



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



Διδακτορική διατριβή

**Αλληλεπίδραση αυξητικών παραγόντων IGF-I/EGF και οιστραδιόλης
στις λειτουργίες καρκινικών κυττάρων του μαστού:
Διερεύνηση σηματοδοτικών μονοπατιών και συμβολή μακρομορίων της
εξωκυττάριας ουσίας**

Βουδούρη Ν. Καλλιρρόη

Ηράκλειο, 2018



**University of Crete
Department of Medicine**



PhD Thesis

**Crosstalk of growth factors IGF-I/EGF and estradiol signaling pathways
on breast cancer cell functions:
Study of signaling pathways and participation of extracellular matrix
molecules**

Voudouri N. Kallirroï

Heraklion, 2018

Εξεταστική επιτροπή

Επιβλέπων καθηγητής

Γεώργιος Τζανακάκης, καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Μέλη τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής

Νικόλαος Καραμάνος, καθηγητής Πανεπιστημίου Πατρών

Κωνσταντίνος Κρασαγάκης, αναπλ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Μέλη εξεταστικής επιτροπής

Δημήτριος Μαυρουδής, καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Γεώργιος Χαλκιαδάκης, καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Μαρία Τζαρδή, αναπλ. καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης

Ιωάννης Τσιαούσης, επικ. καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Η παρούσα διδακτορική διατριβή στηρίχθηκε σε τέσσερις δημοσιεύσεις:

1. Voudouri K., Nikitovic D., Berdiaki Ai., Tsiaoussis J., Kletsas D., Karamanos N.K. and Tzanakakis G.N., Data on the putative role of p53 in breast cancer cell adhesion:technical information for adhesion assay. Data in Brief (2016) Dec; 9: 568–572.
2. Voudouri K., Nikitovic D., Berdiaki Ai., Kletsas D., Karamanos N. K., Tzanakakis, G. N., IGF-I/ EGF and E2 signaling crosstalk through IGF-IR conduit point affect breast cancer cell adhesion, Matrix Biology (2016) doi: 10.1016/j.matbio.2016.06.005
3. Voudouri K., Berdiaki K., Tzardi M., Tzanakakis G.N., Nikitovic D. (2015). Insulin-Like Growth Factor and Epidermal Growth Factor Signaling in Breast Cancer Cell Growth: Focus on Endocrine Resistant Disease. Analytical Cellular Pathology (2015) 975495. doi: 10.1155/2015/975495.
4. Nikitovic D., Kouvidi K., Voudouri K., Berdiaki A., Karousou E., Passi A., Tzanakakis G.N. (2014). The motile breast cancer phenotype- roles of proteoglycans/ glycosaminoglycans. BioMed Research International (2014) Article ID 124321

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) - Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: ΘΑΛΗΣ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου. *«Συμβολή της ενδοκοιττάριας επικοινωνίας των ERα/β με τους EGFR και IGF-IR στην ανάπτυξη και πρόοδο του καρκίνου του μαστού: Λειτουργικές ιδιότητες κοττάρων, έκφραση βιοδραστικών μορίων και επαγωγή EMT».*



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Πρόλογος

Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής αποτελεί για τον κάθε υποψήφιο διδάκτορα ένα προσωπικό ταξίδι προς την επιστημονική κατάρτιση αλλά και την προσωπική ολοκλήρωση. Στην παρούσα ενότητα, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω, όλους όσους ήταν αναγκαίο να συμμετέχουν, με τον έναν ή τον άλλο τρόπο για να ολοκληρωθεί το παρόν διδακτορικό, επιβεβαιώνοντας με τον καλύτερο δυνατό τρόπο πως το ταξίδι της γνώσης δεν τελειώνει ποτέ. Και όπως όλα τα ταξίδια, ακόμα και τα πιο μοναχικά, έτσι κι αυτό εδώ, απαραίτητο συστατικό του έχει τους συνοδοιπόρους. Σε όλους αυτούς, που δίχως αυτούς δε θα τα είχα καταφέρει, αφιερώνεται το παρόν κομμάτι.

Καταρχάς, νιώθω την ανάγκη να εκφράσω τις ελικρινείς μου ευχαριστίες, στον καθηγητή μου, κ. Τζανακάκη Γεώργιο, γιατί μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, με εμπιστεύτηκε για τη διεκπεραίωση ενός σημαντικού για το εργαστήριο ερευνητικού προγράμματος και με καθοδήγησε με υπομονή σε όλη τη διάρκεια της απασχόλησής μου στο εργαστήριο. Τον ευχαριστώ για την εκπαιδευτική μας αλληλεπίδραση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε κάθε δραστηριότητα του εργαστηρίου, ερευνητική και εκπαιδευτική. Η παραμονή μου στο εργαστήριο είχε, λόγω αυτών των γεγονότων, και παιδαγωγικό χαρακτήρα. Ακόμα, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην επίκουρη καθηγήτρια κα. Νικίτοβιτς Ντράγκανα, που είχε άμεση επίβλεψη του διδακτορικού και ήταν πάντα πρόθυμη να συζητήσουμε οτιδήποτε αφορούσε τη μελέτη μας. Επίσης, την ευχαριστώ για τις παρατηρήσεις της, την εποικοδομητική καθοδήγηση της στο κομμάτι του σχεδιασμού και την καθοριστική της συμβολή και συνεργασία στη συγγραφή των δημοσιεύσεων. Την ευχαριστώ πολύ για το χρόνο που κατανάλωσε για όλες τις σχετικές με το διδακτορικό δραστηριότητες μας και για την υπομονή της στο κομμάτι της εκπαίδευσής μου στη συγγραφή, που ήταν καθοριστικό για μένα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ, οφείλω στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια και φίλη Δρ. Μπερδιάκη Αικατερίνη, για όλη τη βοήθεια που μου προσέφερε πάντοτε απλόχερα, για την υποστήριξη και την καθοδήγηση, όποτε αυτό ήταν απαραίτητο.

Ακόμα, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω, θερμά, τον καθηγητή κ. Καραμάνο Νικόλαο, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής του διδακτορικού μου, για την υποστήριξη -επιστημονική και οικονομική- σε όλη τη διάρκεια της διατριβής, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω σε ένα ερευνητικό πρόγραμμα μεγάλου μεγέθους,

σε συνέδρια και συναντήσεις του προγράμματος που υπήρξαν πολύ εκπαιδευτικά για μένα. Τον ευχαριστώ ακόμα, και για τη συμβολή του στη συγγραφή των δημοσιεύσεων.

Ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου, όλα τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής του διδακτορικού μου, που με τίμησαν και δέχτηκαν να συμμετέχουν στην αξιολόγηση μου: τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Κρασαγάκη Κωνσταντίνο, που συμμετέχει και στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή μου, τους καθηγητές κ. Χαλκιάδακη Γεώργιο και κ. Μαυρουδή Δημήτριο, την αναπληρώτρια καθηγήτρια κα. Τζαρδή Μαρία, τον επίκουρο καθηγητή κ. Τσιαούση Ιωάννη.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συναδέλφους μου στο εργαστήριο που έκαναν την καθημερινότητα μου ιδιαίτερα ευχάριστη: την Δρ. Κουβίδη Κατερίνα, τη Δρ. Φθενού Ελένη και τη Δρ. Χαλκιάδακη Γεωργία που με βοήθησαν τον πρώτο καιρό στο εργαστήριο. Την αγαπημένη μου φίλη: Καβάση Ραφαέλα- Μαρία, που έκανε την κάθε μέρα ευχάριστη με την καλή της κουβέντα και την υπομονή της, όσο έγγραφα αλλά και όσο δούλευα στον πάγκο. Ευχαριστώ τον αγαπημένο μου φίλο, γιατρό Κωνσταντίνο Κεχαγιά, τόσο για τις μέρες που περάσαμε ευχάριστα στο εργαστήριο δουλεύοντας, όσο και για τις μέρες έξω από αυτό, αλλά και για τη βοήθεια και τις παρατηρήσεις του στο εισαγωγικό μέρος της διατριβής. Ευχαριστώ τις φοιτήτριες: Γιαρμαντζιάδη Σοφία, Πιτσιδιανάκη Ιωάννα και Φτίκα Σταυρούλα για τη βοήθεια τους στα πειράματα, στα πλαίσια των διπλωματικών εργασιών τους. Ευχαριστώ την τεχνικό κα. Μπουραντά Μαρία, για τη συνεισφορά της στο πειραματικό μέρος. Ευχαριστώ, ακόμα, την Δρ. Σπυριδάκη Ιωάννα και την κα. Κοκκινάκη Ευριδίκη για όσα μου προσέφεραν στην κοινή μας καθημερινότητα στο εργαστήριο Ιστολογίας. Τέλος, ευχαριστώ τους προπτυχιακούς φοιτητές (κατά τη διάρκεια της διατριβής): Μωραΐτη Ρενάτα, Αντωνιάδου Κωνσταντίνα, Γιαταγάνα Ειρήνη, Φανουράκη Γωγώ, Κρασανάκη Θεωδωρή και Κωστούρο Αντώνη, για την όμορφη ατμόσφαιρα και τη δημιουργική αλληλεπίδραση που είχαμε στο εργαστήριο.

Ευχαριστώ όλη την ερευνητική ομάδα του προγράμματος «Θαλής» για κάθε είδους βοήθεια (τεχνική, γραφειοκρατική, επιστημονική) και ιδίως τους Δρ. Κλέτσα Δημήτρη, Δρ. Θεοχάρη Αχιλλέα, Δρ. Σκανδάλη Σπύρο, Δρ. Γιαελή Χρυσοστόμη και Δρ. Αφράτη Νίκο. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στο συνάδελφο μου Δρ. Μπούρη Παναγιώτη, για την παροχή των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στο μέρος Γ της διατριβής και για όλη τη συνεργασία κατά τη διάρκεια του προγράμματος. Η συμμετοχή μου στο πρόγραμμα υπήρξε για μένα πραγματικό σχολείο στον κόσμο της έρευνας. Ευχαριστώ ακόμα, το εργαστήριο της τοξικολογίας της

Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης και προσωπικά τον καθηγητή κ. Τσατσάκη Αριστείδη για τη συνεργασία σε επίπεδο αναλώσιμων υλικών, που χρησιμοποιήθηκαν στη διάρκεια του διδακτορικού.

Ειδική μνεία, αξίζει στο στενό οικογενειακό μου περιβάλλον, που με τη στήριξη του σε κάθε επίπεδο με βοήθησε να φέρω εις πέρας την αποστολή αυτή. Η βοήθεια τους υπήρξε αρωγός σε κάθε μου βήμα, μικρό και μεγάλο, καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής μου. Ευχαριστώ τους γονείς μου: Νίκο και Καλή, γιατί μου παρείχαν την ελευθερία των επιλογών μου και συνάμα την ασφάλεια ότι θα βρίσκονται δίπλα μου σε κάθε κίνηση. Τον πατέρα μου γιατί με υποστηρίζει οικονομικά και ψυχολογικά, πάντα και πολλές φορές παραπάνω από όσο μπορεί, αλλά και γιατί με έμαθε ότι στη ζωή θα πρέπει να δουλεύεις και να παλεύεις και τη μητέρα μου γιατί υπήρξε πάντα βράχος στο σπίτι, να μας υπομένει, με τη φροντίδα της, παρέχοντας μου ασφάλεια και ηρεμία σε όλη την εκπαιδευτική μου πορεία. Εύχομαι να γίνω ένας γονιός σαν κι αυτούς. Τον αδερφό μου: Δημήτρη, γιατί όσο θυμάμαι τον εαυτό μου είναι δίπλα μου σε κάθε βήμα για να ανοίγει το δρόμο που θα διαβώ, με τη βεβαιότητα ότι όπου θα είμαι εγώ, θα βρίσκεται και αυτός, όσο μακριά και αν είμαστε. Ακόμα, τον άνθρωπο μου και συνοδοιπόρο στη ζωή: Παναγιώτη, που με την ατέρμονη αγάπη του και την υπομονή του με βοηθά να ολοκληρώνω ότι κι αν ξεκινώ, τα τελευταία -υπέροχα- δέκα χρόνια.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον αγαπημένο μου φίλο, γιατρό: Παπαδημάτο Σπύρο για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε, με πληροφορίες και γνώσεις σχετικά με το ιατρικό κομμάτι, που αφορά τον καρκίνο του μαστού και για την προθυμία που είχε πάντα να με βοηθήσει, ακόμα και σε μέρες που το πρόγραμμα του ήταν βαρύ, κατά τη διάρκεια του αγροτικού του. Εξάλλου, στους αγαπημένους φίλους μου Παπαδημάτο Σπύρο και Γιάννο Γιώργο, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για το ευχάριστο πολύωρο και μεταμεσονύκτιο ομαδικό διάβασμα και την υπομονή τους κατά τη διάρκεια της συγγραφής του διδακτορικού μου.

Τέλος, ευχαριστώ τους αγαπημένους μου φίλους: Πολυμεράκη Δημήτρη, Μπουρμπούλη Μάρα, Αυγουστή Νίκη και Αναστασίου Αναστασία για την ψυχολογική υποστήριξη και για τα όσα μου έμαθαν εκείνοι όσο καιρό εγώ μάθαινα για την έρευνα μου.

Ευχαριστώ όλους, εκείνους που πίστεψαν σε μενα... «γιατί σ' αυτό τον κόσμο που ολοένα στενεύει ο καθένας μας χρειάζεται και όλους τους γύρω του...».

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού ένας από τους πιο συχνούς καρκίνους, αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου στις γυναίκες παγκοσμίως. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι στο Ηνωμένο Βασίλειο, αντιπροσωπεύει το 20% των συνολικών περιπτώσεων καρκίνου και είναι η πιο κοινή αιτία θανάτου των γυναικών ηλικίας 35-55 ετών. Η σταδιοποίηση των καρκίνων του μαστού, ιστοπαθολογικά, λαμβάνει υπ' όψιν την παρουσία και τα επίπεδα έκφρασης των οιστρογονικών υποδοχέων (Estrogen Receptors - ERs), των υποδοχέων της προγεστερόνης (Progesterone Receptors - PRs), αλλά και των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor-Receptor - EGFR).

Οι αυξητικοί παράγοντες Insulin-like Growth Factor-I, (IGF-I), Epidermal Growth Factor (EGF) και η ορμόνη Οιστραδιόλη- Estradiol (E2) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη και τη βιολογική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Συχνά, η πρώτη θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου μαστού είναι η ορμονοθεραπεία. Ωστόσο, σε περιπτώσεις ανθεκτικότητας των όγκων σε αυτού του είδους τη θεραπεία, ενεργοποιούνται εναλλακτικά σηματοδοτικά μονοπάτια αυξητικών παραγόντων, που συμπεριλαμβάνουν την IGF-I/EGF σηματοδότηση και έτσι διατηρείται η επιβίωση των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Η αλληλεπίδραση των σηματοδοτικών μονοπατιών IGF-I/EGF και E2 είναι μεγάλης σημασίας και η διερεύνηση των δράσεων τους σε κυτταρικό επίπεδο είναι σημαντική για τον καρκίνο του μαστού. Βασικός ερευνητικός σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης των μοριακών σηματοδοτικών μονοπατιών των IGF-I/EGF και E2, στην προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων του μαστού, καθώς και η περαιτέρω διερεύνηση των τρόπων δράσης τους (ενδοκυτταρικοί διαμεσολαβητές). Επιπλέον, στους στόχους της μελέτης συμπεριλαμβάνεται η μελέτη της επίδρασης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *p53* στην κυτταρική λειτουργία της προσκόλλησης και στην σηματοδότηση του υποδοχέα του IGF-I (IGF-IR). Τέλος, η μελέτη της επίδρασης της καφεΐνης, μιας καθημερινά χρησιμοποιούμενης ουσίας, που επηρεάζει τα βασικά

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

σηματοδοτικά μόρια των IGF-I/EGF και E2, στις λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων του μαστού, συμπληρώνει τη στοχοθεσία της διατριβής.

Οι αυξητικοί παράγοντες IGF-I/EGF και η ορμόνη E2 ρυθμίζουν πολλές βιολογικές λειτουργίες των ορμονο-εξαρτώμενων καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των λειτουργιών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κινητικότητας. Η ανάπτυξη των κυττάρων βρίσκεται υπό την σχετική επίδραση του περιβάλλοντος στρώματος. Αυτή η αλληλεπίδραση των κυττάρων με το μικροπεριβάλλον τους, την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, θεωρείται κρίσιμη και καθοριστική για την καρκινογένεση. Έτσι, τυχόν αλλαγές στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και οι αλληλεπιδράσεις των μορίων της με τα καρκινικά κύτταρα τροποποιούν κυτταρικές λειτουργίες. Συγκεκριμένα, τα συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, εμπλέκονται σε πολλές λειτουργίες των κυττάρων των όγκων, επηρεάζοντας έτσι, τη διαδικασία της μετάστασης και κατ' επέκταση την κυτταρική εξέλιξη. Η ινονεκτίνη, συστατικό που βρίσκεται σε αφθονία στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία των καρκινικών κυττάρων του μαστού, είναι μία μεγάλου μοριακού βάρους γλυκοπρωτεΐνη, που έχει χαρακτηριστεί δείκτης επιθετικότητας για τη βιοπαθολογία του καρκίνου του μαστού. Στην παρούσα μελέτη, έχει δειχθεί ότι τόσο οι IGF-I/EGF όσο και η E2 ενισχύουν σημαντικά την προσκόλληση των MCF-7 καρκινικών κυττάρων του μαστού σε υπόστρωμα ινονεκτίνης. Επιπλέον, ο βασικός υποδοχέας (Receptor) του IGF-I, ο IGF-IR, είναι απαραίτητος για την επαγωγή της προσκόλλησης από τους IGF-I/EGF και E2. Οι εν λόγω παράγοντες φαίνεται να επάγουν ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια που ρυθμίζουν λειτουργίες σχετικές με την καρκινογένεση, όπως ο πολλαπλασιασμός, η προσκόλληση και η κινητικότητα των κυττάρων. Τέτοιοι ενδοκυτταρικοί διαμεσολαβητές είναι το Extracellular signal-regulated kinases (Erk1/2) (ανήκει στη σηματοδότηση Mitogen- Activated Protein Kinase (MAPK) και το Phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3 kinase). Σε ενδοκυτταρικό επίπεδο, η αναστολή του Erk1/2 εμποδίζει την IGF-I/EGF/E2- εξαρτώμενη προσκόλληση των MCF-7 κυττάρων, καταδεικνύοντας ότι ο Erk1/2 είναι σημαντικός ενδοκυτταρικός διαμεσολαβητής σήματος των παραγόντων αυτών για τη συγκεκριμένη κυτταρική λειτουργία. Ο Erk1/2 έχει δειχθεί, ακόμα, να

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

τροποποιεί το προφίλ έκφρασης του (full designation) IGF-IR. Συγκεκριμένα, η αναστολή του Erk1/2 σηματοδοτικού μονοπατιού εμποδίζει τόσο την έκφραση, όσο και την ενεργοποίηση του IGF-IR υποδοχέα. Αξιοσημείωτη είναι η ενισχυτική δράση των EGF και E2 στην έκφραση του IGF-IR σε επίπεδο mRNA και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Επιπρόσθετα, δεδομένα συνεστιακής μικροσκοπίας, απέδειξαν ότι η χορήγηση IGF-I και EGF επάγει αναδιοργάνωση των ινιδίων ακτίνης του κυτταροσκελετού στα MCF-7 καρκινικά κύτταρα του μαστού. Η αναδιοργάνωση αυτή φαίνεται να τροποποιείται από την αναστολή του Erk1/2, που είναι ο βασικός κυτταρικός διαμεσολαβητής των IGF-I και EGF. Στη μελέτη της προσκόλλησης σημαντικό ρόλο έχει η κινάση της εστιακής προσκόλλησης Focal Adhesion Kinase (FAK), η οποία ενεργοποιείται (με φωσφορυλίωση) κατά την προσκόλληση του κυττάρου στο υπόστρωμα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το δεδομένο ότι η χορήγηση του IGF-I επάγει το συν-εντοπισμό των IGF-IR και FAK, που είναι ορατός κυρίως κοντά στις κυτταρικές μεμβράνες των MCF-7 κυττάρων. Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν ότι ο IGF-IR είναι σημείο συνάντησης για την IGF-/EGF- και E2- εξαρτώμενη κυτταρική προσκόλληση σε υπόστρωμα ινονεκτίνης.

Επιπροσθέτως, στην παρούσα διατριβή έχει διερευνηθεί ο πιθανός ρόλος του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *p53* στην προσκολλητική ικανότητα των MCF-7 κυττάρων του μαστού. Με βάση τα δεδομένα της συγκεκριμένης μελέτης, ο IGF-IR διαδραματίζει ρόλο κλειδί στην κυτταρική προσκόλληση των εν λόγω κυττάρων. Ωστόσο, η λειτουργία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, επηρεάζει τα σήματα του IGF-IR και τις δράσεις του σε καρκινικά κύτταρα του μαστού. Η μεταγραφή του *IGF-IR* γονιδίου, ρυθμίζεται αρνητικά από πρωτεϊνικά παράγωγα ογκοκατασταλτικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων του γονιδίου του καρκίνου του μαστού-1 (*BRCA1*) και του ογκοκατασταλτικού *p53*. Επιπροσθέτως, η έλλειψη στη λειτουργία του *p53* γονιδίου, έχειδειχθεί ότι τροποποιεί την έκφραση του IGF-IR. Ο μηχανισμός αυτός, ωστόσο, δεν περιλαμβάνει ευθεία πρόσδεση στο DNA, δηλαδή στις αλληλουχίες του υποκινητή του IGF-IR γονιδίου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης η έκφραση του

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

IGF-IR δεν αλλάζει από τον p53. Ακόμα, δοκιμές προσκόλλησης σε υπόστρωμα ινονεκτίνης έδειξαν ότι ο p53 δεν επηρεάζει τη συγκεκριμένη κυτταρική λειτουργία.

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, έχει μελετηθεί ακόμα, ο ρόλος της καφεΐνης σε λειτουργίες καρκινικών κυττάρων του μαστού. Ο καφές είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο ρόφημα παγκοσμίως και καταναλώνεται καθημερινά από εκατομμύρια ανθρώπων. Σε ό,τι αφορά τη συσχέτιση της κατανάλωσης καφέ και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού, τα δεδομένα ποικίλλουν. Η ετερογένεια της νόσου και η κατηγοριοποίηση των καρκινικών όγκων του μαστού σε ER+ και ER- διαφοροποιεί τις δράσεις του καφέ, αναφορικά με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Πρόκειται για τη χημική ουσία 1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη, που στο αντίστοιχο κομμάτι της διατριβής αυτής έχει χρησιμοποιηθεί, σε καθαρή μορφή, σε κύτταρα, προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος της σε βιολογικές λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Η χορήγηση καφεΐνης σε καρκινικές σειρές του μαστού έδειξε ότι επηρεάζει την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα άλλων μελετών, η καφεΐνη εμφανίζει αντι-καρκινικές ιδιότητες, μειώνοντας την αύξηση των κυττάρων MCF-7 (ERα+) αλλά και των (ERα-) MDA-MB-231. Ως προς τον μηχανισμό δράσης της, οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η καφεΐνη δρα όπως τα αντι-οιστρογόνα και τροποποιεί τα ρυθμιστικά για τον κυτταρικό κύκλο μονοπάτια ER/cyclin D1 και IGF-IR/pAkt. Στο αντίστοιχο μέρος της διδακτορικής διατριβής αυτής, έχουν χρησιμοποιηθεί καρκινικές σειρές με διαφορετικό ER προφίλ έκφρασης. Συγκεκριμένα καρκινικές σειρές του μαστού, που έχουν προέλθει από μετασχηματισμένα MCF-7 κύτταρα (stable transfected), ελλιπή σε έκφραση ERα αποκαλούμενες ως MCF-7/csh (negative control) και MCF-7/SP10(ERα-). Με βάση τα αποτελέσματα της διατριβής, η καφεΐνη δεν επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού, ανεξαρτήτως προφίλ έκφρασης των ERs, ενώ φαίνεται να τροποποιεί την κυτταρική λειτουργία της προσκόλλησης, μέσω μορίων που σχετίζονται με τη σηματοδότηση IGF-I/EGF και E2.

Συνοψίζοντας, η συγκεκριμένη διατριβή προτείνει ότι ο IGF-IR είναι σημαντικός για τις δράσεις των μοριακών σηματοδοτικών μονοπατιών των IGF-I/EGF και E2, στη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

λειτουργία της κυτταρικής προσκόλλησης, που είναι επίσης πολύ σημαντική για την εξέλιξη των όγκων και στενά συνδεδεμένη με την κινητικότητα των κυττάρων. Παρουσιάζει δεδομένα για τη σχέση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 και της βιολογικής λειτουργίας των κυττάρων. Επίσης περιέχει δεδομένα για το ρόλο της καφεΐνης τόσο στις λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων του μαστού όσο και στα επιμέρους μόρια που λαμβάνουν μέρος στη μοριακή σηματοδότηση των IGF-I/EGF. Ενδεχομένως στο μέλλον, τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής να φανούν χρήσιμα στη στοχευμένη θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού.

ABSTRACT

Breast cancer is one of the most common types of cancer. On a global scale, it is the second most responsible cause for female death. Indicatively, in United Kingdom breast cancer represents 20% of all cancer types and is the main cause of death of women at the ages between 35-55 years old. In order to characterize different stages of this disease types the expression levels of Estrogen Receptors (ERs), Progesteron Receptors (PRs) as well as Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) are evaluated utilizing histopathological assessment.

Indeed, Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I), Epidermal Growth Factor (EGF) and the hormone Estradiol (E2) have an important role in the development and biological behavior of breast cancer cells. Usually, the fist therapeutic step for breast cancer is hormone therapy. However, in hormone resistant tumor, cancer cell survival is promoted by developing alternative growth factor signaling pathways. Such a candidate signaling pathway is the IGF-I/EGF crosstalk. Moreover, particularly important for breast cancer is the interaction between the IGF-I/EGF axis and E2 signaling pathway which is a focus of study at a cellular level. The principal aims of the present PhD thesis include the investigation of IGF-I/EGF and E2 signaling pathways, breast cancer cell adhesion capability assessment and also, the identification of putative intracellular signaling mediators. In addition, the role of tumor suppression gene p53 was studied on cell adhesion and as a mediator of IGF-I receptor (IGF-IR) signaling. Finally, caffeine, a widely consumed substance, known to affect basic downstream signaling molecules of IGF-I/EGF and E2 pathways was investigated.

IGF-I/EGF and E2 regulate several estrogen- responsive breast cancer biological functions, including cellular proliferation and motility. Cell growth is influenced by the cellular microenvironment, the extracellular matrix (ECM). ECM interactions are fundamental for carcinogenicity. Thus, ECM modifications and molecular interactions between the ECM molecules and cancer cells modulate cellular functions. To be more accurate, ECM components are involved in cellular functions of tumor cells, affecting metastasis and consequently, cancer development. Fibronectin, an abundant ECM component in breast cancer tissues, is a high molecular weight glycoprotein and has been characterized as a crucial biomarker of aggressiveness. In the present study, IGF-I/EGF and E2 were demonstrated to increase adhesion of MCF-7 cell line onto fibronectin. In addition, IGF-I/EGF and E2 mediated adhesion required IGF-I Rparticipation. The above factors were shown to activate intracellular cancer-related signaling molecules which affect functions like proliferation, adhesion and motility. Such signaling mediators include Extracellular signal-regulated kinases (Erk1/2) that belong to Mitogen- Activated Protein Kinase (MAPK) family and Phosphatidylinositol

3-kinase (PI-3 kinase). Intracellularly, Erk1/2 inhibition prevents IGF-I/EGF/E2-dependent MCF-7 adhesion, indicating the importance of Erk1/2 as an intracellular signaling mediator of IGF-I/EGF/E2 mediated adhesion. Moreover, IGF-IR expression profile can be altered by Erk1/2 (full designation). Specifically, Erk1/2 pathway inhibition prevents both the expression and the activation of IGF-IR. Furthermore, IGF-IR mRNA and protein expression are synergistically enhanced by EGF and E2 action.

In addition, data using confocal microscopy showed that incubation with IGF-I and EGF induced microfilament reorganization of the MCF-7 actin cytoskeleton. This reorganization seemed to be modified by the inhibition of Erk1/2, which is the main cell mediator of IGF-I and EGF. Focal Adhesion Kinase (FAK), which is activated through phosphorylation during adhesion onto a respective substrate, was designated to play a crucial role in this adhesion study. It is important to mention that incubation with IGF-I induced the co-localization of IGF-IR and FAK, which was visible close to the cell membranes of MCF-7 cells. This later indicated that IGF-IR may be considered as a meeting point for the IGF-/EGF- and E2- dependent cell adhesion onto fibronectin. Additionally, the possible role of the tumor suppressor gene p53 on the adhesion ability of MCF-7 breast cells was examined. Results of the present study showed that IGF-IR plays a key role in these cells' adhesion. However, the activities of tumor suppressor genes can affect IGF-IR signaling and its role in breast cancer cells. The transcription of IGF-IR gene is negatively regulated by protein products of tumor suppressor genes, including the breast cancer 1 gene (BRCA1) and the p53 gene. Furthermore, the p53 gene loss of function has been shown to modify the expression of IGF-IR, and this mechanism did not include a direct binding on DNA. According to the present study, p53 did not modulate the expression of IGF-IR. Moreover, p53 did not affect the adhesion capacity of these cells onto fibronectin.

This PhD thesis also investigated the role of caffeine in breast cancer cell functions. Coffee is a beverage daily consumed on a world scale. Data that correlate coffee consumption and danger of breast cancer occurrence are controversial. The role of coffee concerning the risk of breast cancer occurrence differs due to the heterogeneity of the disease and ER expression based breast cancer categorization. Caffeine, whose chemical identity is 1,3,7-trimethylxanthine has in this study been used in its original in order to investigate breast cancer cell functions.

Previous studies have shown that treatment of breast cancer cell lines with caffeine affects cell proliferation. Caffeine was shown to exhibit anti-cancer properties, by decreasing growth of MCF-7 (ER α +) and MDA-MB231 (ER α -) cells. Moreover, it has been argued that caffeine acts as an anti-estrogen and modulates cell cycle pathways including ER/cyclin D1 and IGF-IR/pAkt. Thus, in the third part of the present thesis,

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

cell lines with different ER status have been used. More specifically, the cell lines used were stably transfected MCF-7 cells that lack ER α expression, denominated MCF-7/SP10 (ER α -) cells and transfected with vector control MCF-7/csh cells (negative control). The results of the present study indicate that caffeine in a manner independent of ER status did not affect cell proliferation, but appeared to modulate cell adhesion through molecules that are related to IGF-I/EGF and E2 signaling pathways.

To summarize, the results of the present thesis suggest that IGF-IR plays a crucial role in IGF-I/EGF and E2 signaling pathways which modulate cell adhesion, function that is closely correlated to cell motility and cancer development. Furthermore, the thesis presents data associated to the role of the tumor suppressor p53 gene on breast cancer cell behavior. Data on the effect of caffeine on breast cancer cell functions and on the modulation of molecules that participate in the IGF-I/EGF and E2 signaling pathways are also shown. The presented data, may contribute to the development of targeted therapeutic methods for the treatment of breast cancer.

Περιεχόμενα

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1.	Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	1
1.2	ΚΑΡΚΙΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	4
1.3	ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑ ΘΕΜΕΛΙΑ ΟΥΣΙΑ (ECM)	5
1.4	Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΘΕΜΕΛΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ ΣΤΙΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	9
1.5	ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ	12
1.6	Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΥΕΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ IGF-I/EGF ΚΑΙ ΤΗΣ ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗΣ (E2) ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	15
1.7	ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΑΥΕΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΠΟΥ ΟΜΟΙΑΖΕΙ ΜΕ ΤΗΝ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ (INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR).....	16
1.8	ΜΟΡΙΑΚΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΑΥΕΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΠΟΥ ΟΜΟΙΑΖΕΙ ΜΕ ΤΗΝ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ (IGF signaling) ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	18
1.9	ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΑΥΕΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ (EPIDERMAL GROWTH FACTOR)	21
1.10	ΜΟΡΙΑΚΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΑΥΕΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ (EGF signaling) 22	
1.11	ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗ (E2).....	24
1.12	ΜΟΡΙΑΚΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗΣ (E2 signaling)	25
1.13	ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ IGF/EGF ΚΑΙ E2 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ	26
1.14	ΚΑΦΕΪΝΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	32
1.15	ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	34
2.	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	37
2.1	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ: ΧΗΜΙΚΑ, ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	37
2.2	ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	37
2.3	ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN.....	38
2.4	ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ	39
2.5	ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ	40
2.6	RNA ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ REAL TIME PCR.....	41
2.7	ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ	42
2.8	SiRNA.....	43
2.9	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	44
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	45
3.1	ΜΕΡΟΣ Α: ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΩΝ & ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ p53 ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	45
3.1.1.	Βελτιστοποιήσεις πρωτοκόλλων	45
3.1.2.	Βελτιστοποίηση δοκιμασίας πολλαπλασιασμού για τις κυτταρικές σειρές MCF-7, ZR-75-1 και MDA-MB-231.....	45
3.1.3.	Βελτιστοποίηση δοκιμασίας προσκόλλησης για τις κυτταρικές σειρές MCF-7 και ZR-75-1	47
3.1.4.	Επίδραση του p53 στην προσκόλληση καρκινικών κυττάρων του μαστού και στην έκφραση του IGF-IR.....	50
3.2.	ΜΕΡΟΣ Β: Ο IGF-IR ΩΣ ΚΥΡΙΟ ΣΗΜΕΙΟ ΣΥΝΑΝΤΗΣΗΣ ΤΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΤΩΝ IGF-I/EGF ΚΑΙ ΤΗΣ E2, ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	53
3.2.1.	Η IGF-I/EGF και E2- εξαρτώμενη προσκόλληση σε υπόστρωμα ινονεκτίνης ρυθμίζεται από τον IGF-IR.....	53

3.2.2.	Τα ελλειπή σε IGF-IR κύτταρα δεν αποκρίνονται στην IGF-I/EGF και E2 επαγωγή της προσκόλλησης	56
3.2.3.	Η επίδραση των IGF-I, EGF και E2 στην έκφραση του IGF-IR.....	58
3.2.4.	Ο Erk1/2 είναι ο κύριος ενδοκυτταρικός διαμεσολαβητής των δράσεων των IGF-I/EGF και E2 στην κυτταρική προσκόλληση και στην έκφραση του IGF-IR στα MCF-7 κύτταρα	60
3.2.5.	Η επίδραση των IGF-I/ EGF στην οργάνωση του κυτταροσκελετού των MCF-7 κυττάρων εξαρτάται από τον Erk1/2.....	65
3.2.6.	Ο IGF-I και ο EGF επάγουν αύξηση της προσκόλλησης των MCF-7 καρκινικών κυττάρων του μαστού, που εξαρτάται από την παρουσία και την ενεργοποίηση της κινάσης της εστιακής προσκόλλησης (FAK).....	67
3.2.7.	Συνεντοπισμός IGF-IR και FAK	71
3.2.8.	ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΕΙΚΟΝΕΣ ΜΕΡΟΥΣ Β	72
3.3.	ΜΕΡΟΣ Γ: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΑΦΕΪΝΗΣ ΣΤΙΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ & ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ ΤΟΥ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΥ ΧΩΡΟΥ	75
3.3.1	Επίδραση καφεΐνης στις λειτουργίες καρκινικών κυττάρων του μαστού με διαφορετικό προφίλ έκφρασης του υποδοχέα ERα	75
3.3.2	Επίδραση καφεΐνης στη σηματοδότηση των IGF-I/EGF και E2.....	79
3.3.3.	Επίδραση καφεΐνης στην έκφραση των συνδεκανών.....	82
3.3.4.	Επίδραση καφεΐνης στην έκφραση και στην ενεργοποίηση της κινάσης της εστιακής προσκόλλησης (FAK)	85
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	87
4.1.	ΜΕΡΟΣ Α: ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΩΝ & ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ p53 ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	87
4.2.	ΜΕΡΟΣ Β: Ο IGF-IR ΩΣ ΚΥΡΙΟ ΣΗΜΕΙΟ ΣΥΝΑΝΤΗΣΗΣ ΤΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΤΩΝ IGF-I/EGF ΚΑΙ ΤΗΣ E2, ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	88
4.3.	ΜΕΡΟΣ Γ: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΑΦΕΪΝΗΣ ΣΤΙΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ & ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ ΤΟΥ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΥ ΧΩΡΟΥ	96
4.4.	ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ.....	100
4.5	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	102
4.6	ΠΙΘΑΝΕΣ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ.....	102
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	104
6.	ΕΝΘΕΤΟ - ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	117

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

E2: Estradiol

EGF: Epidermal Growth Factor

ER: Estrogen Receptor

Erk1/2: Extracellular signal related Kinase 1/2

FAK: Focal Adhesion Kinase

HER-2: Human Epidermal growth factor Receptor -2

IGF-I: Insulin like Growth Factor -I

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

P13-K: Phosphoinositide 3-kinase

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο συχνός καρκίνος και η δεύτερη αιτία θανάτου στις γυναίκες παγκοσμίως (Turkoz et al., 2013). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι στο Ηνωμένο Βασίλειο, αφορά το 20% των συνολικών περιπτώσεων καρκίνου και είναι η πιο κοινή αιτία θανάτου των γυναικών ηλικίας 35-55 ετών (O'Mahony et al., 2017). Σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις παρατηρείται ανδρικός καρκίνος του μαστού, ενώ θεωρείται ότι σύνδρομα, που σχετίζονται με χρωμοσωμικές ανωμαλίες φυλετικών χρωμοσωμάτων, αυξάνουν την πιθανότητα ανάπτυξης ανδρικού καρκίνου του μαστού (Gomez-Raposo et al., 2010).

Βιβλιογραφικές πηγές αναφέρουν τη συσχέτιση ανάπτυξης καρκίνου του μαστού με συγκεκριμένους παράγοντες κινδύνου (Ondrusek et al., 1999; McPherson et al., 2000; DeSantis et al., 2014; Arthur et al., 2017; Balakrishnan et al., 2017; Playdon et al., 2017). Πιο συγκεκριμένα, το θηλυκό φύλο και η προχωρημένη ηλικία συσχετίζονται θετικά με την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (DeSantis et al., 2014). Ακόμα, αυξημένο κίνδυνο συνιστούν η πρόωμη εμμηνарχή και η όψιμη εμμηνόπαυση, ενώ η τεκνοποίηση και η γαλουχία σε μικρή ηλικία, αποτελούν παράγοντες που μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (Ondrusek et al., 1999; McPherson et al., 2000; DeSantis et al., 2014; Balakrishnan et al., 2017). Επιβαρυντικούς παράγοντες στην εμφάνιση καρκίνου του μαστού συνιστούν η παχυσαρκία ή/και οι κακές διατροφικές συνήθειες, ενώ αναφέρεται αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης σε παχύσαρκες μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, σε γυναίκες που κάνουν κατάχρηση αλκοόλ και σε καπνίστριες (Ondrusek et al., 1999; McPherson et al., 2000; DeSantis et al., 2014; Al Otaibi, 2017; Playdon et al., 2017). Η φυλή και η κοινωνικο-οικονομική θέση της γυναίκας έχει βρεθεί να συσχετίζεται με την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (Ondrusek et al., 1999; McPherson et al., 2000; Arthur et al., 2017). Πιο συγκεκριμένα, γυναίκες υψηλού μορφωτικού επιπέδου και εισοδήματος, άνω των 45 ετών, που ανήκουν στη λευκή φυλή, εμφανίζουν

αυξημένο κίνδυνο να νοσήσουν από καρκίνο του μαστού (Ondrusek et al., 1999; McPherson et al., 2000). Επιπλέον, παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού συνιστούν: η εύρεση άτυπων υπερπλασιών σε προηγούμενες βιοψίες μαστού, η μακροχρόνια χορήγηση αντισυλληπτικών χαπιών και η ορμονοθεραπεία υποκατάστασης (Ondrusek et al., 1999; McPherson et al., 2000; Arthur et al., 2017; Balakrishnan et al., 2017; Playdon et al., 2017). Στην εμφάνιση της νόσου υπάρχει ξεκάθαρη κληρονομική προδιάθεση, καθώς η παρουσία οικογενειακού ιστορικού σχετικού με τον καρκίνο του μαστού θεωρείται παράγοντας υψηλού κινδύνου (Ondrusek et al., 1999; McPherson et al., 2000; DeSantis et al., 2014; Arthur et al., 2017). Τέλος, σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού παίζει η ύπαρξη μεταλλαγμένων γονιδίων στο γονιδίωμα, όπως είναι το *BRCA1*, το *BRCA2*, το *p53* και το *PTEN* (Futreal et al., 1994; Rosianu and Tudose, 1998; Wang et al., 2000; Dumay et al., 2013; Zhang et al., 2017). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι στο 20-30% των καρκίνων του μαστού υπάρχει κάποια μεταλλαγμένη μορφή του *p53* (Petitjean et al., 2007).

Δομικά, ο μαστός συνίσταται από τα λόβια, τα οποία χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη αδένων και ενδολόβιων πόρων (Tanis et al., 2001). Τα λόβια διαχωρίζονται από την ύπαρξη διαφραγματίων ινοκολλαγνώδους ιστού, και διαμορφώνονται από το περιβάλλον στρώμα. Οι αδένες αποτελούν το εκκριτικό μέρος και οι πόροι έχουν λειτουργία παροχέτευσης. Η μορφολογία των μαστικών αδένων σχετίζεται με ένα πλήθος παραγόντων, που αφορούν, κυρίως, την έκθεση του μαζικού αδένα σε διάφορες ορμόνες κατά την διάρκεια της ζωής. Στην πραγματικότητα, σχεδόν όλοι οι καρκίνοι του μαστού είναι αδενοκαρκινώματα, που προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα των αδένων ή των πόρων τους.

