερη συγγένεια δέσμευσης και ικανότητα στόχευσης όγκου για τον ErhA2 στο TNBC, καθιστώντας το έναν πολλά υποσχόμενο ιχνηλάτη για απεικόνιση και πιθανή στόχευση του ErhA2 στο μέλλον. Πρέπει ωστόσο να μελετηθούν πεπτιδία στόχευσης ErhA2 με διαφορετικά ραδιοϊσότοπα που είναι κατάλληλα για κλινική εφαρμογή.¹³

7.6.2.ErhB2

Ο υποδοχέας ErhB2 έχει αποτελέσει στόχο ενδιαφέροντος στην έρευνα για τον καρκίνο και αρκετά πεπτιδία που τον στοχεύουν έχουν ταυτοποιηθεί μέσω τεχνικών σάρωσης βιβλιοθηκών φάγων, με ένα πεπτιδίδιο να έχει ξεχωρίσει, εμφανίζοντας την ισχυρότερη ανασταλτική δράση, το οποίο ονομάζεται SNEW⁶⁶ και αποτελεί ένα δωδεκαμερές.⁷⁶ Τα πεπτιδία μπορούν να δράσουν ως λειτουργικοί ανταγωνιστές των υποδοχέων Erh, προσφέροντας πιθανά θεραπευτικά οφέλη και το SNEW, το οποίο εμφανίζει πολύ υψηλή συγγένεια για τον ErhB2, δρα δεσμεύοντας την υδρόφοβη σχισμή δέσμευσης του υποδοχέα, εμποδίζοντας αποτελεσματικά την αλληλεπίδρασή του με την εφρίνηB2,^{51,6,67} όπως αποκαλύφθηκε από την μελέτη της κρυσταλλικής δομής του πεπτιδίου ^{76,66} και αναστέλλει παθολογικές μορφές αγγειογένεσης.⁷⁸ Η συγγένεια δέσμευσης του SNEW στον υποδοχέα ErhB2 θα μπορούσε ενδεχομένως να βελτιωθεί περαιτέρω κάνοντας προσαρμογές στο C-άκρο του, όπως προσθέτοντας ένα μοτίβο PXSPY ⁶⁷ αν και ήδη παρουσιάζει ικανοποιητική συγγένεια δέσμευσης, πράγμα που οφείλεται στην ικανότητα όλων των αμινοξέων του (εκτός από τα L₉ και H₁₂) να συνεισφέρουν στην αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα. Το SNEW και άλλα πεπτιδία που δεσμεύονται στον υποδοχέα ErhB2, αναστέλλοντας την αλληλεπίδρασή του με την εφρίνηB2 μπορεί να είναι χρήσιμα στην αναστολή παθολογικών μορφών αγγειογένεσης και εξέλιξης καρκίνων στους οποίους εμπλέκεται ενεργά ο ErhB2 υποδοχέας.⁶⁶

7.6.3.ErhB4

Ομοίως, ένα άλλο πεπτιδίο που ονομάζεται TNYL και δεσμεύεται εκλεκτικά στον ErhB4 έχει ανακαλυφθεί μέσα από τεχνικές σάρωσης βιβλιοθηκών φάγων. Ωστόσο μια τροποποιημένη εκδοχή του περιέχει ένα μοτίβο που έχει εντοπισθεί και σε άλλα πεπτιδία που δεσμεύουν τον ErhB4, το μοτίβο RAW. Η προσθήκη αυτή βελτιώνει δραματικά την ισχύ της σύνδεσης και μελέτες της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου TNYL-RAW-υποδοχέα αποκάλυψαν ότι το πεπτιδίο καταλαμβάνει τον θύλακα δέσμευσης της εφρίνης, σχηματίζοντας πλήθος σταθεροποιητικών δεσμών.^{76,66} Έτσι το TNYL-RAW αναστέλλει την αλληλεπίδρασή της εφρίνηςB2 με τον ErhB4 και δεδομένης της υπερέκφρασης του ErhB4 σε διάφορους καρκίνους συμπεριλαμβανομένου του μαστού, αυτά τα πεπτιδία, δείχνουν να είναι πολλά υποσχόμενα ως αντικαρκινικά θεραπευτικά.^{51,6} Αυτό το πεπτιδίο έχει σχεδιαστεί για να παρεμβαίνει στην αλληλεπίδραση μεταξύ της εφρίνηςB2 και του ErhB4, διαταράσσοντας δυνητικά την οδό σηματοδότησης που εμπλέκεται στην αγγειογένεση.^{92,78} Επιπλέον τα T₁ και N₂ υπολείμματα του πεπτιδίου βρέθηκε πως δεν ήταν απαραίτητα για την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα, επιτρέποντας προσαρμοστικές τροποποιήσεις προσκόλλησης φαρμάκων ή παραγόντων απεικόνισης. Πρόσφατες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει το TNYL-RAW για την απεικόνιση ξενομοσχευμάτων καρκίνου θετικών στον ErhB4 σε ποντίκια ενσωματώνοντάς το σε διάφορες απεικονιστικές μεθόδους όπως η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET) και η απεικόνιση φθορισμού κοντά στο υπέρυθρο (NIR).⁶⁶

Ένα εμπόδιο που αποκαλύφθηκε μέσα από μελέτες σταθερότητας είναι ότι το TNYL-RAW έχει πολύ μικρό χρόνο ημιζωής σε κυτταροκαλιέργειες και στο πλάσμα, υποδηλώνοντας υψηλή ευαισθησία στην πρωτεολυτική αποικοδόμηση. Διάφορες στρατηγικές έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την αναστολή της αποικοδόμησης των πεπτιδίων, με μια ενδιαφέρουσα μορφοποίηση να αποτελεί η κυκλοποίηση ενός παραγώγου του TNYL-RAW που περιέχει μια επιπλέον N-τερματική λυσίνη και ένα C-τελικό ασπαρτικό οξύ, προκειμένου να παραχθεί το cTNYL-RAW, το οποίο εμφανίζει αυξημένη σταθερότητα στο πλάσμα ποντικών, πιθανώς γιατί η κυκλική διαμόρφωση αναστέλλει την αποικοδόμηση από αμινοπεπτιδάσες και πρωτεάσες. Ωστόσο η υψηλή συγγένεια του πεπτιδίου για τον ErhB4 παραμένει αμετάβλητη.⁷⁶

Ένα ακόμη πολλά υποσχόμενο προϊόν είναι το sErbB4-HSA που έχει αναπτυχθεί με τη σύντηξη της διαλυτής μορφής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ErbB4 με ανθρώπινη λευκωματίνη ορού, HSA (Human serum albumin). Μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι το sErbB4-HSA αναστέλλει αποτελεσματικά τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, την προσκόλληση και το σχηματισμό σωλήνων μέσω αποτελεσματικής αναστολής της αλληλεπίδρασης ErbB4/εφρίνηςB2. Πειράματα *in vivo* επιβεβαίωσαν την αντι-αγγειογενετική του δράση επιδεικνύοντας την ικανότητά του να εξουδετερώνει τις αγγειογενετικές επιδράσεις του VEGF και του bFGF. Σε ζωικά μοντέλα, το sErbB4-HSA αποδείχθηκε ως το πιο αποτελεσματικό μεταξύ άλλων πρωτεϊνών στη μείωση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων του μαστού MCF7, των κυττάρων SCC15 καρκινώματος πλακωδών κυττάρων κεφαλής και του τραχήλου και των κυττάρων μελανώματος B16.⁵⁶

7.7. Παράγωγα φυσικών προϊόντων.

Η αρτεμισινίνη και τα παράγωγά της έχουν διερευνηθεί για τις επιδράσεις τους στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, την απόκριση του οξειδωτικού στρες, τον μεταβολισμό σιδήρου, τη βλάβη και επιδιόρθωση του DNA, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και τον κυτταρικό θάνατο. Με δεδομένες τις επιδράσεις της αρτεμισινίνης και των παραγώγων της σε ποικίλες σηματοδοτικές οδούς, σε μια μελέτη διερευνήθηκαν οι επιδράσεις του artesunate, ενός παραγώγου, στα επίπεδα των εφρινών και των υποδοχέων τους στα καρκινικά κύτταρα του μαστού και συγκεκριμένα στις κυτταρικές σειρές MCF10A, MCF7 και MDA-MB-231. Το artesunate παρουσίασε ποικίλα αποτελέσματα στη βιωσιμότητα των κυττάρων ανάλογα με την κυτταρική σειρά και τη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε. Τα κύτταρα MCF10A αποκρίθηκαν λιγότερο με τον αριθμό κυττάρων να μειώνεται κατά 25%, ενώ στα κύτταρα MCF7 και MDA-MB-231 ο αριθμός των κυττάρων μειώθηκε κατά 75%, δείχνοντας σημαντικές μειώσεις στη βιωσιμότητα αλλά και αλλαγές στα προφίλ έκφρασης των υποδοχέων ErbB και των εφρινών, τα οποία αναλύθηκαν αποκαλύπτοντας διακριτά μοτίβα μεταξύ των κυτταρικών σειρών. Στα κύτταρα MCF10A δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των εφρινών και των υποδοχέων πριν και μετά την θεραπεία με artesunate, ενώ στα κύτταρα MCF7 και MDA-MB-231, οδήγησε σε σημαντικές αλλαγές στην έκφραση ορισμένων

υποδοχέων και εφρινών, υποδεικνύοντας αλλοιωμένη γονιδιακή έκφραση. Οι παρατηρούμενες αλλαγές στα επίπεδα των υποδοχέων και των εφρινών πριν και μετά τη θεραπεία των καρκινικών κυττάρων του μαστού, που διαπιστώθηκαν με συγκριτική μελέτη, υποδηλώνουν ότι το artesunate μπορεί να επηρεάσει τις κρίσιμες για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης οδούς που είναι υπεύθυνες για τη ρύθμιση των Eph/εφρινών. Πιο συγκεκριμένα, στα κύτταρα MCF7, η χορήγηση artesunate αύξησε τα επίπεδα EphA8, EphA10, EphB6 και εφρίνηςA2, ενώ στα κύτταρα MDA-MB-231, αύξησε τα επίπεδα EphA3 και EphA10 αλλά μείωσε τα επίπεδα EphA7 και εφρίνηςA3. Αυτές οι αλλαγές σε αφθονία μπορεί να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο ή να επηρεάσουν άλλες κυτταρικές διεργασίες. Η αυξορύθμιση για παράδειγμα των EphA8 και EphB6 που είναι γνωστό πως καταστέλλουν την EMT, σε κύτταρα MCF7 που έχουν υποστεί αγωγή, υποδεικνύουν πιθανούς ρόλους στην καταστολή της EMT. Αντίθετα, η μειωμένη ρύθμιση του EphA7 σε κύτταρα MDA-MB-231 που υποβλήθηκαν σε αγωγή υποδηλώνει μειωμένο πολλαπλασιασμό και υποστηρίζει τη σύνδεση μεταξύ EphA7 και απόπτωσης, της οδού σηματοδότησης AKT, της μετάστασης και κακής πρόγνωσης σε διάφορους τύπους καρκίνου.¹⁰⁰

7.8. Εξωσώματα χορήγησης φαρμάκων.

Τα εξωσώματα είναι μικρά κυστίδια που περιέχουν βιομόρια που παίζουν ρόλο στην κυτταρική ομοιόσταση και τη διακυτταρική επικοινωνία. Η ικανότητά τους να μεσολαβούν στην διακυτταρική επικοινωνία τα καθιστά ελκυστικά ως νανοφορείς για τη χορήγηση φαρμάκων. Τα εξωσώματα που προέρχονται από τα κύτταρα του ίδιου του ασθενούς έχουν υψηλή βιοσυμβατότητα, χαμηλή τοξικότητα, μπορούν να παρακάμψουν τους μηχανισμούς ανοχής στα φάρμακα και έχουν την ικανότητα να διεισδύουν στους ιστούς και να διασχίζουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Τα εξωσώματα προσφέρουν δυνατότητες για στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων και χρήση βιοδεικτών σε ασθένειες στις οποίες εμπλέκεται το σύστημα Eph/εφρινών. Οι Eph/εφρίνες που βρίσκονται στα κυκλοφορούντα εξωσώματα έχουν επιπτώσεις σε διάφορες ασθένειες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για θεραπευτικούς και προγνωστικούς σκοπούς. Τα εξωσώματα έχουν αναγνωριστεί για το ρόλο τους στη στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων και για την ικανότητά τους να μεταφέρουν πρωτεΐνες σε απομακρυσμένους ιστούς. Πρόσφατες

μελέτες έχουν δείξει ότι οι Eph/εφρινές συνδεδεμένες στην μεμβράνη εξωσωμάτων μπορούν να διευκολύνουν τη διακυτταρική επικοινωνία μεγάλης εμβέλειας χωρίς να είναι απαραίτητη η άμεση επαφή κυττάρου-κυττάρου. Αυτή η επικοινωνία λαμβάνει χώρα όταν τα εξωσώματα που φέρουν Eph/εφρινές αλληλεπιδρούν με κύτταρα που βρίσκονται σε απομακρυσμένες τοποθεσίες, επιτρέποντας αλληλεπιδράσεις Eph/εφρινών. Αυτή η ανακάλυψη υπογραμμίζει τη δυνατότητα χρήσης εξωσωματικών Eph/εφρινών τόσο ως βιοδεικτών όσο και ως θεραπευτικών παραγόντων σε διάφορες ασθένειες, διευρύνοντας τις επιλογές εξατομικευμένης ιατρικής.³⁶