Ο καρκίνος του μαστού διακρίνεται σε διηθητικό και μη διηθητικό (Frykberg et al., 1987; Lagios, 1990; Weigelt et al., 2008; Vuong et al., 2014). Ο όρος μη διηθητικός σημαίνει ότι τα κακοήθη κύτταρα είναι καλώς ορισμένα είτε στους αδένες, είτε στους πόρους των λοβίων, χωρίς ενδείξεις διήθησης τους, στις βασικές μεμβράνες (Stevanovic et al., 2006). Υπάρχουν δύο τύποι μη διηθητικών καρκινωμάτων: το αδενικό καρκίνωμα *in situ* και το πορογενές καρκίνωμα *in situ* (Frykberg et al., 1987; Lagios, 1990). Από την

άλλη πλευρά, τα διηθητικά καρκινώματα χαρακτηρίζονται από διάρρηξη της βασικής μεμβράνης. Οι βασικότεροι τύποι των διηθητικών καρκινωμάτων είναι το πορογενές (χωρίς συγκεκριμένο τύπο), τα λοβιακά, τα βλεννώδη, τα σωληνοειδή και τα θηλώδη καρκινώματα (Vuong et al., 2014).

Ο καρκίνος του μαστού μπορεί να διηθεί τοπικά (άμεση διασπορά κατά συνέχεια ιστού) ή να μεθίσταται σε πιο απομακρυσμένα σημεία του σώματος, λεμφογενώς, μέσω των μασχαλιαίων αλλά και άλλων λεμφαδένων (παραστερνικοί, υποκλείδιοι), αλλά και αιματογενώς, δίνοντας μεταστάσεις, κατά κύριο λόγο, στους πνεύμονες, στα οστά, στον εγκέφαλο και στο ήπαρ (Lee, 1983; Shaffrey et al., 2004; Suva et al., 2009).

Σε ό,τι αφορά την ανίχνευση της πρώιμης νόσου σε ασυμπτωματικό πληθυσμό χωρίς αυξημένους παράγοντες κινδύνου (screening), αυτή περιλαμβάνει κλινικό και ακτινολογικό έλεγχο. Η μαστογραφία θεωρείται η «gold standard» εξέταση για screening, η οποία θεωρείται ότι είναι καλό να έπεται της κλινικής εξέτασης από ειδικό, ούτως ώστε να εστιαστεί σε τυχόν κλινικά ευρήματα και αν κριθεί απαραίτητο να συμπληρωθεί από υπερηχογράφημα, μαγνητική τομογραφία (MRI), ή/και PET scan (Habberthur et al., 1990; Melnikow et al., 2016; Zhang and Ren, 2017). Η αυτοεξέταση έχει μικρό αλλά υπολογίσιμο αντίκτυπο στην πρώιμη ανίχνευση της νόσου (Grady, 1992). Σε ηλικίες μεταξύ 20 και 40 ετών συνίσταται κλινική εξέταση κάθε τρία χρόνια, ενώ σε ηλικίες άνω των 40 συνίσταται ετήσια μαστογραφία και εξέταση από ειδικό (για γυναίκες χωρίς οικογενειακό ιστορικό). Ωστόσο, η εξατομίκευση θεωρείται αναγκαία στον έλεγχο, καθώς σε γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό, διαφέρει ο έλεγχος και η συχνότητα των εξετάσεων. Η τελική διάγνωση του καρκίνου του μαστού γίνεται πάντα με βιοψία (Yen et al., 2005; Melnikow et al., 2016; Zhang and Ren, 2017).

Η πρόγνωση της νόσου εξαρτάται από το μέγεθος και την έκταση του πρωτοπαθούς όγκου σε συνδυασμό με τα μοριακά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων (έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων - υπερέκφραση του Human Epidermal growth factor Receptor 2- HER2), τη διήθηση των μασχαλιαίων λεμφαδένων και το βαθμό της ιστολογικής διαφοροποίησης του όγκου (Vuong et al., 2014; Kasangian et al., 2017; Poirier et al., 2017).

Από το 1990 και μετά η θνητότητα έχει μειωθεί λόγω του screening και της ίασης του πρώιμου καρκίνου (Kelsey, 1993; DeSantis et al., 2014). Για το μεταστατικό καρκίνο του μαστού έχουν γίνει μικρές πρόοδοι, αλλά θεωρείται, ως σήμερα, μη ιάσιμος.

Σε μοριακό επίπεδο, η διάκριση των καρκίνων του μαστού βασίζεται στην παρουσία/ απουσία και στα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων των οιστρογόνων (Estrogen Receptors- ERs), των υποδοχέων της προγεστερόνης (Progesterone Receptors- PRs), αλλά και των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor- EGFR) (Iglehart et al., 1990; Perou et al., 2000; Jensen and Jordan, 2003). Οι όγκοι ταξινομούνται σε 3 ομάδες, τους ορμονοθετικούς, τους θετικούς στον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (με ένα ποσοστό συνύπαρξης αυτών των δύο) και τους τριπλά αρνητικούς. Σε επίπεδο ιστολογικής διαφοροποίησης οι όγκοι ταξινομούνται σε: Grade A: καλή διαφοροποίηση, Grade B μέτρια διαφοροποίηση και Grade C πτωχή διαφοροποίηση (Bloom and Richardson, 1957; Theissig et al., 1990).

1.2 ΚΑΡΚΙΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Η ανάπτυξη των κυττάρων βρίσκεται υπό τη συνεχή επίδραση του περιβάλλοντος στρώματος (Iozzo and Murdoch, 1996; Geiger et al., 2001; Geiger and Yamada, 2011; Gialeli et al., 2011; Afratis et al., 2012). Έτσι, είναι γνωστό ότι το μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πορεία του όγκου (Iozzo and Murdoch, 1996; Iozzo and Schaefer, 2010; Theocharis et al., 2010; Afratis et al., 2012; Nikitovic et al., 2014b; Nikitovic et al., 2014c). Τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των κυττάρων για την ανάπτυξη του όγκου είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική προσκόλληση, η διήθηση των κυττάρων σε άλλους ιστούς, καθώς και η μετανάστευση τους σε άλλα σημεία του ανθρώπινου σώματος. Οι ιδιότητες αυτές ρυθμίζονται από αλληλεπιδράσεις των κυττάρων με τα συστατικά του μικροπεριβάλλοντος τους (Dickson and Lippman, 1987; Cheskis, 2004; Nikitovic et al., 2008; Iozzo and Schaefer, 2010; Chalkiadaki et al., 2011a; Chalkiadaki et

al., 2011b; Gialeli et al., 2011; Kouvidi et al., 2011; Afratis et al., 2012; Curran and Keely, 2013; Nikitovic et al., 2013; Nikitovic et al., 2014a; Nikitovic et al., 2014b).

Στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού το στρώμα αποτελείται από εξωκυττάρια θεμέλια ουσία πλούσια (Extracellular Matrix- ECM) σε κολλαγόνο και κύτταρα του στρώματος, όπως είναι οι ινοβλάστες, κύτταρα του ανοσοποιητικού, λιποκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα (Ronnov-Jessen et al., 1996). Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία αποτελεί μια «δεξαμενή», γεμάτη από πιθανούς διαμεσολαβητές-ρυθμιστές της μοίρας των κυττάρων. Αυξητικοί παράγοντες, γλυκοπρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες και ένζυμα (μεταλλοπρωτεΐνάσες κλπ) συνθέτουν την εικόνα του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος (Frantz et al., 2010).

1.3 ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑ ΘΕΜΕΛΙΑ ΟΥΣΙΑ (ECM)

Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία παρέχει μηχανική αλλά και βιολογική υποστήριξη στα κύτταρα και είναι παρούσα σε κάθε ιστό και κάθε όργανο του ανθρώπινου σώματος (Rozario and DeSimone, 2010; Tsang et al., 2010; Geiger and Yamada, 2011). Πιο συγκεκριμένα, υποστηρίζει μηχανικά κάθε είδος κυττάρου και ταυτόχρονα συμμετέχει στη μεταβίβαση κρίσιμων βιοχημικών σημάτων, που απαιτούνται για πολλές λειτουργίες όπως η μορφογένεση των ιστών, η κυτταρική διαφοροποίηση και η ομοιοόσταση (Rozario and DeSimone, 2010; Tsang et al., 2010; Geiger and Yamada, 2011).

Κατά κύριο λόγο η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία αποτελείται από νερό, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, ενώ κάθε ιστός έχει εξωκυττάρια θεμέλια ουσία με μοναδική σύσταση, ειδική για αυτόν και διαμορφωμένη με βάση τα χαρακτηριστικά του (Frantz et al., 2010). Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες, ινδικές πρωτεΐνες (κολλαγόνο, ελαστίνη, ινονεκτίνη, λαμινίνη) καθώς επίσης και γλυκοζαμινογλυκάνες (Jarvelainen et al., 2009; Frantz et al., 2010; Schaefer and Schaefer, 2010). Τη σύσταση της συμπληρώνουν διαλυτοί αυξητικοί παράγοντες και ένζυμα που ρυθμίζουν κυτταρικές λειτουργίες (Frantz et al., 2010).

Οι βασικότερες ινιδικές πρωτεΐνες της ECM είναι το κολλαγόνο, η ελαστίνη, η ινονεκτίνη και οι λαμινίνες (Frantz et al., 2010).

Το κολλαγόνο είναι η πιο άφθονη ινιδική πρωτεΐνη της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και αποτελεί το 30% του συνόλου των πρωτεϊνών των πολυκύτταρων οργανισμών (Rozario and DeSimone, 2010). Το κολλαγόνο και οι διάφοροι τύποι του, είναι βασικό συστατικό του εξωκυττάριου χώρου και παρέχει μηχανική στήριξη, ρυθμίζει την κυτταρική προσκόλληση και υποστηρίζει την χημειοταξία και τη μετανάστευση των κυττάρων, ρυθμίζοντας την ανάπτυξη των ιστών (Rozario and DeSimone, 2010).

Η ινονεκτίνη (Fibronectin- FN) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που περιλαμβάνεται στην χωροδιάταξη και στην οργάνωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και έχει ρόλο-κλειδί στην προσκόλληση των κυττάρων στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία τους, καθώς και σε άλλες λειτουργίες των κυττάρων (Schwarzbauer and Sechler, 1999; Pankov and Yamada, 2002). Δομικά η ινονεκτίνη αποτελείται από 2 μεγάλες υπομονάδες, που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από μια σειρά λειτουργικών τομέων (domains), που χωρίζονται από ευλύγιστες πολυπεπτιδικές αλυσίδες (Schwarzbauer and Sechler, 1999; Pankov and Yamada, 2002). Οι τομείς αποτελούνται από μικρότερες υπομονάδες, καθεμιά από τις οποίες κωδικοποιείται από ένα διαφορετικό εξόνιο του γονιδίου της ινονεκτίνης. Ωστόσο, όλες οι μορφές της ινονεκτίνης παράγονται από ένα μεγάλο γονίδιο, που διαθέτει 50 εξόνια και κάθε ισομορφή είναι παράγωγο εναλλακτικού ματίσματος του RNA, που παράγεται από τη μεταγραφή του (Schwarzbauer and Sechler, 1999). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ρόλος της ινονεκτίνης στην προσκόλληση των κυττάρων στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και στην οργάνωση των κυττάρων στο χώρο (Pankov and Yamada, 2002). Περιοχές πρόσδεσης με τα κύτταρα, με το κολλαγόνο, με την ηπαρίνη αλλά και με άλλα μόρια ινονεκτίνης περιλαμβάνονται σε υπομονάδες του μορίου (Schwarzbauer and Sechler, 1999). Βασικό χαρακτηριστικό των περιοχών πρόσδεσης είναι η παρουσία της RGD αλληλουχίας. Πρόκειται για μια αλληλουχία που αποτελείται από μια ειδική τριάδα αμινοξέων (Arg- Gly- Asp) (Schwarzbauer and

Sechler, 1999). Οι αλληλουχίες αυτές αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες της μεμβράνης των κυττάρων (όπως οι ιντεγκρίνες) και έτσι επιτυγχάνεται προσκόλληση των κυττάρων στην ινονεκτίνη (Geiger et al., 2001; Pankov and Yamada, 2002). Η προσκόλληση, ωστόσο δεν είναι αποτέλεσμα μόνο αυτής της πρόσδεσης αλλά και αλληλεπιδράσεων μεταξύ άλλων μορίων.

Πολλές φορές η ινονεκτίνη επιμηκώνεται πέρα από το μήκος της και ξεδιπλώνεται, εξαιτίας τάσεων έλξης, που της προκαλούν τα κύτταρα (Smith et al., 2007). Αυτή η τάση που παρουσιάζει η ινονεκτίνη να αλλάζει τη στερεοδιαμόρφωση της και που εξαρτάται από δυνάμεις που τις ασκούν τα κύτταρα, την ωθούν στο να εκθέτει «κρυφές» θέσεις πρόσδεσης με ιντεγκρίνες, που βρίσκονται εσωτερικά του μορίου, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα μεταβολές στην κυτταρική συμπεριφορά, λόγω αλλαγών που επέρχονται και στο σχήμα των κυττάρων, που καθιστούν την FN εξωκυτταρικό μηχανικό ρυθμιστή (Smith et al., 2007). Η ινονεκτίνη είναι επίσης σημαντική για την κυτταρική μετανάστευση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, και συμμετέχει τόσο σε παθολογικές καταστάσεις όπως η δημιουργία καρδιαγγειακών προβλημάτων, όσο και στην καρκινογένεση, ιδίως στο κομμάτι της κινητικότητας των κυττάρων (Rozario and DeSimone, 2010; Tsang et al., 2010). Ακόμα, η ινονεκτίνη, όπως και άλλες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας π.χ. η τεναςίνη (tenascin) επεκτείνουν τη δράση τους σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης και της μετανάστευσης των κυττάρων κατά την επούλωση τραυμάτων (Trebault et al., 2007; Tucker and Chiquet-Ehrismann, 2009).

Ένα άλλο, σημαντικό συστατικό της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας είναι οι πρωτεογλυκάνες. Οι πρωτεογλυκάνες καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο όγκο του εξωκυττάριας χώρου, σχηματίζοντας ουσιαστικά ένα πλέγμα διαμέσου των ιστών και εμπλέκονται σε πολλές βιολογικές λειτουργίες, όπως η οργάνωση του εξωκυττάριας χώρου, η αποθήκευση αυξητικών παραγόντων και η κυτταρική προσκόλληση (Jarvelainen et al., 2009; Sarrazin et al., 2011).

Οι πρωτεογλυκάνες αποτελούνται από ένα πρωτεϊνικό κορμό συνδεδεμένο ομοιοπολικά με γλυκοζαμινογλυκανικές αλυσίδες (GAGs) (με εξαίρεση το υαλουρονικό

οξύ, το οποίο αποτελεί ελεύθερη γλυκοζαμινογλυκάνη) (Iozzo and Murdoch, 1996; Schaefer and Schaefer, 2010). Οι πρωτεογλυκάνες ταξινομούνται με βάση τον πρωτεϊνικό κορμό τους, τη θέση τους και τη σύσταση των γλυκοζαμινογλυκανών που διαθέτουν (Iozzo and Murdoch, 1996; Schaefer and Schaefer, 2010). Οι γλυκοζαμινογλυκάνες είναι γραμμικοί θειωμένοι, αρνητικά φορτισμένοι πολυσακχαρίτες, που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες δισακχαριτικές ομάδες ουρονικού οξέος και εξοζαμίνης. Βασικότερες ομάδες γλυκοζαμινογλυκανών είναι η θειϊκή ηπαράνη, η θειϊκή χονδροϊτίνη, η θειϊκή κερατάνη/ δερματάνη και η ηπαρίνη (Schaefer and Schaefer, 2010). Η σύσταση των γλυκοζαμινογλυκανικών αλυσίδων σχετίζεται άμεσα με τις ιδιότητες των πρωτεογλυκανών, καθώς η σύνδεση διαφορετικών γλυκοζαμινογλυκανικών αλυσίδων σε έναν πρωτεϊνικό κορμό, προσδίδει διαφορετικές ιδιότητες στην αντίστοιχη σχηματιζόμενη πρωτεογλυκάνη. Ανάλογα με τη θέση τους, οι 3 βασικότερες οικογένειες των πρωτεογλυκανών είναι οι: εκκρινόμενες προς την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, οι σχετιζόμενες με την κυτταρική μεμβράνη και οι ενδοκυτταρικές. Οι εκκρινόμενες διακρίνονται σε μικρές πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες (Small- Leucine Rich Proteoglycans- SLRPs) (Lumican, Decorin), σε πρωτεογλυκάνες της βασικής μεμβράνης (Perlecan, Collagen XVIII, Agrin) και τις υαλεκτίνες (Versican, Neurocan, Aggrecan, Brevican). Οι πρωτεογλυκάνες, που σχετίζονται με την κυτταρική μεμβράνη διακρίνονται σε συνδεκάνες και γλυπικάνες. Τέλος, η μόνη γνωστή ενδοκυττάρια πρωτεογλυκάνη είναι η σεργλυκίνη (Schaefer and Schaefer, 2010). Οι πρωτεογλυκάνες εμπλέκονται σε πολλές βιολογικές λειτουργίες, όπως η οργάνωση του εξωκυττάριου χώρου, η αποθήκευση αυξητικών παραγόντων και η κυτταρική προσκόλληση (Sarrazin et al., 2011).

Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, μέσω των συστατικών της, δημιουργεί ένα δυναμικό σύστημα μεταξύ κυττάρων και κυτταρικού μικροπεριβάλλοντος (Frantz et al., 2010). Έτσι, τροποποιήσεις στη δομή/ αρχιτεκτονική αλλά και στη σύσταση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας είναι πιθανές και σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις, μεταξύ των οποίων είναι και ο καρκίνος (Afratis et al., 2012; Kouvidi et al., 2014; Nikitovic et al., 2014a; Nikitovic et al., 2014b; Nikitovic et al., 2014c).

1.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΘΕΜΕΛΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ ΣΤΙΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ο καρκίνος χαρακτηρίζεται από έλλειψη στην οργάνωση του ιστού και κυτταρική συμπεριφορά που διαφέρει από τις φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες. Ο μετασχηματισμός των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά οφείλεται τόσο σε γενετικές μεταλλάξεις, όσο και σε επιγενετικές τροποποιήσεις. Ακόμα, οι καρκινικοί όγκοι μοιάζουν με “τραύματα” που έχουν αποτύχει να επουλωθούν (Bissell and Radisky, 2001). Έτσι το καρκινικό μικροπεριβάλλον, συμπεριφέρεται όπως ένας τραυματισμένος ιστός, χαρακτηριζόμενος για παράδειγμα από αυξημένη σκληρότητα, σε σχέση με ένα φυσιολογικό κυτταρικό περιβάλλον (Ronnon-Jessen et al., 1996; Bissell and Radisky, 2001). Τέτοιες τροποποιήσεις επάγονται από αλλαγές, στην τοποθέτηση και στην ποσότητα των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας, όπως επίσης και σε αλλαγές στις εκκριτικές λειτουργίες των ινοβλαστών που τα παράγουν (Butcher et al., 2009; Levental et al., 2009).

Το κυτταρικό μικροπεριβάλλον και οι τροποποιήσεις των συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας σχετίζονται άμεσα με τον κακοήγη μετασχηματισμό των κυττάρων και με τις αλλαγές που συμβαίνουν σε όλα τα στάδια της μεταστατικής διαδικασίας (Afratis et al., 2012; Nikitovic et al., 2014a). Άλλωστε είναι γνωστό ότι τα καρκινικά κύτταρα δεν υφίστανται ως μεμονωμένες οντότητες, αλλά πάντα περιστοιχιζόμενα από ένα πλούσιο μικροπεριβάλλον, που τους παρέχει βιολογική υποστήριξη.

Έτσι, τυχόν αλλαγές στη σύσταση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και αλληλεπιδράσεις των μορίων της με τα καρκινικά κύτταρα ρυθμίζουν κυτταρικές λειτουργίες των κυττάρων των όγκων, όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση, η προσκόλληση, επηρεάζοντας έτσι, τη διαδικασία της μετάστασης και κατ’ επέκταση την κυτταρική τους συμπεριφορά (Chalkiadaki et al., 2011a; Kouvidi et al., 2011; Nikitovic et al., 2013; Nikitovic et al., 2014a; Nikitovic et al., 2014b; Trotter and Yang, 2016). Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία ομοιάζει με μια δεξαμενή, που περιέχει πληθώρα

μορίων- διαμεσολαβητών πολυάριθμων κυτταρικών λειτουργιών, όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες και οι κυτοκίνες, που μπορεί να βρίσκονται είτε ελεύθεροι σε διαλυτή κατάσταση, είτε προσδεδεμένοι σε άλλα δομικά στοιχεία της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Kirkpatrick and Selleck, 2007).

Βασικά συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως είναι η ινονεκτίνη και το κολλαγόνο θεωρούνται πολύ σημαντικά για την εξέλιξη του καρκίνου (Pankov and Yamada, 2002; Imamichi and Menke, 2007; Kirkland, 2009). Πιο συγκεκριμένα, η αυξημένη έκφραση της ινονεκτίνης θεωρείται δείκτης υψηλής επιθετικότητας (Pankov and Yamada, 2002; Wu et al., 2015). Ακόμα, η ινονεκτίνη αφθονεί στην εξωκυττάρια ουσία των καρκινικών κυττάρων του μαστού και θεωρείται δείκτης για τη διαδικασία του μετασχηματισμού των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (Ignotz and Massague, 1986; Ioachim et al., 2002; Park and Schwarzbauer, 2014; Bouris et al., 2015; Wu et al., 2015). Η έκφραση της ινονεκτίνης έχει συσχετισθεί θετικά με αυξημένη επιθετικότητα και την επαγωγή ενός πιο “κινητικού” φαινοτύπου σε καρκινικά κύτταρα του μαστού (Edderkaoui et al., 2005; Bouris et al., 2015; Wu et al., 2015). Η αλληλεπίδραση της ινονεκτίνης με πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης, ρυθμίζει την προσκολλητική και μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων του μαστού (Pankov and Yamada, 2002). Ακόμα, η έκφραση της ινονεκτίνης ρυθμίζεται από τον υποδοχέα της οιστραδιόλης α (Estrogen Receptor α- ERα), συγκεκριμένα κύτταρα ελλιπή σε ERα εκφράζουν αυξημένη ποσότητα ινονεκτίνης (Bouris et al., 2015). Επίσης, καρκινικά κύτταρα του μαστού που είναι ανθεκτικά στην ταμοξιφαίνη (ανθεκτικά στις ορμονοθεραπείες) εμφανίζουν αυξημένη σύνθεση ινονεκτίνης, αλλά και άλλων μεσεγχυματικών δεικτών (Kim et al., 2015).

Οι γλυκοζαμινογλυκάνες και οι πρωτεογλυκάνες του εξωκυττάριας χώρου, έχειδειχθεί ότι καθορίζουν ή συμμετέχουν στη ρύθμιση πολλών κυτταρικών λειτουργιών, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διήθηση και η μετανάστευση, τόσο δρώντας ως προσδέτες άλλων παραγόντων, όσο και ως προσδέτες των υποδοχέων τους επιδρώντας στη βιοδιαθεσιμότητα τους, που είναι καθοριστική για τη δράση τους (Mitropoulou et al., 2004; Nikitovic et al., 2008; Schaefer and Schaefer, 2010; Chalkiadaki et al., 2011a;

Chalkiadaki et al., 2011b; Afratis et al., 2012; Mytilinaiou et al., 2013; Nikitovic et al., 2014a; Nikitovic et al., 2014b; Nikitovic et al., 2014c; Kouvidi et al., 2016). Τα ειδικά δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεογλυκανών, που αφορούν είτε τον πρωτεϊνικό κορμό, είτε τα είδη των γλυκοζαμινογλυκανικών αλυσίδων, που διαθέτουν, παρέχουν τη βάση για την πληθώρα των βιολογικών λειτουργιών, στις οποίες περιλαμβάνονται δράντας είτε σα δομικά συστατικά στην οργάνωση των ιστών, όσο και σαν ρυθμιστές της κυτταρικής συμπεριφοράς (Afratis et al., 2012; Nikitovic et al., 2014a).

Η οικογένεια των συνδεκανών αποτελείται από τη συνδεκάνη 1, τη συνδεκάνη 2, τη συνδεκάνη 3 και τη συνδεκάνη 4 και είναι διαμεμβρανικές πρωτεογλυκάνες θειϊκής ηπαράνης (Bernfield et al., 1992). Οι συνδεκάνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση και στην κυτταρική σηματοδότηση δράντας σαν συν-υποδοχείς των ιντεγκρινών της κυτταρικής μεμβράνης και μορίων της προσκόλλησης (Beauvais and Rapraeger, 2004). Ως πρωτεογλυκάνες θειϊκής ηπαράνης, αλληλεπιδρούν μέσω των GAGs που διαθέτουν, τόσο με αυξητικούς παράγοντες του εξωκυττάρικου χώρου, όσο και με τις ιντεγκρίνες των κυτταρικών μεμβρανών, συμμετέχοντας στην προσκόλληση των κυττάρων (Bernfield et al., 1992; Beauvais and Rapraeger, 2004)

Στο στρώμα διηθητικών καρκίνων του μαστού έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση συνδεκάνης 1 (Stanley et al., 1999; Leivonen et al., 2004; Maeda et al., 2004). Η αυξημένη έκφραση της συνδεκάνης 1, τόσο στα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα του μαστού, όσο και στο στρώμα θεωρείται δείκτης κακής πρόγνωσης και επιθετικότητας, μιας και σχετίζεται με γρήγορη ανάπτυξη και αυξημένο μέγεθος του όγκου (Stanley et al., 1999; Barbareschi et al., 2003; Lendorf et al., 2011). Σε *in vitro* μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί σε καρκινικά κύτταρα του μαστού έχει δειχθεί ότι η συνδεκάνη 1 επάγει αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Maeda et al., 2004). Λειτουργικά θεωρείται ότι η συνδεκάνη 1 δρα ως συν-υποδοχέας, που ενεργοποιεί τη σηματοδότηση αυξητικών παραγόντων και κατά συνέπεια ρυθμίζει την αγγειογένεση, την κυτταρική προσκόλληση και την κινητικότητα (Bernfield et al., 1999). Γενικά, σε καρκινικά κύτταρα του μαστού αρνητικά ως προς την έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων που χαρακτηρίζονται από ταχεία ανάπτυξη η συνδεκάνη 1 και η συνδεκάνη 4

υπερεκφράζονται (Baba et al., 2006; Malavaki et al., 2013). Ωστόσο, άλλη μελέτη έχει επισημάνει μειωμένη έκφραση της συνδεκάνη 4 σε κακοήθεις ιστούς του μαστού (Mundhenke et al., 2002).

Η βιοδιαθεσιμότητα των αυξητικών παραγόντων IGF-I (Insulin-like Growth Factor) και EGF (Epidermal Growth Factor), που θεωρούνται μόρια-κλειδιά, στο μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Milani et al., 2014) και επηρεάζουν την εξέλιξη της νόσου, τροποποιεί το φαινότυπο των κυττάρων, τη γονιδιακή έκφραση και τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων συγκεκριμένων τριπλά αρνητικών (TNBC) όγκων (Voudouri et al., 2015).

Τα συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας τροποποιούνται από τις δράσεις πολλών πρωτεασών και γλυκοζιδασών, που διαθέτει το κυτταρικό μικροπεριβάλλον και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, αλλαγές τόσο στη δομή του στρώματος του όγκου, όσο και στη βιοδιαθεσιμότητα πολλών διαμεσολαβητών (Gialeli et al., 2011). Πράγματι, η πρωτεολυτική δράση πολλών ενζύμων μπορεί να τροποποιεί τη βιοδιαθεσιμότητα διαλυτών αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι μέσω της ενεργοποίησής συγκεκριμένων ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών, ρυθμίζουν σημαντικές λειτουργίες των κυττάρων, όπως ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση. Ενδεικτικά αναφέρεται, ότι η οικογένεια των μεταλλοπρωτεϊνών του στρώματος (MMPs) που αποτελείται από 24 (γνωστές) ενδοπεπτιδάσες φέρεται να διαδραματίζει ρόλο κλειδί στην αναδιοργάνωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης (Gialeli et al., 2011).

Αυτά τα σημαντικά συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας τροποποιούν την κινητικότητα των κυττάρων επηρεάζοντας την προσκολλητική και μεταστατική ικανότητα των κυττάρων (Chalkiadaki et al., 2011b; Mytilinaïou et al., 2013).

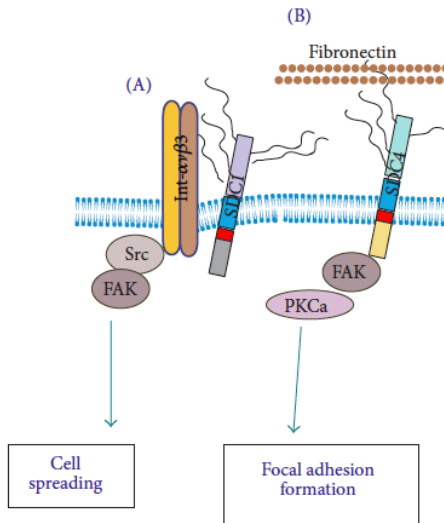
1.5 ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ

Τα κύτταρα προσκολλώνται στην εξωκυττάρια ουσία με τρόπο που διαμεσολαβείται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες στα σημεία προσκόλλησης. Οι

ιντεγκρίνες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που λειτουργούν ως γέφυρα συνδέοντας τα μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας με τα ινίδια της ακτίνης του κυτταροσκελετού, ρυθμίζοντας το σχήμα, τον προσανατολισμό και την κίνηση των κυττάρων (Geiger et al., 2001; Harburger and Calderwood, 2009). Συγκεκριμένα η εξωκυττάρια υπομονάδα των ιντεγκρινών (διαμεμβρανικών πρωτεϊνών), συνδέεται με μια πρωτεϊνική υπομονάδα ενός συστατικού της εξωκυττάριας ουσίας, όπως είναι η ινονεκτίνη, ενώ η ενδοκυττάρια υπομονάδα συνδέεται εμμέσως με την ακτίνη του κυτταροσκελετού, μέσω ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών αγκυροβολίας, όπως η ταλίνη, η α-ακτινίνη και η βινκουλίνη (Schwarzbauer and Sechler, 1999; Geiger et al., 2001; Geiger and Yamada, 2011). Με τον τρόπο αυτό, η προσκόλληση πραγματοποιείται από τη σύνδεση στοιχείων του κυτταροσκελετού με στοιχεία της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και περιλαμβάνεται στη διαδικασία κυτταρικής μετανάστευσης (Schmidt and Friedl, 2010).

Οι περισσότερες σηματοδοτικές λειτουργίες της προσκόλλησης και των ιντεγκρινών, διαμεσολαβούνται από μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη με ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης, που ονομάζεται κινάση της εστιακής προσκόλλησης (Focal Adhesion Kinase- FAK) και βρίσκεται κοντά στην κυτταρική μεμβράνη (Hanks and Polte, 1997). Η FAK είναι η πιο κοινή πρωτεΐνη που βρίσκεται στις εστίες προσκόλλησης, δηλαδή, στα σημεία επαφής, μέσω των οποίων, το κύτταρο προσφύεται στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (Hanks and Polte, 1997). Όταν οι ιντεγκρίνες “πακετάρονται” στις εστίες προσκόλλησης κυττάρου-εξωκυττάριου χώρου, οι FAK “στρατολογούνται” στα σημεία αυτά από ενδοκυττάριας πρωτεΐνες αγκυροβολίας, όπως είναι η ταλίνη, που συνδέεται στην υπομονάδα β των ιντεγκρινών ή η παξιλίνη που συνδέεται στην υπομονάδα α (Hanks and Polte, 1997; Chhabra and Higgs, 2007). Οι ενδιαμέσες πρωτεΐνες αγκυροβολίας η ταλίνη, η βινκουλίνη και άλλες, συνδέονται με την ακτίνη του κυτταροσκελετού (Geiger et al., 2001; Chhabra and Higgs, 2007; Geiger and Yamada, 2011). Τα συγκεντρωμένα μόρια FAK στις εστίες προσκόλλησης φωσφορυλιώνονται, σε συγκεκριμένα κατάλοιπα τυροσίνης, ενεργοποιώντας κατάντη πρωτεΐνες της οικογένειας Src, καθώς και άλλες ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες (Hanks and Polte, 1997; Harburger and Calderwood, 2009).

Οι συνδεκάνες βρίσκονται στις μεμβράνες των περισσότερων κυττάρων και δρουν ως υποδοχείς για πρωτεΐνες του στρώματος (Beauvais and Rapraeger, 2004). Είναι παρούσες στα σημεία προσκόλλησης των κυττάρων και τροποποιούν τις λειτουργίες των ιντεγκρινών, καθώς αλληλεπιδρούν με την ινονεκτίνη από την εξωκυττάρια πλευρά και τις ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες από την κυτταροπλασματική (Bernfield et al., 1999). Πιο συγκεκριμένα, η συνδεκάνη 1 ρυθμίζει κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται, παραδοσιακά, με ιντεγκρίνες (Fears and Woods, 2006; Lambaerts et al., 2009; Theocharis et al., 2010), διαμεσολαβώντας έτσι την κυτταρική μετανάστευση, με τη δημιουργία μιας δυναμικής σύνδεσης μεταξύ εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και κυτταροσκελετού, ασκώντας έλεγχο στην ενεργοποίηση της FAK (Εικόνα 1). Πράγματι, έχει παρατηρηθεί ότι σε καρκινικά κύτταρα του μαστού MDA-MB-231 η συνδεκάνη 1 αλληλεπιδρά φυσικά με την FAK (Ibrahim et al., 2012). Επιπλέον, η συνδεκάνη 1 ρυθμίζει την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών $\alpha_v\beta_3$ και/ή $\alpha_v\beta_5$. Η ενεργοποίηση αυτή διεγείρει την κυτταρική προσκόλληση και τη διασπορά των κυττάρων, επηρεάζοντας, με σαφή τρόπο, την πορεία του καρκίνου του μαστού (Beauvais and Rapraeger, 2004). Ακόμα, η συνδεκάνη 4 φαίνεται να συμμετέχει στη δημιουργία συμπλόκου προσκόλλησης στα σημεία εστιακής προσκόλλησης αλλά και στην κατάντη σηματοδότηση που επάγει τη προσκόλληση (Baba et al., 2006).



Εικόνα 1: Ο ρόλος των πρωτεογλυκανών στην κινητικότητα καρκινικών κυττάρων του μαστού. (Α) Ο σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ ιντεγκρίνης $\alpha_3\beta_3$ και συνδεκάνης 1 ενεργοποιεί την κινάση της εστιακής προσκόλλησης, διευκολύνοντας την διασπορά των καρκινικών κυττάρων του μαστού. (Β) Η σύνδεση της συνδεκάνης 4 στην ινονεκτίνη ενεργοποιεί την κινάση της εστιακής προσκόλλησης και την πρωτεϊνική κινάση του ασβεστίου (PKCa) διεγείροντας την προσκόλληση.

Η συνδεκάνη 4 φαίνεται να συμμετέχει στη δημιουργία συμπλόκου προσκόλλησης στα σημεία εστιακής προσκόλλησης αλλά και στην κατάντη σηματοδότηση που επάγει τη προσκόλληση (Baba et al., 2006).

1.6 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ IGF-I/EGF ΚΑΙ ΤΗΣ ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗΣ (E2) ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Η ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού ρυθμίζεται τόσο από την ενδογενή παραγωγή των αυξητικών παραγόντων, από τα κύτταρα του μαστού, όσο και από τη δράση αυξητικών παραγόντων που έχουν παραχθεί σε άλλα όργανα του ανθρώπινου σώματος (εξωγενώς) (Dickson and Lippman, 1987; Beckmann et al., 2007). Οι αυξητικοί παράγοντες, αλλά και οι στεροειδείς ορμόνες, όπως είναι η οιστραδιόλη, μπορούν να επάγουν πολλαπλασιασμό ή/και διασπορά των καρκινικών κυττάρων του μαστού. (Dickson and Lippman, 1987; Milani et al., 2014; Skandalis et al., 2014; Voudouri et al., 2015). Η στόχευση του ER α συνηθίζεται, ως θεραπευτική προσέγγιση στον ορμονο-

εξαρτώμενο καρκίνο του μαστού (ER+) (Milani et al., 2014). Οι περιπτώσεις των καρκίνων αυτών, χαρακτηρίζονται από καλή πρόγνωση και η αντιμετώπιση τους στηρίζεται, κατά κύριο λόγο, σε ορμονοθεραπεία. Ωστόσο η πλειονότητα των ασθενών, που υποβάλλονται σε ορμονοθεραπεία εμφανίζει, προοδευτικά, ανθεκτικότητα στη θεραπεία αυτή (επίκτητη ανθεκτικότητα), ενώ ένα ποσοστό ασθενών δεν ανταποκρίνεται εξαρχής στην θεραπεία (*de novo* ανθεκτικότητα) (Milani et al., 2014). Η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας αυτής μπορεί να αυξήσει την επιθετικότητα και την αναπτυξιακή ικανότητα του όγκου (Barrios et al., 2012). Αποκρίσεις των κυττάρων, στα στεροειδή, έχουν συνδεθεί λειτουργικά, με ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένου του c-Src και των υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης (Receptor Tyrosine Kinase) (Shupnik, 2004; Milani et al., 2014; Skandalis et al., 2014). Η αντίσταση των καρκινικών κυττάρων του μαστού στην ορμονοθεραπεία έχει συσχετισθεί με την ενεργοποίηση άλλων, εναλλακτικών σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως αυτό του IGF-I και του EGF (Milani et al., 2014). Η αντίσταση στις ορμονοθεραπείες έχει σχέση με την υπερέκφραση μορίων που έχουν ρόλο- κλειδί στη μοριακή σηματοδότηση των αυξητικών παραγόντων αυτών, όπως είναι τα IGF-IR, EGFR, HER2 και c-Src (Shupnik, 2004).

1.7 ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΠΟΥ ΟΜΟΙΑΖΕΙ ΜΕ ΤΗΝ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ (INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR)

Οι βιολογικές δράσεις των παραγόντων που συμπεριλαμβάνονται στην οικογένεια των αυξητικών παραγόντων που ομοιάζουν με την ινσουλίνη (Insulin-like Growth Factor- IGF) δεν επηρεάζουν, μόνο, την κανονική ανάπτυξη των οργανισμών, αλλά εμπλέκονται στην ογκογένεση, ρυθμίζοντας πολλές σχετικές διαδικασίες (Baserga et al., 1997; LeRoith and Roberts, 2003). Η οικογένεια αυτή αποτελείται από τους προσδέτες IGF-I, IGF-II (Insulin-like Growth Factor I & II), τους διαμεμβρανικούς τους υποδοχείς (IGF-IR, IGF-IIR και IR) και μια ομάδα πρωτεϊνών που προσδέονται στους

παράγοντες που ομοιάζουν με την ινσουλίνη (Insulin-like Growth Factor- Binding Proteins- IGFbps) (LeRoith et al., 1995).

Δομικά, η ινσουλίνη αποτελείται από δύο πεπτιδία (Α και Β), ενώ οι παράγοντες IGFs αποτελούνται από μια, μονή αλυσίδα, που διατηρεί το συνδεδεμένο πεπτιδίο C που βρίσκεται μεταξύ των πεπτιδίων Α και Β στη δομή της προΐνσουλίνης (Daughaday and Rotwein, 1989). Οι IGFs παράγοντες διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στον καρκίνο και μάλιστα, υψηλά επίπεδα IGF-I στην κυκλοφορία του αίματος, συνιστούν παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού, του προστάτη, του κόλον καθώς και του πνεύμονα (LeRoith et al., 1995).

Αξιοσημείωτο είναι ότι η έκφραση του IGF-I θεωρείται δείκτης για την πορεία και την πρόγνωση του καρκίνου του μαστού (LeRoith and Roberts, 2003). Οι μιτογόνες και αντι- αποπτωτικές δράσεις του IGF-I διαμεσολαβούνται, κυρίως μέσω του υποδοχέα του IGF-IR (LeRoith et al., 1995; Sepp-Lorenzino, 1998). Η ενεργοποίηση και η υπερέκφραση του υποδοχέα IGF-IR εμπλέκονται σε πολυάριθμες βιολογικές λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των λειτουργιών της μετανάστευσης, του πολλαπλασιασμού αλλά και άλλων διαδικασιών, που σχετίζονται με τον κακοήγη φαινότυπο των κυττάρων (Baserga et al., 1997; Surmacz, 2000; Bohula et al., 2003).

Ο IGF-IR είναι μια ετερο-τετραμερής, διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που περιλαμβάνει δύο α και δύο β υπομονάδες ($\alpha_2\beta_2$). Οι υπομονάδες α διαθέτουν την ικανότητα σύνδεσης στον προσδέτη και οι υπομονάδες β διαθέτουν ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης (Ullrich et al., 1986; Baserga et al., 2003). Η σύνδεση του προσδέτη στον IGF-IR επιφέρει αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση του και αυτοφωσφορυλίωση στα κατάλοιπα τυροσίνης 1131, 1135 και 1136 της περιοχής που διαθέτει ενεργότητα κινάσης (Kato et al., 1994). Η πρόσδεση του IGF-I στον IGF-IR προκαλεί τη μοριακή “στρατολόγηση” πολλών πρωτεϊνών, οι οποίες ανήκουν, κατά κύριο λόγο, στην οικογένεια των πρωτεϊνών- υποστρωμάτων του υποδοχέα της ινσουλίνης. Οι πρωτεΐνες αυτές αυτοφωσφορυλιώνονται διαμέσου της κυτταροπλασματικής περιοχής του IGF-IR, με επακόλουθο την ενεργοποίηση κατάντη σηματοδοτικών μορίων όπως είναι τα

Shc/Grb10 (Craparo et al., 1995; Ricketts et al., 1996), Ras/Raf-1, MAPK/Erk και PI-3K/Akt (White and Kahn, 1994; Nguyen et al., 2000).

1.8 ΜΟΡΙΑΚΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΠΟΥ ΟΜΟΙΑΖΕΙ ΜΕ ΤΗΝ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ (IGF signaling) ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Τα μέλη της οικογένειας του IGF αυξητικού παράγοντα (συμπεριλαμβανομένου του IGF-I) υπερεκφράζονται στους καρκίνους του μαστού και έχειδειχθεί ότι βοηθούν στην επιβίωση των κυττάρων αλλά και στην ανάπτυξη τους, μέσω πληθώρας σηματοδοτικών ενδοκυτταρικών μονοπατιών (LeRoith and Roberts, 2003). Τα βασικότερα σηματοδοτικά μόρια για τη μεταγωγή του σήματος του IGF-I είναι τα MAPK και PI-3kinase (Ahmad et al., 1999; Adams et al., 2000; Martin et al., 2012). Τα συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια έχουν καθοριστική σημασία, τόσο για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (McCubrey et al., 2006; Whyte et al., 2009; Jeong et al., 2010), όσο και για άλλες βασικές ιδιότητες τους, όπως είναι η προσκόλληση (Voudouris et al., 2016). Επιπλέον, επιστημονικά δεδομένα κάνουν λόγο για τη συμμετοχή του Erk1/2 (MAPK44/42) στην αντίσταση των MCF-7 κυττάρων στην κυτταρική απόπτωση, γεγονός που φανερώνει τη σημασία της Erk1/2 σηματοδότησης στην παρατεταμένη επιβίωση των κυττάρων αυτών (Jeong et al., 2010). Από την άλλη πλευρά, δημοσιευμένα δεδομένα κάνουν λόγο για αρνητική ρύθμιση της σηματοδότησης του IGF στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού, από τη c-Jun N-αμινοτελική κινάση (c-Jun N-terminal kinase- JNK) (Mamay et al., 2003).

Η πλειονότητα των δράσεων του IGF-I στις κυτταρικές δραστηριότητες διαμεσολαβείται από το βασικότερο μόριο-κλειδί της σηματοδότησης του, που είναι ο υποδοχέας του: IGF-IR (LeRoith et al., 1995). Η ενεργοποίηση του IGF-IR από τον IGF-I επιφέρει την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα σε συγκεκριμένα κατάλοιπα τυροσίνης (Kato et al., 1994; LeRoith et al., 1995). Στη συνέχεια, ο ενεργοποιημένος IGF-IR αμέσως,

φωσφορυλιώνει άλλα υποστρώματα, όπως το IRS-1, IRS-2, IRS-4 (Myers et al., 1994a). Όταν ενεργοποιηθεί η IRS-1 δίνει το σήμα αναγνώρισης για **άλλα** μόρια, παρέχοντας και μια περιοχή πρόσδεσης για πρωτεΐνες που διαθέτουν SH2 υπομονάδα (Myers et al., 1993). Μετά τη φωσφορυλίωση της IRS-1, πολλά κατάντη ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια ενεργοποιούνται επάγοντας τις μιτογόνες δράσεις τους. Τέτοια σηματοδοτικά μονοπάτια είναι το MAPK και το PI3-k (Skolnik et al., 1993; Coppola et al., 1994; Myers et al., 1994b). Άλλα υποστρώματα που φωσφορυλιώνονται από τον IGF-IR είναι οι Shc (src-homology 2/collagen -α proteins) (Giorgetti et al., 1994), η πρωτεΐνη 10 που προσδέεται σε υποδοχείς αυξητικών παραγόντων (Growth Factor receptor- binding protein 10) (Morrione et al., 1996), η κινάση της εστιακής προσκόλλησης (Focal Adhesion Kinase- FAK) (Baron et al., 1998) και η καρβοξυτελική src κινάση (Carboxyl-terminal src kinase- CSK) (Arbet-Engels et al., 1999).

Η σημασία της IGF σηματοδότησης στον καρκίνο του μαστού έχει τονιστεί από μελέτες που αποδεικνύουν ότι η δράση του IGF-I στα MCF-7 κύτταρα σταματά με την προσθήκη αναστολέα για το PI-3K, τόσο σε ότι αφορά τον πολλαπλασιασμό (Zhang et al., 2005), όσο και στην προσκόλληση (Voudouri et al., 2016). Το ίδιο παρατηρείται και σε πειράματα παρουσία αντι-οιστρογόνων ICI 182780 (Zhang et al., 2005). Οι Ahmad et al., έχουν προτείνει ότι το Akt ενδοκυτταρικό σηματοδοτικό μόριο είναι βασικός διαμεσολαβητής, τόσο της σηματοδότησης της οιστραδιόλης, όσο και του IGF-I στα ορμονο-εξαρτώμενα MCF-7 κύτταρα (Ahmad et al., 1999). Επιπλέον ο IGF-IR, μέσω ενεργοποίησης του PI-3k/Akt σηματοδοτικού μονοπατιού, αυξάνει τον Cyr61, μια πρωτεΐνη της οικογένειας των CCN με πολύ σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου, η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία ποικίλων ομόλογων περιοχών, συμπεριλαμβανομένης της περιοχής πρόσδεσης με τον IGF-I (Sarkissyan et al., 2014). Αυτή η αύξηση στην Cyr61 οδηγεί σε επαγωγή της διηθητικότητας, αλλά και του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Sarkissyan et al., 2014). Επιπρόσθετα, η αναστολή των MAPK και PI-3k πριν τη διέγερση των κυττάρων με IGF-I αποτρέπει την έκφραση ειδικών ογκοκατασταλτικών miRNAs. Ενδεικτικά αναφέρεται

ότι έχει προταθεί ότι η IGF-I σηματοδότηση ρυθμίζει την έκφραση ειδικών miRNAs στα ER+ MCF-7 κύτταρα του μαστού (Martin et al., 2012).

Η παρεμπόδιση του IGF-IR σηματοδοτικού μονοπατιού, μέσω αναστολής της λειτουργίας του IGF-IR (χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων) έχει δείχθει ότι παρεμποδίζει την ενεργοποίηση κατάντη σηματοδοτικών μορίων, όπως είναι το Akt και το MAPK (Burtrum et al., 2003). Όπως είναι λογικό, κατόπιν τούτου η πολλαπλασιαστική δράση του IGF-I αναστέλλεται σημαντικά (Burtrum et al., 2003). Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει ότι σε ποντίκια με καρκίνο η ελλιπής έκφραση του IGF-IR συνοδεύεται από μειωμένη πολλαπλασιαστική και μεταναστευτική ικανότητα των όγκων (Yakar et al., 2005), αποδίδοντας έναν κεντρικό ρόλο για τον IGF-IR στις κυτταρικές λειτουργίες καρκινικών κυττάρων του μαστού. Επιπλέον, επιστημονικά δεδομένα αναφέρουν ότι η καταστολή του IGF-IR αυξάνει την κυτταρική απόπτωση των MCF-7 κυττάρων, μέσω του *p38*, που είναι μέρος του MAPK μονοπατιού (Mendoza et al., 2011). Προς το παρόν ωστόσο, αυτό δεν έχει μεταφραστεί σε κάποιο αποτελεσματικό κλινικό εύρημα (Yee, 2012).

Επιπροσθέτως, η λειτουργία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, επηρεάζει τα σήματα του IGF-IR και τις δράσεις του σε καρκινικά κύτταρα του μαστού (Pollak et al., 2004). Η μεταγραφή του *IGF-IR* γονιδίου, ρυθμίζεται αρνητικά από πρωτεϊνικά παράγωγα ογκοκατασταλτικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των: γονίδιο του καρκίνου του μαστού-1 (*BRCA1*), *p53*, και η Wilms' tumor protein-1 (*WT-1*) (Abramovitch and Werner, 2003; Sarfstein et al., 2006). Οι ρόλοι των *BRCA1* και *BRCA2* στην εξέλιξη και στην πρόγνωση του καρκίνου του μαστού είναι πολύ καλά τεκμηριωμένοι (Wang et al., 2000). Μελέτες σε διάφορα πειραματικά μοντέλα, όπως είναι τα ποντίκια, ιστοί από όγκους ωοθηκών, αλλά και κυτταρικές καλλιέργειες, έχουν δείξει ότι το *BRCA1* παρεμποδίζει τη δράση του IGF-I (Shukla et al., 2006; Hudelist et al., 2007). Επομένως, η έλλειψη του *BRCA1* μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη έκφραση συγκεκριμένων μορίων που συμμετέχουν στο IGF-I σηματοδοτικό μονοπάτι (Shukla et al., 2006; Hudelist et al., 2007). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, μετάλλαξη ή έλλειψη στο *BRCA1* να οδηγεί σε αυξημένη ενεργότητα του IGF-I, με ότι αυτό συνεπάγεται για τις

κυτταρικές λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Το *p53* ογκοκατασταλτικό γονίδιο έχει βρεθεί να ρυθμίζει πολλά γονίδια και μεταλλάξεις του σχετίζονται με πολλούς τύπους καρκίνου (Di Agostino et al., 2006). Πέρα από αυτό, η έλλειψη στη λειτουργία του *p53* ογκοκατασταλτικού γονιδίου, έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την έκφραση του IGF-IR (Webster et al., 1996; Werner and Maor, 2006). Ο μηχανισμός αυτός, ωστόσο, δεν περιλαμβάνει ευθεία πρόσδεση στο DNA, δηλαδή στις αλληλουχίες του υποκινητή του *IGF-IR* γονιδίου (Sarfstein et al., 2006). Ακόμα ένα τέτοιο παράδειγμα, είναι η έλλειψη στη λειτουργία του *PTEN*, ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου, που κωδικοποιεί μια φωσφατάση, η οποία σταματά τη σηματοδότηση που προέρχεται από υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης, όπως είναι ο IGF-IR (LeRoith and Roberts, 2003; Pollak et al., 2004).

1.9 ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ (EPIDERMAL GROWTH FACTOR)

Ο ρόλος των μελών της οικογένειας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF family) είναι αρκετά καλά μελετημένος στην παθογένεση του καρκίνου του μαστού (Riese and Stern, 1998). Η οικογένεια του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) αποτελείται από τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα EGF, τον μετασχηματιστικό αυξητικό παράγοντα- α (Transforming Growth Factor- TGF-α), τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα που προσδέεται με την ηπαρίνη (Heparin Binding- Epidermal Growth Factor- HB-EGF), την amphiregulin (AR), την epiregulin (EPR), την betacellulin (BTC) και τις neuregulins (NRGs) (Hynes and Stern, 1994; Meyer and Birchmeier, 1995). Όλα τα μέλη της συγκεκριμένης, μοριακής οικογένειας αποτελούνται από πρόδρομες δομές που αγκυροβολούν στην κυτταρική μεμβράνη και τις εξωτερικές τους υπομονάδες συνδεδεμένες για να απελευθερώσουν, τη διαλυτή μορφή του παράγοντα, ως επακόλουθο μιας πρωτεολυτικής διαδικασίας (Massague and Pandiella, 1993; Riese and Stern, 1998).

Η οικογένεια των ErbB υποδοχέων, που σχετίζεται δομικά με τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor- EGFR), αποτελείται από τον ErbB1 (γνωστός επίσης ως EGFR ή HER2), τον ErbB2 (HER2/Neu), τον ErbB3 (HER3) και τον ErbB4 (HER4) (Hynes and Stern, 1994; Holbro et al., 2003). Δομικά οι υποδοχείς ErbBs αποτελούνται από μια εξωκυττάρια υπομονάδα πλούσια σε κατάλοιπα κυστεΐνης, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια μεγάλη ενδοκυττάρια υπομονάδα (Riese and Stern, 1998). Όλοι οι προσδέτες των υποδοχέων αυτών έχουν μια υπομονάδα που μοιάζει με τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα και έχει μεγάλη ικανότητα πρόσδεσης στους υποδοχείς αυτούς (Pinkas-Kramarski et al., 1996; Holbro et al., 2003). Η εξωκυττάρια υπομονάδα διαθέτει ικανότητα πρόσδεσης με τους αυξητικούς παράγοντες (προσδέτες), ενώ η ενδοκυττάρια έχει ενεργότητα κίνησης της τυροσίνης. Από πλευράς μηχανισμού, η σύνδεση του προσδέτη στον υποδοχέα, οδηγεί σε διμερισμό του και επακόλουθη αυτοφωσφορυλίωσή του σε συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα τυροσίνης, διαμέσου, της κυτταροπλασματικής του υπομονάδας (Holbro et al., 2003). Αυτές οι δομικές αλλαγές, ενεργοποιούν άλλες σηματοδοτικές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες οι οποίες, με τη σειρά τους προκαλούν ενεργοποίηση κατάντη σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως είναι οι Mitogen- Activated Protein Kinases (MAPKs) και οι PI-3kinase (με μια διαδικασία που μοιάζει με ντόμινο) (Hynes and Stern, 1994; Olayioye et al., 2000; Yarden and Sliwkowski, 2001).

1.10 ΜΟΡΙΑΚΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ (EGF signaling)

Οι υποδοχείς ErbBs σχετίζονται θετικά με την καρκινογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού (Bucci et al., 1997; Skandalis et al., 2014). Αυτοί ενεργοποιούνται από τον EGF, ο οποίος θεωρείται μιτογόνο παράγοντα και είναι ο βασικός προσδέτης αυτών των υποδοχέων, ιδίως σε κύτταρα που υπερκεφράζουν τον EGFR (Stern et al., 1986; Dong et al., 1991). Οι υποδοχείς της οικογένειας ErbB έχουν τη δυνατότητα να αυτοφωσφορυλιώνονται ή να φωσφορυλιώνονται από άλλες κινάσες (Holbro et al.,

2003). Οι ενεργοποιημένοι ErbBs υποδοχείς προσδένουν ενδοκυτταρικούς διαμεσολαβητές, που βρίσκονται παρακάτω στη μοριακή σηματοδότηση τους, όπως είναι οι Grb2 και Sos και αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως είναι τα Ras/Raf, MAPK και PI-3k/Akt, που συμπεριλαμβάνονται στην κυτταρική ανάπτυξη, την απόπτωση, τη διήθηση και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Olayioye et al., 2000; Yarden and Sliwkowski, 2001; Levin, 2003; Fu et al., 2013). Ειδικά ο σχηματισμός συμπλόκου EGFR/Grb7-Ras ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Chu et al., 2010).

Ο ρόλος- κλειδί που έχει ο EGFR στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του μαστού, γίνεται εύκολα αντιληπτός από την αντι-πολλαπλασιαστική δράση που έχει η χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων, ειδικών για τον υποδοχέα αυτόν (Mendelsohn and Baselga, 2000). Επιπλέον, υπάρχουν πειραματικά δεδομένα για τη συνεισφορά πρωτεϊνών που ενεργοποιούν τον EGFR, στην EGFR-εξαρτώμενη αύξηση του πολλαπλασιασμού (Gaucsi et al., 2013). Για παράδειγμα, η ERp57 πρωτεΐνη, μέλος της οικογένειας των δισουλφιδικών ισομερασών, συμμετέχει στην ενεργοποίηση της EGFR σηματοδότησης και στην τροποποίηση της εισαγωγής του υποδοχέα στο κύτταρο, οδηγώντας σε αυξημένο πολλαπλασιασμό (Gaucsi et al., 2013). Ακόμα, η επαγωγή του πολλαπλασιασμού μέσω ενεργοποίησης του EGFR προωθεί την αποδόμηση της πρωτεΐνης Fhit (προϊόν του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *FHIT*) (Bianchi et al., 2006).

Η δράση του EGF στον καρκίνο του μαστού φαίνεται να σχετίζεται και με τη συγκέντρωση του παράγοντα (Filmus et al., 1985; Grant et al., 2002a; Adams et al., 2009). Εντούτοις, ο EGF σε συγκεντρώσεις που έχει δειχθεί ότι διεγείρει κάποιες κυτταρικές σειρές, επισημαίνεται ότι προκαλεί μείωση στον πολλαπλασιασμό των MDA-468 καρκινικών κυττάρων του μαστού (Filmus et al., 1985). Έχει προταθεί επίσης, μια διττή δράση για τον EGF στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων του μαστού, όπου η Src λειτουργεί σαν διακόπτης της EGF μοριακής σηματοδότησης, με τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωση του EGF (Zhang et al., 2012). Επιπλέον, ο EGF δείχνει να επάγει αναστολή του πολλαπλασιασμού μέσω της διέγερσης μιας ιντερλευκίνης

τύπου 6, της ογκοστατίνης M, τόσο σε ER+, όσο και σε ER- καρκινικά κύτταρα του μαστού (Grant et al., 2002b). Ωστόσο, ένας καινούργιος ρόλος για τον EGF έχει προταθεί από τους Adams et al. 2009, που έχουν προτείνει ότι ο EGF ενεργοποιεί την έκφραση του miRNA-206 (microRNA-206) σε MCF-7 κύτταρα, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα το μειωμένο πολλαπλασιασμό, την αυξημένη κυτταρική απόπτωση και την μείωση στην έκφραση των γονιδίων που ανταποκρίνονται στα οιστρογόνα (Adams et al., 2009).

Αντίθετα, η EBP50 (Ezrin- radixin- moesin- binding phosphoprotein-50), είναι μια πρωτεΐνη που μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι, η EBP50 μπορεί να καταστείλει τον EGF- επαγόμενο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού εμποδίζοντας την EGFR φωσφορυλίωση και αναστέλλοντας το κατάντη σηματοδοτικό μονοπάτι του EGFR (Yao et al., 2012).

1.11 ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗ (E2)

Τα φυσικώς παραγόμενα οιστρογόνα 17β-οιστραδιόλη (E2), οιστριόλη 1 (E1), και οιστρόνη 3 (E3) είναι στεροειδή, που παράγονται από τη χοληστερόλη (Gruber et al., 2002). Οι πρωτογενείς πηγές οιστραδιόλης για τις γυναίκες είναι τα κύτταρα της θήκης και τα κοκκώδη κύτταρα των ωοθυλακίων (Gruber et al., 2002). Η E2 προέρχεται, είτε από την επίδραση της P450 αρωματάσης στην τεστοστερόνη, είτε από την μετατροπή της οιστρόνης (Gruber et al., 2002).

Οι υποδοχείς των οιστρογόνων είναι μέλη μιας υπεροικογένειας πυρηνικών υποδοχέων ορμονών που αριθμεί περίπου 150 μέλη. Οι υποδοχείς των οιστρογόνων διαθέτουν τόσο υπομονάδα που προσδέεται στο DNA, όσο και υπομονάδα που χρησιμοποιείται για την πρόσδεση της ορμόνης (Gruber et al., 2002).

Υπάρχουν δύο υποτύποι οιστρογονικών υποδοχέων καθώς επίσης και ισομορφές τους ή/και προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος για κάθε υποτύπο. Ο πρώτος υποτύπος είναι ο κλασσικός υποδοχέας των οιστρογόνων α (Estrogen Receptor α- ERα), ο οποίος κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1986, ενώ ο δεύτερος υποτύπος είναι ο υποδοχέας των οιστρογόνων β (Estrogen Receptor β- ERβ), που ταυτοποιήθηκε το 1996 (Green et

al., 1986; Kuiper et al., 1996). Παρόλο που η υπομονάδα πρόσδεσης στο DNA εμφανίζει ομοιότητες μεταξύ των δύο υποδοχέων, ο βαθμός ομολογίας τους δεν είναι μεγάλος. Αυτό οφείλεται κατά κύριο λόγο στη διαφορά μεταξύ των υπομονάδων που προσδέουν την ορμόνη (Witkowska et al., 1997). Και οι δύο υποτύποι εμφανίζουν ικανότητα πρόσδεσης με τους ίδιους προσδέτες, αλλά με σαφώς διαφορετική χημική συγγένεια (Gruber et al., 2002). Η οιστραδιόλη ενεργοποιεί μεταγραφή γονιδίων-στόχων προσδεμένη στον ERα, αλλά φέρνει αντίθετα μεταγραφικά αποτελέσματα όταν είναι προσδεμένη στον ERβ (Paech et al., 1997).

1.12 ΜΟΡΙΑΚΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗΣ (E2 signaling)

Η E2 διεγείρει την πολλαπλασιαστική ικανότητα των ορμονο-εξαρτώμενων καρκινικών κυττάρων του μαστού και αλληλεπιδρά, σε μοριακό επίπεδο με τα σηματοδοτικά μονοπάτια των IGF/EGF (Ahmad et al., 1999; Gee et al., 2005). Οι στεροειδείς ορμόνες, όπως η οιστραδιόλη, μεταφέρονται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου προσδέονται σε υποδοχείς τους, που θεωρούνται ενεργοποιημένοι μεταγραφικοί παράγοντες, προκειμένου να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων και να προάγουν την κυτταρική ανάπτυξη (Ali and Coombes, 2000; Milani et al., 2014; Voudouri et al., 2015).

Πιο συγκεκριμένα, η δράση των οιστρογόνων φαίνεται να είναι διττή. Ο ένας τρόπος δράσης αφορά το γενωμικό μονοπάτι (κλασικό μονοπάτι), που περιλαμβάνει, την εξαρτώμενη από τον προσδέτη, ενεργοποίηση των υποδοχέων των οιστρογόνων. Αναλυτικότερα, οι υποδοχείς των οιστρογόνων βρίσκονται διαλυτοί μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος και συνδεδεμένοι συνήθως σε κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες-μοριακές συνοδούς (τσαπερόνες) (Smith and Toft, 1993). Μετά την εισαγωγή των οιστρογόνων στο κυτταρόπλασμα, οι υποδοχείς αποχωρίζονται τις μοριακές πρωτεΐνες συνοδούς (τσαπερόνες) και προσδέουν τα οιστρογόνα σχηματίζοντας σύμπλοκα οιστρογόνο-οιστρογονικός υποδοχέας. Αυτά τα σύμπλοκα, εισέρχονται στον πυρήνα του κυττάρου και προσδέονται σε ειδικές περιοχές του DNA, που λέγονται

αλληλουχίες απόκρισης των οιστρογόνων (Estrogen Response Elements- ERE) (Pettersson et al., 1997). Συνεπώς, ρυθμίζουν πληθώρα γονιδίων που διαθέτουν αλληλουχίες ERE και σχετίζονται με την καρκινογένεση. Ακόμα, τα οιστρογόνα ρυθμίζουν και γονίδια που δε διαθέτουν ERE μέσω ρύθμισης, που ασκούν σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (Gruber et al., 2002).

Ο δεύτερος τρόπος δράσης, αναφέρεται ως μη γενωμική δράση και αφορά την ανεξαρτήτως προσδέτη ενεργοποίηση των οιστρογονικών υποδοχέων. Πολλοί ενεργοποιητές πρωτεϊνών με ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης, όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες, μπορούν να οδηγήσουν σε ανεξάρτητη της E2 ενεργοποίηση των ERs (Shao and Lazar, 1999). Η ενεργοποίηση αυτού του είδους, μπορεί να επιτευχθεί, μέσω μεμβρανικών υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης, αλλά και κατόπιν ενεργοποίησης του ενδοκυτταρικού MAPK (Shao and Lazar, 1999). Ακόμα, συγκεκριμένες αποκρίσεις στεροειδών έχουν, λειτουργικά, συνδεθεί με ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια συμπεριλαμβανομένων των μονοπατιών των υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης ή το c-Src. Οι στεροειδείς ορμόνες, όπως η 17-β-οιστραδιόλη (E2), προσδένονται σε κυτταροπλασματικούς ή μεμβρανικούς υποδοχείς, έχει δειχθεί να ενεργοποιούν άμεσα, ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια όπως το Erk1/2, το PI-3K και τα STATs (Fox et al., 2008). Αυτοί οι “σηματοδοτικοί καταρράκτες” που ενεργοποιούνται από την οιστραδιόλη, συνεισφέρουν στην αλλαγή κυτταρικών λειτουργιών, όπως είναι η πολλαπλασιαστική και μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων (Fox et al., 2008).

1.13 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ IGF/EGF ΚΑΙ E2 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ

Η θεραπεία που στοχεύει στον ERα, είναι συνήθως, η πρώτη απόπειρα θεραπείας στον καρκίνο του μαστού. Ωστόσο, οι ασθενείς ανταποκρίνονται περιορισμένα σε αυτό, εξαιτίας την αναπτυσσόμενης ανθεκτικότητας στην ορμονοθεραπεία (Ali et al., 2011; Barrios et al., 2012). Η αναπτυσσόμενη ανθεκτικότητα στην ορμονοθεραπεία, οδηγεί σε

ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και σε διασπορά των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Barrios et al., 2012). Επί τοις ουσίας, τα καρκινικά κύτταρα βρίσκουν τρόπους να αποφεύγουν την ορμονοθεραπεία, διατηρώντας τη ζωτικότητα τους. Εντούτοις, οι ακριβείς μηχανισμοί που οδηγούν σε ενδοκρινική αντίσταση, δεν είναι απολύτως γνωστοί και η ανακάλυψη τους θεωρείται υψηλής προτεραιότητας.

Τόσο η κατάντη σηματοδότηση του IGF-I, όσο και του EGF επηρεάζει την οργάνωση του κυτταροσκελετού (Guvakova et al., 2002; Mezi et al., 2012), που είναι πολύ σημαντική για την κυτταρική προσκόλληση, την κινητικότητα και τη διηθητική ικανότητα των κυττάρων. Επιπλέον, σε επίπεδο κυτταρικών λειτουργιών, η E2 σε συνδυασμό με τους IGF-I/ EGF, επάγουν αυξημένο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού, σε υπόστρωμα ινονεκτίνης και κολλαγόνου τύπου I (Woodward et al., 2000). Η αλληλεπίδραση αυτών των σηματοδοτικών μορίων, επηρεάζει τη σχέση του κυττάρου με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, τροποποιώντας την επιφάνεια αλληλεπίδρασης μεταξύ τους και ρυθμίζοντας έτσι την κυτταρική συμπεριφορά και την πορεία του όγκου (Mitropoulou et al., 2004; Skandalis et al., 2014).

Πιο αναλυτικά, μεγάλος όγκος πειραματικών δεδομένων υποδεικνύει μιτογόνα-ογκογόνα σηματοδοτικά μονοπάτια, που ενεργοποιούνται στις περιπτώσεις ενδοκρινικής αντίστασης. Σε αυτά τα σηματοδοτικά συμπεριλαμβάνονται οι IGF-IR, EGFR, HER2, c-Src και ERs (Dufourny et al., 1997; Alexaki et al., 2004). Πράγματι, σε καρκινικά κύτταρα του μαστού ανθεκτικά στον ανταγωνιστή του ER fulvestrant παρατηρείται αυξημένη ενεργότητα του EGFR και του ενδοκυτταρικού διαμεσολαβητή του Erk1/2. Επιπλέον, ο EGFR έχει ταυτοποιηθεί ως ένα από τα πιο βασικά γονίδια που σχετίζονται με μη- ορμονοεξαρτώμενους όγκους στον καρκίνο του μαστού (van Agthoven et al., 2009). Η μοριακή σηματοδότηση της οιστραδιόλης αλληλεπιδρά με τα σηματοδοτικά μονοπάτια των IGF-I και EGF, σε διάφορα επίπεδα, παραδείγματος χάριν μέσω της γρήγορης ενεργοποίησης των υποδοχέων IGF-IR και EGFR και μέσω της επακόλουθης ενεργοποίησης ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μορίων όπως το MAPK, σε καρκινικά κύτταρα του μαστού (Kahlert et al., 2000; Pietras, 2003; Song et al., 2010). Η E2 και ο EGF θεωρούνται παράγοντες αναγκαίοι για κυτταρικό πολλαπλασιασμό και

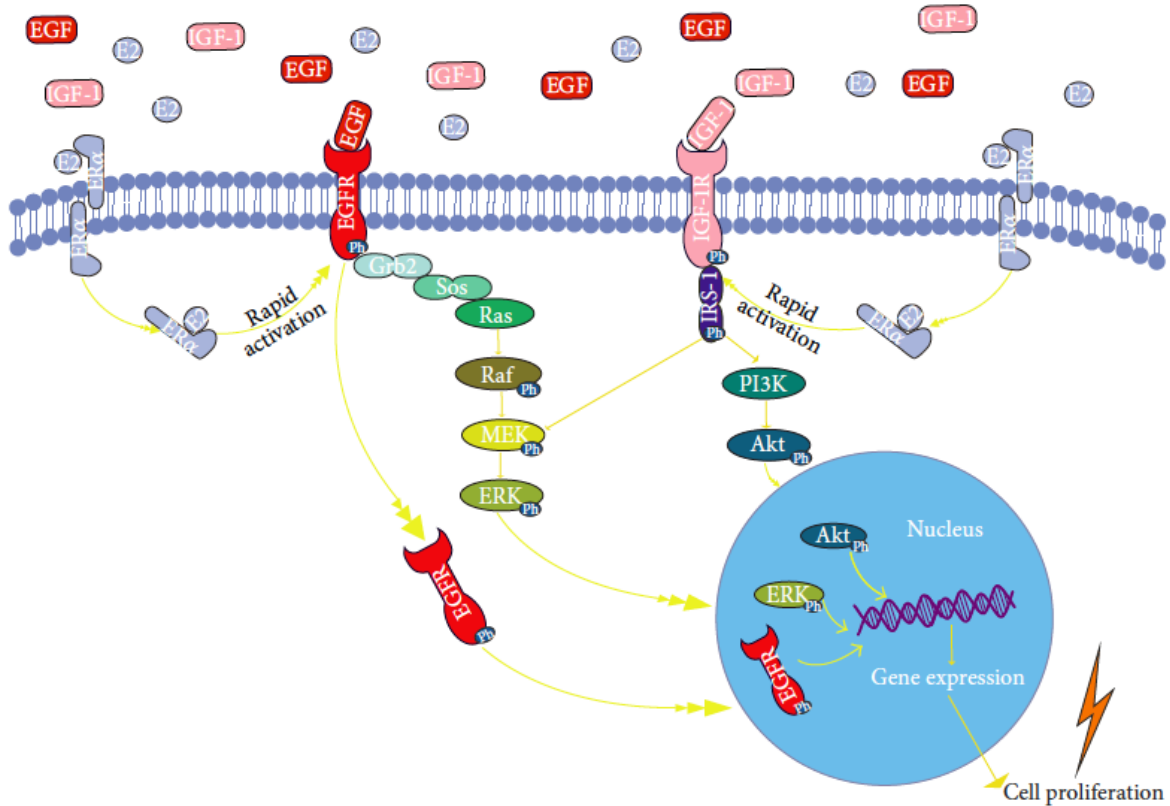
φαίνεται να έχουν συνεργατική δράση (Shupnik, 2004; Fox et al., 2009). Επιπλέον, η αναστολή της δράσης του EGFR (ή του IGF-IR) καταργεί τον E2- επαγόμενο πολλαπλασιασμό σε ποντίκια και παρομοίως, η αναστολή της ενεργότητας του EGFR καταστέλλει την πολλαπλασιαστική δράση της E2, *in vitro* (Hall et al., 2001; Fox et al., 2008). Επιπροσθέτως, η χρήση ειδικών αναστολέων και η μείωση της έκφρασης (knockdown) και των δύο υποδοχέων καταργεί την E2- εξαρτώμενη ενεργοποίηση του MAPK και μπλοκάρει τη δράση της E2 (Song et al., 2007). Έχει προταθεί ότι η E2 διεγείρει την έκφραση των IGF και EGF και των αντίστοιχων υποδοχέων τους, τόσο σε ιστούς, όσο και σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (Faulds et al., 2004). Ωστόσο, οι μιτογόνες δράσεις του EGF, δε διαμεσολαβούνται από τους ERs, αλλά θεωρείται ότι η συνεργασία στα σηματοδοτικά μονοπάτια μπορεί να συμβεί μέσω άλλων μηχανισμών (Gehm et al., 2000). Αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο τα EGFR όσο και τα c-Src- επαγόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια μπορεί να επιφέρουν ενεργοποίηση ενός μεταγραφικού παράγοντα STAT5, ο οποίος είναι αναγκαίος στην E2- εξαρτώμενη κυτταρική διαίρεση, σε πειράματα κυτταρικών σειρών (Fox et al., 2008). Η ενεργοποίηση των ERs που διαμεσολαβείται από αυξητικούς παράγοντες είναι η βασικότερη οδός για να διατηρήσουν τα καρκινικά κύτταρα του μαστού τη βιωσιμότητα τους απέναντι στην ορμονοθεραπεία (Hawsawi et al., 2013). Όπως αναφέρεται και παραπάνω, κατά τη διάρκεια της γενωμικής δράσης της E2, η πρόσδεση της E2 στον ERα έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του τελευταίου, μέσω του αποχωρισμού του από την μοριακή συνοδό πρωτεΐνη Heat Shock Protein 90 (Hsp90). Το ενεργό διμερές ER-E2 προσδένεται είτε άμεσα, είτε έμμεσα σε γονίδια που διαθέτουν αλληλουχίες αποκρινόμενες σε οιστρογόνα (ERE genes- Estrogen Response Elements genes) (Nilsson et al., 2001). Από την άλλη, η μη γενωμική δράση της οιστραδιόλης οδηγεί σε γρήγορη ενεργοποίηση άλλων ανεξάρτητων σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως αυτά του IGF-IR και του EGFR, που εξαρτώνται από την κυτταρικό τύπο (Yee and Lee, 2000). Στα MCF-7 κύτταρα τα οιστρογόνα συμμετέχουν στη δράση του IGF-I και στην IGF-IR σηματοδότηση που προκαλεί αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Dupont et al., 2001). Ειδικότερα, ο ERα προσδένεται στον IGF-IR και ενεργοποιεί την κατάντη σηματοδότηση του (Song et

al., 2004). Έχει ακόμα αναφερθεί ότι ο IGF-I επάγει τη φυσική συσχέτιση IGF-IR και ERα (Yu et al., 2013). Επιπρόσθετα, ο ERα ρυθμίζει τα σηματοδοτικά μονοπάτια του IGF-I μέσω φωσφορυλίωσης του Erk1/2 και του Akt, όπου η αλληλεπίδραση IGF-IR και ERα οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Yu et al., 2013). Ειδικοί αναστολείς του IGF-IR (ή του EGFR) μειώνουν την E2- εξαρτώμενη ενεργοποίηση του MAPK και μπλοκάρουν τις μιτογόνες δράσεις της οιστραδιόλης επιβεβαιώνοντας την αλληλεπίδραση των σηματοδοτικών μονοπατιών των IGF-IR, E2 και EGFR (Song et al., 2007). Επιπλέον, η οιστραδιόλη έχει βρεθεί να χρησιμοποιεί ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που περιλαμβάνει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ERα, IGF-IR, μεταλλοπρωτεϊνάσων και του EGFR, προκειμένου να ενεργοποιήσει το MAPK (Alexaki et al., 2004). Μια άλλη μελέτη υποδεικνύει ότι η μεταγραφική δραστηριότητα του ER, ακόμα και όταν αυτός είναι ελεύθερος από προσδέτη, είναι ικανή να υποβοηθήσει τη μιτογόνο δράση του IGF-IR- επαγόμενης ενεργοποίησης του PI-3k/Akt (Gaben et al., 2012). Από την άλλη, έχει προταθεί ότι ο IGF-I μειώνει τον πολλαπλασιασμό των MCF-7 κυττάρων ενεργοποιώντας το JNK (μέρος του MAPK μονοπατιού), μέσω επαγωγής της έκφρασης μιας φωσφατάσης, της SHP1 (Amin et al., 2011).

Περίπου το 15% των καρκινικών όγκων του μαστού είναι αρνητικοί ως προς την ύπαρξη των οιστρογονικών υποδοχέων και κατηγοριοποιούνται ως τριπλά αρνητικοί καρκίνοι του μαστού (Triple Negative Breast Cancer- TNBC), όρος που υποδηλώνει την απουσία υποδοχέων των οιστρογόνων και της προγεστερόνης καθώς και μειωμένη παρουσία του HER2 (Stevens et al., 2013). Εντούτοις, οι TNBC ασθενείς δεν μπορούν να δεχτούν ορμονοθεραπεία ή κάποια άλλη στοχευμένη θεραπεία, λόγω της έλλειψης των σχετικών υποδοχέων, με αποτέλεσμα την πτωχή γενικά πρόγνωση των περιπτώσεων τους. Χαρακτηριστικά, οι ασθενείς αυτοί εκφράζουν τον υποδοχέα EGFR και τις IFGBP-3 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein- 3) (Probst-Hensch et al., 2010), αλλά εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αναστολείς των υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης (Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors- RTKs inhibitors) καθώς και σε αναστολείς του EGFR. Προς το παρόν, έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί για την αντίσταση στους αναστολείς των υποδοχέων αυτών, που περιλαμβάνουν ανεξαρτησία

από τον EGFR, μεταλλάξεις στον EGFR και άλλων μορίων που συμμετέχουν στα ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια του (Bellizzi et al., 2015). Οι ερευνητικές προσπάθειες έχουν επικεντρωθεί σε μια επερχόμενη αντίσταση σε στοχευμένες θεραπείες. Σε περιπτώσεις TNBC, κινάσες της οικογένειας Src (Src Family Kinases-SFKs) επηρεάζουν τη μεταφορά του EGFR στον πυρήνα, ενισχύοντας έτσι την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Brand et al., 2014). Μέσα στον πυρήνα, ο EGFR μπορεί να δρα ως μεταγραφικός παράγοντας, ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην ογκογένεση (Brand et al., 2011) και έχουν συσχετισθεί με ανθεκτικότητα στην EGFR στοχευμένη θεραπεία (Huang et al., 2011). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο EGFR συνεισφέρει στην χημειο και την ραδιο-ανθεκτικότητα ενισχύοντας την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA (DNA damage repair) (Huang et al., 2011). Η παρεμπόδιση της μεταφοράς του EGFR στον πυρήνα, οδηγεί σε συσσώρευση του στην πλασματική μεμβράνη, με συνεπαγόμενη αυξημένη ευαισθησία των TNBC κυττάρων στη θεραπεία που στοχεύει τον EGFR (Brand et al., 2014). Εντούτοις, η στόχευση της μοριακής σηματοδότησης του EGFR, είτε αυτή γίνεται μέσω του πυρήνα, είτε διαμέσου της κλασσικής οδού μέσω του καταρράκτη ενεργοποίησης των πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα, αποτελεί μια αξιόπιστη θεραπευτική προσέγγιση. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη ικριώματος NHERF1 σε όγκους ευπαθείς στην EGFR- εξαρτώμενη ανάπτυξη, επηρεάζει την κινητικότητα και την δημιουργία προσεκβολών του κυτταροπλάσματος σε καρκίνους TNBC (Bellizzi et al., 2015). Η αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού της IGFBP-3 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3) μέσω μιας κινάσης που ονομάζεται sphingosine kinase-3 καθιστά ευαίσθητα τα TNBC κύτταρα σε αναστολή του EGFR (Martin et al., 2014). Ακόμα, η αναστολή της αννεξίνης 2 (annexin-2) (μιας πρωτεΐνης εξαρτώμενη από το ασβέστιο, που προσδένεται σε φωσφολιπίδια και βρίσκεται στις μεμβράνες των τριπλά αρνητικών καρκινικών κυττάρων του μαστού) με τη χρήση ειδικού αντισώματος καταστέλλει την EGF- εξαρτώμενη φωσφορυλίωση και την ενδοκυττάρωση του EGFR. Χορήγηση, πάντως, αντισωμάτων επίσης, καταστέλλει την EGFR-εξαρτώμενη ενεργοποίηση των PI-3k/Akt και Ras-MEK-Erk σηματοδοτικών μονοπατιών και

επιφέρει μείωση του πολλαπλασιαστικού ρυθμού των κυττάρων (Chaudhary et al., 2014). Οι βασικότεροι μηχανισμοί που σχετίζονται με τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν οι IGF/EGF σε καρκινικά κύτταρα του μαστού, αναπαρίστανται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης των σηματοδοτικών μονοπατιών των IGF-I/EGF και ERs. Η πρόσδεση του IGF-I στον IGF-IR οδηγεί στην ενεργοποίηση του και στην επακόλουθη ενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών διαμεσολαβητών PI-3kinase και Erk. Η EGF-εξαρτώμενη ενεργοποίηση του EGFR έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του Erk και μπορεί να οδηγήσει στην επαγωγή έκφρασης γονιδίων σχετικών με τον πολλαπλασιασμό, καθώς ο ενεργοποιημένος EGFR εισάγεται στον πυρήνα. Η πρόσδεση της E2 στον ERα οδηγεί σε γρήγορη ενεργοποίηση του EGFR και/ή του IGF-IR.

1.14 ΚΑΦΕΪΝΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ο καφές είναι το πιο διαδεδομένο ρόφημα παγκοσμίως. Στατιστικές μελέτες εκτιμούν ότι η παγκόσμια παραγωγή καφέ ανέρχεται σε 7,4 δισεκατομμύρια κιλά τη χρονιά (στοιχεία από το International Coffee Organization). Το ρόφημα του καφέ είναι ένα μείγμα καφεΐνης και πολυφαινολών (αρωματικών ενώσεων), ενώ περιέχει φυτοχημικές και αντιοξειδωτικές ουσίες (Scalbert and Williamson, 2000; Halvorsen et al., 2006; Fukushima et al., 2009).

Η κατανάλωση καφέ έχει συσχετισθεί με τον κίνδυνο εμφάνισης νοσημάτων, όπως ο καρκίνος. Ωστόσο, ο καφές φαίνεται να έχει διττό ρόλο: είτε ως καρκινογόνος παράγοντας, που εμποδίζει τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA είτε ως διεγέρτης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Minton et al., 1979; Tavani et al., 1998), αλλά και ως αντικαρκινικός- προστατευτικός παράγοντας με αντιοξειδωτικές δράσεις (Lee and Zhu, 2006). Με βάση τη βιβλιογραφία, φαίνεται να επηρεάζει πέρα από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και άλλες βιολογικές διεργασίες, όπως τη κινητικότητα, τη απόπτωση και τη αυτοφαγία των κυττάρων (Saiki et al., 2011; Dumit and Dengjel, 2014; Mathew et al., 2014; Pietrocola et al., 2014).

Σε ότι αφορά τη συσχέτιση της κατανάλωσης καφέ και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού, τα δεδομένα ποικίλλουν. Η ετερογένεια της νόσου και η κατηγοριοποίηση των καρκινικών όγκων του μαστού, ανάλογα με το προφίλ έκφρασης των ERs, διαφοροποιεί τις δράσεις του καφέ, αναφορικά με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν μηδενική συσχέτιση της κατανάλωσης καφέ και του κινδύνου αυτού (Folsom et al., 1993; Michels et al., 2002; Arab, 2010). Οι Fagherazzi et al., 2011 αναφέρουν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης καφεΐνης και τσαγιού και του κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου του μαστού, ανεξαρτήτως του προφίλ έκφρασης των υποδοχέων των ορμονών στα καρκινικά κύτταρα (Fagherazzi et al., 2011). Από την άλλη πλευρά, σε γυναίκες, που βρίσκονται στην εμμηνόπαυση, αναφέρεται ότι η υψηλή ημερήσια κατανάλωση καφέ έχει αρνητική συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού, και

συγκεκριμένα καρκίνων που χαρακτηρίζονται από έλλειψη των ERs (Li et al., 2011; Jiang et al., 2013; Bohn et al., 2014). Το δεδομένο της αρνητικής συσχέτισης ενισχύεται και από άλλες έρευνες, που αναφέρουν ότι η υψηλή κατανάλωση καφέ σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (Nkondjock, 2009; Tang et al., 2009). Μία άλλη έρευνα, επισημαίνει ότι η αρνητική συσχέτιση αυτή δεν αφορά την καφεΐνη, αλλά γενικά την κατανάλωση καφέ (Lowcock et al., 2013). Εντούτοις, έχει αναφερθεί, ότι η υψηλή κατανάλωση καφέ αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού, την ίδια στιγμή που ο ντεκαφεϊνέ καφές και το τσάι δε σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (Ganmaa et al., 2008). Καταδεικνύοντας ένα ρόλο για την καφεΐνη στον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. Όπως γίνεται αντιληπτό, λόγω της ύπαρξης ποικίλων δεδομένων, προκειμένου να διασαφηνιστούν οι δράσεις της καφεΐνης απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.

Ο καφές είναι ένα μίγμα ουσιών, με βασική ουσία την καφεΐνη. Η παρούσα μελέτη εστιάζει στη χρήση της καφεΐνης, ως μεμονωμένης ουσίας, προκειμένου να διερευνηθούν οι βιολογικές επιδράσεις της στα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Τα δεδομένα που αφορούν το βιολογικό μηχανισμό δράσης της καφεΐνης σε καρκινικούς ιστούς είναι σαφώς λιγότερα, συγκριτικά με τα επιδημιολογικά δεδομένα, για την κατανάλωση καφέ. Οι Rosendahl et al., 2015, δοκίμασαν τη χρήση καφεΐνης σε καρκινικές σειρές του μαστού και μελέτησαν την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, η καφεΐνη εμφανίζει αντι-καρκινικές ιδιότητες, μειώνοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7 (ERα+) αλλά και των (ERα-) MDA-MB-231 (Rosendahl et al., 2015). Ως προς τον μηχανισμό δράσης της, οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η καφεΐνη δρα όπως τα αντι-οιστρογόνα και τροποποιεί τα ρυθμιστικά για τον κυτταρικό κύκλο μονοπάτια ER/cyclin D1 και IGF-IR/pAkt (Rosendahl et al., 2015). Η καφεΐνη μιμείται τις δράσεις γνωστών αντι-οιστρογόνων, όπως είναι η fulvestrant και η tamoxifen, τα οποία εμποδίζουν τον οιστρογόνο-εξαρτώμενο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ανταγωνιζόμενα την πρόσδεση της οιστραδιόλης, στους ERs (Oliveira et al., 2003; Wu et al., 2009; Rosendahl et al., 2015). Παρότι η δράση της καφεΐνης αναφέρεται να είναι σχετική με τα ER+ σηματοδοτικά

μονοπάτια, επεκτείνεται και σε ER- κύτταρα, δεδομένο που χρήζει διερεύνησης και σχετίζεται με άλλα ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια (Rosendahl et al., 2015). Επιπλέον, προστατευτική- αντιμεταστατική δράση της καφεΐνης έχει βρεθεί και σε κύτταρα μελανώματος (Gude et al., 2001; Lu et al., 2007). Επίσης, σε ηπατοκυτταρικό καρκίνο, έχει δειχθεί ότι η καφεΐνη μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, σταματώντας τον κυτταρικό κύκλο στη Go/G1 φάση (Okano et al., 2008). Η ίδια μελέτη προτείνει ένα μηχανισμό, παράλληλο και ανεξάρτητο της αρνητικής για τον πολλαπλασιασμό δράσης της καφεΐνης, που αφορά ενεργοποίηση του Erk1/2 και επακόλουθη αύξηση της έκφρασης του EGFR από αυτήν (Okano et al., 2008).

Με δεδομένη την επίδραση της καφεΐνης σε μόρια της παρούσας μελέτης (IGF-IR, EGFR) που συμμετέχουν στη μοριακή σηματοδότηση των IGF-I/ EGF (Rosendahl et al., 2015), θα ήταν χρήσιμο να δούμε πως οι μηχανισμοί αυτοί επηρεάζονται από την καφεΐνη. Με δεδομένη τη σημασία του εξωκυτταρίου χώρου στον καρκίνο του μαστού και τη συμμετοχή πρωτεογλυκανών, όπως οι συνδεκάνες, σε ιδιότητες που σχετίζονται με την κινητικότητα των κυττάρων, επιχειρείται στη παρούσα διατριβή η μελέτη της επίδρασης της καφεΐνης στα μόρια αυτά, προς διερεύνηση του τρόπου δράσης της. Άλλωστε, η έκφραση του IGF-IR και του ERα συνδέεται με την έκφραση των συνδεκανών (Kousidou et al., 2008), άρα είναι πιθανό η καφεΐνη να ρυθμίζει τη βιοσύνθεση των μορίων αυτών.

Στην παρούσα μελέτη ερευνάται ο τρόπος δράσης της καφεΐνης σε λειτουργίες καρκινικών κυττάρων του μαστού και η επίδραση της στα μόρια που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια των IGF-I/EGF.

1.15 ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η μελέτη του καρκίνου του μαστού, αποτελεί βαρύνουσας σημασίας θέμα και προτεραιότητα στην παγκόσμια έρευνα, εξαιτίας της θνησιμότητας που προκαλεί η νόσος, σε μεγάλο κομμάτι του πληθυσμού. Η κατηγοριοποίηση των καρκινικών όγκων του μαστού, γίνεται με βάση την παρουσία και τα επίπεδα έκφρασης των οιστρογονικών υποδοχέων (Estrogen Receptors - ERs), των υποδοχέων της

προγεστερόνης (Progesterone Receptors - PRs), αλλά και των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor-Receptor - EGFR). Το προφίλ έκφρασης των υποδοχέων των οιστρογόνων είναι πολύ χαρακτηριστικό και καθοριστικό για την πρόγνωση της νόσου.

Οι αυξητικοί παράγοντες Insulin-like Growth Factor-I, (IGF-I), Epidermal Growth Factor (EGF) και η ορμόνη οιστραδιόλη- Estradiol (E2) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη και τη βιολογική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Συνήθως, η πρώτη θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου μαστού είναι η ορμονοθεραπεία. Ωστόσο, πολλές φορές, σε περιπτώσεις ανθεκτικότητας των όγκων σε αυτού του είδους τη θεραπεία, ενεργοποιούνται εναλλακτικά σηματοδοτικά μονοπάτια αυξητικών παραγόντων, που συμπεριλαμβάνουν την IGF-I/EGF σηματοδότηση και βοηθούν στη διατήρηση της ζωτικότητας των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Η αλληλεπίδραση των σηματοδοτικών μονοπατιών IGF-I/EGF και E2 είναι μεγάλης σημασίας και η διερεύνηση των δράσεών τους σε κυτταρικό επίπεδο είναι σημαντική για την πορεία της νόσου.

Βασικός ερευνητικός σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης των μοριακών σηματοδοτικών μονοπατιών των IGF-I/EGF και E2, στην προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων του μαστού, καθώς και η περαιτέρω διερεύνηση των τρόπων δράσης τους. Ακόμα, στόχος είναι να ελεγχθούν οι ενδοκυτταρικοί διαμεσολαβητές των αυξητικών παραγόντων και της οιστραδιόλης, κατά την ευαισθητοποίηση των κυττάρων από αυτούς, στη λειτουργία της κυτταρικής προσκόλλησης.

Σε όλους τους τύπους καρκίνου, βασικό ρόλο παίζουν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Μεταλλαγές σε ογκοκατασταλτικά γονίδια, ευθύνονται για την καρκινογένεση και τροποποιούν τις κυτταρικές λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν το γονίδιο του καρκίνου του μαστού-1 (*BRCA1*), το *p53*, και η Wilms' tumor protein-1 (*WT-1*). Η λειτουργία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων αυτών, επηρεάζει τα σήματα του IGF-IR και τις δράσεις του σε καρκινικά κύτταρα του μαστού.

Η μεταγραφή του *IGF-IR* γονιδίου, ρυθμίζεται αρνητικά από πρωτεϊνικά παράγωγα ογκοκατασταλτικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των: γονίδιο του καρκίνου του μαστού-1 (*BRCA1*), *p53*, και η *Wilms' tumor protein-1 (WT-1)*. Συγκεκριμένα, το *p53* ογκοκατασταλτικό γονίδιο έχει βρεθεί να ρυθμίζει πολλά γονίδια και μεταλλάξεις του σχετίζονται με πολλούς τύπους καρκίνου. Πέρα από αυτό, η έλλειψη στη λειτουργία του *p53* ογκοκατασταλτικού γονιδίου, έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την έκφραση του *IGF-IR*. Ο μηχανισμός αυτός, ωστόσο, δεν περιλαμβάνει ευθεία πρόσδεση στο DNA, δηλαδή στις αλληλουχίες του υποκινητή του *IGF-IR* γονιδίου. Στους στόχους της μελέτης, συμπεριλαμβάνεται η μελέτη της επίδρασης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *p53* στην κυτταρική λειτουργία της προσκόλλησης. Ακόμα, βασικός σκοπός είναι η διερεύνηση της επίδρασης του *p53* στην σηματοδότηση του υποδοχέα *IGF-IR*.

Στο τελευταίο μέρος της διατριβής μελετήθηκε η επίδραση της καφεΐνης, μιας καθημερινά, ευρύτατα χρησιμοποιούμενης ουσίας, στις ιδιότητες καρκινικών κυττάρων του μαστού. Παρόλο, που ο καφές είναι το ρόφημα με τη μεγαλύτερη απήχηση στο καταναλωτικό κοινό, η επίδραση του σε κυτταρικές σειρές και ο ρόλος του στον καρκίνο, δεν έχει διερευνηθεί εκτενώς. Εμείς μελετήσαμε την επίδραση της καφεΐνης σε καρκινικά κύτταρα του μαστού, καθώς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η ουσία αυτή τροποποιεί την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων και τροποποιεί την έκφραση των μορίων που συμμετέχουν στη σηματοδότηση των *IGF-I/EGF* και *E2*. Έτσι, η στοχοθεσία της διατριβής συμπληρώνεται με τη μελέτη της επίδρασης της καφεΐνης στην κυτταρική λειτουργία της προσκόλλησης καρκινικών κυττάρων του μαστού. Συμπεριλαμβάνεται, ακόμα, η διερεύνηση της επίδρασης της καφεΐνης στα σηματοδοτικά μονοπάτια των *IGF-I/EGF* και ο τρόπος δράσης της σε μόρια- κλειδιά που αφορούν την κυτταρική προσκόλληση και σχετίζονται με τους εν λόγω αυξητικούς παράγοντες.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ: ΧΗΜΙΚΑ, ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Ο IGF-I (Insulin-like Growth Factor) αγοράστηκε από την R&D Diagnostics MN και προετοιμάστηκαν διαλύματα με αρχική συγκέντρωση (stock solutions) 10μg/ml, διαλύοντας IGF-I σε αποστειρωμένο PBS (Phosphate Buffered Saline). Ο παράγοντας EGF (Epidermal Growth Factor) αγοράστηκε, από τη Sigma Chemicals (Γερμανία) και διαλύματα με αρχική συγκέντρωση 5μg/ml προετοιμάστηκαν διαλύοντας EGF σε αποστειρωμένο PBS. Η οιστραδιόλη (E2) αγοράστηκε επίσης από τη Sigma Chemicals (Γερμανία). Διαλύοντας την E2 σε θρεπτικό υλικό, δημιουργήθηκαν διαλύματα με αρχική συγκέντρωση 200nM, προς χρήση. Οι αλλοστερικοί αναστολείς του IGF-IR και του EGFR (AG1024 και AG1478, αντίστοιχα) αγοράστηκαν, επίσης από τη Sigma Chemicals (Γερμανία). Τα αρχικά διαλύματα των αναστολέων αυτών, φτιάχτηκαν διαλύοντας τους σε DEPC νερό. Ειδικός αναστολέας για τον ενδοκυτταρικό Erk1/2 (UO126), αγοράστηκε από την Life Technologies και χρησιμοποιήθηκε όπως περιγράφηκε σε προηγούμενες δημοσιεύσεις του εργαστηρίου (Kouvidi et al., 2011; Kouvidi et al., 2016). Ειδικός αναστολέας του PI-3kinase (LY294002) αγοράστηκε από την Cayman Chemical. Θρεπτικό υλικό Dubblecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose και αντιβιοτικό πενικιλίνη- στρεπτομυκίνη αποκτήθηκαν από την Biosera. Ορός Fetal Bovine Serum (FBS) από τη Gibco CA και ινονεκτίνη ανθρώπινου πλάσματος (human plasma fibronectin) 1mg/ml, από την Millipore. Η καφεΐνη αγοράστηκε από τη Sigma Chemicals (Γερμανία) και αραιώθηκε με DEPC νερό σε κατάλληλες συγκεντρώσεις.

2.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Στα τμήματα Α και Β της μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν MCF-7 (ERα+), ZR-75-1 (ERα/ERβ+) και MDA-MB-231 (ERα-/ERβ+). Για το τρίτο μέρος της μελέτης

χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα του μαστού που προήλθαν από κύτταρα MCF-7 κατόπιν μόνιμης διαμόλυνσης (stable transfection) με shRNA για το ER α γονίδιο. Έτσι χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα προερχόμενα από τα MCF-7 διαμολυσμένα με αρνητικό shRNA (control sh) που καλούνται csh κύτταρα και κύτταρα προερχόμενα από τα MCF-7 διαμολυσμένα με shRNA ειδικό για το ER α , που καλούνται sp10. καρκινικά κύτταρα του μαστού (Engel et al., 1978). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στους 37°C, παρουσία υγρασίας και CO $_2$ 5% v/v. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλαστικές φλάσκες 75cm 2 και καλλιεργήθηκαν παρουσία DMEM high glucose, εμπλουτισμένο με ορό FBS 10% v/v και αντιμικροβιακούς παράγοντες πενικιλίνη- στρεπτομυκίνη (100IU/ml πενικιλίνη, 100μg/ml στρεπτομυκίνη).

Πριν από τα πειράματα τα κύτταρα καλλιεργούνταν για 24 ώρες και στη συνέχεια όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σε συνθήκες χωρίς ορό. Αξίζει να σημειωθεί ότι η χορήγηση του IGF-IR αναστολέα (AG1024) 1μM γινόταν 30 λεπτά πριν τη χορήγηση IGF-I (10ng/ml), EGF (5ng/ml), E2 (10nM) και η χορήγηση του Erk1/2 αναστολέα (5μM) γινόταν 1 ώρα πριν τη χορήγηση IGF-I (10ng/ml), EGF (5ng/ml), E2 (10nM), για 48 ώρες. Επίσης, πειράματα έγιναν με κύτταρα στα οποία είχε γίνει διαμόλυνση με siRNA ειδικό για την FAK (siFAK) και για τον IGF-IR (siIGF-IR) και αρνητικό δείγμα ελέγχου με αλληλουχία siRNA αρνητική (control- siscramble), στα οποία στη συνέχεια χορηγήθηκε IGF-I (10ng/ml), EGF (5ng/ml), E2 (10nM) για 48 ώρες. Η επώαση της καφεΐνης (0,01mM, 0,03mM και 0,05mM) γινόταν για 48 ώρες.

2.3 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN

Μετά το πέρας 48 ωρών από τα αντίστοιχα πειράματα, πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων με την επίδραση διαλύματος Rira. Τα πρωτεϊνικά δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε 8% πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και κατόπιν μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, παρουσία διαλύματος CAPS pH=11 και 10% μεθανόλης. Στις μεμβράνες ακολούθησε επώαση κατά τη διάρκεια μιας νύχτας, στους 4°C, παρουσία διαλύματος PBS 0,1% Tween και 5%v/v γάλα με χαμηλά λιπαρά, για να

αποφευχθούν οι μη ειδικές προσδέσεις. Κατόπιν, οι μεμβράνες επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου με πρώτα αντισώματα: αντι-IGF-IR (1:1000) (Millipore), αντι-p-IGF-IR (Tyr 1165/1166) (1:200) (Millipore), αντι- Erk1/2 (1:1000) (Millipore), αντι-p-Erk1/2 (Thr 202/Tyr 204, Thr 185/Tyr 187) (1:200) (Santa Cruz Biotechnology), αντι-FAK (1:200) (Sant Cruz Biotechnology), αντι-p-FAK (Tyr 397) (1:200) (Acris), αντι-EGFR (1:1000) (Millipore), αντι-pEGFR (1:1000) (Millipore) και αντι- actin (1:250) (Millipore), διαλυμένα σε PBS 0,1% Tween και γάλα με χαμηλά λιπαρά 1% v/v. Τα δημιουργούμενα ανοσολογικά σύμπλοκα ανιχνεύθηκαν με σεσημασμένα με υπεροξειδάση δεύτερα αντισώματα αντι -goat, αντι- rabbit και αντι-mouse (ανάλογα με το ζώο στο οποίο ήταν κατασκευασμένα τα πρώτα) (1:10000) (Millipore) διαλυμένα σε PBS 0,1% Tween και 1% v/v γάλα με χαμηλά λιπαρά και τη χρήση υποστρώματος Super Signal West Pico Chemiluminescent (Pierce, IL).

2.4 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

Για τη δοκιμασία πολλαπλασιασμού οι κύτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν MCF-7, ZR-75-1 και MDA-MB-231, οι οποίες καλλιεργήθηκαν σε πλαστικά πιάτα 96 οπών (Corning, USA) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (2.500, 5.000, 10.000) προκειμένου να επιλεγεί ο κατάλληλος αριθμός για τα βέλτιστα αποτελέσματα της τεχνικής. Οι αριθμοί που επιλέχθηκαν φαίνονται στα αποτελέσματα της μελέτης (MCF-7 και τα ZR-75-1 κύτταρα αριθμός ίσος με 10.000 κύτταρα/ οπή και για τα MDA-MB-231 αριθμός ίσος με 5.000 κύτταρα/ οπή).

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες παρουσία 10% ορού. Στη συνέχεια επώαστηκαν για 48 ώρες χωρίς ορό ή κατόπιν ακόμα 24 ωρών χορηγήθηκαν οι αντίστοιχοι παράγοντες. Ο τελικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε με τη χρήση φθοριόμετρου και αντιδραστηρίων CyQUANT (Molecular Probes), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο φθορισμός μετρήθηκε σε φθοριόμετρο (Biotek), χρησιμοποιώντας έκθεση στα 485/528nm φίλτρα εκπομπής. Για τη μετατροπή του φθορισμού των δειγμάτων σε αριθμό κυττάρων, δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη

αναφοράς, με τη χρήση διαδοχικών αραιώσεων γνωστού αριθμού κυττάρων. Όλα τα πειράματα δοκιμών προσκόλλησης επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές, με τη χρήση τριάδων για κάθε δείγμα.

2.5 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ

Για τη δοκιμασία προσκόλλησης χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά πιάτα 96 οπών (96 well plate), στον οποίων ο πάτος των οπών καλύφθηκε με ινονεκτίνη ($5\mu\text{g}/\text{cm}^2$) και τα πιάτα επώαστηκαν για 1 ώρα στους 37°C , προκειμένου να δημιουργηθεί το υπόστρωμα ινονεκτίνης. Οι μη ειδικές προσδέσεις αποφεύχθηκαν με τη χρήση διαλύματος 1% BSA για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα MCF-7, ZR-75-1, MDA-MB-231, csh, sp10 κύτταρα καλλιεργήθηκαν και έγινε χειρισμός τους, όπως περιγράφεται στην υποενότητα «Κυτταρικές Σειρές και Συνθήκες καλλιέργειας». Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από τις πλαστικές φλάσκες καλλιέργειας με τη χρήση 5mM PBS/EDTA και 6.000 κύτταρα μετρήθηκαν και στρώθηκαν σε κάθε οπή, στην οποία είχε δημιουργηθεί υπόστρωμα ινονεκτίνης, για 1 ώρα. Ο αριθμός των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και ο χρόνος προσκόλλησης επιλέχθηκαν κατόπιν πειραμάτων βελτιστοποίησης της τεχνικής. Τα κύτταρα που δεν προσκολλήθηκαν στο υπόστρωμα απομακρύνθηκαν, κάνοντας δύο πλύσεις με θρεπτικό υλικό, χωρίς ορό. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν επίσης σε οπές στις οποίες δεν υπήρχε υπόστρωμα ινονεκτίνης, αλλά είχε γίνει προσθήκη- επικάλυψη με BSA (αρνητικά δείγματα). Έτσι, υπολογίστηκε, ο αριθμός των κυττάρων, που είχαν προσκολληθεί ειδικά στο υπόστρωμα της ινονεκτίνης, αφαιρώντας τον αριθμό των κυττάρων, που είχαν προσκολληθεί στις οπές με υπόστρωμα BSA, από τον αριθμό των κυττάρων που είχαν προσκολληθεί στην ινονεκτίνη. Οι αριθμοί των κυττάρων που είχαν προσκολληθεί μετρήθηκαν με τη χρήση φθοριόμετρου και αντιδραστηρίων CyQUANT (Molecular Probes), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο φθορισμός μετρήθηκε σε φθοριόμετρο (Biotek), χρησιμοποιώντας έκθεση στα 485/528nm φίλτρα εκπομπής. Για τη μετατροπή του φθορισμού των δειγμάτων σε αριθμό κυττάρων, δημιουργήθηκε

πρότυπη καμπύλη αναφοράς, με τη χρήση διαδοχικών αραιώσεων γνωστού αριθμού κυττάρων. Όλα τα πειράματα δοκιμών προσκόλλησης επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές, με τη χρήση τριάδων για κάθε δείγμα.

2.6 RNA ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ REAL TIME PCR

Το συνολικό RNA απομονώθηκε από τα κύτταρα με τη χρήση Trizol (Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. 1μg συνολικού RNA χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιώντας Takara kit αντίστροφης μεταγραφής (Takara, Japan), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Για το Real time PCR χρησιμοποιήθηκε Mx3005P κυκλοποιητής (Stratagene). Το KAPA SYBR® FAST Universal qPCR kit (KAPA Biosystems) χρησιμοποιήθηκε για το real time PCR, σε τελικό όγκο 20μl με κατάλληλους εκκινητές. (Πίνακας 1). Οι συνθήκες της PCR ήταν για την αποδιάταξη 94°C για 15 λεπτά και κατόπιν 40 κύκλοι στους 94°C για 20 δευτερόλεπτα, 55°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 30 δευτερόλεπτα. Πρότυπες καμπύλες σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για κάθε βελτιστοποιημένο σετ πειραμάτων (ανά γονίδιο) και ήταν μια γραμμική συσχέτιση (γράφημα) threshold cycle (Ct) συναρτήσει του log (αραίωση). Η ποσότητα κάθε γονιδίου ποσοτικοποιήθηκε σύμφωνα με τις συγκεντρώσεις της πρότυπης καμπύλης και αναπαράσταση της έγινε με τη χρήση αυθαίρετων μονάδων μέτρησης σε γραφήματα. Ως γονίδιο δείκτης ποσότητας (housekeeping gene) χρησιμοποιήθηκε GAPDH (Πίνακας 1).

Πίνακας 1	Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν για real time-PCR (primers)
Γονίδιο	Αλληλουχία
IGF-IR_F	5'-TCTCTTCTACCTGGCGCTGT-3'
IGF-IR_R	5'-AAGCAGCAGTCATCCACGAT-3'
FAK_F	5'-GTGCTCTTGGTTCAAGCTGGAT-3'
FAK_R	5'-ACTTGAGTGAAGTCAGCAAGATGTG-3'
Syndecan 1_F	5'-TCTGACAACTTC TCCGGCTC-3'
Syndecan 1_R	5'-CCACTTCTGGCAGGACTACA-3'
Syndecan 2_F	5'-GAGTGTATCCTATTGATGACGATGACTAC-3'
Syndecan 2_R	5'-CTCTGGACTCTCTACATCCTCATCAG-3'
Syndecan 4_F	5'-CCATGATCGGCCCTGAAG-3'
Syndecan 4_R	5'-TGCCCTCTCAGGGATATGGTT-3'
ER α _F	5'-TGCCCTACTACCTGGAGAACGA-3'
ER α _R	5'-TCGATTATCTGAATTTGGCCTGTA-3'
ER β _F	5'-AAGAATATCTCTGTGTCAAGGCCATG-3'
ER β _R	5'-GGCAATCACACCAAACCAAAG-3'
GAPDH_F	5'-GGAAGGTGAAGGTCCGAGTCA-3'
GAPDH_R	5'-GTCATTGATGGCAACAATATCCACT-3'

2.7 ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Τα MCF-7 κύτταρα καλλιεργήθηκαν πάνω σε γυάλινες καλυπτρίδες, που είχαν τοποθετηθεί στον πάτο πλαστικών πιάτων 24 οπών. Αρχικά η καλλιέργεια τους έγινε παρουσία DMEM με 10% ορό FBS, για 24 ώρες. 48 ώρες μετά τη χορήγηση των εκάστοτε παραγόντων, έγινε μονιμοποίηση των κυττάρων στις καλυπτρίδες παρουσία 5% φορμαλδεΰδης και 2% σουκρόζης (διαλυμένη σε PBS) (επώαση 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου). Ακολούθησαν 3 διαδοχικές πλύσεις με PBS και κατόπιν προστέθηκε Triton X, απορρυπαντικός παράγοντας που δημιουργεί οπές στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων, για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν τούτου, τα κύτταρα επώαστηκαν για μία ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου, με τα πρώτα αντισώματα, ειδικά για την ιχνηθέτηση της FAK (1:100) (Santa Cruz Biotechnology) και του IGF-IR (1:100) (Millipore). Μετά την επώαση έγιναν τρεις διαδοχικές πλύσεις των καλυπτρίδων με PBS

εμπλουτισμένο με 1% όρο (FBS). Ακολούθησε προσθήκη των δευτέρων αντισωμάτων anti-goat (1:500) (Alexa Fluor 488) και anti-rabbit (1:800) (Alexa Fluor 488) (Invitrogen), για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και σκοτάδι. Για την παρατήρηση των πυρήνων των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε Topro-3 του οποίου η επώαση διήρκησε 20 λεπτά, σε συνθήκες έλλειψης φωτισμού και θερμοκρασία δωματίου. Τα ινίδια της ακτίνης ανιχνεύθηκαν με τη χρήση φθορίζουσας φαλλοϊδίνης (1:100) (Molecular Probes). Η επώαση για τη φαλλοϊδίνη διήρκησε 20 λεπτά. Τέλος, οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες, με τη χρήση γλυκερόλης και παρατηρήθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο.

2.8 SiRNA

Τα MCF-7 κύτταρα στρώθηκαν σε ειδικές φλάσκες T25 (25cm²) σε κατάλληλη αραιώση, με θρεπτικό DMEM χωρίς ορό και αντιβιοτικά και επώαστηκαν παρουσία siRNA (100nM) αλληλουχιών ειδικών για το γονίδιο της FAK (Hong et al., 2006; Chalkiadaki et al., 2011a) και του IGF-IR (ON-TARGET plus SMART pool siRNA by Dharmacon) και με ειδικό αρνητικό siRNA (siscrumble). Το ειδικό siRNA (Invitrogen) και η λιποφεκταμίνη (Lipofectamine™ 2000) (Invitrogen) σε συγκέντρωση 1μL/50μL θρεπτικού υλικού Opti-MEM © (Invitrogen) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν αυτής της επώασης η διαλυμένη Lipofectamine και το διαλυμένο siRNA αναμείχθηκαν και αφέθηκαν για 20 λεπτά σε συνθήκες RT, προκειμένου να σχηματιστούν τα σύμπλοκα siRNA- λιποσωμάτων και να γίνει η μεταφορά των siRNA ενδοκυτταρικά. Το θρεπτικό υλικό που περιείχε το siRNA ή το αρνητικό siscrumble αφέθηκαν στις φλάσκες καλλιέργειας για 6 ώρες και κατόπιν έγινε αντικατάσταση τους από νέο θρεπτικό υλικό απουσία ορού και η επώαση συνεχίστηκε κανονικά. Οι βέλτιστες συνθήκες του πειραματικού πρωτόκολλου της διαμόλυνσης επιλέχθηκαν μετά τη διεξαγωγή αρχικών πειραμάτων.

2.9 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τον προσδιορισμό στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ μεταβλητών χρησιμοποιήθηκαν τα Student's t-test ή καθώς και η one-way Analysis of Variance (ANOVA) και Turkey's *post hoc* test. Οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με την χρήση του λογισμικού GraphPad prism (version 4.0).

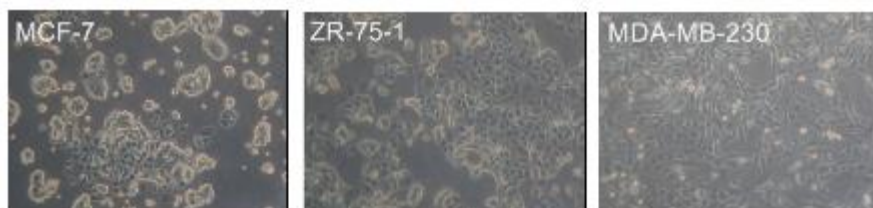
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΜΕΡΟΣ Α: ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΩΝ & ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ p53 ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

3.1.1. Βελτιστοποιήσεις πρωτοκόλλων

Για τη διεξαγωγή της παρούσας διδακτορικής διατριβής απαραίτητη κρίθηκε η βελτιστοποίηση των, προς χρήση, τεχνικών και πρωτοκόλλων για τη διασφάλιση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων της.

Στην αρχή της διδακτορικής διατριβής, χρησιμοποιήθηκαν 3 καρκινικές σειρές του μαστού, με διαφορετικό προφίλ έκφρασης των οιστρογονικών υποδοχέων. Ο τρόπος καλλιέργειας των κυττάρων, περιγράφεται στο τμήμα των μεθόδων της διατριβής. Η μορφολογία των κυττάρων φαίνεται στην εικόνα 1.



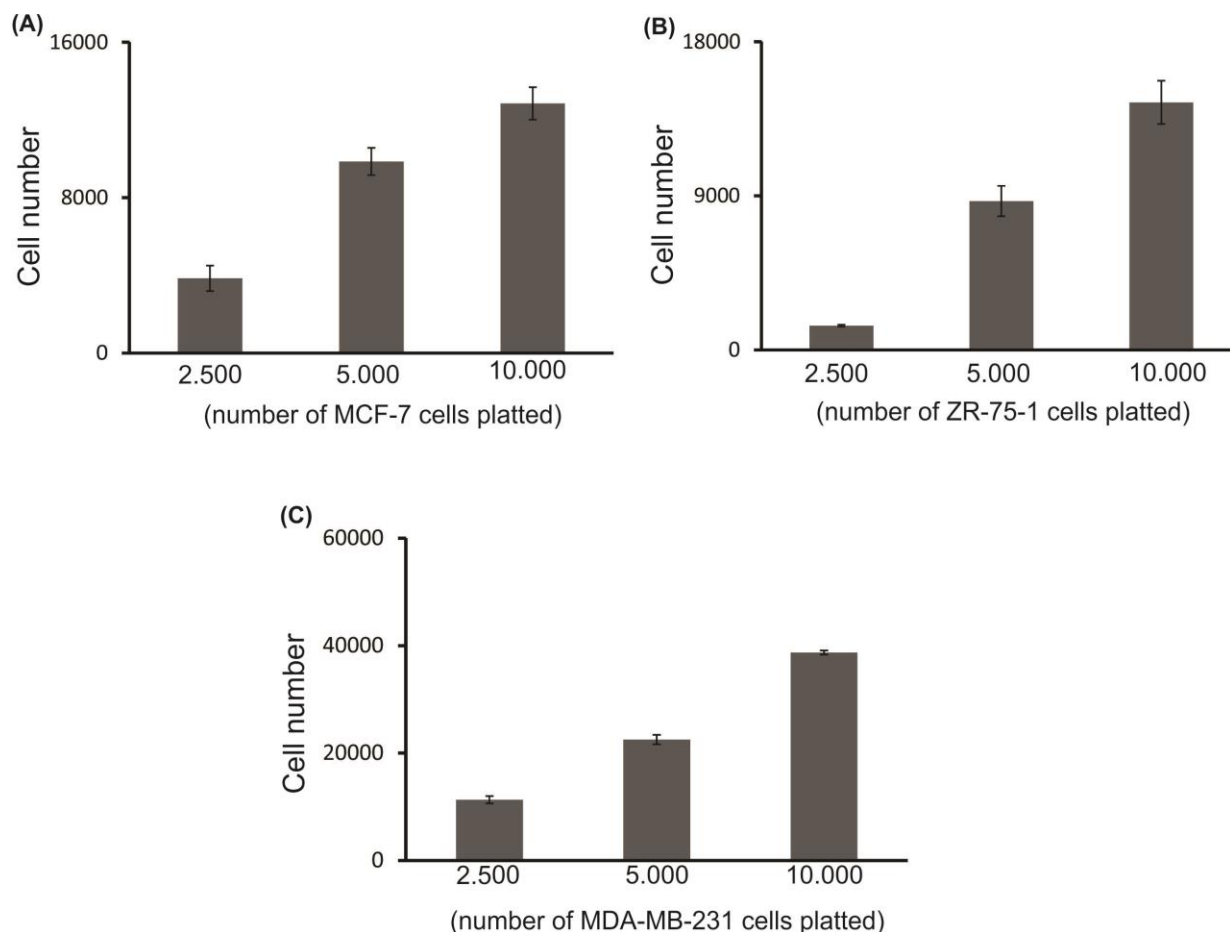
Εικόνα 1: Μορφολογία κυτταρικών σειρών. Στην εικόνα φαίνεται η μορφολογία των κυττάρων MCF-7, ZR-75-1, MDA-MB-231 σε συνθήκες καλλιέργειας παρουσία θρεπτικού υλικού και 10% ορό, σε πλαστικές φλάσκες καλλιέργειας.

3.1.2. Βελτιστοποίηση δοκιμασίας πολλαπλασιασμού για τις κυτταρικές σειρές MCF-7, ZR-75-1 και MDA-MB-231

Προκειμένου να εφαρμοστούν τεχνικές που εξετάζουν την πολλαπλασιαστική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων του μαστού, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της δοκιμής πολλαπλασιασμού και για τις τρεις κυτταρικές σειρές, που επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν στην παρούσα μελέτη. Σε αρχικά πειράματα της μελέτης, τα κύτταρα MCF-7 (Εικόνα 2 Α), ZR-75-1 (Εικόνα 2 Β) και MDA-MB-231 (Εικόνα 2 C),

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

υποβλήθηκαν σε δοκιμή πολλαπλασιασμού, που πραγματοποιήθηκε σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, για να επιλεγεί ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων. Με βάση τα αποτελέσματα, που φαίνονται στην εικόνα 2, επιλέχθηκε για τα MCF-7 και τα ZR-75-1 κύτταρα αριθμός ίσος με 10.000 κύτταρα/ οπή (Εικόνα 2 Α και Β) και για τα MDA-MB-231 αριθμός ίσος με 5.000 κύτταρα/ οπή (Εικόνα 2 C).

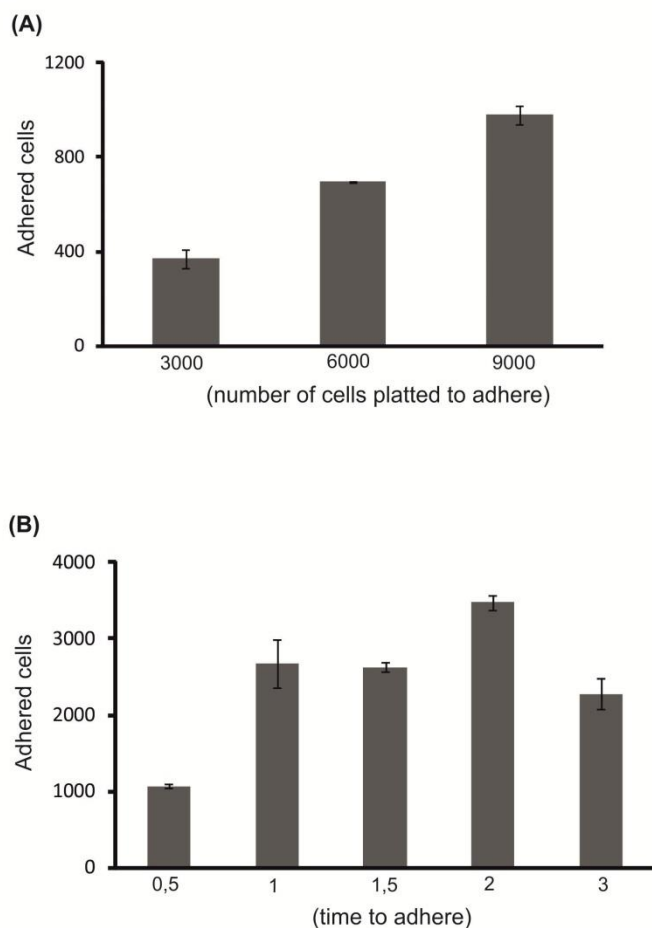


Εικόνα 2: Βελτιστοποίηση δοκιμασίας πολλαπλασιασμού. (Α) Τα MCF-7 κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 72 ώρες σε συνθήκες απουσίας ορού, σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (2.500, 5.000 και 10.000 κύτταρα (B) Τα ZR-75-1 κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 72 ώρες σε συνθήκες απουσίας ορού, σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (2.500, 5.000 και 10.000 κύτταρα). (C) Τα MDA-MB-231 κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 72 ώρες σε συνθήκες απουσίας ορού, σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (2.500, 5.000 και 10.000 κύτταρα). Ο τελικός αριθμός των κυττάρων που είχαν πολλαπλασιαστεί προσδιορίστηκε με μέτρηση φθορισμού από το CyQUANT assay kit (Molecular Probes). Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα.