7.9. miRNAs

Ο καρκίνος του μαστού, ιδιαίτερα ο τριπλά αρνητικός υπότυπος, είναι μια εξαιρετικά επεμβατική μορφή καρκίνου με, όπως έχουμε δει, περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές. Η θεραπεία υποκατάστασης microRNA (miRNA) είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη στόχευση των καρκινικών μονοπατιών. Τα miRNA είναι μικρά μη κωδικοποιητικά RNA που δρουν ως ογκοκατασταλτικοί παράγοντες και συχνά χάνονται στον καρκίνο. Τα μέλη της οικογένειας miR-200, συμπεριλαμβανομένων των miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 και miR-429, έχουν αναγνωρισθεί ως κρίσιμα ογκοκατασταλτικά miRNA. Χαμηλή έκφραση των miR-200 παρατηρείται στα βλαστοκύτταρα του καρκίνου του μαστού και στο TNBC, οδηγώντας σε ενισχυμένη αυτοανανέωση βλαστοκυττάρων, EMT, εξέλιξη και επιθετικό φαινότυπο όγκου. Κατά την διερεύνηση της σχέσης του miR-200a με τον υποδοχέα EphA2, απεδείχθη ότι στην 3' αμετάφραστη του γονιδίου EphA2 εντοπίζεται μια διατηρημένη θέση δέσμησης miR-200a, υποδηλώνοντας μια ρυθμιστική σχέση μεταξύ τους. Η εν λόγω υπόθεση υποστηρίχθηκε από πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι όταν τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με miR-200a, υπήρξε σημαντική μείωση στα επίπεδα πρωτεΐνης EphA2 και αναστολή της μετανάστευσης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, τόσο σε μη διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού ποντικών, όσο και σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές TNBC, όπου ο EphA2 συχνά υπερεκφράζεται. Επιπλέον, έχουν διεξαχθεί πρόσθετα πειράματα με δοκιμές αναφοράς λουσιφεράσης, που επιτυχώς επιβεβαίωσαν την άμεση στόχευση του EphA2 από το miR-200a στην 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου. Η αποσιώπηση του EphA2 αναπαράγει τα αντιμεταναστευτικά

αποτελέσματα του miR-200a, ενώ η υπερέκφραση του EphA2 τα εξουδετερώνει. Αξίζει να σημειωθεί πως τα επίπεδα E-καντερίνης δεν επηρεάζονται από αλλαγές στην έκφραση του EphA2, υποδηλώνοντας ότι το miR-200a ρυθμίζει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού και στα κύτταρα TNBC μέσω μιας οδού ανεξάρτητης από τη ρύθμιση της E-καντερίνης. Επιπλέον, η οδός miR-200a-EphA2 βρέθηκε ότι συμβάλλει στην ενεργοποίηση της AMPK, η οποία έχει επιπτώσεις στη μετανάστευση στα κύτταρα TNBC. Συλλογικά, αυτά τα ευρήματα αποκαλύπτουν έναν μηχανισμό μειορύθμισης του EphA2 από το miR-200a, προσφέροντας πιθανώς μια νέα θεραπευτική προσέγγιση για τον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού.⁹⁰

8. Επίλογος

Συμπερασματικά, το σύστημα Eph/εφρινών αντιπροσωπεύει ένα αξιολογικό πεδίο μελέτης με τεράστιες επιπτώσεις στις θεραπευτικές παρεμβάσεις για τον καρκίνο του μαστού. Σε όλη αυτή τη διπλωματική εργασία, έχουμε εμβαθύνει στα δομικά χαρακτηριστικά, τους μηχανισμούς σηματοδότησης και τους διαφορετικούς ρόλους των υποδοχέων Eph και των εφρινών τόσο στις φυσιολογικές διεργασίες του οργανισμού όσο και στην εξέλιξη του καρκίνου. Η πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ των εφρινών, των υποδοχέων τους και των διαφόρων κυτταρικών και μοριακών συστατικών του μικροπεριβάλλοντος του όγκου έχει ρίξει φως στις δυνατότητές τους ως θεραπευτικού στόχου στον καρκίνο του μαστού.

Προσαρμόζοντας την θεραπεία με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά του όγκου, στοχεύοντας συγκεκριμένα τους υποδοχείς Eph και τις εφρίνες, δίνεται η ευκαιρία διατάραξης των μηχανισμών που προάγουν τον καρκίνο και τη νεοαγγειογένεση, η ευκαιρία ρύθμισης του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και ενίσχυσης της αποτελεσματικότητας των υπάρχουσών θεραπευτικών προσεγγίσεων. Η ανάπτυξη στοχευμένων στρατηγικών, μέσω αντισωμάτων, της ανοσοθεραπείας, πεπτιδίων, αναστολέων μικρών μορίων, καθώς και η χρήση συζευγμένων μορίων με κυτταροτοξικές ουσίες για στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων ως ένα μέσο για την επιλεκτική εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων, ελαχιστοποιώντας τις εκτός στόχου επιδράσεις, μεταξύ άλλων, προσφέρει πολλά υποσχόμενες οδούς για προσαρμοσμένες και εξατομικευμένες επιλογές θεραπείας.

Προχωρώντας προς τα εμπρός, το σύστημα Ερη/εφρινών έχει πασιφανώς τεράστιες θεραπευτικές δυνατότητες, ωστόσο απαιτείται περαιτέρω έρευνα και κλινικές έρευνες για την πλήρη αποσαφήνιση των πολυποίκιλων ρόλων των υποδοχέων Ερη και των εφρινών στον καρκίνο του μαστού, ώστε να αποκτηθούν και να αξιοποιηθούν οι γνώσεις που θα οδηγήσουν στην ανάπτυξη περαιτέρω καινοτόμων θεραπευτικών οδών και συνδυαστικών θεραπειών, με τελικό στόχο τη βελτίωση της πρόγνωσης και της ποιότητας ζωής των ασθενών με καρκίνο του μαστού παγκοσμίως.

Βιβλιογραφικές αναφορές.