3.1.3. Βελτιστοποίηση δοκιμασίας προσκόλλησης για τις κυτταρικές σειρές MCF-7 και ZR-75-1

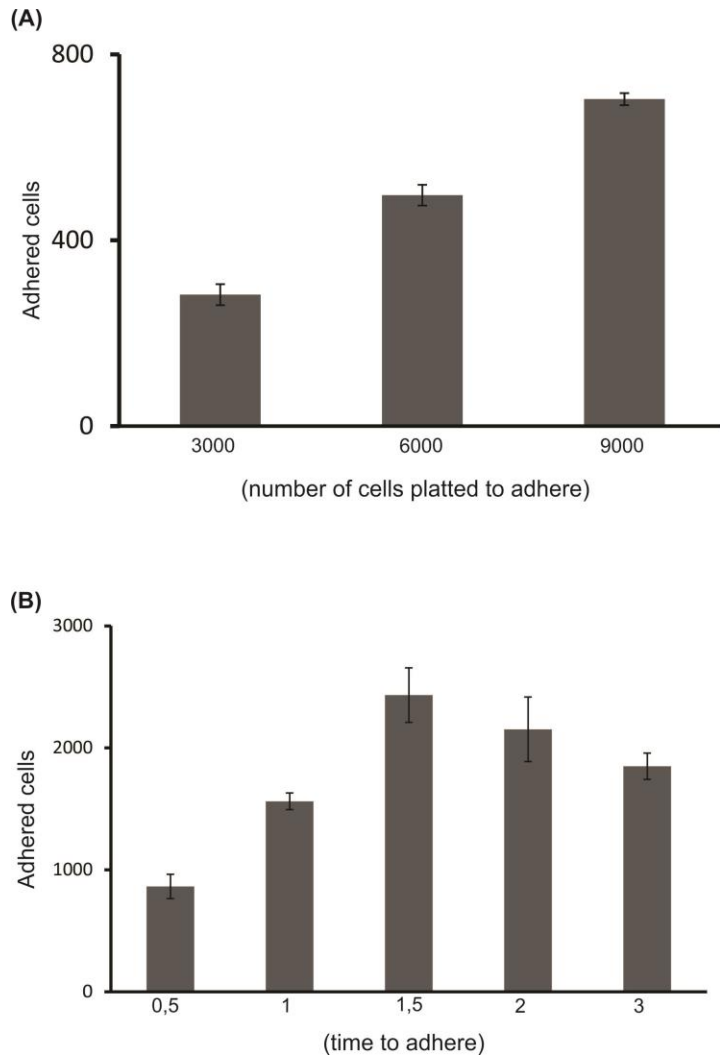
Βασική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη, ήταν η δοκιμή προσκόλλησης σε υπόστρωμα ινονεκτίνης. Σε αρχικά πειράματα της μελέτης, τα MCF-7 (Εικόνα 3), τα ZR-75-1 (Εικόνα 4) και τα MDA-MB-231 (Εικόνα 5) καρκινικά κύτταρα του μαστού, υποβλήθηκαν σε δοκιμή προσκόλλησης για να επιλεγθεί ο κατάλληλος χρόνος προσκόλλησης και ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων. Στις εικόνες 3, 4 Α έχει δειχθεί ότι ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων για τη μελέτη της προσκόλλησης είναι 6.000 κύτταρα/ οπή για τα MCF-7 και τα ZR-75-1. Στην εικόνα 5 Α επιλέχθηκε για τα MDA-MB-231 αριθμός ίσος με 3.500 κύτταρα/ οπή. Όπως φαίνεται στις εικόνες 3, 4 Β κατόπιν δοκιμής προσκόλλησης για την επιλογή του χρόνου προσκόλλησης για κάθε κυτταρική σειρά, έχει επιλεγεί χρόνος 1 ώρα προσκόλλησης για τα κύτταρα MCF-7 και τα ZR-75-1, ενώ για τα MDA-MB-231 κατάλληλος χρόνος προσκόλλησης επιλέχθηκαν τα 30 λεπτά (Εικόνα 5 Β).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



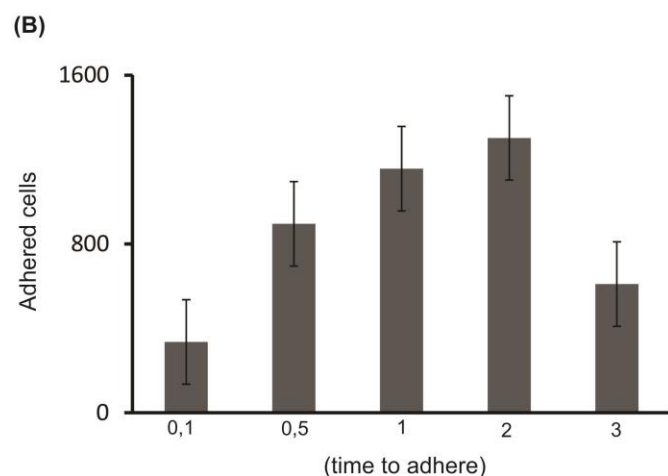
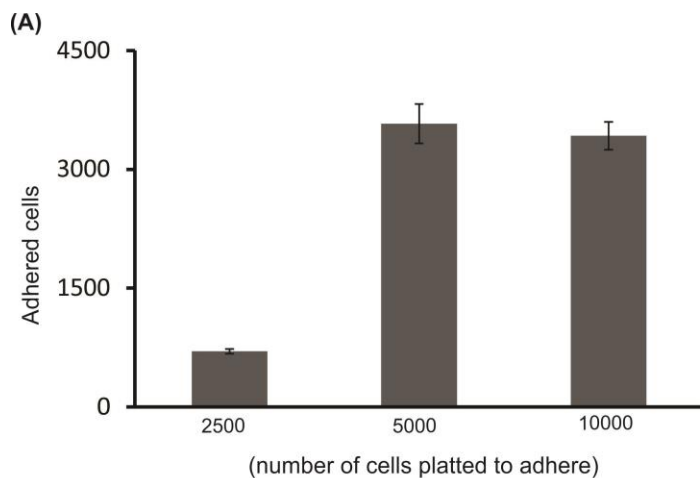
Εικόνα 3: Βελτιστοποίηση δοκιμασίας προσκόλλησης. Τα MCF-7 κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε συνθήκες απουσίας ορού. (A) Κατόπιν στρώθηκαν σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, στα οποία είχε τοποθετηθεί υπόστρωμα ινονεκτίνης για 30 λεπτά σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (3.000, 6.000 και 9.000 κύτταρα) (B) 6.000 κύτταρα/οπή επώαστηκαν για να προσκολληθούν για 0,5, 1, 1,5, 2, 3 ώρες σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, με υπόστρωμα ινονεκτίνης. Ο αριθμός των κυττάρων που είχαν προσκολληθεί προσδιορίστηκε με μέτρηση φθορισμού από το CyQUANT assay kit (Molecular Probes). Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 4: Βελτιστοποίηση δοκιμασίας προσκόλλησης. Τα ZR-75-1 κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε συνθήκες απουσίας ορού. (A) Κατόπιν στρώθηκαν σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, στα οποία είχε τοποθετηθεί υπόστρωμα ινονεκτίνης για 30 λεπτά σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (3.000, 6.000 και 9.000 κύτταρα). (B) 6.000 κύτταρα/οπή επώαστηκαν για να προσκολληθούν για 0,5, 1, 1,5, 2, 3 ώρες σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, με υπόστρωμα ινονεκτίνης. Ο αριθμός των κυττάρων που είχαν προσκολληθεί προσδιορίστηκε με μέτρηση φθορισμού από το CyQUANT assay kit (Molecular Probes). Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 5: Βελτιστοποίηση δοκιμασίας προσκόλλησης. Τα MDA-MB-231 κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε συνθήκες απουσίας ορού. (A) Κατόπιν στρώθηκαν σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, στα οποία είχε τοποθετηθεί υπόστρωμα ινονεκτίνης για 30 λεπτά σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (2.500, 5.000 και 10.000 κύτταρα). (B) 3.500 κύτταρα/οπή επωάστηκαν για να προσκολληθούν για 0,1, 0,5, 1, 2, 3 ώρες σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, με υπόστρωμα ινονεκτίνης. Ο αριθμός των κυττάρων που είχαν προσκολληθεί προσδιορίστηκε με μέτρηση φθορισμού από το CyQUANT assay kit (Molecular Probes). Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα.

3.1.4. Επίδραση του p53 στην προσκόλληση καρκινικών κυττάρων του μαστού και στην έκφραση του IGF-IR

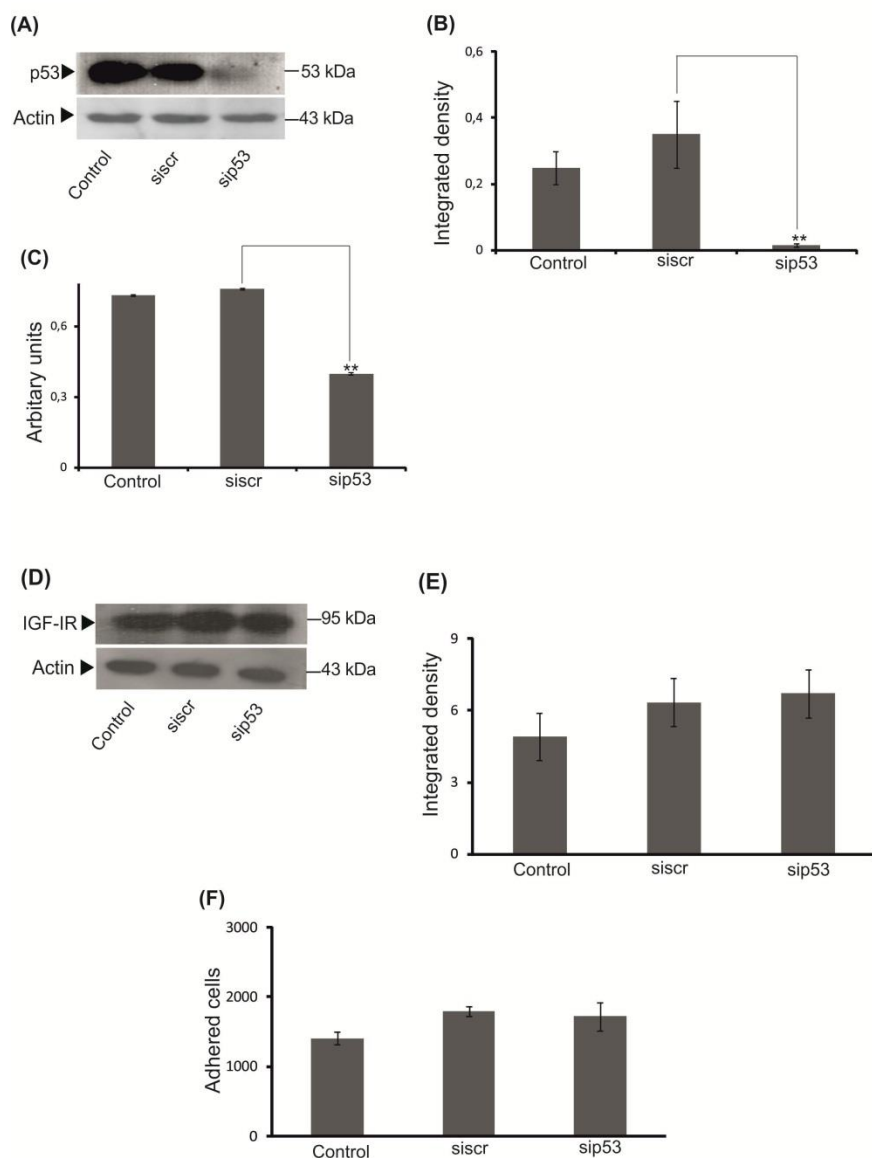
Ο p53, γνωστός ογκοκατασταλτικός παράγοντας, είναι κύριος ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Rosianu and Tudose, 1998). Δεδομένα παλαιότερων

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

μελετών, έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ του p53 και του IGF-IR, στην ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων, μέσω της γονιδιακής ρύθμισης του *IGF-IR* από τον p53 (Werner et al., 1996; Prisco et al., 1997; Werner and Maor, 2006).

Με βάση τα δεδομένα αυτά, διερευνήθηκε η πιθανή ρύθμιση του IGF-IR από τον p53, καθώς και ο πιθανός ρόλος του p53 στην προσκόλληση των MCF-7 καρκινικών κυττάρων του μαστού. Η μελέτη της επίδρασης του p53 στην έκφραση του IGF-IR έγινε με τη χρήση ειδικού siRNA, για το γονίδιο του p53, που δείχθηκε ότι μειώνει, τόσο την παραγωγή του mRNA, όσο και της πρωτεΐνης ($p \leq 0,01$) (Εικόνα 6 A, B, C). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ο p53 δεν τροποποιεί την έκφραση του IGF-IR, καθώς η μείωση του p53, δεν προκαλεί αλλαγές στην έκφραση του IGF-IR (Εικόνα 6 D, E). Ακόμα, η μείωση της έκφρασης του p53 δεν επηρεάζει την προσκολλητική ικανότητα των MCF-7 κυττάρων, σε υπόστρωμα ινονεκτίνης (Εικόνα 6 F).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 6: Ο ρόλος του p53 στην προσκόλληση καρκινικών κυττάρων του μαστού και στην έκφραση του IGF-IR. Τα MCF-7 κύτταρα διαμολύνθηκαν με μικρές ειδικές για το p53 αλληλουχίες παρεμβολής RNA (short interfering RNA- siRNA) (sip53), αρνητικές αλληλουχίες παρεμβολής RNA (siscramble- siScr) χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικό δείγμα ελέγχου (negative control). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε συνθήκες απουσίας ορού. (A) Αντιπροσωπευτική απεικόνιση του προτύπου ζώνωσης της πρωτεΐνης p53 (53kDa). (B) Οι πρωτεϊνικές ζώνες του p53 ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την πυκνότητά τους, αναλύθηκαν και κανονικοποιήθηκαν με τη χρήση ακτίνης ως πρωτεϊνικό δείκτη ποσότητας των δειγμάτων. (C) Η μελέτη της έκφρασης του p53 σε επίπεδο mRNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του real time PCR. (D) Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε συνθήκες απουσίας ορού και τα επίπεδα έκφρασης του IGF-IR (95kDa) μελετήθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western. (E) Οι πρωτεϊνικές ζώνες του IGF-IR ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την πυκνότητά τους, αναλύθηκαν και κανονικοποιήθηκαν με τη χρήση ακτίνης ως πρωτεϊνικό δείκτη ποσότητας των δειγμάτων. (F) Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 48

ώρες σε συνθήκες απουσίας ορού, συλλέχθηκαν και επωάστηκαν για προσκόλληση για 1 ώρα σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, με υπόστρωμα ινονεκτίνης. Ο αριθμός των κυττάρων που είχαν προσκολληθεί προσδιορίστηκε με μέτρηση φθορισμού από το CyQUANT assay kit (Molecular Probes). Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα.

3.2. ΜΕΡΟΣ Β: Ο IGF-IR ΩΣ ΚΥΡΙΟ ΣΗΜΕΙΟ ΣΥΝΑΝΤΗΣΗΣ ΤΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΤΩΝ IGF-I/EGF ΚΑΙ ΤΗΣ E2, ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

3.2.1. Η IGF-I/EGF και E2- εξαρτώμενη προσκόλληση σε υπόστρωμα ινονεκτίνης ρυθμίζεται από τον IGF-IR

Λαμβάνοντας υπ' όψιν το ρόλο των IGF-I, EGF και του σηματοδοτικού μονοπατιού του IGF-IR, στην παθολογία του καρκίνου του μαστού, εξετάστηκε η ικανότητα των παραγόντων αυτών στη ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης τόσο των MCF-7 κυττάρων, όσο και των ZR-75-1 (Εικόνα 7). Η χρήση της δοκιμής κυτταρικής προσκόλλησης έδειξε (Εικ. 7 Α και Β) ότι ο IGF-I και ο EGF αύξησαν σημαντικά την προσκόλληση σε υπόστρωμα ινονεκτίνης και στις 2 κυτταρικές σειρές ($p \leq 0,01$ και $p \leq 0,001$ αντίστοιχα). Χρησιμοποιώντας τον AG1024, ειδικό αναστολέα για τον υποδοχέα IGF-IR, τόσο η ενδογενής προσκολλητική ικανότητα ($p \leq 0,05$), όσο και η IGF-I/EGF- εξαρτώμενη προσκόλληση στα MCF-7 κύτταρα, μειώθηκαν σημαντικά ($p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$). Ομοίως, στα κύτταρα ZR-75-1, παρατηρήθηκε επίσης, ότι η IGF-I και EGF-επαγόμενη προσκόλληση, μειώνεται παρουσία του AG1024 ($p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$ αντίστοιχα).

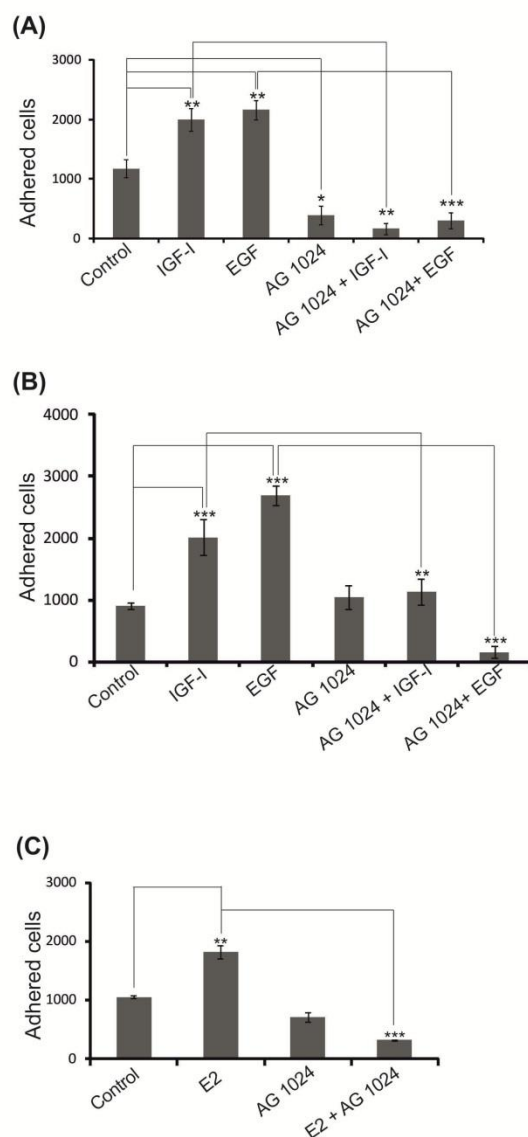
Τα παρόντα δεδομένα δείχνουν ότι ο IGF-I και ο EGF τροποποιούν την προσκολλητική ικανότητα των MCF-7 και των ZR-75-1 κυττάρων, μέσω του κατάντη σηματοδοτικού μονοπατιού του IGF-IR, προτείνοντας έτσι, την ύπαρξη της αλληλεπίδρασης των μοριακών μηχανισμών δράσης των παραγόντων αυτών. Ο AG1024 είναι αναστολέας, με πολύ χαμηλή ικανότητα πρόσδεσης σε άλλους υποδοχείς

της ινσουλίνης (όπως ο IR) έτσι οι παρατηρούμενες δράσεις είναι ειδικές για τον υποδοχέα IGF-IR (Parrizas et al., 1997).

Με βάση συμπληρωματικά δεδομένα της μελέτης, σε πειράματα ελέγχου επιβεβαιώθηκε ότι ο AG1024 εμποδίζει την ενεργοποίηση του IGF-IR (Συμπληρωματική εικόνα 1). Ακόμα, τα πειράματα της προσκόλλησης έχουν γίνει επίσης και 24 ώρες, μετά την προσθήκη των παραγόντων με τα ίδια αποτελέσματα (Συμπληρωματική εικόνα 1). Επιπλέον, έχει χρησιμοποιηθεί ο AG1438, αναστολέας του υποδοχέα EGFR και παρόλο που δεν παρατηρήθηκε δράση στην IGF-I- επαγόμενη προσκόλληση, παρατηρήθηκε μείωση της δράσης της E2 στην προσκόλληση ($p \leq 0,01$) (Συμπληρωματική εικόνα 2).

Παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη αλληλεπίδρασης των σηματοδοτικών μονοπατιών των παραγόντων IGF-I/EGF και της ορμόνης E2 στα MCF-7 κύτταρα (Masiakowski et al., 1982). Λαμβάνοντας υπόψη, τις γενωμικές και πρωτεϊνικές ομοιότητες, που εμφανίζουν τα MCF-7 κύτταρα, με τους πρωτογενείς καρκινικούς όγκους, επιλέχθηκαν ως ένα αντιπροσωπευτικό μοντέλο για τη μελέτη του ορμονο-εξαρτώμενου καρκίνου του μαστού (Masiakowski et al., 1982; Neve et al., 2006). Στην παρούσα μελέτη, η οιστραδιόλη φαίνεται να αυξάνει σημαντικά την προσκόλληση των MCF-7 κυττάρων, στο υπόστρωμα της ινονεκτίνης ($p \leq 0,01$). Επιπλέον, η συμμετοχή του IGF-IR φαίνεται να είναι απαραίτητη για την E2- επαγόμενη κυτταρική προσκόλληση, όπως αποδεικνύεται από τη χρήση του IGF-IR αναστολέα ($p \leq 0,001$) (Εικόνα 7 C).

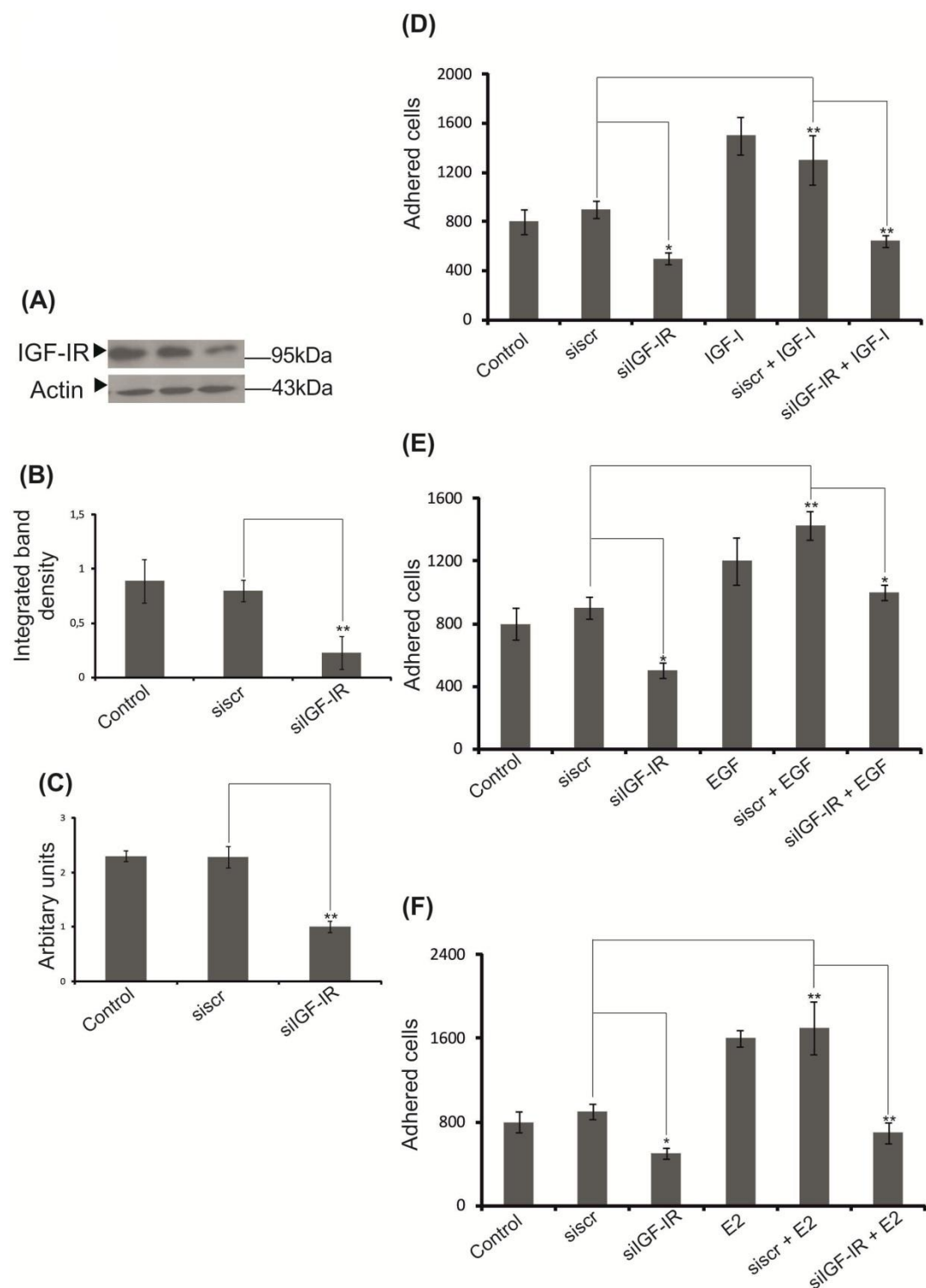
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 7: Ο ρόλος του IGF-IR στην IGF-I/EGF, E2- επαγόμενη προσκόλληση καρκινικών κυττάρων του μαστού. (A) Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε IGF-I (10ng/ml), EGF (5ng/ml), AG1024 (αναστολέας του IGF-IR) (1μM) για 48 ώρες, συλλέχθηκαν και στρώθηκαν εκ νέου για προσκόλληση για 1 ώρα, σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, με υπόστρωμα ινονεκτίνης. (B) Στα ZR-75-1 κύτταρα χορηγήθηκε IGF-I (10ng/ml), EGF (5ng/ml), AG1024 (αναστολέας του IGF-IR) (1μM) για 48 ώρες, συλλέχθηκαν και στρώθηκαν εκ νέου για προσκόλληση για 1 ώρα, σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, με υπόστρωμα ινονεκτίνης. (C) Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε E2 (10nM) και AG1024 (αναστολέας του IGF-IR) (1μM) και συνδυασμός τους για 48 ώρες, συλλέχθηκαν και στρώθηκαν εκ νέου για προσκόλληση για 1 ώρα, σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, με υπόστρωμα ινονεκτίνης. Ο αριθμός των κυττάρων που είχαν προσκολληθεί προσδιορίστηκε με μέτρηση φθορισμού από το CyQUANT assay kit (Molecular Probes). Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα. Στατιστική σημασία: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.2.2. Τα ελλιπή σε IGF-IR κύτταρα δεν αποκρίνονται στην IGF-I/EGF και E2 επαγωγή της προσκόλλησης

Προκειμένου να διερευνηθεί σε βάθος ο ρόλος του IGF-IR στην προσκόλληση των MCF-7 κυττάρων χρησιμοποιήθηκε siRNA ειδικό για το γονίδιο του *IGF-IR*. Η διαμόλυνση των MCF-7 κυττάρων με siIGF-IR είχε ως αποτέλεσμα μια ικανοποιητική μείωση της έκφρασης του IGF-IR (της τάξης του 55%), σε επίπεδο mRNA και σε πρωτεϊνικό επίπεδο (Εικόνα 8 A, B, C). Η μείωση στην έκφραση του IGF-IR συνοδεύτηκε από ενδογενή μείωση της προσκόλλησης των κυττάρων σε υπόστρωμα ινονεκτίνης ($p \leq 0,05$) (Εικόνα 8 D, E, F). Επιπλέον, η IGF-I/EGF και E2- επαγόμενη προσκόλληση, μειώθηκε σημαντικά σε κύτταρα ελλιπή σε IGF-IR ($p \leq 0,001$, $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, αντίστοιχα). Τα παρόντα δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο IGF-IR είναι σημείο συνάντησης για τη δράση των αυξητικών παραγόντων IGF-I, EGF και της ορμόνης E2.



Εικόνα 8: Ο ρόλος του IGF-IR στην IGF-I/EGF, E2- επαγόμενη προσκόλληση καρκινικών κυττάρων του μαστού. Τα MCF-7 κύτταρα διαμολύνθηκαν με μικρές ειδικές, για τον IGF-IR, αλληλουχίες παρεμβολής RNA (short interfering RNA- siRNA) (siIGF-IR), αρνητικές αλληλουχίες παρεμβολής RNA (scramble-siScr) χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικό δείγμα ελέγχου (negative control). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε συνθήκες απουσίας ορού. (A) Αντιπροσωπευτική απεικόνιση του προτύπου ζώνωσης της

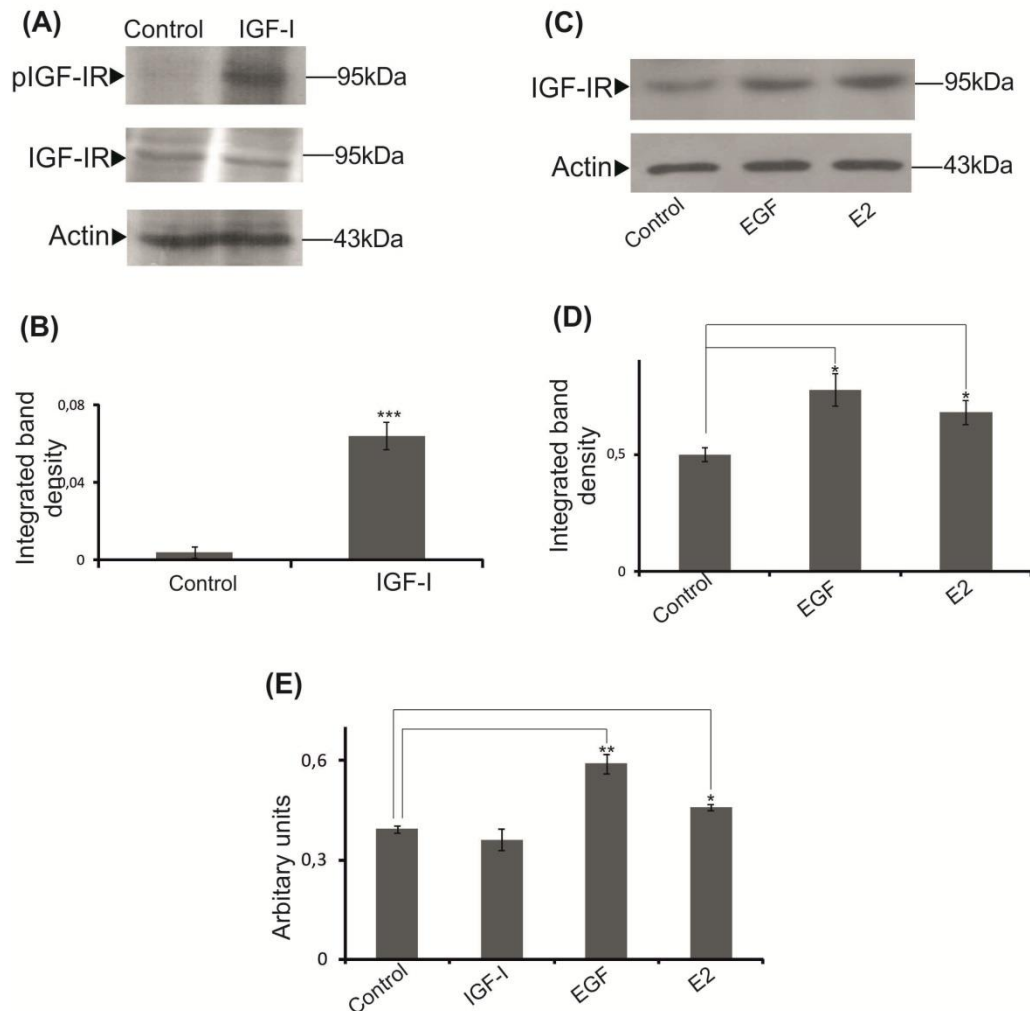
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

πρωτεΐνης IGF-IR (95kDa). (B) Οι πρωτεϊνικές ζώνες του IGF-IR ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την πυκνότητα τους, αναλύθηκαν και κανονικοποιήθηκαν με τη χρήση ακτίνης ως πρωτεϊνικό δείκτη ποσότητας των δειγμάτων. (C) Η μελέτη της έκφρασης του p53 σε επίπεδο mRNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του real time PCR. 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση των MCF-7 κυττάρων με τη χρήση siRNA για τον IGF-IR χορηγήθηκε IGF-I (10ng/ml) (D), EGF (5ng/ml) (E) και E2(10nM) (F) για 48 ώρες, συλλέχθηκαν και στρώθηκαν εκ νέου για προσκόλληση για 1 ώρα, σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, με υπόστρωμα ινονεκτίνης. Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα. Στατιστική σημασία: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.2.3. Η επίδραση των IGF-I, EGF και E2 στην έκφραση του IGF-IR

Σε πειράματα ελέγχου, αλλά και σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Guvakova and Surmacz, 1997; Zhang et al., 2011) έχει δειχθεί ότι τα MCF-7 κύτταρα παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης του IGF-IR (Εικόνα 9 A, B) και ο IGF-I επάγει την φωσφορυλίωση του υποδοχέα του στα κατάλοιπα τυροσίνης 1165/1166 ($p \leq 0,01$). Ο EGF και η E2 αυξάνουν την έκφραση του IGF-IR, τόσο σε επίπεδο mRNA ($p \leq 0,01$, $p \leq 0,05$), όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο ($p \leq 0,05$) (Εικόνα 9 C, D, E). Εντούτοις, τόσο το Real-time PCR, όσο και το western blot, έδειξαν ότι η έκφραση του EGFR δεν επηρεάζεται από τους IGF-I, EGF και E2 (Συμπληρωματική εικόνα 3).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

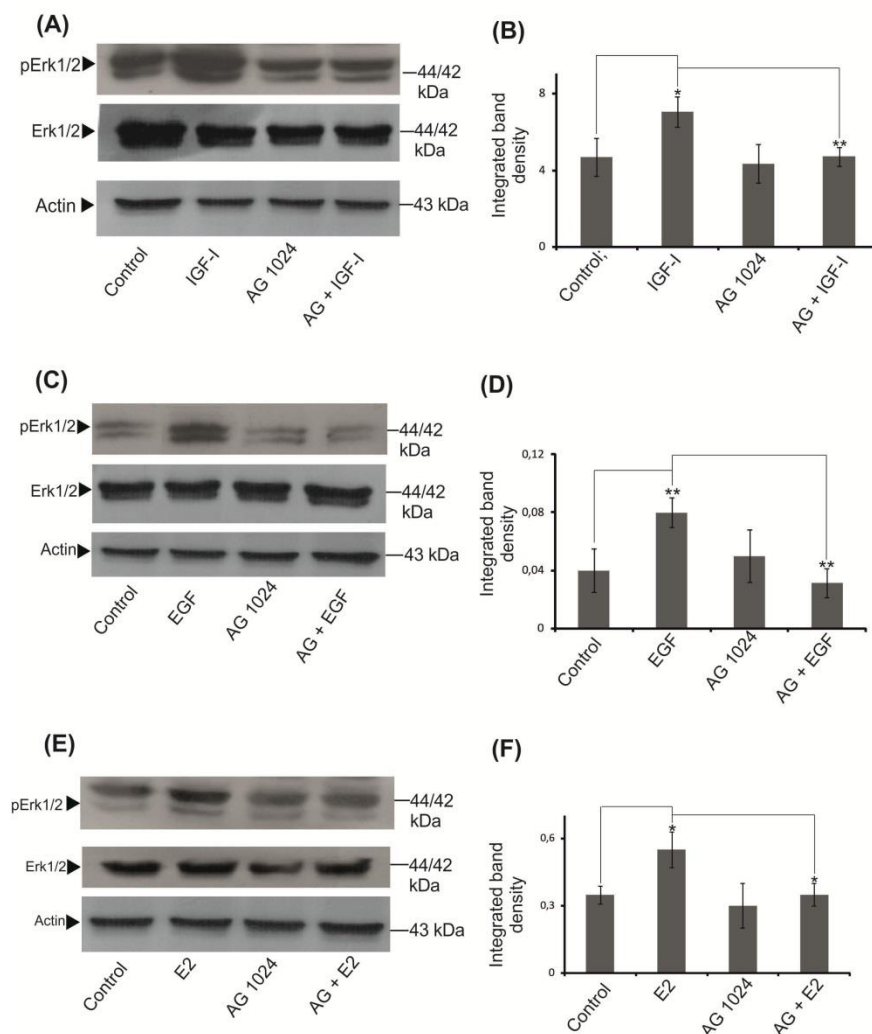


Εικόνα 9: Επίδραση IGF-I/EGF και E2 στην έκφραση του IGF-IR. (A) Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε IGF-I (10ng/ml), για 48 ώρες. Παρουσιάζεται αντιπροσωπευτική απεικόνιση του προτύπου ζώνωσης της πρωτεΐνης IGF-IR (95kDa) και p-IGF-IR (95kDa). (B) Οι πρωτεϊνικές ζώνες του IGF-IR και του p-IGF-IR ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την πυκνότητά τους, αναλύθηκαν και κανονικοποιήθηκαν με τη χρήση ακτίνης ως πρωτεϊνικό δείκτη ποσότητας των δειγμάτων. (C) Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε EGF (5ng/ml), E2 (10nM) για 48 ώρες. Παρουσιάζεται αντιπροσωπευτική απεικόνιση του προτύπου ζώνωσης της πρωτεΐνης IGF-IR (95kDa). (D) Οι πρωτεϊνικές ζώνες του IGF-IR ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την πυκνότητά τους, αναλύθηκαν και κανονικοποιήθηκαν με τη χρήση ακτίνης ως πρωτεϊνικό δείκτη ποσότητας των δειγμάτων. (E) Προσδιορίζονται τα επίπεδα mRNA έκφρασης του IGF-IR, κατόπιν χορήγησης IGF-I, EGF, E2, με τη χρήση Real-time PCR. Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα. Στατιστική σημασία: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.2.4. Ο Erk1/2 είναι ο κύριος ενδοκυτταρικός διαμεσολαβητής των δράσεων των IGF-I/EGF και E2 στην κυτταρική προσκόλληση και στην έκφραση του IGF-IR στα MCF-7 κύτταρα

Η IGF-I- επαγόμενη ενεργοποίηση του IGF-IR μπορεί να ενεργοποιήσει ενδοκυττάρους σηματοδοτικούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των Ras/Raf/Erk, που συμμετέχουν στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Baserga et al., 1997). Στην παρούσα μελέτη, και σε συμφωνία με παλαιότερες μελέτες, ο IGF-I και ο EGF αυξάνουν την ενεργοποίηση του Erk1/2 ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, αντίστοιχα) (Εικόνα 10 A, B, C, D). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, η ενεργοποίηση αυτή εξαρτάται από τον IGF-IR, καθώς η αναστολή του IGF-IR σηματοδοτικού μονοπατιού, μειώνει την IGF-I, EGF - επαγόμενη ενεργοποίηση του Erk1/2 ($p \leq 0,01$) (Εικόνα 10 A, B, C, D). Ακόμα, η E2- επαγόμενη ενεργοποίηση του Erk1/2 μειώνεται από την αναστολή του IGF-IR ($p \leq 0,05$) (Εικόνα 10 E, F).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 10: Επίδραση του IGF-IR στην ενεργοποίηση του Erk1/2. (A) Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε IGF-I (10ng/ml), AG1024 (αναστολέας του IGF-IR) (1μM) και συνδυασμός τους για 48 ώρες. Παρουσιάζεται αντιπροσωπευτική απεικόνιση του προτύπου ζώνωσης της πρωτεΐνης Erk1/2 (42/44kDa) και p-Erk1/2 (42/44kDa). (B) Οι πρωτεϊνικές ζώνες του Erk1/2 και του p-Erk1/2 ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την πυκνότητά τους, αναλύθηκαν και κανονικοποιήθηκαν με τη χρήση ακτίνης ως πρωτεϊνικό δείκτη ποσότητας των δειγμάτων. (C) Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε EGF (5ng/ml), AG1024 (αναστολέας του IGF-IR) (1μM) και συνδυασμός τους για 48 ώρες. Παρουσιάζεται αντιπροσωπευτική απεικόνιση του προτύπου ζώνωσης της πρωτεΐνης Erk1/2 (42/44kDa) και p-Erk1/2 (42/44kDa). (D) Οι πρωτεϊνικές ζώνες του Erk1/2 και του p-Erk1/2 ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την πυκνότητά τους, αναλύθηκαν και κανονικοποιήθηκαν με τη χρήση ακτίνης ως πρωτεϊνικό δείκτη ποσότητας των δειγμάτων. (E) Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε E2 (10nM), AG1024 (αναστολέας του IGF-IR) (1μM) και συνδυασμός τους για 48 ώρες. Παρουσιάζεται αντιπροσωπευτική απεικόνιση του προτύπου ζώνωσης της πρωτεΐνης Erk1/2 (42/44kDa) και p-Erk1/2 (42/44kDa). (F) Οι πρωτεϊνικές ζώνες του Erk1/2 και του p-Erk1/2 ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την πυκνότητά τους, αναλύθηκαν και κανονικοποιήθηκαν με τη χρήση ακτίνης ως πρωτεϊνικό δείκτη ποσότητας των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο

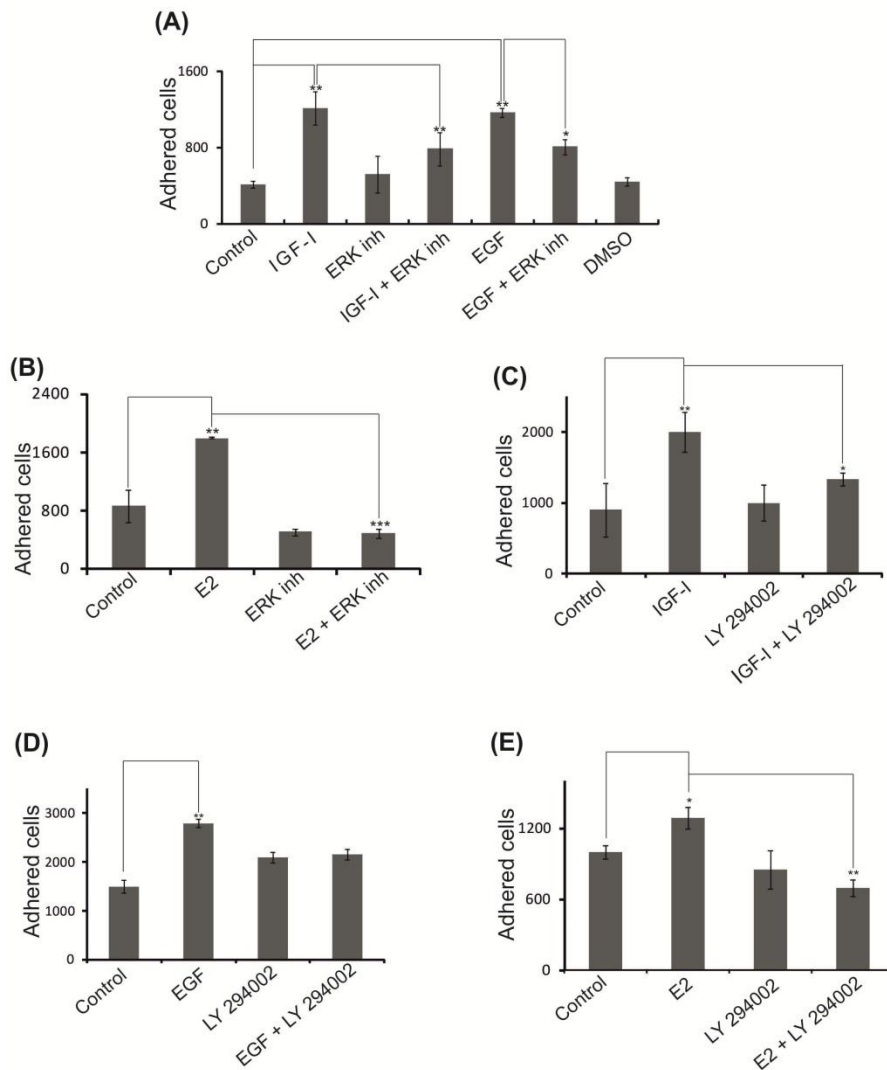
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα. Στατιστική σημασία: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν τη μελέτη στη διερεύνηση της πιθανής συμμετοχής του Erk1/2 στην IGF-I/EGF- εξαρτώμενη προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Όπως φαίνεται στην εικόνα 11 A, η χρήση αναστολέα για την ενδοκυττάρια σηματοδοτική πρωτεΐνη Erk1/2 μείωσε σημαντικά, τόσο την IGF-I ($p \leq 0,01$), όσο και την EGF ($p \leq 0,05$) - εξαρτώμενη προσκόλληση. Τα παρόντα αποτελέσματα προτείνουν ότι η IGF-I, EGF- εξαρτώμενη ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης διαμεσολαβείται ενδοκυττάρια από τον Erk1/2. Επιπρόσθετα, η αναστολή του Erk1/2 οδηγεί στην μείωση της E2- εξαρτώμενης προσκόλλησης των MCF-7 κυττάρων (Εικόνα 11 B) ($p \leq 0,001$).