1. Alfaro D, Rodríguez-Sosa MR, Zapata AG. Eph/ephrin Signaling and Biology of Mesenchymal Stromal/Stem Cells. *J Clin Med.* 2020 Jan 22;9(2):310. doi: 10.3390/jcm9020310. PMID: 31979096; PMCID: PMC7074403.
2. Anderton, M.; van der Meulen, E.; Blumenthal, M.J.; Schäfer, G. The Role of the Eph Receptor Family in Tumorigenesis. *Cancers* 2021, 13, 206. <https://doi.org/cancers13020206>
3. Andres AC, Ziemiecki A. Eph and ephrin signaling in mammary gland morphogenesis and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2003 Oct;8(4):475-85. doi: 10.1023/B:JOMG.0000017433.83226.22. PMID: 14985642.
4. Andreucci E, Peppicelli S, Ruzzolini J, Bianchini F, Calorini L. Physicochemical aspects of the tumour microenvironment as drivers of vasculogenic mimicry. *Cancer Metastasis Rev.* 2022 Dec;41(4):935-951. doi: 10.1007/s10555-022-10067-x. Epub 2022 Oct 13. PMID: 36224457; PMCID: PMC9758104.
5. Arnold M, Morgan E, Rungay H, Mafra A, Singh D, Laversanne M, Vignat J, Gralow JR, Cardoso F, Siesling S, Soerjomataram I. Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *Breast.* 2022 Dec;66:15-23. doi: 10.1016/j.breast.2022.08.010. Epub 2022 Sep 2. PMID: 36084384; PMCID: PMC9465273.
6. Arora, S.; Scott, A.M.; Janes, P.W. Eph Receptors in Cancer. *Biomedicines* 2023, 11, 315. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020315>
7. Arthur A and Gronthos S (2021) Eph-Ephrin Signaling Mediates Cross-Talk Within the Bone Microenvironment. *Front. Cell Dev. Biol.* 9:598612. doi: 10.3389/fcell.2021.598612
8. Arvanitis D, Davy A. Eph/ephrin signaling: networks. *Genes Dev.* 2008 Feb 15;22(4):416-29. doi: 10.1101/gad.1630408. PMID: 18281458; PMCID: PMC2731651.
9. Barquilla A, Pasquale EB. Eph receptors and ephrins: therapeutic opportunities. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2015;55:465-87. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140226. Epub 2014 Oct 3. PMID: 25292427; PMCID: PMC4388660.
10. Beauchamp A, Debinski W. Ephs and ephrins in cancer: ephrin-A1 signalling. *Semin Cell Dev Biol.* 2012 Feb;23(1):109-15. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.10.019. Epub 2011 Oct 25. PMID: 22040911; PMCID: PMC3288643.
11. Bethany E Perez White & Spiro Getsios (2014) Eph receptor and ephrin function in breast, gut, and skin epithelia, *Cell Adhesion & Migration*, 8:4, 327-338, DOI: 10.4161/19336918.2014.970012
12. Bhushan L, Kandpal RP (2011) EphB6 Receptor Modulates Micro RNA Profile of Breast Carcinoma Cells. *PLoS ONE* 6(7): e22484. doi:10.1371/journal.pone.0022484
13. Bin Qu, Yeming Han, Ting Liang, Chao Zhang, Guihua Hou, Feng Gao, Evaluation of a novel EphA2 targeting peptide for triple negative breast cancer based on radionuclide molecular imaging, *Arabian Journal of Chemistry*, Volume 15, Issue 11, 2022, 104211, ISSN 1878-5352, <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104211>.
14. Brantley-Sieders D, Schmidt S, Parker M, Chen J. Eph receptor tyrosine kinases in tumor and tumor microenvironment. *Curr Pharm Des.* 2004;10(27):3431-42. doi: 10.2174/1381612043383160. PMID: 15544526.

15. Brantley-Sieders DM, Jiang A, Sarma K, Badu-Nkansah A, Walter DL, et al. (2011) Eph/Ephrin Profiling in Human Breast Cancer Reveals Significant Associations between Expression Level and Clinical Outcome. *PLoS ONE* 6(9): e24426. doi:10.1371/journal.pone.0024426
16. Brantley-Sieders DM, Jiang A, Sarma K, Badu-Nkansah A, Walter DL, et al. (2011) Eph/Ephrin Profiling in Human Breast Cancer Reveals Significant Associations between Expression Level and Clinical Outcome. *PLoS ONE* 6(9): e24426. doi:10.1371/journal.pone.0024426
17. Brantley-Sieders DM, Zhuang G, Hicks D, Fang WB, Hwang Y, Cates JM, Coffman K, Jackson D, Bruckheimer E, Muraoka-Cook RS, Chen J. The receptor tyrosine kinase EphA2 promotes mammary adenocarcinoma tumorigenesis and metastatic progression in mice by amplifying ErbB2 signaling. *J Clin Invest.* 2008 Jan;118(1):64-78. doi: 10.1172/JCI33154. PMID: 18079969; PMCID: PMC2129239.
18. Brantley-Sieders DM. Clinical relevance of Ephs and ephrins in cancer: lessons from breast, colorectal, and lung cancer profiling. *Semin Cell Dev Biol.* 2012 Feb;23(1):102-8. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.10.014. Epub 2011 Oct 21. PMID: 22040912; PMCID: PMC3288332.
19. Bush JO. Cellular and molecular mechanisms of EPH/EPHRIN signaling in evolution and development. *Curr Top Dev Biol.* 2022;149:153-201. doi: 10.1016/bs.ctdb.2022.02.005. Epub 2022 Mar 7. PMID: 35606056.
20. Castelli R, Tognolini M, Vacondio F, Incerti M, Pala D, Callegari D, Bertoni S, Giorgio C, Hassan-Mohamed I, Zanotti I, Bugatti A, Rusnati M, Festuccia C, Rivara S, Barocelli E, Mor M, Lodola A. $\Delta(5)$ -Cholenoyl-amino acids as selective and orally available antagonists of the Eph-ephrin system. *Eur J Med Chem.* 2015 Oct 20;103:312-24. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.08.048. Epub 2015 Aug 29. PMID: 26363867.
21. Cha JH, Chan LC, Wang YN, Chu YY, Wang CH, Lee HH, Xia W, Shyu WC, Liu SP, Yao J, Chang CW, Cheng FR, Liu J, Lim SO, Hsu JL, Yang WH, Hortobagyi GN, Lin C, Yang L, Yu D, Jeng LB, Hung MC. Ephrin receptor A10 monoclonal antibodies and the derived chimeric antigen receptor T cells exert an antitumor response in mouse models of triple-negative breast cancer. *J Biol Chem.* 2022 Apr;298(4):101817. doi: 10.1016/j.jbc.2022.101817. Epub 2022 Mar 10. PMID: 35278434; PMCID: PMC8988001.
22. Chen J. Regulation of tumor initiation and metastatic progression by Eph receptor tyrosine kinases. *Adv Cancer Res.* 2012;114:1-20. doi: 10.1016/B978-0-12-386503-8.00001-6. PMID: 22588054; PMCID: PMC3626259.
23. Chivot, J.; Ferrand, N.; Fert, A.; Van Dreden, P.; Morichon, R.; Sabbah, M. PARP Inhibitor Inhibits the Vasculogenic Mimicry through a NF- κ B-PTX3 Axis Signaling in Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 16171. <https://doi.org/10.3390/ijms232416171>
24. Chukkapalli S, Amessou M, Dilly AK, Dekhil H, Zhao J, Liu Q, Bejna A, Thomas RD, Bandyopadhyay S, Bismar TA, Neill D, Azoulay L, Batist G, Kandouz M. Role of the EphB2 receptor in autophagy, apoptosis and invasion in human breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 2014 Jan 15;320(2):233-46. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.10.022. Epub 2013 Nov 6. PMID: 24211352