Επιπλέον πειράματα, έδειξαν ότι η IGF-I- εξαρτώμενη ενεργοποίηση του PI-3K ενδοκυττάριου σηματοδοτικού μονοπατιού συμμετέχει, επίσης, στην επαγωγή της κυτταρικής προσκόλλησης των MCF-7 κυττάρων (Εικόνα 11 C, D, E). Η χρήση αναστολέα του PI-3K (LY294002), μείωσε τόσο τη δράση του IGF-I ($p \leq 0,05$), όσο και τη δράση της E2 ($p \leq 0,01$) στην προσκολλητική ικανότητα των κυττάρων (Εικόνα 11 C, E).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

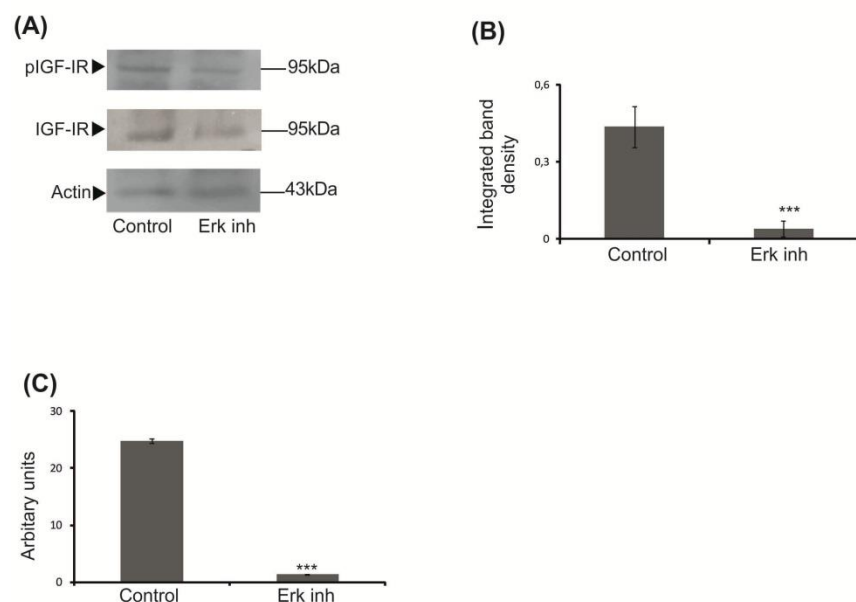


Εικόνα 11: Ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης των MCF-7 κυττάρων από Erk1/2 και PI-3kinase. (A) Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε IGF-I (10ng/ml), EGF (5ng/ml), Erk1/2 inhibitor (5μM) και συνδυασμός τους για 48 ώρες, συλλέχθηκαν και στρώθηκαν εκ νέου για προσκόλληση για 1 ώρα, σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, με υπόστρωμα ινονεκτίνης. (B) Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε E2 (10nM), Erk1/2 inhibitor (5μM) και συνδυασμός τους για 48 ώρες, συλλέχθηκαν και στρώθηκαν εκ νέου για προσκόλληση για 1 ώρα, σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, με υπόστρωμα ινονεκτίνης. (C) Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε IGF-I (10ng/ml), LY294002 (αναστολέας του PI-3kinase) (10μM) και συνδυασμός τους για 48 ώρες, συλλέχθηκαν και στρώθηκαν εκ νέου για προσκόλληση για 1 ώρα, σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, με υπόστρωμα ινονεκτίνης. (D) Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε EGF (5ng/ml), LY294002 (αναστολέας του PI-3kinase) (10μM) και συνδυασμός τους για 48 ώρες, συλλέχθηκαν και στρώθηκαν εκ νέου για προσκόλληση για 1 ώρα, σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, με υπόστρωμα ινονεκτίνης. (E) Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε E2 (10nM), LY294002 (αναστολέας του PI-3kinase) (10μM) και συνδυασμός τους για 48 ώρες, συλλέχθηκαν και στρώθηκαν εκ νέου για προσκόλληση για 1 ώρα, σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, με υπόστρωμα ινονεκτίνης. Ο αριθμός των κυττάρων που είχαν

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

προσκολληθεί προσδιορίστηκε με μέτρηση φθορισμού από το CyQUANT assay kit (Molecular Probes). Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα. Στατιστική σημασία: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Είναι γνωστό ότι η IGF-I επαγόμενη ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού (Chung et al., 1991), μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στη διαδικασία της εξέλιξης των καρκινικών όγκων (Ruderman, 1993). Με βάση τα δεδομένα αυτά, στη συνέχεια, διερευνήθηκε η πιθανή ύπαρξη ενός μηχανισμού ρύθμισης μεταξύ του Erk1/2, κατάντη ενδοκυττάριου διαμεσολαβητή του IGF-I επαγόμενου σηματοδοτικού μονοπατιού, και της έκφρασης/ ενεργοποίησης του υποδοχέα του, IGF-IR. Για τη συγκεκριμένη μελέτη, αναγκαία ήταν η χρήση αναστολέα του Erk1/2. Πράγματι, η διερεύνηση αυτή απέδωσε ρόλο- κλειδί στον Erk1/2 για την έκφραση/ενεργοποίηση του IGF-IR, καθώς η αναστολή του Erk1/2 μείωσε σημαντικά την έκφραση και την ενεργοποίηση του IGF-IR ($p \leq 0,001$) (Εικόνα 12 A, B, C).

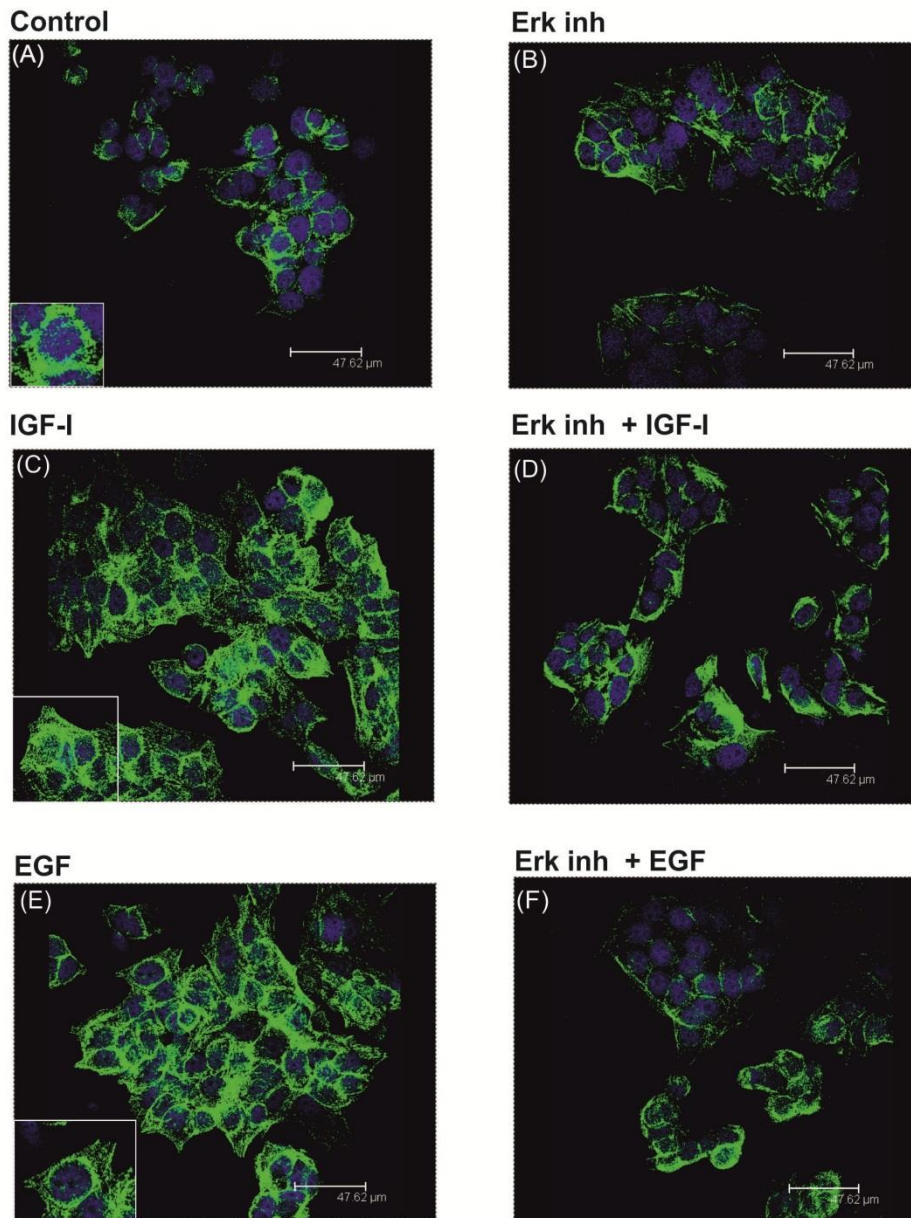


Εικόνα 12: Ο ρόλος του Erk1/2 στην έκφραση και την ενεργοποίηση του IGF-IR. (A) Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε Erk1/2 inhibitor (5 μ M) για 48 ώρες. Παρουσιάζεται αντιπροσωπευτική απεικόνιση του προτύπου ζώνωσης της πρωτεΐνης IGF-IR (95kDa) και p-IGF-IR (95kDa). (B) Οι πρωτεϊνικές ζώνες του

IGF-IR και του p-IGF-IR ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την πυκνότητα τους, αναλύθηκαν και κανονικοποιήθηκαν με τη χρήση ακτίνης ως πρωτεϊνικό δείκτη ποσότητας των δειγμάτων. (C) Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε Erk1/2 inhibitor (5μM) για 48 ώρες και τα επίπεδα mRNA έκφρασης του IGF-IR προσδιορίστηκαν με τη χρήση Real-time PCR. Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα. Στατιστική σημασία: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.2.5. Η επίδραση των IGF-I/ EGF στην οργάνωση του κυτταροσκελετού των MCF-7 κυττάρων εξαρτάται από τον Erk1/2

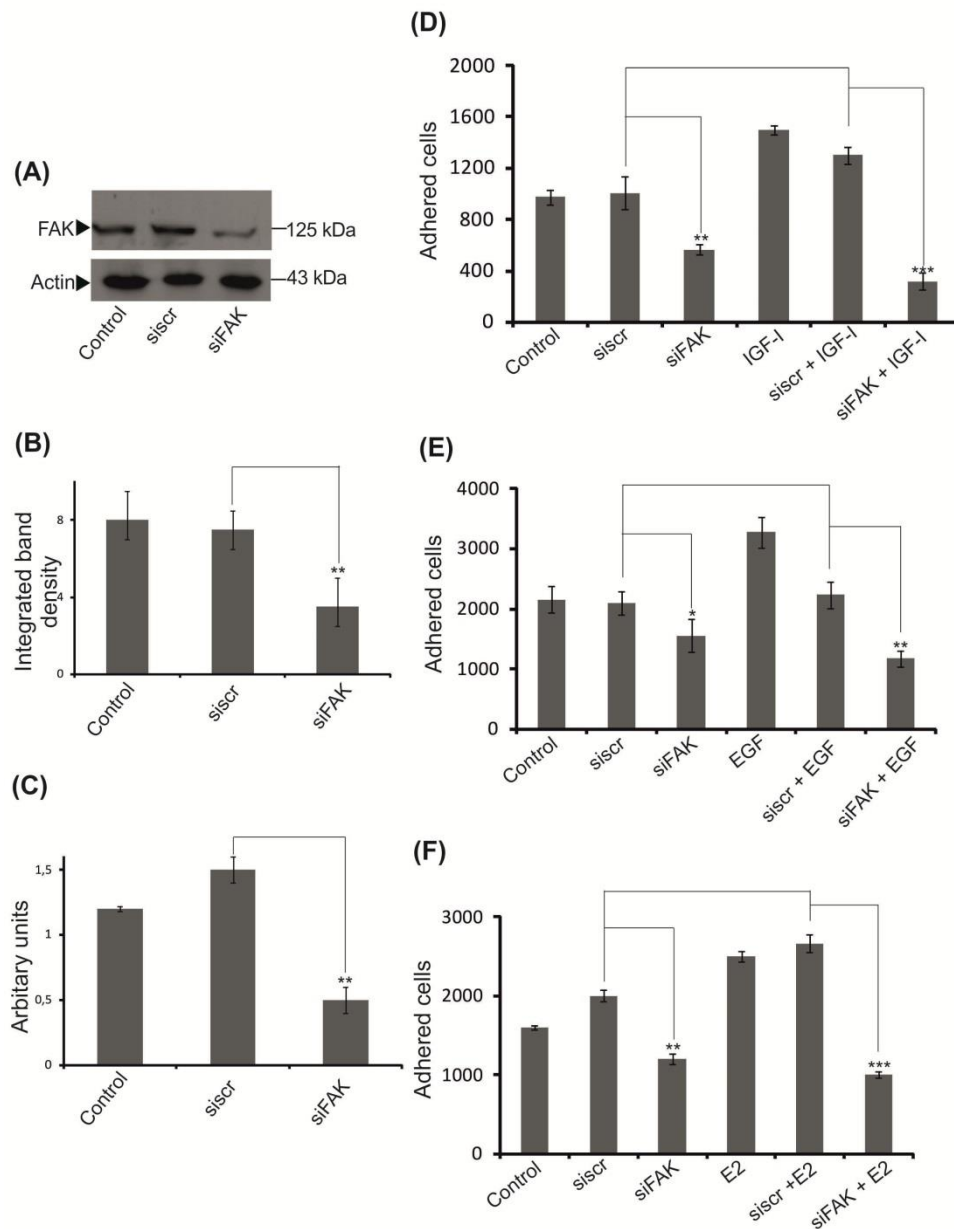
Ο φαινότυπος των καρκινικών κυττάρων, βασίζεται κατά ένα μεγάλο μέρος, στην αναδιοργάνωση στοιχείων του κυτταροσκελετού και συσχετίζεται με την ανάπτυξη των κυττάρων, την αποτελεσματική προσκόλληση και μετανάστευση τους, οδηγώντας σε αποτελεσματική διασπορά των κυττάρων και μετάσταση των καρκινικών όγκων (Geiger and Yamada, 2011). Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκε η πιθανή συμμετοχή των IGF-I/EGF στην οργάνωση της ακτίνης, σε καρκινικά κύτταρα του μαστού. Για την ανίχνευση των ινιδίων της ακτίνης (F-ακτίνη) χρησιμοποιήθηκε χρώση φαιλλοϊδίνης, συνδεδεμένη με ροδαμίνη. Στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με τους IGF-I και EGF παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στον πολυμερισμό της ακτίνης (πράσινο χρώμα) (Εικόνα 13 C, E). Επιπλέον, η χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου κατέδειξε την επαγωγή ενός προσκολλητικού φαινοτύπου, από τους IGF-I και EGF, με τη δημιουργία κυτταροπλασματικών αποφυάδων που σχηματίζονται από τα ινίδια της ακτίνης (Εικόνα 13 C, E). Όπως παρατηρείται και στην εικόνα 13, τα κύτταρα ελέγχου (χωρίς παρουσία αυξητικών παραγόντων) παρουσιάζουν εμφανώς λιγότερο καλά οργανωμένα ινίδια ακτίνης (Εικόνα 13 A). Αξιοσημείωτο είναι ότι η αναστολή του Erk1/2 σταματά την IGF-I και την EGF επαγόμενη αναδιοργάνωση των ινιδίων της ακτίνης.



Εικόνα 13: Ο ρόλος του Erk1/2 στην οργάνωση της ακτίνης. Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε IGF-I (10ng/ml), EGF (5ng/ml), Erk1/2 inhibitor (5μM) και συνδυασμός τους για 48 ώρες. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες, μονιμοποιήθηκαν, έγιναν διαπερατά στα αντισώματα και τους έγινε προσθήκη φαλλοϊδίνης για να παρατηρηθούν τα ινίδια της ακτίνης (πράσινο χρώμα). Οι πυρήνες σημαίνονται με τη χρήση TO-PRO-3. Τα σήματα από τη φαλλοϊδίνη και το TO-PRO-3 αλληλεπικαλύφθηκαν. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν και αναλύθηκαν με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου και οι εικόνες ελήφθησαν χρησιμοποιώντας μεγέθυνση x 40.

3.2.6. Ο IGF-I και ο EGF επάγουν αύξηση της προσκόλλησης των MCF-7 καρκινικών κυττάρων του μαστού, που εξαρτάται από την παρουσία και την ενεργοποίηση της κινάσης της εστιακής προσκόλλησης (FAK)

Η κινάση της εστιακής προσκόλλησης (FAK) είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, με ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης, που τοποθετείται κοντά στην πλασματική μεμβράνη, στις εστίες προσκόλλησης των κυττάρων και διαδραματίζει ρόλο κλειδί στις διαδικασίες της προσκόλλησης, της κινητικότητας και της επιβίωσης των κυττάρων (Schaller et al., 1992; Weiner et al., 1993). Σημαντικό είναι ότι η FAK είναι κύριος διαμεσολαβητής της μοριακής σηματοδότησης των ιντεγκρινών, που είναι απαραίτητες για την σταθεροποίηση του κυτταροσκελετού της ακτίνης (Schaller et al., 1992; Weiner et al., 1993). Προκειμένου να εξεταστεί η πιθανή συμμετοχή της FAK στην IGF-I/EGF- εξαρτώμενη επαγωγή της προσκόλλησης, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των MCF-7 κυττάρων, με ειδικό siRNA για την μείωση της έκφρασης της FAK. Το συγκεκριμένο siFAK, σχεδιάστηκε και η εφαρμογή του εκτελέστηκε σύμφωνα με τους Hong et al., 2006 (Hong et al., 2006), αφού δείχθηκε ότι είναι ειδικό για το γονίδιο της FAK (Chalkiadaki et al., 2011a). Όπως φαίνεται στην εικόνα 14 (Εικόνα 14 A, B, C), η προσθήκη του siFAK για 48h, οδήγησε σε σημαντική μείωση της παραγωγής της FAK ($p \leq 0,001$), τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Η μείωση της έκφρασης της FAK, επέφερε μείωση της ενδογενούς προσκολλητικής ικανότητας των MCF-7 κυττάρων (50%), συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου, στα οποία είχε γίνει διαμόλυνση με αρνητική αλληλουχία siRNA (scramble) (Εικόνα 14 D, E, F). Η IGF-I, EGF, E2- εξαρτώμενη προσκόλληση, μειώθηκε σημαντικά στα κύτταρα που είναι ελλιπή σε έκφραση της FAK ($p \leq 0,001$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$, αντίστοιχα). Τα συγκεκριμένα δεδομένα κατέδειξαν ότι η παρουσία της FAK είναι απαραίτητη για την επαγωγική δράση των IGF-I, EGF και E2 στην προσκόλληση των MCF-7 κυττάρων (Εικόνα 14 D, E, F).



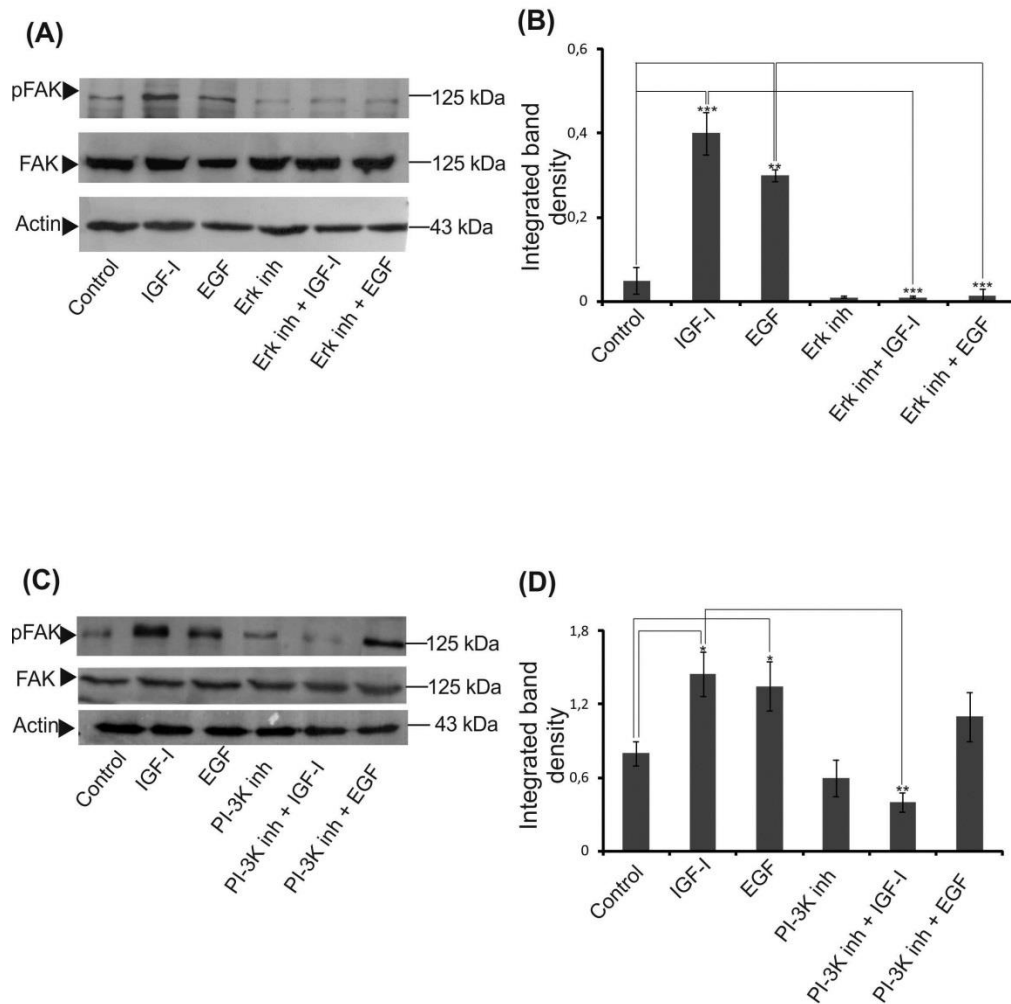
Εικόνα 14: Ο ρόλος της FAK στην προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Τα MCF-7 κύτταρα διαμολύνθηκαν με μικρές ειδικές, για τη FAK, αλληλουχίες παρεμβολής RNA (short interfering RNA- siRNA) (siFAK), αρνητικές αλληλουχίες παρεμβολής RNA (siscrumble- siScr) χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικό δείγμα ελέγχου (negative control). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε συνθήκες απουσίας ορού. (A) Παρουσιάζεται αντιπροσωπευτική απεικόνιση του προτύπου ζώνωσης της πρωτεΐνης FAK (125kDa). (B) Οι πρωτεϊνικές ζώνες της FAK ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την πυκνότητά τους, αναλύθηκαν και κανονικοποιήθηκαν με τη χρήση ακτίνης ως πρωτεϊνικό δείκτη ποσότητας των δειγμάτων. (C) Η μελέτη της έκφρασης του FAK σε επίπεδο mRNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Real-time PCR. 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση, στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε IGF-I (10ng/ml) (D), EGF (5ng/ml) (E) και E2 (10nM) (F), για 48 ώρες. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και στρώθηκαν εκ νέου για

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

προσκόλληση για 1 ώρα, σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, με υπόστρωμα ινονεκτίνης. Ο αριθμός των κυττάρων που είχαν προσκολληθεί προσδιορίστηκε με μέτρηση φθορισμού από το CyQUANT assay kit (Molecular Probes). Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα. Στατιστική σημασία: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η δράση των IGF-I/EGF στην ενεργοποίηση της FAK και η πιθανή συμμετοχή του Erk1/2 σε αυτήν. Παλαιότερες μελέτες, έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση της FAK, μπορεί να ενεργοποιήσει μοριακά σηματοδοτικά μονοπάτια αυξητικών παραγόντων (Parsons, 2003). Στην παρούσα έρευνα, τόσο ο IGF-I, όσο και ο EGF, επάγουν την φωσφορυλίωση της FAK στο κατάλοιπο τυροσίνης 397, με στατιστικά σημαντικό τρόπο ($p \leq 0,001$, $p \leq 0,01$, αντίστοιχα) (Εικόνα 15 A, B). Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι η IGF-I/EGF - εξαρτώμενη ενεργοποίηση της FAK, πραγματοποιείται μέσω του Erk1/2, ενδοκυττάριου σηματοδοτικού μορίου (Εικόνα 15 A, B), σε συμφωνία με παλαιότερες έρευνες, που έχουν δείξει ότι ο Erk1/2 μπορεί να ρυθμίσει την ενεργοποίηση της FAK, σε άλλα βιολογικά μοντέλα (Teranishi et al., 2009). Ακόμα, η χρήση ειδικού αναστολέα για την PI-3k έδειξε ότι η κατάντη ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI-3kinase συμμετέχει στη ρύθμιση της ενεργοποίησης της FAK από τον IGF-I (Εικόνα 15 C, D). Οι ιντεγκρίνες και κυρίως η $\beta 1$, έχει αποδειχθεί ότι είναι ο κύριος υποδοχέας της πλασματικής μεμβράνης, που σε συνεργασία με την FAK, συμμετέχει στην προσκόλληση, σε υπόστρωμα ινονεκτίνης. Σε πειράματα ελέγχου, δείχθηκε ότι οι IGF-I, EGF και E2 δεν επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης της ιντεγκρίνης $\beta 1$ (Συμπληρωματική εικόνα 4).

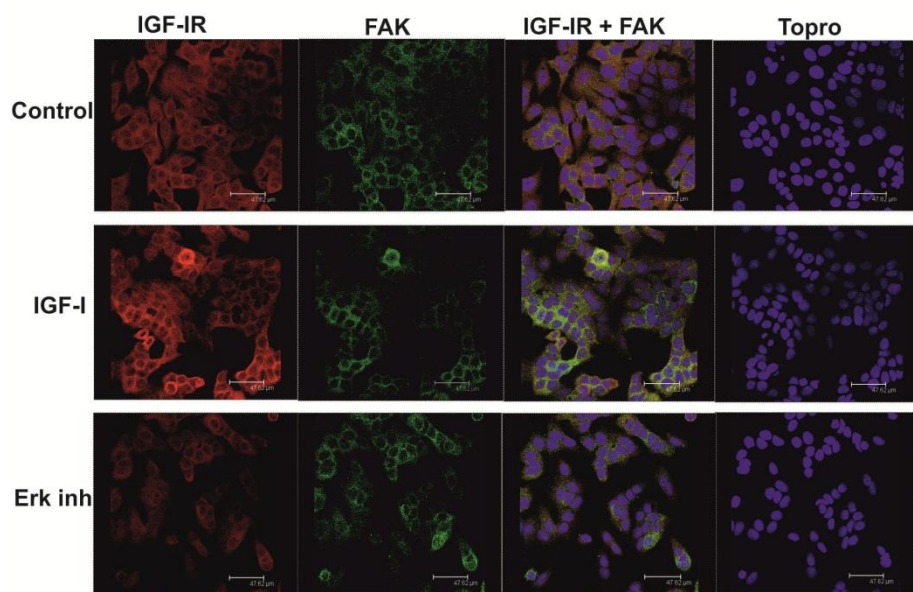
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 15: Ο ρόλος του Erk1/2 στην ενεργοποίηση του FAK. (A) Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε IGF-I (10ng/ml), EGF (5ng/ml), Erk1/2 inhibitor (5μM) και συνδυασμός τους για 48 ώρες. Παρουσιάζεται αντιπροσωπευτική απεικόνιση του προτύπου ζώνωσης της πρωτεΐνης FAK και της p-FAK (125kDa). (B) Οι πρωτεϊνικές ζώνες του FAK και του p-FAK ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την πυκνότητά τους, αναλύθηκαν και κανονικοποιήθηκαν με τη χρήση ακτίνης ως πρωτεϊνικό δείκτη ποσότητας των δειγμάτων. (C) Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε IGF-I (10ng/ml), EGF (5ng/ml), LY294002 (αναστολέας του PI-3kinase) (10μM) και συνδυασμός τους για 48 ώρες. Παρουσιάζεται αντιπροσωπευτική απεικόνιση του προτύπου ζώνωσης της πρωτεΐνης FAK και της p-FAK (125kDa). (D) Οι πρωτεϊνικές ζώνες του FAK και του p-FAK ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την πυκνότητά τους, αναλύθηκαν και κανονικοποιήθηκαν με τη χρήση ακτίνης ως πρωτεϊνικό δείκτη ποσότητας των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα. Στατιστική σημασία: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

3.2.7. Συνεντοπισμός IGF-IR και FAK

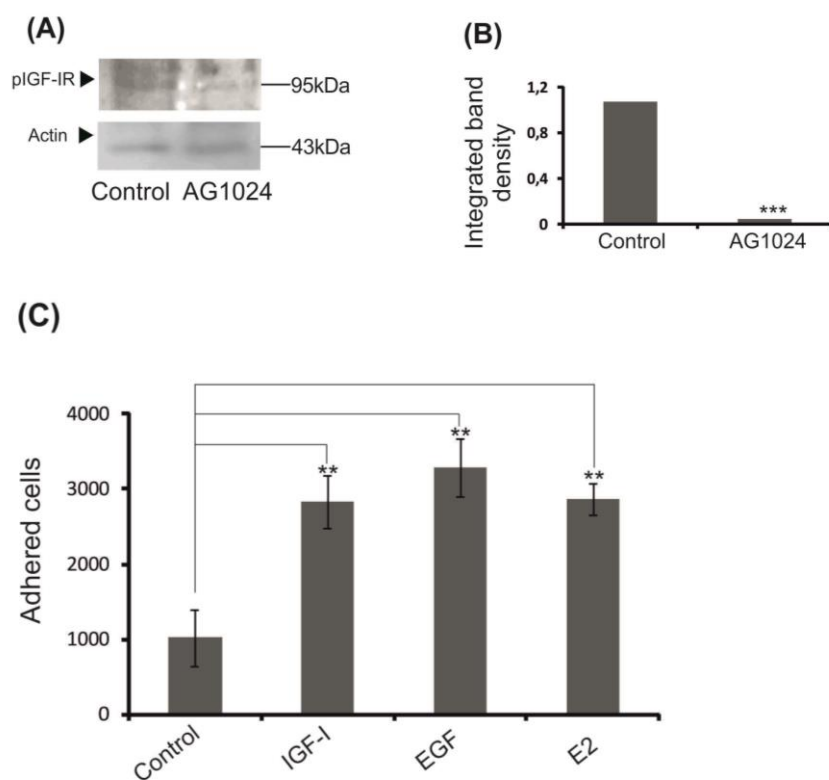
Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω δεδομένα, που δείχνουν την συνεργασία IGF-IR και FAK, στη ρύθμιση της προσκόλλησης των κυττάρων και τη δεδομένη ενεργοποίηση της FAK από τον IGF-I και τα κατάντη σηματοδοτικά μόρια, που επάγει η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού του μονοπατιού, σε συμφωνία και με παλιότερες μελέτες (Andersson et al., 2009), μελετήθηκε η κυτταρική τοποθέτηση των εν λόγω μορίων. Με τη χρήση μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού, διαπιστώθηκε η ύπαρξη άφθονης ποσότητας IGF-IR και FAK, στα MCF-7 κύτταρα (Εικόνα 16). Ο IGF-I επάγει συνεντοπισμό των IGF-IR και FAK, κυρίως κοντά στις κυτταρικές μεμβράνες των MCF-7 κυττάρων (Εικόνα 16). Η αναστολή του Erk1/2, προκαλεί μείωση της έκφρασης του IGF-IR και αναστολή του συνεντοπισμού των IGF-IR και FAK.



Εικόνα 16: Συνεντοπισμός IGF-IR και FAK. Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε IGF-I (10ng/ml) και Erk1/2 inhibitor (5μM) και συνδυασμός τους για 48 ώρες. Τα κύτταρα καλλιιεργήθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες και μονιμοποιήθηκαν. Για τη χρώση χρησιμοποιήθηκαν ειδικά για την FAK (πράσινο χρώμα) και για τον IGF-IR (κοκκινό χρώμα) αντισώματα. Οι πυρήνες σημαίνονται με TO-PRO-3. Τα σήματα από τη FAK και το TO-PRO-3 αλληλεπικαλύφθηκαν. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν και αναλύθηκαν με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου. Οι εικόνες ελήφθησαν χρησιμοποιώντας μεγέθυνση x 40.

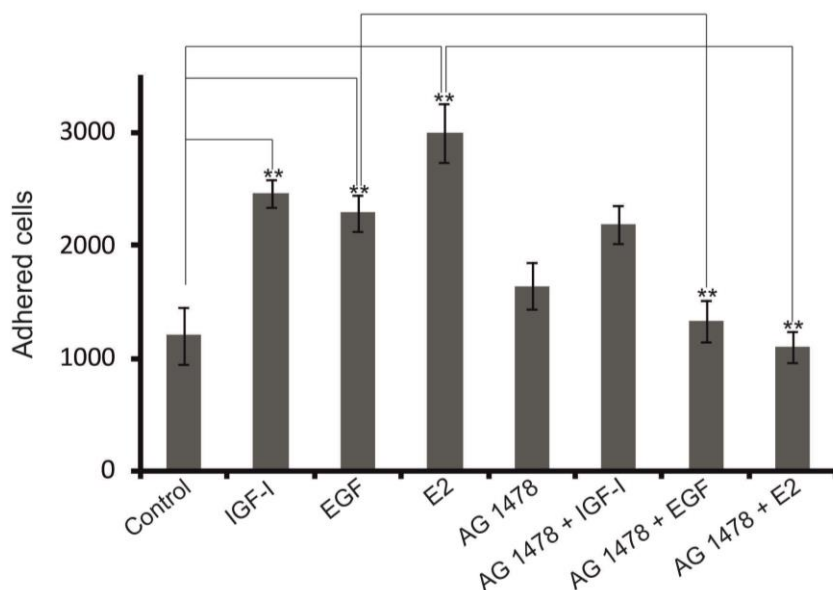
3.2.8. ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΕΙΚΟΝΕΣ ΜΕΡΟΥΣ Β

Σε πειράματα ελέγχου επιβεβαιώθηκε η δράση του AG1024 αναστολέα και συγκεκριμένα πιστοποιήθηκε ότι παρεμποδίζει την ενεργοποίηση του IGF-IR ($p \leq 0,001$) (Συμπληρωματική εικόνα 1). Ακόμα, τα πειράματα της προσκόλλησης έχουν γίνει επίσης και 24 ώρες μετά την προσθήκη των παραγόντων με τα ίδια αποτελέσματα (Συμπληρωματική εικόνα 1).



Συμπληρωματική εικόνα 1: (A) Αναστολή του IGF-IR από τον AG1024. AG1024 (1 μ M) (αναστολέας του IGF-IR) χορηγήθηκε στα MCF-7 κύτταρα, για 48 ώρες. Παρουσιάζεται αντιπροσωπευτική απεικόνιση του προτύπου ζώνωσης της πρωτεΐνης pIGF-IR (95kDa). (B) Οι πρωτεϊνικές ζώνες του p-IGF-IR ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την πυκνότητά τους, αναλύθηκαν και κανονικοποιήθηκαν με τη χρήση ακτίνης ως πρωτεϊνικό δείκτη ποσότητας των δειγμάτων. (C) Δοκιμή προσκόλλησης MCF-7 κυττάρων, παρουσία IGF-I, EGF, E2. Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε IGF-I (10ng/ml), EGF (5ng/ml), E2 (10nM) για 24 ώρες, συλλέχθηκαν και στρώθηκαν εκ νέου για προσκόλληση για 1 ώρα, σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, με υπόστρωμα ινονεκτίνης. Ο αριθμός των κυττάρων που είχαν προσκολληθεί προσδιορίστηκε με μέτρηση φθορισμού από το CyQUANT assay kit (Molecular Probes). Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα. Στατιστική σημασία: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

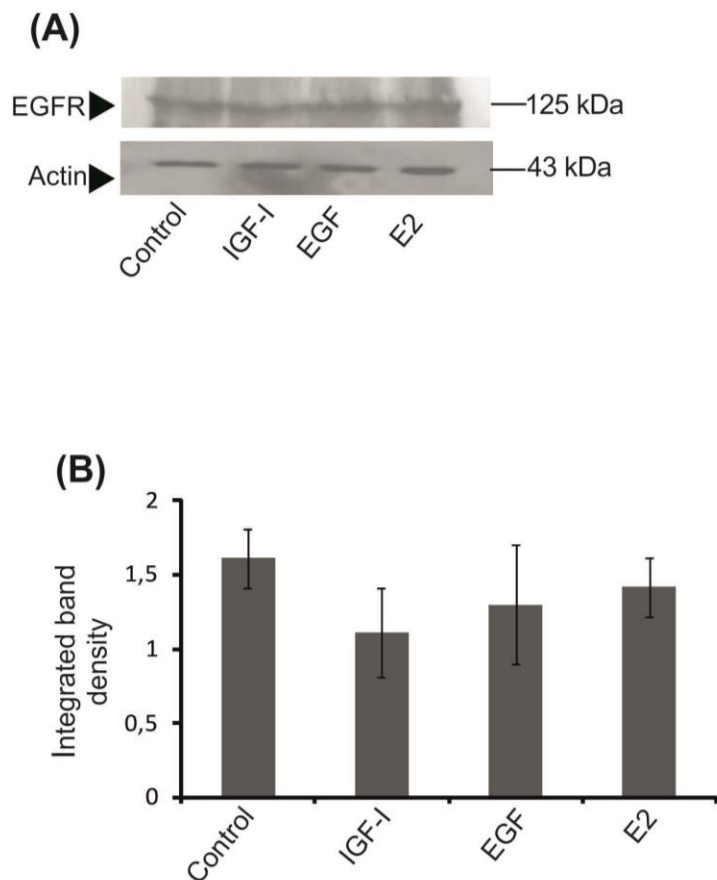
Στη συμπληρωματική εικόνα 2, χρησιμοποιήθηκε ο AG1438, αναστολέας του υποδοχέα EGFR και παρόλο που δεν παρατηρήθηκε δράση στην IGF-I- επαγόμενη προσκόλληση, παρατηρήθηκε μείωση της δράσης της E2 στην προσκόλληση ($p \leq 0,01$) (Συμπληρωματική εικόνα 2).



Συμπληρωματική εικόνα 2: Ο ρόλος του EGFR στην IGF-I/EGF, E2- επαγόμενη προσκόλληση καρκινικών κυττάρων του μαστού. Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε IGF-I (10ng/ml), EGF (5ng/ml), AG1478 (αναστολέας του EGFR) (1μM) και συνδυασμός τους για 48 ώρες, συλλέχθηκαν και στρώθηκαν εκ νέου για προσκόλληση για 1 ώρα, σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, με υπόστρωμα ινονεκτίνης. Ο αριθμός των κυττάρων που είχαν προσκολληθεί προσδιορίστηκε με μέτρηση φθορισμού από το CyQUANT assay kit (Molecular Probes). Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα. Στατιστική σημασία: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

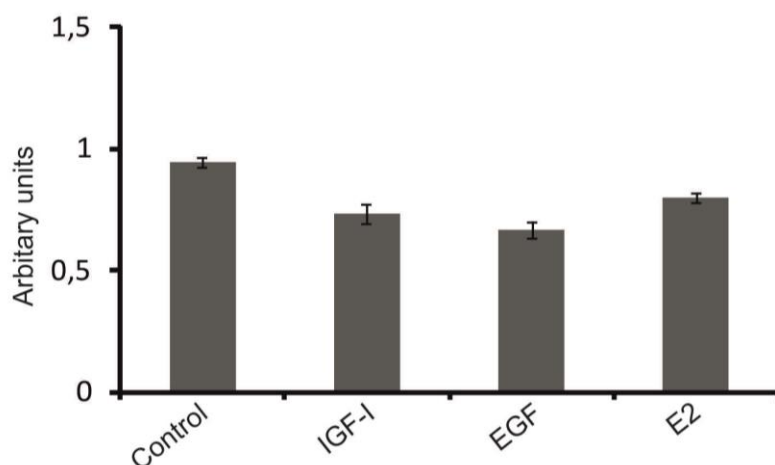
Στη συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση του EGFR υπό την επίδραση των IGF-I, EGF και E2. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η έκφραση του EGFR δεν επηρεάζεται από τους IGF-I, EGF και E2 (Συμπληρωματική εικόνα 3).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Συμπληρωματική εικόνα 3: Επίδραση των IGF-I, EGF και E2 στην έκφραση του EGFR. Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε IGF-I (10ng/ml), EGF (5ng/ml), E2 (10nM) για 48 ώρες. (A) Παρουσιάζεται αντιπροσωπευτική απεικόνιση του προτύπου ζώνωσης της πρωτεΐνης EGFR (125kDa). (B) Οι πρωτεϊνικές ζώνες του EGFR ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την πυκνότητά τους, αναλύθηκαν και κανονικοποιήθηκαν με τη χρήση ακτίνης ως πρωτεϊνικό δείκτη ποσότητας των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα.

Επιπλέον, σε πειράματα ελέγχου, μελετήθηκε η επίδραση των αυξητικών παραγόντων και της E2 στην έκφραση της ιντεγκρίνης $\beta 1$ και δείχθηκε ότι οι IGF-I, EGF και E2 δεν επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης της ιντεγκρίνης $\beta 1$ (Συμπληρωματική εικόνα 4).



Συμπληρωματική εικόνα 4: Επίδραση των IGF-I, EGF και E2 στην έκφραση της ιντεγκρίνης β1 σε επίπεδο mRNA. Στα MCF-7 κύτταρα χορηγήθηκε IGF-I (10ng/ml), EGF (5ng/ml), E2 (10nM) για 48 ώρες. Τα επίπεδα έκφρασης της ιντεγκρίνης β1 μελετήθηκε με τη χρήση real time PCR. Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων.

3.3. ΜΕΡΟΣ Γ: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΑΦΕΪΝΗΣ ΣΤΙΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ & ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ ΤΟΥ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΥ ΧΩΡΟΥ

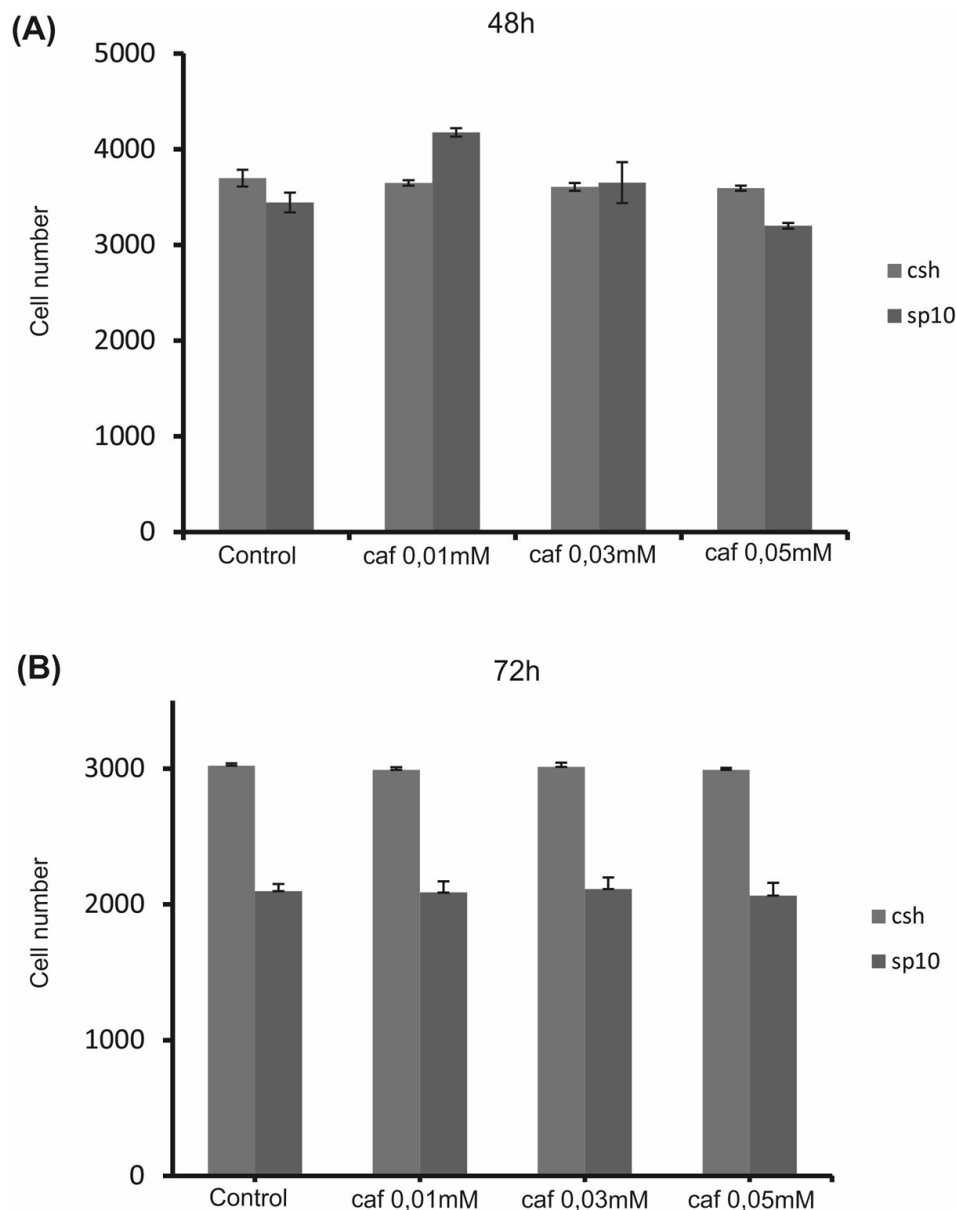
Για το τρίτο μέρος της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα του μαστού που προήλθαν από κύτταρα MCF-7 κατόπιν μόνιμης διαμόλυνσης (stable transfection) με shRNA για το ERα γονίδιο. Έτσι χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα προερχόμενα από τα MCF-7 διαμολυσμένα με αρνητικό shRNA (control sh) που καλούνται csh κύτταρα και κύτταρα προερχόμενα από τα MCF-7 διαμολυσμένα με shRNA ειδικό για το ERα, που καλούνται SP10.

3.3.1 Επίδραση καφεΐνης στις λειτουργίες καρκινικών κυττάρων του μαστού με διαφορετικό προφίλ έκφρασης του υποδοχέα ERα

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Λαμβάνοντας υπ' όψιν την τροποποίηση των κυτταρικών λειτουργιών καρκινικών κυττάρων του μαστού με την επίδραση καφεΐνης (Rosendahl et al., 2015), στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η πιθανή επίδραση της ουσίας αυτής στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική προσκόλληση καρκινικών κυττάρων του μαστού, σε υπόστρωμα ινονεκτίνης. Με βάση τα αποτελέσματα, η καφεΐνη δεν προκαλεί αλλαγή στον πολλαπλασιαστικό ρυθμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού, τόσο σε επώαση 48 όσο και 72 ωρών (χρόνοι που επιλέχθηκαν κατόπιν βελτιστοποιήσεων και με βάση το ρυθμό πολλαπλασιασμού των εν λόγω κυτταρικών σειρών). Είναι εμφανές ότι οι δυο κυτταρικές σειρές διαιρούνται με διαφορετικό ρυθμό, ωστόσο σχετικά με την επίδραση της καφεΐνης, το αποτέλεσμα είναι ανεξάρτητο της παρουσίας του οιστρογονικού υποδοχέα ERα (Εικόνα 17).

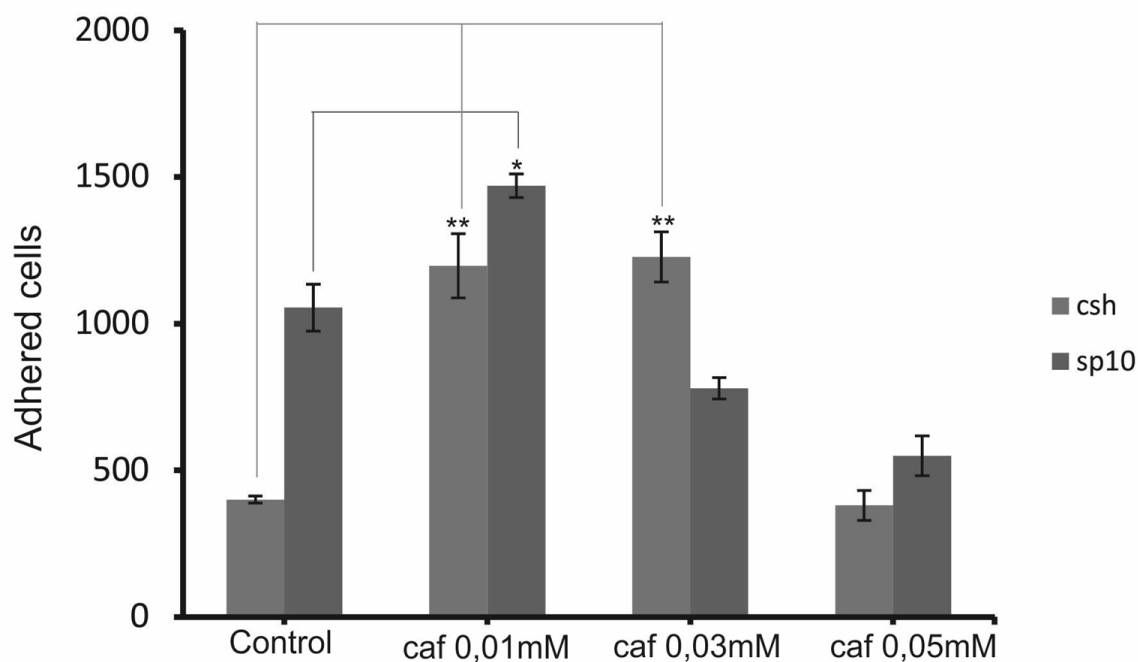
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 17: (A) Στα csh κύτταρα χορηγήθηκε καφεΐνη (0,01mM, 0,03mM και 0,05mM) καλλιεργήθηκαν για 48 και 72 ώρες σε συνθήκες απουσίας ορού, σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών (5.000 κύτταρα/ οπή) (B) Τα sp10 κύτταρα χορηγήθηκε καφεΐνη (0,01mM, 0,03mM και 0,05mM), καλλιεργήθηκαν για 72 ώρες σε συνθήκες απουσίας ορού, σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών (5.000 κύτταρα/ οπή). Ο τελικός αριθμός των κυττάρων που είχαν πολλαπλασιαστεί προσδιορίστηκε με μέτρηση φθορισμού από το CyQUANT assay kit (Molecular Probes). Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα.

Στη συνέχεια της μελέτης, η έρευνα επικεντρώθηκε στη διερεύνηση της επίδρασης της καφεΐνης στην προσκόλληση των κυττάρων, σε υπόστρωμα ινονεκτίνης. Όπως έχει αναφερθεί η προσκόλληση είναι η κυτταρική λειτουργία- κλειδί για την πορεία της καρκινογένεσης, καθώς είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη σταθερότητα ή/και την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων (Pankov and Yamada, 2002; Humphries et al., 2006; Harburger and Calderwood, 2009).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η καφεΐνη επηρεάζει την προσκόλληση, τόσο στην περίπτωση των csh, όσο και των sp10 κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, στα κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα ERα η καφεΐνη αυξάνει την προσκόλληση σε συγκέντρωση 0,01mM και 0,03mM ($p \leq 0,01$), ενώ δεν παρατηρείται αλλαγή σε συγκέντρωση 0,05mM και άνω. Στα sp10 κύτταρα, που δεν εκφράζουν ικανά επίπεδα ERα, η καφεΐνη αυξάνει την προσκόλληση, σε συγκέντρωση 0,01mM ($p \leq 0,05$). (Εικόνα 18).



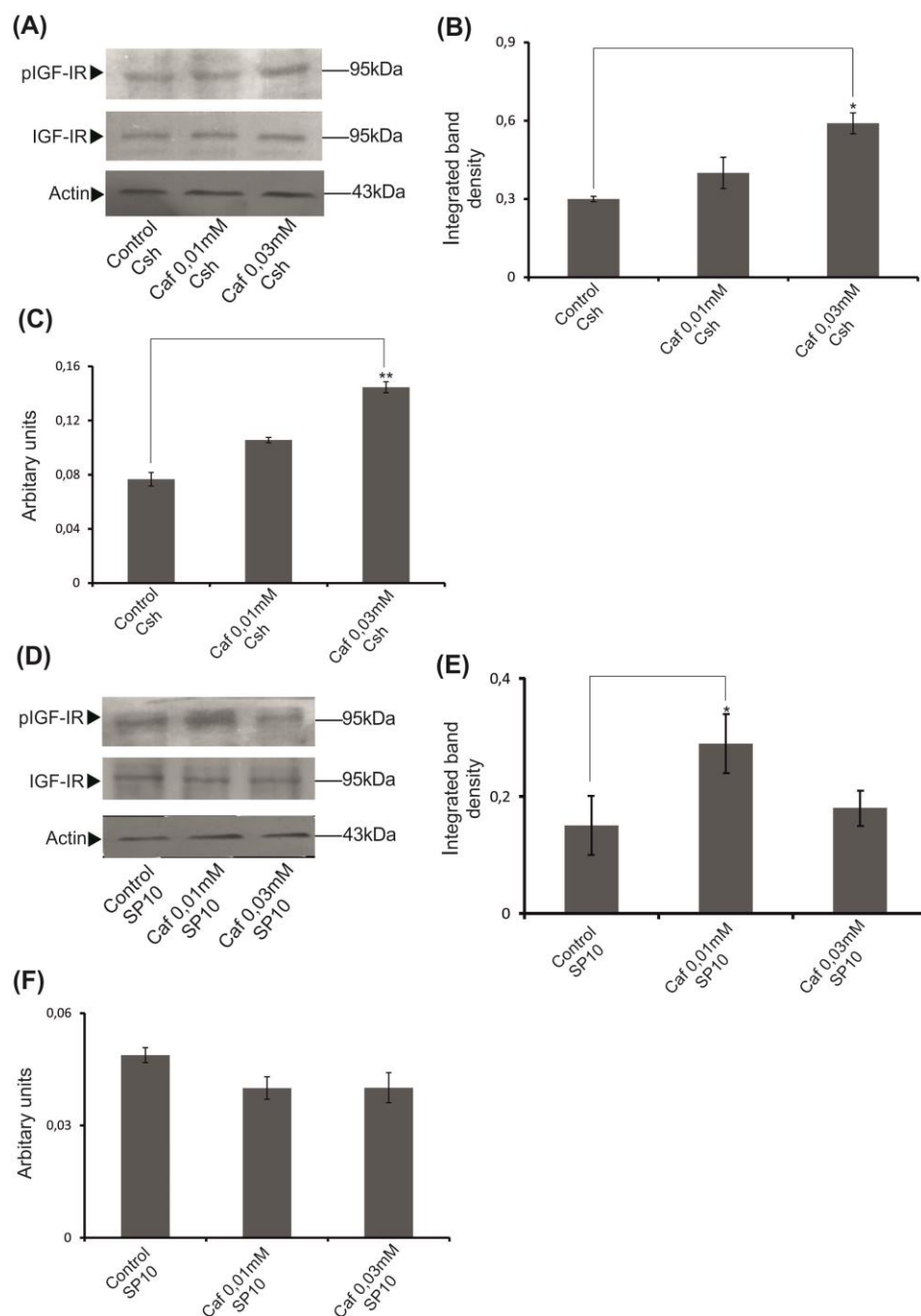
Εικόνα 18: Ο ρόλος της καφεΐνης στην προσκόλληση καρκινικών κυττάρων του μαστού. Στα csh και στα sp10 κύτταρα χορηγήθηκε καφεΐνη (0,01mM, 0,03mM και 0,05mM) για 48 ώρες, συλλέχθηκαν και στρώθηκαν εκ νέου για προσκόλληση για 30 λεπτά, σε ειδικά πλαστικά πιάτα 96 οπών, με υπόστρωμα ινονεκτίνης. Ο αριθμός των κυττάρων που είχαν προσκολληθεί προσδιορίστηκε με μέτρηση φθορισμού από το CyQUANT assay kit (Molecular Probes). Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα. Στατιστική σημασία: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.3.2 Επίδραση καφεΐνης στη σηματοδότηση των IGF-I/EGF και E2

Είναι γνωστό, ότι η μοριακή σηματοδότηση- μεταγωγή σήματος των αυξητικών παραγόντων IGF-I/EGF και της ορμόνης E2 πραγματοποιείται μέσω των υποδοχέων IGF-IR, EGFR και ERs (Dickson and Lippman, 1987; Milani et al., 2014; Voudouri et al., 2016). Ακόμα, είναι γνωστό ότι η αλληλεπίδραση των σηματοδοτικών μορίων των παραγόντων αυτών, ρυθμίζει πολλές από τις κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένων του πολλαπλασιασμού και της προσκόλλησης (Zhang et al., 2005; Yu et al., 2013; Voudouri et al., 2016). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του μέρους Β της παρούσας μελέτης, ο IGF-IR υποδοχέας είναι πολύ σημαντικό μόριο για τη ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης και αποτελεί σημείο συνάντησης για τη σηματοδότηση των IGF-I/EGF και E2 (Voudouri et al., 2016). Δεδομένου ότι η καφεΐνη έχει δειχθεί να επηρεάζει ενδοκυττάριους διαμεσολαβητές των παραγόντων αυτών (Okano et al., 2008; Al-Ansari and Aboussekhra, 2014; Rosendahl et al., 2015) πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης της στον IGF-IR, στον EGFR, στον ERα και στον ERβ.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όπως φαίνεται και στην εικόνα 19 η καφεΐνη ενεργοποιεί τον IGF-IR και αυξάνει την παραγωγή του στα κύτταρα που εκφράζουν τον ERα ($p \leq 0,05$ και $p \leq 0,01$ αντίστοιχα), ενώ φαίνεται να προκαλεί αύξηση της ενεργοποίησης του και στα κύτταρα που είναι ελλιπή σε ERα, παρόλο που τα δεδομένα μας δείχνουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα στα κύτταρα αυτά ($p \leq 0,05$) (Εικόνα 19).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

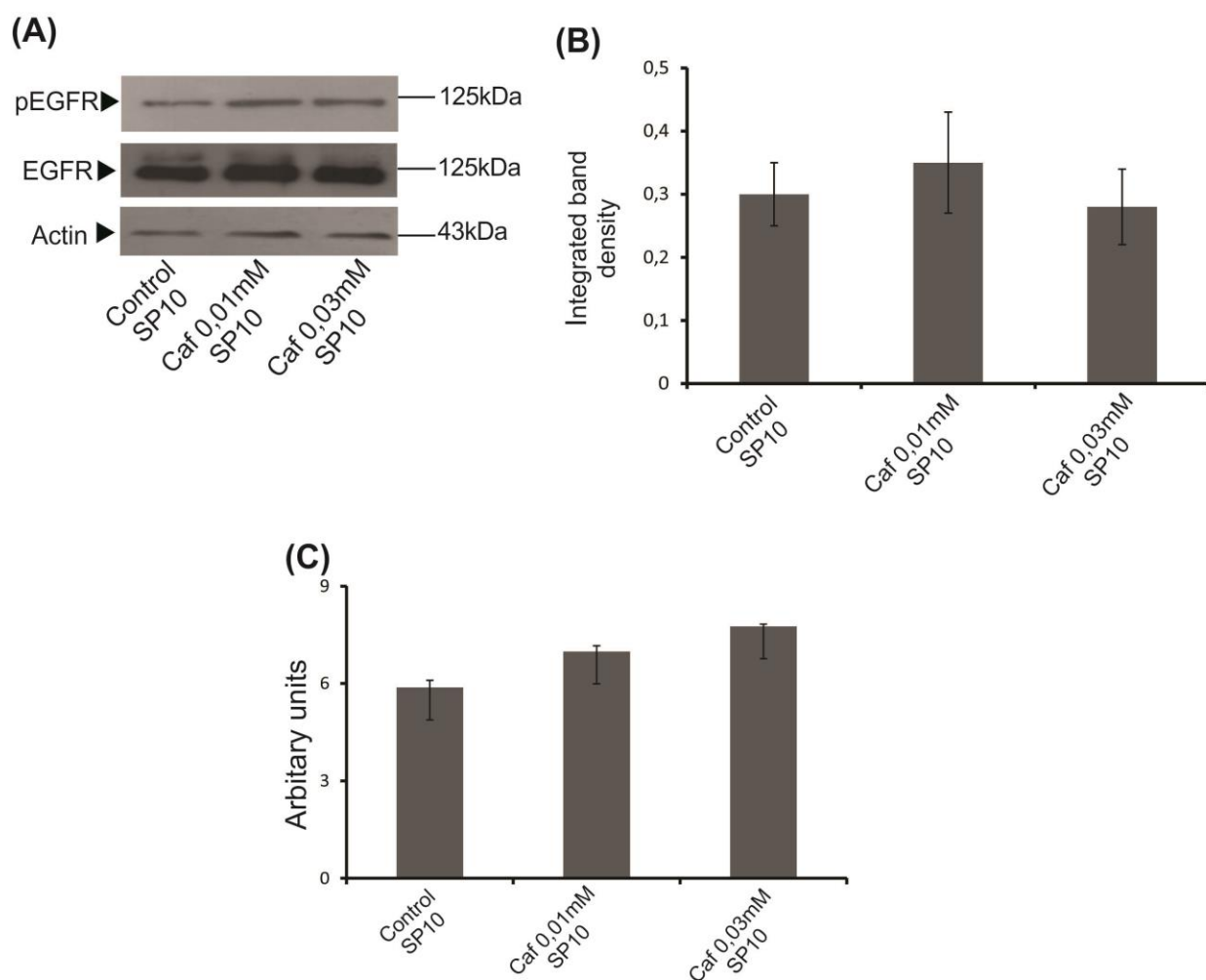


Εικόνα 19: Ο ρόλος της καφεΐνης στην ενεργοποίηση του IGF-IR σε καρκινικά κύτταρα του μαστού. (A) Στα csh κύτταρα χορηγήθηκε καφεΐνη (0,01mM και 0,03mM), για 48 ώρες. Παρουσιάζεται αντιπροσωπευτική απεικόνιση του προτύπου ζώνωσης της πρωτεΐνης IGF-IR (95kDa) και p-IGF-IR (95kDa). (B) Οι πρωτεϊνικές ζώνες του IGF-IR και του p-IGF-IR ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την πυκνότητά τους, αναλύθηκαν και κανονικοποιήθηκαν με τη χρήση ακτίνης ως πρωτεϊνικό δείκτη ποσότητας των δειγμάτων. (C) Τα επίπεδα έκφρασης του IGF-IR ελέγχθηκαν με τη χρήση real-time PCR (D) Στα sp10 κύτταρα χορηγήθηκε καφεΐνη (0,01mM και 0,03mM), για 48 ώρες. Παρουσιάζεται αντιπροσωπευτική απεικόνιση του προτύπου ζώνωσης της πρωτεΐνης IGF-IR (95kDa) και p-IGF-IR (95kDa). (E) Οι πρωτεϊνικές ζώνες του IGF-IR και του p-IGF-IR ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

πυκνότητα τους, αναλύθηκαν και κανονικοποιήθηκαν με τη χρήση ακτίνης ως πρωτεϊνικό δείκτη ποσότητας των δειγμάτων. (F) Τα επίπεδα έκφρασης του IGF-IR ελέγχθηκαν με τη χρήση real-time PCR. Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα. Στατιστική σημασία: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Αντίστοιχη μελέτη που πραγματοποιήθηκε για τη επίδραση της καφεΐνης στον υποδοχέα EGFR, δεν έδειξε τροποποίηση της ενεργοποίησης ή της έκφρασης του EGFR στα κύτταρα SP10 (Εικόνα 20). Στην κυτταρική σειρά csh δεν ανιχνεύτηκαν ικανά προς ανάλυση επίπεδα του EGFR.



Εικόνα 20: Ο ρόλος της καφεΐνης στην ενεργοποίηση του EGFR σε καρκινικά κύτταρα του μαστού. (A) Στα sp10 κύτταρα χορηγήθηκε καφεΐνη (0,01mM και 0,03mM), για 48 ώρες. Παρουσιάζεται αντιπροσωπευτική απεικόνιση του προτύπου ζώνωσης της πρωτεΐνης EGFR (125kDa) και p-EGFR (125kDa). (B) Οι πρωτεϊνικές ζώνες του EGFR και του p-EGFR ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την πυκνότητα τους, αναλύθηκαν και κανονικοποιήθηκαν με τη χρήση ακτίνης ως πρωτεϊνικό δείκτη ποσότητας των δειγμάτων. (C) Τα επίπεδα έκφρασης του EGFR ελέγχθηκαν με τη χρήση real-time PCR. Τα

αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα.

Σχετικά με την επίδραση της καφεΐνης στους οιστρογονικούς υποδοχείς ERα και ERβ, πραγματοποιήθηκε μελέτη της παραγωγής τους σε mRNA επίπεδο με τη χρήση real-time PCR. Στα csh κυτταρα, δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στην έκφραση του ERα με την επίδραση της καφεΐνης. Στα κύτταρα SP10 τα επίπεδα έκφρασης του ERα είναι ιδιαίτερος χαμηλά λόγω της μόνιμης διαμόλυνσης που τους έχει γίνει. Η παραγωγή του ERβ ήταν πολύ χαμηλή και τα επίπεδα του δεν ήταν ικανά για ανάλυση.

3.3.3. Επίδραση καφεΐνης στην έκφραση των συνδεκανών

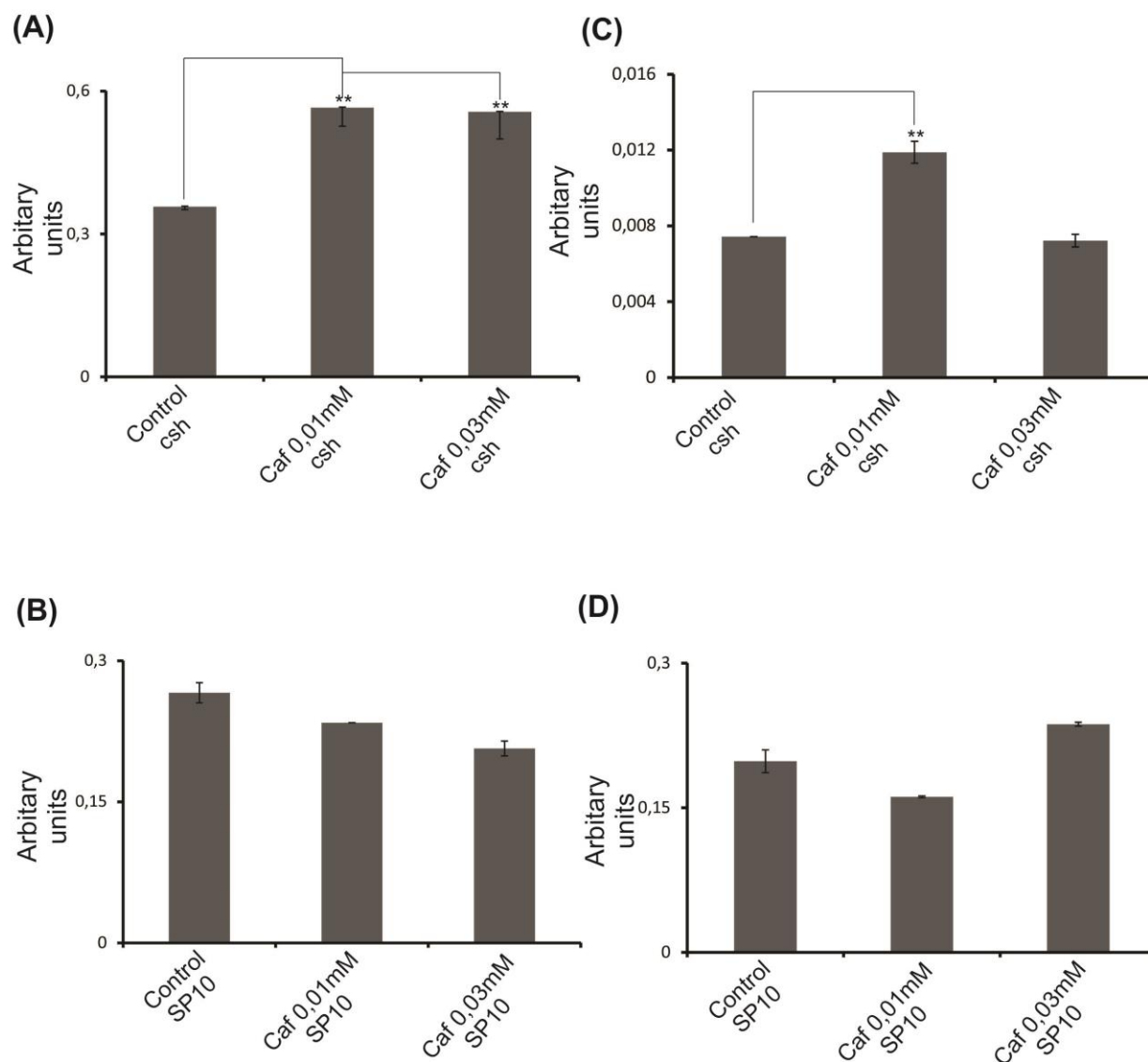
Με βάση τα αποτελέσματα μας η καφεΐνη τροποποιεί την προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Η αύξηση που προκαλεί η καφεΐνη φαίνεται να μη σχετίζεται με το προφίλ έκφρασης του υποδοχέα ERα.

Η οικογένεια των συνδεκανών αποτελείται από τη συνδεκάνη 1, τη συνδεκάνη 2, τη συνδεκάνη 3 και τη συνδεκάνη 4 και είναι διαμεμβρανικές πρωτεογλυκάνες θείκης ηπαράνης (Bernfield et al., 1992). Οι συνδεκάνες είναι διαμεμβρανικές πρωτεογλυκάνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της προσκόλλησης και δρουν σαν συν-υποδοχείς των ιντεγκρινών της κυτταρικής επιφάνειας των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Beauvais and Rapraeger, 2004). Η αυξημένη έκφραση της συνδεκάνης 1 σχετίζεται με αυξημένη επιθετικότητα στους καρκινικούς όγκους του μαστού και δρα ως συν-υποδοχέας, που ενεργοποιεί τη σηματοδότηση αυξητικών παραγόντων ρυθμίζοντας την κυτταρική προσκόλληση και την κινητικότητα των κυττάρων (Bernfield et al., 1999; Stanley et al., 1999; Lendorf et al., 2011). Γενικά, σε καρκινικά κύτταρα του μαστού αρνητικά ως προς την έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων που χαρακτηρίζονται από υψηλό πολλαπλασιαστικό ρυθμό η συνδεκάνη 1 και 4 βρέθηκε ότι υπερεκφράζονται (Baba et al., 2006).

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω δεδομένα, μελετήθηκε η επίδραση της καφεΐνης στην έκφραση των συνδεκανών, καθώς η ρύθμιση τους από την καφεΐνη υποδεικνύει ενδεχομένως, έναν τρόπο δράσης της στην κυτταρική προσκόλληση.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, η συνδεκάνη-1 αυξάνεται παρουσία καφεΐνης ($p \leq 0,01$), και στις δύο συγκεντρώσεις, μόνο στα ERα+ κύτταρα (Εικόνα 21 Α), υποδεικνύοντας ρύθμιση που σχετίζεται με την παρουσία του υποδοχέα των οιστρογόνων, την ίδια στιγμή που στα κύτταρα ελλιπούς έκφρασης ERα δεν παρατηρείται αλλαγή (Εικόνα 21Β). Παρόμοια αποτελέσματα είχαμε και στη μελέτη της επίδρασης της καφεΐνης στην έκφραση της συνδεκάνης 4, όπου παρατηρήθηκε αύξηση παρουσία καφεΐνης 0,01mM στα csh κύτταρα, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στα sp10 κύτταρα (Εικόνα 21 C και D, αντίστοιχα). Δεν παρέχονται δεδομένα σχετικά με τη συνδεκάνη- 2 καθώς δεν ανιχνεύθηκαν ικανά επίπεδα έκφρασης προς ανάλυση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



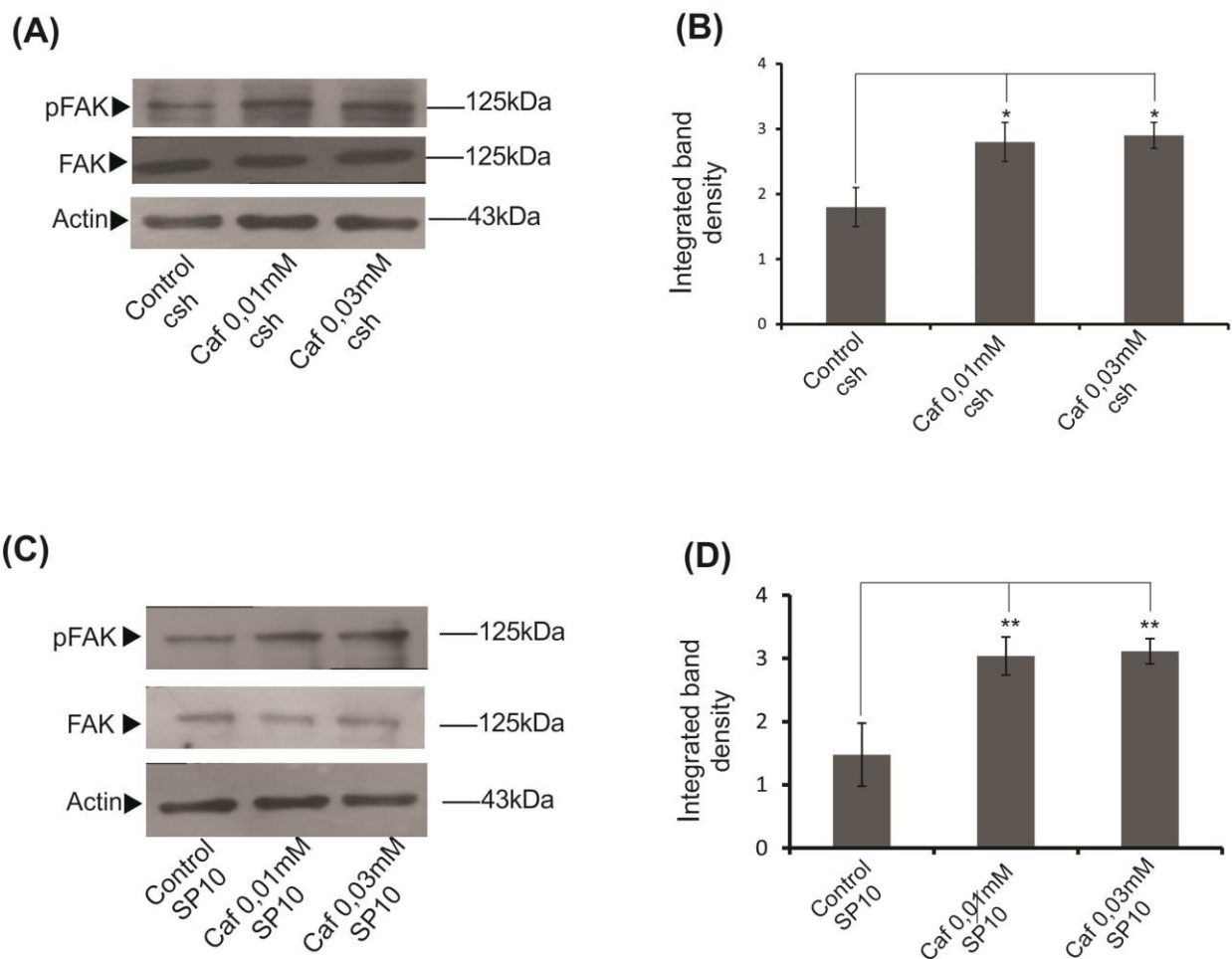
Εικόνα 21: Επίδραση της καφεΐνης στην mRNA έκφραση συνδεκάνης-1 και συνδεκάνης-4 σε καρκινικά κύτταρα του μαστού. (A) Στα csh κύτταρα χορηγήθηκε καφεΐνη (0,01mM και 0,03mM), για 48 ώρες. Τα επίπεδα έκφρασης της συνδεκάνης-1 μελετήθηκαν με τη χρήση real time PCR. (B) Στα sp10 κύτταρα χορηγήθηκε καφεΐνη (0,01mM και 0,03mM), για 48 ώρες. Τα επίπεδα έκφρασης της συνδεκάνης-1 μελετήθηκαν με τη χρήση real time PCR. (C) Στα csh κύτταρα χορηγήθηκε καφεΐνη (0,01mM και 0,03mM), για 48 ώρες. Τα επίπεδα έκφρασης της συνδεκάνης-4 μελετήθηκαν με τη χρήση real time PCR. (D) Στα sp10 κύτταρα χορηγήθηκε καφεΐνη (0,01mM και 0,03mM), για 48 ώρες. Τα επίπεδα έκφρασης της συνδεκάνης-4 μελετήθηκαν με τη χρήση real time PCR. Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα. Στατιστική σημασία: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

3.3.4. Επίδραση καφεΐνης στην έκφραση και στην ενεργοποίηση της κινάσης της εστιακής προσκόλλησης (FAK)

Στα πλαίσια της διερεύνησης του τρόπου δράσης της καφεΐνης στην προσκόλληση, μελετήθηκε η επίδραση της στην έκφραση και την ενεργοποίηση της κινάσης της εστιακής προσκόλλησης. Οι περισσότερες σηματοδοτικές λειτουργίες της προσκόλλησης και των ιντεγκρινών, διαμεσολαβούνται από μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη με ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης, που ονομάζεται κινάση της εστιακής προσκόλλησης (Focal Adhesion Kinase- FAK) και βρίσκεται κοντά στην κυτταρική μεμβράνη (Hanks and Polte, 1997).

Έτσι θεωρήθηκε βαρύνουσας σημασίας η μελέτη της επίδρασης της καφεΐνης στο μόριο αυτό, καθώς διαμεσολαβεί την προσκόλληση των κυττάρων. Με βάση τα αποτελέσματα (εικόνα 22), η καφεΐνη ενεργοποιεί τη FAK, ανεξαρτήτως προφίλ έκφρασης του ERα, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της δοκιμής προσκόλλησης σε υπόστρωμα ινονεκτίνης ($p \leq 0,05$ και $p \leq 0,01$ αντίστοιχα).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 22: Επίδραση της καφεΐνης στην ενεργοποίηση και στην έκφραση της FAK, σε καρκινικά κύτταρα του μαστού. (A) Στα csh κύτταρα χορηγήθηκε καφεΐνη (0,01mM και 0,03mM) για 48 ώρες. Παρουσιάζεται αντιπροσωπευτική απεικόνιση του προτύπου ζώνωσης της πρωτεΐνης FAK (125kDa) και p-FAK (125kDa). (B) Οι πρωτεϊνικές ζώνες του FAK και του p-FAK ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την πυκνότητά τους, αναλύθηκαν και κανονικοποιήθηκαν με τη χρήση ακτίνης ως πρωτεϊνικό δείκτη ποσότητας των δειγμάτων. (C) Στα sp10 κύτταρα χορηγήθηκε καφεΐνη (0,01mM και 0,03mM) για 48 ώρες. Παρουσιάζεται αντιπροσωπευτική απεικόνιση του προτύπου ζώνωσης της πρωτεΐνης FAK (125kDa) και p-FAK (125kDa). (D) Οι πρωτεϊνικές ζώνες του FAK και του p-FAK ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την πυκνότητά τους, αναλύθηκαν και κανονικοποιήθηκαν με τη χρήση ακτίνης ως πρωτεϊνικό δείκτη ποσότητας των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριπλέτων. Το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου απεικονίζεται στο γράφημα. Στατιστική σημασία: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. ΜΕΡΟΣ Α: ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΩΝ & ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ p53 ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν βελτιστοποιήσεις πρωτοκόλλων, οι οποίες ήταν ιδιαίτερα χρήσιμες στη συνέχεια της έρευνας, καθώς οι βέλτιστες συνθήκες στις τεχνικές, διασφαλίζουν αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Στην πρώτη φάση της διατριβής χρησιμοποιούνταν τρεις διαφορετικές καρκινικές σειρές του μαστού: MCF-7 (ERα+), ZR-75-1 (ERα+/ ERβ+) (Engel et al., 1978), MDA-MB-231 (ERβ+). Η δοκιμή πολλαπλασιασμού βελτιστοποιήθηκε και επελέγησαν κατάλληλοι αριθμοί κυττάρων και για τις 3 σειρές. Η δοκιμή προσκόλλησης μελετήθηκε τόσο, ως προς τον αριθμό των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν, όσο και ως προς την επιλογή του κατάλληλου χρόνου προσκόλλησης, προκειμένου να λαμβάνεται το πιο αξιόπιστο αποτέλεσμα και για τις 3 κυτταρικές σειρές. Κατόπιν αρχικών πειραμάτων αποφασίστηκε η έρευνα να εστιαστεί στην κυτταρική σειρά MCF-7, ως η σειρά που έδινε τα πιο ενδιαφέροντα αποτελέσματα, με στόχο να μπορέσει να γίνει περισσότερη και σε βάθος μελέτη.

Ακόμα, στο παρόν τμήμα μελετήθηκε η επίδραση του ογκοκατασταλτικού p53 στην έκφραση του IGF-IR και στην προσκόλληση καρκινικών κυττάρων του μαστού. Το p53 είναι προϊόν της έκφρασης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *p53* και θεωρείται βασικός ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, καθώς επιφέρει κυτταρική απόπτωση (Matlashewski et al., 1984). Το p53 φαίνεται να ασκεί ρυθμιστικό ρόλο σε πολλά γονίδια σχετικά με την καρκινογένεση, όπως είναι αυτό του *IGF-IR* (Sarfstein et al., 2006). Πιο συγκεκριμένα, η μεταγραφή του *IGF-IR* γονιδίου, ρυθμίζεται αρνητικά από πρωτεϊνικά παράγωγα ογκοκατασταλτικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των: γονίδιο του καρκίνου του μαστού-1 (BRCA1), p53 (Abramovitch and Werner, 2003; Sarfstein et al., 2006). Μεταλλαγμένες μορφές του είναι συχνές στον καρκίνο του μαστού (Petitjean et al., 2007).

Ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν το ρόλο του p53 σε κυτταρικές λειτουργίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός (Matlashewski et al., 1984; Di Agostino et al., 2006; Chalkiadaki et al., 2011a). Έτσι, μελετήθηκε ο ενδεχόμενος ρόλος του στην προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων του μαστού και τα αποτελέσματα μας έδειξαν, ότι η μείωση του p53 δεν επέφερε τροποποίηση στην προσκόλληση των κυττάρων. Ο p53 ρυθμίζει κυρίως μόρια σχετικά με τον κυτταρικό κύκλο (Engeland, 2018). Επίσης η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε είναι ειδική για τη μελέτη της προσκόλλησης που εξαρτάται από την ινονεκτίνη, έτσι ίσως να μην επηρεάζεται από την ύπαρξη του p53, καθώς δεν υπάρχει βιβλιογραφική συσχέτιση των μορίων αυτών.

Ακόμα, βιβλιογραφικά υπάρχει σαφής συσχέτιση μεταξύ των p53 και IGF-IR, ενώ περιγράφεται ρύθμιση του IGF-IR υποκινητή από το p53 (Webster et al., 1996; Abramovitch and Werner, 2003; Sarfstein et al., 2006) και συγκεκριμένα αναφέρεται ότι ο p53 προκαλεί καταστολή του υποκινητή του IGF-IR (Webster et al., 1996). Στην παρούσα ενότητα έγινε η μελέτη της έκφρασης του IGF-IR κατόπιν μείωσης του p53 με το ειδικό siRNA, αλλά δεν παρατηρήθηκε αύξηση στον IGF-IR των MCF-7 κυττάρων, όπως έχει αναφερθεί σε άλλες μελέτες.