25. Cowan CA, Henkemeyer M. The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature*. 2001 Sep 13;413(6852):174-9. doi: 10.1038/35093123. PMID: 11557983.
26. Damelin M, Bankovich A, Park A, Aguilar J, Anderson W, Santaguida M, Aujay M, Fong S, Khandke K, Pulito V, Ernstoff E, Escarpe P, Bernstein J, Pysz M, Zhong W, Upeslaciis E, Lucas J, Lucas J, Nichols T, Loving K, Foord O, Hampl J, Stull R, Barletta F, Falahatpisheh H, Sapra P, Gerber HP, Dylla SJ. Anti-EFNA4 Calicheamicin Conjugates Effectively Target Triple-Negative Breast and Ovarian Tumor-Initiating Cells to Result in Sustained Tumor Regressions. *Clin Cancer Res*. 2015 Sep 15;21(18):4165-73. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0695. Epub 2015 May 26. PMID: 26015513.
27. de Boer ECW, van Gils JM, van Gils MJ. Ephrin-Eph signaling usage by a variety of viruses. *Pharmacol Res*. 2020 Sep;159:105038. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105038. Epub 2020 Jun 18. PMID: 32565311
28. De Muijnck C, van Gorkom Y, van Duijvenvoorde M, Eghtesadi M, Dekker-Ensink G, Bhairosingh SS, Affinito A, Kuppen PJK, Vahrmeijer AL, Sier CFM. Evaluation of EphB4 as Target for Image-Guided Surgery of Breast Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020 Jul 30;13(8):172. doi: 10.3390/ph13080172. PMID: 32751634; PMCID: PMC7464973.
29. Ding J, Yao Y, Huang G, Wang X, Yi J, Zhang N, Liu C, Wang K, Zhang Y, Wang M, Liu P, Ye M, Li M, Cheng H. Targeting the EphB4 receptor tyrosine kinase sensitizes HER2-positive breast cancer cells to Lapatinib. *Cancer Lett*. 2020 Apr 10;475:53-64. doi: 10.1016/j.canlet.2020.01.032. Epub 2020 Jan 29. PMID: 32006616.
30. Ebrahim, A.S.; Hailat, Z.; Bandyopadhyay, S.; Neill, D.; Kandouz, M. The Value of EphB2 Receptor and Cognate Ephrin Ligands in Prognostic and Predictive Assessments of Human Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 8098. <https://doi.org/10.3390/ijms22158098>
31. Fang WB, Brantley-Sieders DM, Parker MA, Reith AD, Chen J. A kinase-dependent role for EphA2 receptor in promoting tumor growth and metastasis. *Oncogene*. 2005 Nov 24;24(53):7859-68. doi: 10.1038/sj.onc.1208937. PMID: 16103880.
32. Ferrari FR, Giorgio C, Zappia A, Ballabeni V, Bertoni S, Barocelli E, Scalvini L, Galvani F, Mor M, Lodola A, Tognolini M. Pharmacological characterization of second generation FXR agonists as effective EphA2 antagonists: A successful application of target hopping approach. *Biochem Pharmacol*. 2023 Mar;209:115452. doi: 10.1016/j.bcp.2023.115452. Epub 2023 Feb 13. PMID: 36792038.
33. Fox BP, Kandpal RP. Invasiveness of breast carcinoma cells and transcript profile: Eph receptors and ephrin ligands as molecular markers of potential diagnostic and prognostic application. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jun 11;318(4):882-92. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.04.102. PMID: 15147954.
34. Fu DY, Wang ZM, Wang BL, Chen L, Yang WT, Shen ZZ, Huang W, Shao ZM. Frequent epigenetic inactivation of the receptor tyrosine kinase EphA5 by promoter methylation in human breast cancer. *Hum Pathol*. 2010 Jan;41(1):48-58. doi: 10.1016/j.humpath.2009.06.007. Epub 2009 Sep 5. PMID: 19733895.
35. Giorgio C, Incerti M, Corrado M, Rusnati M, Chiodelli P, Russo S, Callegari D, Ferlenghi F, Ballabeni V, Barocelli E, Lodola A, Tognolini M. Pharmacological evaluation of new

- bioavailable small molecules targeting Eph/ephrin interaction. *Biochem Pharmacol.* 2018 Jan;147:21-29. doi: 10.1016/j.bcp.2017.11.002. Epub 2017 Nov 10. PMID: 29129483.
36. Goutas, D.; Pergaris, A.; Goutas, N.; Theocharis, S. Utilizing Exosomal-EPHs/Ephrins as Biomarkers and as a Potential Platform for Targeted Delivery of Therapeutic Exosomes. *Int. J. Mol. Sci.* 2022,23,3551. [https://doi.org/ 10.3390/ijms23073551](https://doi.org/10.3390/ijms23073551).
37. Gucciardo E, Sugiyama N, Lehti K. Eph- and ephrin-dependent mechanisms in tumor and stem cell dynamics. *Cell Mol Life Sci.* 2014 Oct;71(19):3685-710. doi: 10.1007/s00018-014-1633-0. Epub 2014 May 4. PMID: 24794629.
38. Guo Z, He B, Yuan L, Dai W, Zhang H, Wang X, Wang J, Zhang X, Zhang Q. Dual targeting for metastatic breast cancer and tumor neovasculature by EphA2-mediated nanocarriers. *Int J Pharm.* 2015 Sep 30;493(1-2):380-9. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.05.051. Epub 2015 May 21. PMID: 26004003.
39. Haldimann M, Custer D, Munarini N, Stirnimann C, Zürcher G, Rohrbach V, Djonov V, Ziemięcki A, Andres AC. Deregulated ephrin-B2 expression in the mammary gland interferes with the development of both the glandular epithelium and vasculature and promotes metastasis formation. *Int J Oncol.* 2009 Sep;35(3):525-36. doi: 10.3892/ijo_00000364. PMID: 19639173.
40. Han B, Zhang H, Tian R, Liu H, Wang Z, Wang Z, Tian J, Cui Y, Ren S, Zuo X, Tian R, Niu R, Zhang F. Exosomal EPHA2 derived from highly metastatic breast cancer cells promotes angiogenesis by activating the AMPK signaling pathway through Ephrin A1-EPHA2 forward signaling. *Theranostics.* 2022 May 13;12(9):4127-4146. doi: 10.7150/thno.72404. PMID: 35673569; PMCID: PMC9169374.
41. Huang J, Xiao D, Li G, Ma J, Chen P, Yuan W, Hou F, Ge J, Zhong M, Tang Y, Xia X, Chen Z. EphA2 promotes epithelial-mesenchymal transition through the Wnt/ β -catenin pathway in gastric cancer cells. *Oncogene.* 2014 May 22;33(21):2737-47. doi: 10.1038/onc.2013.238. Epub 2013 Jun 10. PMID: 23752181.
42. Husa AM, Magić Ž, Larsson M, Fornander T, Pérez-Tenorio G. EPH/ephrin profile and EPHB2 expression predicts patient survival in breast cancer. *Oncotarget.* 2016 Apr 19;7(16):21362-80. doi: 10.18632/oncotarget.7246. PMID: 26870995; PMCID: PMC5008291.
43. Inagaki Y, Tokunaga T, Yanai M, Wu D, Huang J, Nagase H, Fukuda N, Ozaki T, Soma M, Fujiwara K. Silencing of EPHB2 promotes the epithelial-mesenchymal transition of skin squamous cell carcinoma-derived A431 cells. *Oncol Lett.* 2019 Apr;17(4):3735-3742. doi: 10.3892/ol.2019.10019. Epub 2019 Feb 6. PMID: 30881495; PMCID: PMC6403506.
44. Ireton RC, Chen J. EphA2 receptor tyrosine kinase as a promising target for cancer therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets.* 2005 May;5(3):149-57. doi: 10.2174/1568009053765780. PMID: 15892616.
45. Janes PW, Vail ME, Ernst M, Scott AM. Eph Receptors in the Immunosuppressive Tumor Microenvironment. *Cancer Res.* 2021 Feb 15;81(4):801-805. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-3047. Epub 2020 Nov 11. PMID: 33177063.
46. Johnson C, Segovia B, Kandpal RP. EPHA7 and EPHA10 Physically Interact and Differentially Co-localize in Normal Breast and Breast Carcinoma Cell Lines, and the Co-localization Pattern Is Altered in EPHB6-expressing MDA-MB-231 Cells. *Cancer*

- Genomics Proteomics. 2016 09-10;13(5):359-68. PMID: 27566654; PMCID: PMC5070625.
47. Jørgensen C, Sherman A, Chen GI, Pasculescu A, Poliakov A, Hsiung M, Larsen B, Wilkinson DG, Linding R, Pawson T. Cell-specific information processing in segregating populations of Eph receptor ephrin-expressing cells. *Science*. 2009 Dec 11;326(5959):1502-9. doi: 10.1126/science.1176615. PMID: 20007894.
 48. Kamada H, Taki S, Nagano K, Inoue M, Ando D, Mukai Y, Higashisaka K, Yoshioka Y, Tsutsumi Y, Tsunoda S. Generation and characterization of a bispecific diabody targeting both EPH receptor A10 and CD3. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Jan 24;456(4):908-12. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.030. Epub 2014 Dec 17. PMID: 25528586.
 49. Kandouz M. The Eph/Ephrin family in cancer metastasis: communication at the service of invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 2012 Jun;31(1-2):353-73. doi: 10.1007/s10555-012-9352-1. PMID: 22549394.
 50. Kou CJ, Kandpal RP. Differential Expression Patterns of Eph Receptors and Ephrin Ligands in Human Cancers. *Biomed Res Int*. 2018 Feb 28;2018:7390104. doi: 10.1155/2018/7390104. PMID: 29682554; PMCID: PMC5851329.
 51. Lau A, Le N, Nguyen C, Kandpal RP. Signals transduced by Eph receptors and ephrin ligands converge on MAP kinase and AKT pathways in human cancers. *Cell Signal*. 2023 Apr;104:110579. doi: 10.1016/j.cellsig.2022.110579. Epub 2022 Dec 23. PMID: 36572189.
 52. Li Y, Jin L, Ye F, Ma Q, Yang Z, Liu D, Yang J, Ma D, Gao Q. Isoform expression patterns of EPHA10 protein mediate breast cancer progression by regulating the E-Cadherin and β -catenin complex. *Oncotarget*. 2017 May 2;8(18):30344-30356. doi: 10.18632/oncotarget.15910. PMID: 28427223; PMCID: PMC5444747.
 53. Liang Z, Wang X, Dong K, Li X, Qin C, Zhou H. Expression Pattern and Prognostic Value of EPHA/EFNA in Breast Cancer by Bioinformatics Analysis: Revealing Its Importance in Chemotherapy. *Biomed Res Int*. 2021 Apr 22;2021:5575704. doi: 10.1155/2021/5575704. PMID: 33977106; PMCID: PMC8087473.
 54. Lin B, Du L, Li H, Zhu X, Cui L, Li X. Tumor-infiltrating lymphocytes: Warriors fight against tumors powerfully. *Biomed Pharmacother*. 2020 Dec;132:110873. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110873. Epub 2020 Oct 14. PMID: 33068926.
 55. Liu W, Yu C, Li J, and Fang J (2022) The Roles of EphB2 in Cancer. *Front. Cell Dev. Biol*. 10:788587. doi: 10.3389/fcell.2022.788587
 56. Lodola A, Giorgio C, Incerti M, Zanotti I, Tognolini M. Targeting Eph/ephrin system in cancer therapy. *Eur J Med Chem*. 2017 Dec 15;142:152-162. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.07.029. Epub 2017 Jul 18. PMID: 28780190.
 57. Lv XY, Wang J, Huang F, Wang P, Zhou JG, Wei B, Li SH. EphA3 contributes to tumor growth and angiogenesis in human gastric cancer cells. *Oncol Rep*. 2018 Oct;40(4):2408-2416. doi: 10.3892/or.2018.6586. Epub 2018 Jul 20. PMID: 30066881.
 58. Merlos-Suárez A, Batlle E. Eph-ephrin signalling in adult tissues and cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 2008 Apr;20(2):194-200. doi: 10.1016/j.ceb.2008.01.011. Epub 2008 Mar 18. PMID: 18353626.

59. Morales-Guadarrama,G.; García-Becerra, R.; Méndez-Pérez, E.A.; García-Quiroz, J.; Avila, E.; Díaz, L. Vasculogenic Mimicry in Breast Cancer: Clinical Relevance and Drivers.Cells2021,10,1758. [https:// doi.org/10.3390/cells10071758](https://doi.org/10.3390/cells10071758)
60. Nagano K, Kanasaki S, Yamashita T, Maeda Y, Inoue M, Higashisaka K, Yoshioka Y, Abe Y, Mukai Y, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S. Expression of Eph receptor A10 is correlated with lymph node metastasis and stage progression in breast cancer patients. *Cancer Med.* 2013 Dec;2(6):972-7. doi: 10.1002/cam4.156. Epub 2013 Nov 7. PMID: 24403271; PMCID: PMC3892402.
61. Nagano K, Maeda Y, Kanasaki S, Watanabe T, Yamashita T, Inoue M, Higashisaka K, Yoshioka Y, Abe Y, Mukai Y, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S. Ephrin receptor A10 is a promising drug target potentially useful for breast cancers including triple negative breast cancers. *J Control Release.* 2014 Sep 10;189:72-9. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.06.010. Epub 2014 Jun 16. PMID: 24946238.
62. Nagano K. Development and Evaluation of Antibody Proteomics Technology for Rapid and Comprehensive Identification of Potential Biomarkers and Therapeutic Targets. *Biol Pharm Bull.* 2018;41(5):663-669. doi: 10.1248/bpb.b17-01041. PMID: 29709904.
63. Nikas I, Ryu HS, Theocharis S. Viewing the Eph receptors with a focus on breast cancer heterogeneity. *Cancer Lett.* 2018 Oct 10;434:160-171. doi: 10.1016/j.canlet.2018.07.030. Epub 2018 Jul 25. PMID: 30055288.
64. Nikas, I.; Giaginis, C.; Petrouska, K.; Alexandrou, P.; Michail, A.; Sarantis, P.; Tsouroufflis, G.; Danas, E.; Pergaris, A.; Politis, P.K.; et al. EPHA2, EPHA4, and EPHA7 Expression in Triple-Negative Breast Cancer. *Diagnostics*2022,12,366. [https:// doi.org/10.3390/diagnostics 12020366](https://doi.org/10.3390/diagnostics 12020366) .
65. Nikolov DB, Xu K, Himanen JP. Eph/ephrin recognition and the role of Eph/ephrin clusters in signaling initiation. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Oct;1834(10):2160-5. doi: 10.1016/j.bbapap.2013.04.020. Epub 2013 Apr 26. PMID: 23628727; PMCID: PMC3777820.
66. Noberini R, Lamberto I, Pasquale EB. Targeting Eph receptors with peptides and small molecules: progress and challenges. *Semin Cell Dev Biol.* 2012 Feb;23(1):51-7. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.10.023. Epub 2011 Oct 25. PMID: 22044885; PMCID: PMC3319464.
67. Oscar J Buckens, Btissame El Hassouni, Elisa Giovannetti & Godefridus J Peters (2020) The role of Eph receptors in cancer and how to target them: novel approaches in cancer treatment, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 29:6, 567-582, DOI: 10.1080/13543784.2020.1762566 .
68. Papadakos, S.P.; Dedes, N.; Gkolemi, N.; Machairas, N.; Theocharis, S. The EPH/Ephrin System in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC): From Pathogenesis to Treatment. *Int. J. Mol. Sci.*2023,24,3015. <https://doi.org/ 10.3390/ijms24033015>
69. Papadakos, S.P.; Petrogiannopoulos, L.; Pergaris, A.; Theocharis, S. The EPH/Ephrin System in Colorectal Cancer. *Int. J. Mol.Sci.*2022,23,2761. [https:// doi.org/10.3390/ijms23052761](https://doi.org/10.3390/ijms23052761).
70. Paul JM, Toosi B, Vizeacoumar FS, Bhanumathy KK, Li Y, Gerger C, El Zawily A, Freywald T, Anderson DH, Mousseau D, Kanthan R, Zhang Z, Vizeacoumar FJ, Freywald A. Targeting synthetic lethality between the SRC kinase and the EPHB6

- receptor may benefit cancer treatment. *Oncotarget*. 2016 Aug 2;7(31):50027-50042. doi: 10.18632/oncotarget.10569. PMID: 27418135; PMCID: PMC5226566.
71. Peng J, Zhang D. Coexpression of EphA10 and Gli3 promotes breast cancer cell proliferation, invasion and migration. *J Investig Med*. 2021 Aug;69(6):1215-1221. doi: 10.1136/jim-2021-001836. Epub 2021 May 14. PMID: 33990369; PMCID: PMC8327407.
 72. Pergaris, A.; Danas, E.; Goutas, D.; Sykaras, A.G.; Soranidis, A.; Theocharis, S. The Clinical Impact of the Eph/Ephrin System in Cancer: Unwinding the Thread. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 8412. <https://doi.org/10.3390/ijms22168412>
 73. Philip Kaenel, Mischa Mosimann & Anne-Catherine Andres (2012) The multifaceted roles of Eph/ephrin signaling in breast cancer, *Cell Adhesion & Migration*, 6:2, 138-147, DOI 10.4161/cam.20154
 74. Poliakov A, Cotrina M, Wilkinson DG. Diverse roles of eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. *Dev Cell*. 2004 Oct;7(4):465-80. doi: 10.1016/j.devcel.2004.09.006. PMID: 15469835.
 75. Rezaie E, Amani J, Bidmeshki Pour A, Mahmoodzadeh Hosseini H. A new scfv-based recombinant immunotoxin against EPHA2-overexpressing breast cancer cells; High in vitro anti-cancer potency. *Eur J Pharmacol*. 2020 Mar 5;870:172912. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.172912. Epub 2020 Jan 10. PMID: 31926992.
 76. Riedl SJ, Pasquale EB. Targeting the Eph System with Peptides and Peptide Conjugates. *Curr Drug Targets*. 2015;16(10):1031-47. doi: 10.2174/1389450116666150727115934. PMID: 26212263; PMCID: PMC4861043.
 77. Rusnati M, Paiardi G, Tobia C, Urbinati C, Lodola A, D'Ursi P, Corrado M, Castelli R, Wade RC, Tognolini M, Chiodelli P. Cholenic acid derivative UniPR1331 impairs tumor angiogenesis via blockade of VEGF/VEGFR2 in addition to Eph/ephrin. *Cancer Gene Ther*. 2022 Jul;29(7):908-917. doi: 10.1038/s41417-021-00379-5. Epub 2021 Aug 23. Erratum in: *Cancer Gene Ther*. 2021 Sep 30;: PMID: 34426652; PMCID: PMC9293752.
 78. Saha N, Robev D, Mason EO, Himanen JP, Nikolov DB. Therapeutic potential of targeting the Eph/ephrin signaling complex. *Int J Biochem Cell Biol*. 2018 Dec;105:123-133. doi: 10.1016/j.biocel.2018.10.006. Epub 2018 Oct 19. PMID: 30343150; PMCID: PMC6457248.
 79. Salem AF, Wang S, Billet S, Chen JF, Udompholkul P, Gambini L, Baggio C, Tseng HR, Posadas EM, Bhowmick NA, Pellecchia M. Reduction of Circulating Cancer Cells and Metastases in Breast-Cancer Models by a Potent EphA2-Agonistic Peptide-Drug Conjugate. *J Med Chem*. 2018 Mar 8;61(5):2052-2061. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01837. Epub 2018 Feb 27. PMID: 29470068; PMCID: PMC5907794.
 80. Schmitt F, Nguyen PH, Gupta N, Mayer D. Eph receptor B4 is a regulator of estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *J Recept Signal Transduct Res*. 2013 Aug;33(4):244-8. doi: 10.3109/10799893.2013.795971. Epub 2013 May 31. PMID: 23725356.
 81. Schwill M, Tamaskovic R, Gajadhar AS, Kast F, White FM, Plückthun A. Systemic analysis of tyrosine kinase signaling reveals a common adaptive response program in a HER2-positive breast cancer. *Sci Signal*. 2019 Jan 22;12(565):eaau2875. doi: 10.1126/scisignal.aau2875. PMID: 30670633; PMCID: PMC6546113.

82. Shiuan E, Chen J. Eph Receptor Tyrosine Kinases in Tumor Immunity. *Cancer Res.* 2016 Nov 15;76(22):6452-6457. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1521. Epub 2016 Nov 3. PMID: 27811149; PMCID: PMC5290221.
83. Song W, Hwang Y, Youngblood VM, Cook RS, Balko JM, Chen J, Brantley-Sieders DM. Targeting EphA2 impairs cell cycle progression and growth of basal-like/triple-negative breast cancers. *Oncogene.* 2017 Oct 5;36(40):5620-5630. doi: 10.1038/onc.2017.170. Epub 2017 Jun 5. PMID: 28581527; PMCID: PMC5629103.
84. Su Q, Wang J, Wu Q, Ullah A, Ghauri MA, Sarwar A, Chen L, Liu F, Zhang Y. Sanguinarine combats hypoxia-induced activation of EphB4 and HIF-1 α pathways in breast cancer. *Phytomedicine.* 2021 Apr;84:153503. doi: 10.1016/j.phymed.2021.153503. Epub 2021 Feb 9. PMID: 33636580.
85. Taki S, Kamada H, Inoue M, Nagano K, Mukai Y, Higashisaka K, et al. (2015) A Novel Bispecific Antibody against Human CD3 and Ephrin Receptor A10 for Breast Cancer Therapy. *PLoS ONE* 10(12): e0144712. doi:10.1371/journal.pone.0144712
86. Tanaka T, Yamada H, Kuroki M, Kodama S, Tamura K, Takamatsu Y. A Modified Adenovirus Vector-Mediated Antibody Screening Method Identifies EphA2 as a Cancer Target. *Transl Oncol.* 2017 Aug;10(4):476-484. doi: 10.1016/j.tranon.2017.04.001. Epub 2017 May 12. PMID: 28505517; PMCID: PMC5430157.
87. Taylor H, Campbell J, Nobes CD. Ephs and ephrins. *Curr Biol.* 2017 Feb 6;27(3):R90-R95. doi: 10.1016/j.cub.2017.01.003. PMID: 28171762.
88. Toosi BM, El Zawily A, Truitt L, Shannon M, Allonby O, Babu M, DeCoteau J, Mousseau D, Ali M, Freywald T, Gall A, Vizeacoumar FS, Kirzinger MW, Geyer CR, Anderson DH, Kim T, Welm AL, Siegel P, Vizeacoumar FJ, Kusalik A, Freywald A. EPHB6 augments both development and drug sensitivity of triple-negative breast cancer tumours. *Oncogene.* 2018 Jul;37(30):4073-4093. doi: 10.1038/s41388-018-0228-x. Epub 2018 Apr 27. PMID: 29700392; PMCID: PMC6062499.
89. Truitt L, Freywald T, DeCoteau J, Sharfe N, Freywald A. The EphB6 receptor cooperates with c-Cbl to regulate the behavior of breast cancer cells. *Cancer Res.* 2010 Feb 1;70(3):1141-53. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1710. Epub 2010 Jan 19. PMID: 20086179.
90. Tsouko E, Wang J, Frigo DE, Aydođdu E, Williams C. miR-200a inhibits migration of triple-negative breast cancer cells through direct repression of the EPHA2 oncogene. *Carcinogenesis.* 2015 Sep;36(9):1051-60. doi: 10.1093/carcin/bgv087. Epub 2015 Jun 18. PMID: 26088362; PMCID: PMC5975720.
91. Vasileiou I, Adamakis I, Patsouris E, Theocharis S. Ephrins and pain. *Expert Opin Ther Targets.* 2013 Aug;17(8):879-87. doi: 10.1517/14728222.2013.801456. Epub 2013 Jun 8. PMID: 23746169.
92. Vaught D, Brantley-Sieders DM, Chen J. Eph receptors in breast cancer: roles in tumor promotion and tumor suppression. *Breast Cancer Res.* 2008;10(6):217. doi: 10.1186/bcr2207. Epub 2008 Dec 22. PMID: 19144211; PMCID: PMC2656900.
93. Washburn HR, Chander P, Srikanth KD, Dalva MB. Transsynaptic Signaling of Ephs in Synaptic Development, Plasticity, and Disease. *Neuroscience.* 2023 Jan 1;508:137-152. doi: 10.1016/j.neuroscience.2022.11.030. Epub 2022 Nov 29. PMID: 36460219.

94. Wilson K, Shiuan E, Brantley-Sieders DM. Oncogenic functions and therapeutic targeting of EphA2 in cancer. *Oncogene*. 2021 Apr;40(14):2483-2495. doi: 10.1038/s41388-021-01714-8. Epub 2021 Mar 8. PMID: 33686241; PMCID: PMC8035212.
95. Wolf K, Hu H, Isaji T, Dardik A. Molecular identity of arteries, veins, and lymphatics. *J Vasc Surg*. 2019 Jan;69(1):253-262. doi: 10.1016/j.jvs.2018.06.195. Epub 2018 Aug 25. PMID: 30154011; PMCID: PMC6309638.
96. Wu J, Luo H. Recent advances on T-cell regulation by receptor tyrosine kinases. *Curr Opin Hematol*. 2005 Jul;12(4):292-7. doi: 10.1097/01.moh.0000166497.26397.9f. PMID: 15928486.
97. Wu Q, Suo Z, Risberg B, Karlsson MG, Villman K, Nesland JM. Expression of Ephb2 and Ephb4 in breast carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2004;10(1):26-33. doi: 10.1007/BF02893405. Epub 2004 Mar 18. PMID: 15029258.
98. Yin H, Lu C, Tang Y, Wang H, Wang H, Wang J. Enhanced expression of EphrinB1 is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in breast cancer. *Cancer Biomark*. 2013;13(4):261-7. doi: 10.3233/CBM-130356. PMID: 24240587.
99. Yu G, Luo H, Wu Y, Wu J. Ephrin B2 induces T cell costimulation. *J Immunol*. 2003 Jul 1;171(1):106-14. doi: 10.4049/jimmunol.171.1.106. PMID: 12816988.
100. Zadeh T, Lucero M, Kandpal RP. Artesunate-induced Cellular Effects Are Mediated by Specific EPH Receptors and Ephrin Ligands in Breast Carcinoma Cells. *Cancer Genomics Proteomics*. 2022 Jan-Feb;19(1):19-26. doi: 10.21873/cgp.20300. PMID: 34949656; PMCID: PMC8717954.
101. Zang X, Ding H, Zhao X, Li X, Du Z, Hu H, Qiao M, Chen D, Deng Y, Zhao X. Anti-EphA10 antibody-conjugated pH-sensitive liposomes for specific intracellular delivery of siRNA. *Int J Nanomedicine*. 2016 Aug 17;11:3951-67. doi: 10.2147/IJN.S107952. PMID: 27574425; PMCID: PMC4993279.
102. Zhang J, Du Z, Pan S, Shi M, Li J, Yang C, Hu H, Qiao M, Chen D, Zhao X. Overcoming Multidrug Resistance by Codelivery of MDR1-Targeting siRNA and Doxorubicin Using EphA10-Mediated pH-Sensitive Lipoplexes: In Vitro and In Vivo Evaluation. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018 Jun 27;10(25):21590-21600. doi: 10.1021/acsami.8b01806. Epub 2018 Jun 13. PMID: 29798663.
103. Zhang T, Li J, Ma X, Yang Y, Sun W, Jin W, Wang L, He Y, Yang F, Yi Z, Hua Y, Liu M, Chen Y, Cai Z. Inhibition of HDACs-EphA2 Signaling Axis with WW437 Demonstrates Promising Preclinical Antitumor Activity in Breast Cancer. *EBioMedicine*. 2018 May;31:276-286. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.05.003. Erratum in: *EBioMedicine*. 2020 Feb;52:102629. PMID: 29759486; PMCID: PMC6013969.
104. Zhao P, Jiang D, Huang Y, Chen C. EphA2: A promising therapeutic target in breast cancer. *J Genet Genomics*. 2021 Apr 20;48(4):261-267. doi: 10.1016/j.jgg.2021.02.011. Epub 2021 Mar 29. PMID: 33962882.
105. Zhou D, Ren K, Wang J, Ren H, Yang W, Wang W, Li Q, Liu X, Tang F. Erythropoietin-producing hepatocellular A6 overexpression is a novel biomarker of poor prognosis in patients with breast cancer. *Oncol Lett*. 2018 Apr;15(4):5257-5263. doi: 10.3892/ol.2018.7919. Epub 2018 Feb 1. PMID: 29552165; PMCID: PMC5840743.

106. Zhou X, Tu P, Chen X, Guo S, Wang J. Eph Receptors: Actors in Tumor Microenvironment. *Crit Rev Oncog*. 2017;22(5-6):499-505. doi: 10.1615/CritRevOncog.2017020557. PMID: 29604927.
107. Zhuang G, Brantley-Sieders DM, Vaught D, Yu J, Xie L, Wells S, Jackson D, Muraoka-Cook R, Arteaga C, Chen J. Elevation of receptor tyrosine kinase EphA2 mediates resistance to trastuzumab therapy. *Cancer Res*. 2010 Jan 1;70(1):299-308. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1845. Epub 2009 Dec 22. PMID: 20028874; PMCID: PMC3859619.