4.2. ΜΕΡΟΣ Β: Ο IGF-IR ΩΣ ΚΥΡΙΟ ΣΗΜΕΙΟ ΣΥΝΑΝΤΗΣΗΣ ΤΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΤΩΝ IGF-I/EGF ΚΑΙ ΤΗΣ E2, ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Στην παρούσα μελέτη έχει δειχθεί ότι οι IGF-I, EGF και η E2 αυξάνουν την προσκολλητική ικανότητα των MCF-7 κυττάρων, σε υπόστρωμα ινονεκτίνης με τρόπο εξαρτώμενο από τον IGF-IR και την κατάντη μοριακή σηματοδότηση του, που περιλαμβάνει τα Erk1/2, το συν-εντοπισμό IGF-IR/FAK, την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, καθώς επίσης και μορφολογικές αλλαγές (Voudouri et al., 2016). Στον καρκίνο του μαστού, οι αυξητικοί παράγοντες IGF-I και EGF αποτελούν βασικούς ρυθμιστές βιολογικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η διήθηση και η μετανάστευση των κυττάρων (LeRoith et al., 1995; Baserga et al., 1997; Bucci et al., 1997). Επιπροσθέτως, θεωρείται ότι η βιολογική τους

επίδραση, σε ότι αφορά την διατήρηση του κακοήθους φαινοτύπου των κυττάρων, καθώς και την προστασία ενάντια στην απόπτωση, είναι βαρύνουσας σημασίας για την πορεία της νόσου (Baserga et al., 2003; Hart et al., 2005).

Η κυτταρική προσκόλληση είναι κρίσιμο βήμα στον καρκίνο, καθώς καθορίζει τις διαδικασίες της διήθησης και την μετανάστευσης (Cierly et al., 2015). Η κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων του μαστού, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό, από τα συστατικά της περιβάλλουσας εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Nikitovic et al., 2014a; Iozzo and Schaefer, 2015). Η ινονεκτίνη είναι βασικό συστατικό της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας που αφθονεί στον μικροπεριβάλλον των όγκων του καρκίνου του μαστού και εμφανίζει άμεση συσχέτιση με την πορεία της νόσου (Pankov and Yamada, 2002; Edderkaoui et al., 2005).

Στην παρούσα διατριβή αποδεικνύεται ότι οι IGF-I, EGF και E2 αυξάνουν την FN- εξαρτώμενη προσκόλληση των MCF-7 κυττάρων, μέσω των δράσεων του IGF-IR (Voudouri et al., 2016). Αρχικά, επιβεβαιώθηκε ότι οι IGF-I και EGF αυξάνουν σημαντικά την ενεργοποίηση του Erk1/2, που είναι όμοιος ενδοκυττάριος διαμεσολαβητής για τους IGF-IR (Baserga et al., 1997) και EGFR (Earp et al., 2003; Adams et al., 2004). Τα δεδομένα μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ενεργοποίηση του Erk1/2 από τους IGF-I και EGF είναι εξαρτώμενη από τον IGF-IR (Voudouri et al., 2016).

Στους ορμονο- εξαρτώμενους καρκίνους του μαστού, η οιστραδιόλη παίζει σημαντικό ρόλο σε πολυάριθμες κυτταρικές λειτουργίες, που αφορούν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Ahmad et al., 1999; McDonnell and Norris, 2002). Τα σηματοδοτικά μονοπάτια των E2, IGF-I και EGF ρυθμίζουν την πορεία του καρκίνου του μαστού (Yee and Lee, 2000; Dupont et al., 2001) και επίσης στη ρύθμιση αυτή περιλαμβάνεται και η έκφραση των μακρομορίων του στρώματος (Mitropoulou et al., 2004; Skandalis et al., 2014). Επιπρόσθετα, επιστημονικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο ERα συμμετέχει στην εκτός πυρήνα σηματοδότηση, με τη συμμετοχή του σε ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που συνολικά ονομάζεται “signalosome” (σώμα σηματοδότησης) (Levin, 2005). Πράγματι, έχει προταθεί ότι ο

EGFR, ο ErbB2, και ο IGF-IR (όλοι υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης) δεσμεύουν τον ERα στην κυτταρική μεμβράνη και συμμετέχουν στις βιολογικές δράσεις της οιστραδιόλης αλληλεπιδρώντας με το σώμα σηματοδότησης (signalosome) (Song et al., 2004). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, ο IGF-IR και ο ERα συχνά δείχνουν παράλληλη υπερέκφραση στον καρκίνο του μαστού, με το IGF-IR – διαμεσολαβούμενο σηματοδοτικό μονοπάτι, να παίζει σημαντικό ρόλο στη βιολογική δράση της E2 (Song et al., 2004). Αυτό το πρότυπο της έκφρασης για τα IGF-IR/ERα επιβεβαιώνεται στη δική μας μελέτη στα κύτταρα MCF-7, καθώς και τα δύο εκφράζονται σε μεγάλες ποσότητες. Από την άλλη, η έκφραση του EGFR σχετίζεται αντίστροφα με την έκφραση του ERα, όπως φαίνεται τόσο στην παρούσα μελέτη, όσο και σε παλιότερες (Bouris et al., 2015; Voudouri et al., 2016). Ωστόσο, ένας αριθμός μελετών αποδεικνύει ότι και οι δύο υποδοχείς συμμετέχουν στη ρύθμιση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων του μαστού, ανεξάρτητα από το ποιος εκφράζεται κατά βάση σε κάθε περίπτωση (Klijn et al., 1992; van Agthoven et al., 1994). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η έκφραση του EGFR απαιτεί συμμετοχή ενεργού IGF-IR, για να επάγει τις μιτογόνες και μετασχηματιστικές ενεργότητες του υποδοχέα (Coppola et al., 1994). Στην παρούσα διατριβή αποδεικνύεται ότι, τόσο ο IGF-I, όσο και ο EGF επάγουν αύξηση στην έκφραση του IGF-IR, γεγονός που, αφενός οδηγεί σε αυξημένη ενεργότητα του ενδοκυτταρικού Erk1/2 και αφ' ετέρου ενισχύει την κατάντη σηματοδότηση του (Voudouri et al., 2016). Σε παλαιότερες μελέτες, έχει δειχθεί ότι στα MCF-7 κύτταρα οι IGF-I, EGF ενεργοποιούν τον A/B τομέα του ERα μέσω του MEK/Erk1/2 σηματοδοτικού μονοπατιού (Bunone et al., 1996; Levin, 2005). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, έχουν δείξει ότι η E2 ενισχύει την ικανότητα των MCF-7 κυττάρων να προσκολληθούν στο υπόστρωμα της ινονεκτίνης. Επιπλέον, η συμμετοχή του IGF-IR είναι απαραίτητη για την E2-επαγόμενη προσκόλληση, καθώς ο ειδικός αναστολέας του IGF-IR (AG1024) που χρησιμοποιήθηκε μείωσε την E2-εξαρτώμενη προσκόλληση (Voudouri et al., 2016). Σύμφωνα με παλιότερες μελέτες η δράση της E2 συμπεριλαμβάνει τόσο την IGF-IR σηματοδότηση, όσο και την EGFR σηματοδότηση (Song et al., 2004). Η βιολογική δράση της οιστραδιόλης στην προσκόλληση των MCF-7 κυττάρων είναι κομμάτι της μη-

γενωμικής δράσης της, που οδηγεί σε γρήγορη φωσφορυλίωση του IGF-IR και συνεπώς σε ενεργοποίηση του κατάντη σηματοδοτικού μονοπατιού (MAPK και Akt) (Yee and Lee, 2000; Cheskis, 2004).

Ο ERα φαίνεται να συμμετέχει καθοριστικά στη ρύθμιση βασικών ιδιοτήτων για τα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι μέσω της σηματοδότησης του Erk1/2 ρυθμίζει τις κινητικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Bouris et al., 2015). Ωστόσο, και ο ρόλος του ERβ στη ρύθμιση της κυτταρικής συμπεριφοράς, δεν είναι αμελητέος στην περίπτωση του μαστού (Piperigkou et al., 2016). Ομοίως, με τα δικά μας αποτελέσματα, ερευνητές έχουν δείξει ότι η IGF-IR εξαρτώμενη κινητικότητα και ικανότητα διήθησης των κυττάρων απαιτεί την ενεργοποίηση των MAPK και PI-3kinase σηματοδοτικών μονοπατιών (Metalli et al., 2010). Περαιτέρω μελέτη στο ρόλο του Erk1/2 σηματοδοτικού μονοπατιού στις δράσεις των IGF-I, EGF και της E2, έδειξε ότι η παρατηρούμενη αύξηση της προσκόλλησης των κυττάρων από τους παράγοντες αυτούς είναι εξαρτώμενη από τη σηματοδότηση IGF-IR/Erk1/2 (Voudouri et al., 2016). Σε μια παλιότερη μελέτη έχειδειχθεί ότι τυχόν αλλαγές στις εκφράσεις πρωτεϊνών, που αποτελούν βασικά συστατικά του IGF-I σηματοδοτικού μονοπατιού, ενισχύουν την MAPK ενεργοποίηση και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον αυξημένο πολλαπλασιασμό των MCF-7 κυττάρων (Yee and Lee, 2000).

Ο ER είναι μεταγραφικός παράγοντας που παίζει ρόλο-κλειδί στους ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους του μαστού, ρυθμίζοντας τη γονιδιακή έκφραση (Ali and Coombes, 2000). Σε αυτή τη μελέτη, συμπεριλαμβάνονται τόσο οι γενωμικές, όσο και οι μη-γενωμικές δράσεις των ERs (Song et al., 2007; Zhang et al., 2014), καθώς η E2 δείχνει να ενεργοποιεί τον IGF-IR και να αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του, γεγονός που διευκολύνει την ικανότητα προσκόλλησης των MCF-7 κυττάρων στην ινονεκτίνη (Voudouri et al., 2016). Ειδικότερα, η E2 ενεργοποιεί τον ERα, ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί τον IGF-IR που διαμεσολαβεί μέσω του Erk1/2 σηματοδοτικού μονοπατιού στην προσκόλληση των κυττάρων (Song et al., 2007; Zhang, 2015; Voudouri et al., 2016).

Επιπλέον, μετά την ενεργοποίηση ενός πρωτεϊνικού υποδοχέα με ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης, όπως είναι ο IGF-IR και ο EGFR, η PI-3kinase μπορεί να

επιστρατευθεί στην κυτταρική μεμβράνη και να προκαλέσει την ενεργοποίηση άλλων κατάντη σηματοδοτικών ενδοκυττάρων μορίων (Lemmon et al., 1996). Η πιθανή συμμετοχή του σηματοδοτικού μονοπατιού PI-3kinase στις δράσεις των IGF-I/EGF και E2, μελετήθηκε επίσης στην παρούσα διατριβή. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, το PI-3k σηματοδοτικό μόριο, διαμεσολαβεί στις βιολογικές δράσεις των IGF-I και της οιστραδιόλης στην προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Voudouri et al., 2016). Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι το PI-3k σηματοδοτικό μονοπάτι, συμμετέχει στην IGF-I και E2- εξαρτώμενη προσκόλληση των MCF-7 κυττάρων. Δεδομένα από παλαιότερες μελέτες, σχετικές με κακοήθεις όγκους προερχόμενους από επιθηλιακά κύτταρα, υποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών, κατόπιν ενεργοποίησης διαμεμβρανικών υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης, μπορεί να έχουν διαφορετικές δράσεις, ως προς τη στρατολόγηση άλλων ενδοκυτταρικών μορίων, πέρα από την MAPK και την PI-3K συμμετοχή (Nguyen et al., 2000; Lyu et al., 2016). Από την άλλη πλευρά, η έκφραση του IRS-1, έναν πολύ βασικό ενδοκυττάριο διαβιβαστή για τον IGF-IR υποδοχέα, που βρίσκεται παρακάτω στη σηματοδότηση του και είναι γνωστό ότι μεταβιβάζει σήματα στα PI-3K/Akt και Erk1/2 μονοπάτια, ρυθμίζεται από την ενεργότητα των ERs (Cesarone et al., 2007). Οι μελέτες αυτές αποδεικνύουν μια επλεκτική αλληλεπικάλυψη των σηματοδοτικών μονοπατιών Erk1/2 και PI-3K στη ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών των καρκινικών κυττάρων του μαστού.

Η αναστολή του Erk1/2 μειώνει την έκφραση και την ενεργοποίηση του IGF-IR, υποδεικνύοντας την ύπαρξη ενός μηχανισμού ανάδρασης μεταξύ IGF-IR και Erk1/2 (Voudouri et al., 2016). Ειδικότερα, ο IGF-I ενεργοποιεί τον Erk1/2, μέσω ρύθμισης του IGF-IR και ταυτόχρονα ο Erk1/2 ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση του IGF-IR (Voudouri et al., 2016). Είναι γνωστό ότι ο Erk1/2 ρυθμίζει πληθώρα γονιδίων που σχετίζονται με την εξέλιξη του καρκίνου (Johnson and Lapadat, 2002). Το γονίδιο *IGF-IR* στερείται ρυθμιστικής αλληλουχίας TATA box (cis- ρυθμιστική αλληλουχία της μεταγραφής, που βρίσκεται στον υποκινητή των γονιδίων) και CAAT αλληλουχιών που απαιτούνται για την ακριβή ρύθμιση της μεταγραφής, επομένως το συγκεκριμένο γονίδιο μπορεί να

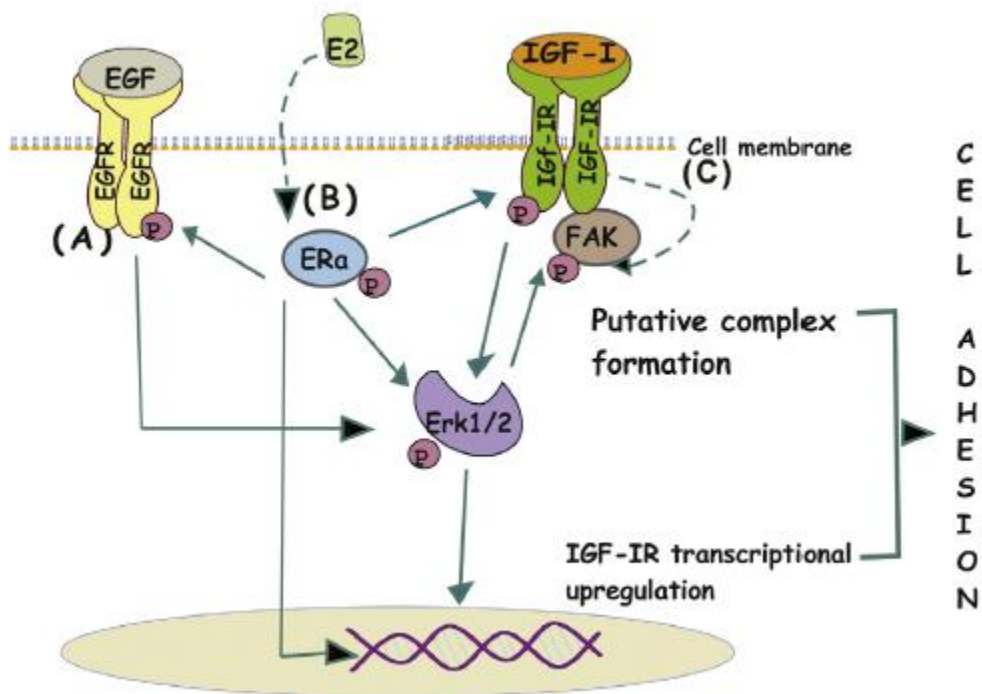
υπόκειται σε πολλαπλή ρύθμιση μέσω ενός, μοναδικού μοτίβου του υποκινητή του (Werner et al., 1992; Werner and Maor, 2006). Επιπλέον, έχει δειχθεί, ότι στα ERα+ κύτταρα τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του IGF-IR έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταφορά του στον πυρήνα και την επακόλουθη αυξημένη μεταγραφή του *IGF-IR* γονιδίου (Sarfstein et al., 2012). Γενικότερα, η έκφραση του IGF-IR θεωρείται βασικό προαπαιτούμενο για την πρόοδο της ογκογένεσης (Werner and Maor, 2006). Επιπλέον η γονιδιακή έκφραση του IGF-IR στον καρκίνο του μαστού και στον καρκίνο του προστάτη, είναι ενδεικτική, για το στάδιο στο οποίο βρίσκεται ο καρκίνος (Tennant et al., 1996; Schnarr et al., 2000). Μπορεί να υποτεθεί επομένως, ότι η εκτενής υπερέκφραση του IGF-IR σε πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης, προσδίδει χαρακτηριστικά που δίνουν πλεονέκτημα στα μετασχηματισμένα κύτταρα.

Η παρουσία των αυξητικών παραγόντων και η εναλλαγή στις προσκολλητικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων επιφέρουν αλλαγές στην οργάνωση του κυτταροσκελετού (Zigmond, 1996). Τα MCF-7 κύτταρα είναι κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης και θεωρούνται χαμηλής μεταστατικής ικανότητας (Fillmore and Kuperwasser, 2008). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, η αυξημένη προσκόλληση των MCF-7 κυττάρων, στην ινονεκτίνη, που επιφέρουν οι IGF-I και EGF, συνοδεύεται από τροποποίηση της οργάνωσης των ινιδίων της ακτίνης του κυτταροσκελετού (Voudouri et al., 2016). Η δράση αυτών των αυξητικών παραγόντων στην οργάνωση της ακτίνης, είναι εξαρτώμενη από τον Erk1/2. Η σηματοδότηση των IGF-I και EGF επάγει τη διήθηση των κυττάρων, επιφέροντας έναν πιο προσκολλητικό φαινότυπο με τα κύτταρα να δείχνουν “τεταμένα” από τις δυνάμεις πίεσης των ινιδίων της ακτίνης, που δείχνουν έναν χαρακτηριστικό φαινότυπο μετασχηματισμένου καρκινικού κυττάρου (Voudouri et al., 2016). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ικανοποιητική προσκόλληση και μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Η κινάση της εστιακής προσκόλλησης (Focal Adhesion Kinase – FAK) είναι μια πρωτεΐνη που τοποθετείται κοντά στην κυτταρική μεμβράνη και παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην προσκόλληση, την επιβίωση αλλά και την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Schaller et al., 1992; Weiner et al., 1993). Η φωσφορυλίωση της FAK, στο

κατάλοιπο τυροσίνης Y397 (Hanks and Polte, 1997; McLean et al., 2005) και η επακόλουθη φωσφορυλίωση άλλων πρωτεϊνών, που συνδέονται με την FAK, όπως η παξιλλίνη (paxillin) και η Cas (Schaller et al., 1992) επιφέρουν αλλαγές στον κυτταροσκελετό και ενεργοποίηση των Ras-Raf-MAPK και PI-3K σηματοδοτικών μονοπατιών (Hanks et al., 2003; McLean et al., 2005). Στην παρούσα μελέτη, έχει δειχθεί ότι τόσο ο IGF-I, όσο και ο EGF ενεργοποιούν την FAK στο κατάλοιπο Y397 με τρόπο Erk1/2 εξαρτώμενο. Σύμφωνα με παλαιότερες μελέτες, πράγματι η σηματοδότηση αυξητικών παραγόντων μπορεί να προκαλέσει την ενεργοποίηση της FAK (Parsons, 2003). Επιπλέον, η ενεργοποίηση της FAK έχει προταθεί ότι διαμεσολαβείται από τον IGF-IR σε ινοβλάστες (Casamassima and Rozengurt, 1998) και από τον EGFR σε κερατινοκύτταρα (Eberwein et al., 2015). Επίσης, προηγούμενες μελέτες δείχνουν ότι ο Erk1/2 συμμετέχει στην ενεργοποίηση της FAK (Teranishi et al., 2009; Zheng et al., 2009).

Η φυσική σχέση αλληλεπίδρασης FAK και IGF-IR έχει νωρίτερα, αποδειχθεί σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα και καρκινικά κύτταρα γλοίας (Liu et al., 2007; Liu et al., 2008). Επιπλέον, οι Zheng et al., 2009, έδειξαν ότι ο FERM τομέας της FAK μπορεί να προσδένεται στην β υπομονάδα του IGF-IR (Zheng et al., 2009). Η ενεργοποίηση της FAK είναι απαραίτητη για την IGF-IR -διαμεσολαβούμενη διαδικασία μετάπτωσης από τον επιθηλιακό στο μεσεγχυματικό φαινότυπο (EMT) και για τη ρύθμιση της κινητικότητας των τριπλά αρνητικών καρκινικών κυττάρων του μαστού (Taliaferro-Smith et al., 2015). Στην παρούσα διατριβή, η FAK και ο IGF-IR βρέθηκαν να συν-εντοπίζονται στα MCF-7 καρκινικά κύτταρα του μαστού (Voudouri et al., 2016). Επιπροσθέτως, ο IGF-I βρέθηκε να ενισχύει το συγκεκριμένο διπλό σήμα αποδεικνύοντας ότι ο συν-εντοπισμός ήταν εξαρτώμενος από την κατάντη, ενδοκυττάρια σηματοδότηση του IGF-IR (Voudouri et al., 2016). Η αναστολή του Erk1/2 επέφερε δραματική μείωση στο συν-εντοπισμό των μορίων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, ο Erk1/2 μέσω ρύθμισης της έκφρασης των IGF-IR και FAK, καθώς και μέσω του σχηματισμού ενός πιθανού συμπλόκου μεταξύ τους, επηρεάζει σημαντικά την αναδιοργάνωση των ινιδίων του κυτταροσκελετού της

ακτίνης και τροποποιεί την προσκολλητική ικανότητα των MCF-7 κυττάρων στην ινονεκτίνη (Voudouri et al., 2016). Αυτά τα ευρήματα, εντούτοις, εισάγουν μια νέα υπόθεση, σύμφωνα με την οποία, οι IGF-I/EGF και E2 αλληλεπιδρούν, υποστηριζόμενοι μηχανιστικά από το κυτταρικό μικροπεριβάλλον του καρκίνου, κατά τη διάρκεια της προσκόλλησης και διατηρώντας την υπερ-έκφραση του IGF-IR, που είναι καθοριστική για τα πρώιμα στάδια του καρκίνου (Voudouri et al., 2016). Οι ρόλοι των IGF-I/EGF και η αλληλεπίδραση του με την E2 στην προσκόλληση καρκινικών κυττάρων του μαστού παρουσιάζονται στην εικόνα 1.



Εικόνα 1: Ο IGF-IR είναι βασικό σημείο συνάντησης για την αλληλεπίδραση IGF-I/EGF και E2 στη ρύθμιση της προσκόλλησης καρκινικών κυττάρων του μαστού. (A) Πρόσδεση του EGF στον EGFR και ενεργοποίηση του τελευταίου οδηγεί σε ενεργοποίηση του Erk1/2 και αύξηση της έκφρασης του IGF-IR. (B) Εισαγωγή της οιστραδιόλης στο κυτταρόπλασμα ενεργοποιεί τον ER που μπορεί να ενεργοποιήσει EGFR και IGF-IR (μη γενωμική δράση) ή να μετακινηθεί στον πυρήνα, όπου επάγει μεταγραφική δραστηριότητα του IGF-IR (γενωμική δράση). (C) Η πρόσδεση του IGF-I ενεργοποιεί τον IGF-IR και επακολούθως ενεργοποιεί την FAK και σχηματίζεται σύμπλοκο που διεγείρει την ενεργοποίηση του Erk και τη φωσφορυλίωση της FAK. Με αυτό το ρυθμιστικό μηχανισμό ο Erk διατηρεί υψηλά τα επίπεδα του IGF-IR. Οι αλληλεπιδράσεις των παραπάνω μονοπατιών οδηγούν σε αυξημένη κυτταρική προσκόλληση.

Συνοψίζοντας, ο IGF-IR φαίνεται να είναι σημείο συνάντησης για την IGF-I/EGF- και E2 επαγόμενη προσκόλληση των MCF-7 κυττάρων, σε υπόστρωμα ινονεκτίνης. Κοινοί ενδοκυτταρικοί σηματοδοτικοί διαμεσολαβητές και μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων των Erk1/2 και FAK, ενεργοποιούνται και επιδρούν στην οργάνωση του κυτταροσκελετού. Ο σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ IGF-IR- FAK και ER δεν μπορεί να αποκλειστεί, αλλά χρήζει περαιτέρω μελέτης.

4.3. ΜΕΡΟΣ Γ: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΑΦΕΪΝΗΣ ΣΤΙΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ & ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ ΤΟΥ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΥ ΧΩΡΟΥ

Η καφεΐνη, μια ουσία ευρέως χρησιμοποιούμενη σε καθημερινή βάση από εκατομμύρια ανθρώπους έχει συσχετισθεί με τον καρκίνο του μαστού (Ganmaa et al., 2008; Saiki et al., 2011; Dumit and Dengjel, 2014; Pietrocola et al., 2014; Rosendahl et al., 2015). Ωστόσο, παρά την πληθώρα επιδημιολογικών μελετών που αφορούν την κατανάλωση καφέ και την πιθανή σχέση της με την ανάπτυξη του καρκίνου (Folsom et al., 1993; Michels et al., 2002; Arab, 2010), δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για τη βιολογική της δράση σε καρκινικά κύτταρα του μαστού. Έτσι, στο τρίτο μέρος της παρούσας μελέτης, διερευνήθηκε ο πιθανός ρόλος της καφεΐνης στις λειτουργίες καρκινικών κυττάρων του μαστού, με διαφορετικό προφίλ έκφρασης του υποδοχέα ER α .

Στη χρήση οποιασδήποτε ουσίας, σημαντικό ρόλο έχει η δόση. Κατά την έναρξη των πειραμάτων του μέρους Γ, πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική μελέτη αλλά και πειραματικές δοκιμές που αφορούσαν τις συγκεντρώσεις της καφεΐνης που επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν. Μετά από ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, βρέθηκε ότι πολλές *in vitro* μελέτες χρησιμοποιούσαν συγκεντρώσεις της τάξης των 0,25- 10mM (Okano et al., 2008; Ravi et al., 2008; Rosendahl et al., 2015). Ωστόσο, άλλες μελέτες επιδημιολογικού χαρακτήρα αναφορικά με τις συγκεντρώσεις της καφεΐνης στο ανθρώπινο πλάσμα, μετά από κατανάλωση καφέ αυτή κυμαίνονταν περίπου στο 0,01mM (μέση κατανάλωση

περίπου 2,12mg/L) (Cook et al., 1996; Leon et al., 2002). Με βάση τα δεδομένα αυτά η μελέτη προσαρμόσε τις συγκεντρώσεις της καφεΐνης, που χρησιμοποιήθηκαν στα κύτταρα στα 0,01mM- 0,05mM προκειμένου να πλησιάζει τα πραγματικά επίπεδα της καφεΐνης στο σώμα, αλλά και δεδομένης της τοξικότητας που παρατηρήθηκε σε πολύ υψηλά επίπεδα καφεΐνης στα κύτταρα.

Η καφεΐνη έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τις λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων (Saiki et al., 2011; Al-Ansari and Aboussekhra, 2014; Pietrocola et al., 2014; Rosendahl et al., 2015). Πιο συγκεκριμένα, η καφεΐνη επάγει την απόπτωση σε κύτταρα νευροβλαστώματος (Saiki et al., 2011), ενώ *in vivo* πειράματα σε ποντίκια έχουν δείξει ότι σχετίζεται και με την αυτοφαγία (Pietrocola et al., 2014). Ακόμα, σε ινοβλάστες σχετικούς με τον καρκίνο (Cancer- associated fibroblasts- CAFs) έχει δείχθει ότι η καφεΐνη καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αυξάνει ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες όπως είναι το p16, το p53 και το p21 και εμποδίζει τη μετανάστευση των κυττάρων, μειώνοντας την ενεργοποίηση των Erk1/2 και Akt (Al-Ansari and Aboussekhra, 2014).

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε ο ρόλος της στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ανεξαρτήτως προφίλ έκφρασης των υποδοχέων των οιστρογόνων, δεν παρατηρήθηκε τροποποίηση του πολλαπλασιαστικού ρυθμού των κυττάρων. Από την άλλη πλευρά, μια παλαιότερη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε καρκινικά κύτταρα του μαστού, με αντίστοιχο προφίλ έκφρασης των υποδοχέων των οιστρογόνων, πρότεινε μείωση του πολλαπλασιαστικού ρυθμού, μέσω ρύθμισης της ERs σηματοδότησης και κυκλινών που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο (Rosendahl et al., 2015). Ενδεχομένως, η διαφορά στη δράση της ουσίας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, να σχετίζεται με τη μεγάλη διαφορά στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται. Εντούτοις, με βάση τα αποτελέσματα μας, παρατηρήθηκε ότι η καφεΐνη επηρεάζει την προσκολλητική ικανότητα των κυττάρων, σε υπόστρωμα ινονεκτίνης και συγκεκριμένα, την αυξάνει, ανεξαρτήτως προφίλ έκφρασης των υποδοχέων των οιστρογόνων.

Μετά τη διαπίστωση ότι η καφεΐνη τροποποιεί την ικανότητα των κυττάρων να προσκολλώνται στην ινονεκτίνη, το επόμενο βήμα ήταν η διερεύνηση του τρόπου

δράσης της και η εύρεση πιθανών διαμεσολαβητών της στη δράση αυτή. Με βάση προηγούμενα αποτελέσματα της μελέτης, στο μέρος Β, ο IGF-IR, μόριο-κλειδί στη σηματοδότηση των IGF-I/EGF, διαδραματίζει σημαντικότερο ρόλο στην προσκόλληση. Συγκεκριμένα, μείωση του υποδοχέα, επέφερε μείωση της ενδογενούς προσκόλλησης των κυττάρων του μαστού. Έτσι μελετήθηκε ο ρόλος της καφεΐνης στην έκφραση και την ενεργοποίηση του IGF-IR και δείχθηκε ότι στα csh κύτταρα η καφεΐνη αυξάνει τόσο την ενεργοποίηση του, όσο και τα επίπεδα έκφρασης. Στα sp10 κύτταρα δείχθηκε ότι η καφεΐνη ενεργοποιεί τον IGF-IR (παρά τα χαμηλά του επίπεδα έκφρασης στη σειρά αυτή). Εντούτοις, οι Rosendahl et al. 2015 είχαν δείξει μείωση του υποδοχέα, με τη χορήγηση της καφεΐνης σε πολύ μεγαλύτερες δόσεις από αυτές της παρούσας διατριβής (Rosendahl et al., 2015).

Παρόλο που στο μέρος Β δεν είχεδειχθεί σχέση μεταξύ του EGFR και της προσκόλλησης, ελέγχθηκε η επίδραση της καφεΐνης στον υποδοχέα αυτόν, ως βασικό κομμάτι της IGF-I/EGF σηματοδότησης. Με βάση τα αποτελέσματα μας, στα κύτταρα sp10 (που εκφράζουν υψηλά επίπεδα EGFR (Bouris et al., 2015)) η καφεΐνη δεν τροποποιεί την ενεργοποίηση ή/και την έκφραση του εν λόγω υποδοχέα. Αντίστοιχη μελέτη δεν κατέστη δυνατή στα κύτταρα csh λόγω των εξαιρετικά χαμηλών επιπέδων έκφρασης του υποδοχέα αυτού.

Με δεδομένη την αλληλεπίδραση των σηματοδοτικών μονοπατιών των IGF-I/EGF με τους ERs, ελέγχθηκε η επίδραση της καφεΐνης στους υποδοχείς των οιστρογόνων, στα πλαίσια της διερεύνησης του ρόλου της και των διαμεσολαβητών της. Η μελέτη της επίδρασης της καφεΐνης στην έκφραση του ERα πραγματοποιήθηκε μόνο στην κυτταρική σειρά csh και δεν έδειξε καμία επίδραση του συγκεκριμένου υποδοχέα των οιστρογόνων από την καφεΐνη. Η μελέτη δεν έγινε στα κύτταρα sp10 λόγω της μόνιμης διαμόλυνσης που είχε γίνει για μείωση της έκφρασης του ERα.

Παρά τη μεγάλη σημασία που φαίνεται να έχει ο ERβ στις λειτουργίες καρκινικών κυττάρων του μαστού (Piperigkou et al., 2016), δεν κατέστη δυνατή η μελέτη της επίδρασης της καφεΐνης σε αυτόν, καθώς η real-time PCR δεν έδειξε, ικανά προς ανάλυση, επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα σε καμία από τις δύο σειρές.

Στα πλαίσια της περαιτέρω μελέτης του τρόπου δράσης της καφεΐνης στην κυτταρική προσκόλληση μελετήθηκε η δράση της στην ενεργοποίηση και στην έκφραση της FAK, καθώς και στην έκφραση των συνδεκανών 1 και 4. Είναι γνωστή η σχέση της προσκόλλησης με την ενεργοποίηση της FAK, έτσι η ενεργοποίηση της από την καφεΐνη, επιβεβαιώνει τη διεγερτική επίδραση της στην προσκόλληση. Η σχέση καφεΐνης και μορίων του εξωκυττάρου χώρου δεν είναι ιδιαίτερος μελετημένη, εντούτοις μια μελέτη σε βλαστοκύτταρα αναφέρει μείωση των πρωτεογλυκανών λουμικάνης και διγλυκάνης υπό την επίδραση της καφεΐνης (Jeon et al., 2013). Οι συνδεκάνες 1 και 4 έχει βρεθεί να συμμετέχουν στην προσκόλληση καρκινικών κυττάρων του μαστού (Bernfield et al., 1992; Bernfield et al., 1999; Beauvais and Rappaege, 2004). Η συνδεκάνη 1 βρίσκεται στο στρώμα διηθητικών καρκίνων του μαστού και θεωρείται δείκτης επιθετικότητας (Stanley et al., 1999). Ακόμα, δρώντας σαν συν-υποδοχέας των ιντεγκρινών συμμετέχει στην προσκόλληση (Beauvais and Rappaege, 2004). Η συνδεκάνη 4 συμμετέχει στη δημιουργία συμπλόκου προσκόλλησης στα σημεία εστιακής προσκόλλησης αλλά και στη σηματοδότηση που επάγει την προσκόλληση (Baba et al., 2006). Έχει αναφερθεί ακόμα η συνεργασία και η δημιουργία συμπλόκου με τον IGF-IR προς διευκόλυνσης της προσκόλλησης καρκινικών κυττάρων του μαστού (Beauvais and Rappaege, 2004; Afratis et al., 2017). Στην παρούσα μελέτη η καφεΐνη αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της συνδεκάνης 1 (εξίσου και στις 2 συγκεντρώσεις) στα κύτταρα csh, ενώ δεν επηρεάζει την έκφραση της στα κύτταρα sp10. Παρόμοια δράση φαίνεται και στη μελέτη των επιπέδων έκφρασης της συνδεκάνης 4 όπου η καφεΐνη σε συγκέντρωση 0,01mM αυξάνει τη συνδεκάνη 4, στα csh κύτταρα, αλλά δεν επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης της, στα sp10 κύτταρα. Παρατηρείται εδώ μια ERα-εξαρτώμενη δράση της καφεΐνης στην έκφραση των συνδεκανών, μιας και αυξάνει τα επίπεδα των συνδεκανών 1 και 4 μόνο στα κύτταρα που εκφράζουν τον ERα και όχι στα ERα αρνητικά κύτταρα. Στα ERα θετικά κύτταρα έχει δειχθεί ότι η έκφραση της συνδεκάνης 4 ρυθμίζεται από τη σηματοδότηση του IGF-IR (Tsonis et al., 2013; Theocharis et al., 2015; Afratis et al., 2017), του οποίου η έκφραση και η ενεργοποίηση αυξάνεται από την καφεΐνη με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Εντούτοις, ο ERα- εξαρτώμενος τρόπος δράσης της καφεΐνης χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι η καφεΐνη αυξάνει την προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων του μαστού, ανεξαρτήτως προφίλ έκφρασης του ERα. Ακόμα, η καφεΐνη αυξάνει την έκφραση του IGF-IR και με βάση τα δικά μας αποτελέσματα, είναι πιθανό να χρησιμοποιεί τον υποδοχέα αυτόν για να επάγει τη δράση της στην προσκόλληση. Ωστόσο η αύξηση που προκαλεί η καφεΐνη στις συνδεκάνες 1 και 4 δείχνει να εξαρτάται από την ύπαρξη του ERα.

Περισσότερη και εις βάθος μελέτη στον τρόπο δράσης της καφεΐνης στην προσκολλητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων του μαστού, τη ενδεχόμενη συμμετοχή του IGF-IR στην επαγωγή της προσκόλλησης από αυτήν και το ρόλο των συνδεκανών θα είχε μεγάλη σημασία στην κατανόηση της λειτουργίας των καρκινικών κυττάρων του μαστού.

4.4. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Η στόχευση μορίων που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια των IGF-I/EGF έχει χαρακτηριστεί από πολλούς, ως μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν επικεντρώσει τις μελέτες τους στη χρήση φυσικών ή συνθετικών αναστολέων, καθώς επίσης και ειδικών αντισωμάτων για πρωτεΐνες της οικογένειας του EGF αλλά και του IGF-I ως στρατηγική για τη μείωση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Ghosh et al., 1999; Burtrum et al., 2003; Fattah et al., 2006; Zhan et al., 2012; Suh et al., 2013; Elumalai et al., 2014).

Παραδείγματος χάρη, η gefitinib είναι ένας αναστολέας κινάσης της τυροσίνης, ο οποίος έχει δείχθει ότι μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική ανάπτυξη σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού αλλά και σε *in vivo* βιολογικά μοντέλα, με διάφορα προφίλ έκφρασης για τους υποδοχείς EGFR και HER2 (Anido et

al., 2003). Ένας άλλος θεραπευτικός δρόμος που έχει χρησιμοποιηθεί με θετικά αποτελέσματα είναι η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Αντισώματα όπως η trastuzumab, η pertuzumab και η ado-trastuzumabemtansine, που χορηγούνται ενδοφλέβια είναι μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν τον εξωκυττάριο τομέα των ErbBs και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των ErbB2 θετικών καρκίνων του μαστού (Roskoski, 2014). Σχετικά με τη στόχευση του IGF-IR, παρόλο που φαίνεται να είναι ένας από τους πολλά υποσχόμενους νέους θεραπευτικούς στόχους και κάποια πρώτα αποτελέσματα κλινικών δοκιμών, που στόχευσαν τον IGF-IR, ανέφεραν ενδείξεις ανταπόκρισης, οι μεγαλύτερες τυχαιοποιημένες φάσης III δοκιμές δεν έχουν δείξει κάποιο ξεκάθαρο κλινικό όφελος από τη στόχευση του συγκεκριμένου σηματοδοτικού μονοπατιού, σε σύγκριση με συμβατικές στρατηγικές (Yang and Yee, 2012; Yee, 2012). Εντούτοις, αναφέρεται ότι έχει παρατηρηθεί η αντι-πολλαπλασιαστική δράση για πολλά φυσικά προϊόντων που στοχεύουν στον IGF- εξαρτώμενο πολλαπλασιασμό, όπως είναι το sansum ant venom, δηλητήριο ενός είδους μυρμηγκιού, η deguelin ένα φυσικό παράγωγο που απομονώνεται από διάφορα φυτικά είδη, το Nimbolide ένα τερπενοειδές λακτόνης, που απομονώνεται από το φυτό *Azadirachta indica* (Ινδική Πασχαλιά) και η calycosin ένα φυσικό φυτο-οιστρογόνο που έχει δομή παρόμοια με αυτή των οιστρογόνων (Badr et al., 2012; Suh et al., 2013; Elumalai et al., 2014)

Η σύσταση των υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης, τα προφίλ έκφρασης πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη σηματοδότηση IGF-I/EGF καθώς επίσης και η παραγωγή των προσδέτων- αυξητικών παραγόντων εγγενώς, μπορεί να επηρεάσουν τη θεραπευτική πορεία και την πρόγνωση της νόσου (Byron et al., 2006; Gualberto et al., 2011; Becker et al., 2012). Εξαιτίας της πληθώρας των μορίων αλλά και των αλληλεπικαλύψεων στη σηματοδότηση πιθανόν η ταυτόχρονη στόχευση πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών είναι περισσότερο από αναγκαία και ουσιαστική (Lluch et al., 2014).

4.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Το γονιδιακό προϊόν του ογκοκατασταλτικού *p53*, που διαθέτει ρόλο- κλειδί στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, δεν επηρεάζει την λειτουργία της προσκόλλησης των καρκινικών κυττάρων του μαστού σε υπόστρωμα ινονεκτίνης.
- Ο IGF-IR είναι σημείο συνάντησης για τα σηματοδοτικά μονοπάτια των IGF-I/EGF και E2, στην προσκόλληση καρκινικών κυττάρων του μαστού. Η αλληλεπίδραση των σηματοδοτικών μονοπατιών των IGF-I/EGF και E2 έχει δειχθεί, μέσω της χρήσης κοινών ενδοκυττάρων διαμεσολαβητών που χρησιμοποιούνται στη μεταγωγή σήματος των παραγόντων αυτών.
- Η καφεΐνη αυξάνει την προσκολλητική ικανότητα καρκινικών κυττάρων του μαστού και την έκφραση του IGF-IR, ανεξαρτήτως προφίλ έκφρασης του υποδοχέα ERα. Ωστόσο, η ρύθμιση της στην έκφραση των συνδεκανών είναι ERα- εξαρτώμενη.

4.6 ΠΙΘΑΝΕΣ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ

Η γεφύρωση της απόστασης μεταξύ προ-κλινικών μελετών και χρήσιμων κλινικών στρατηγικών χειρισμών φαίνεται να απαιτεί βαθύτερη κατανόηση αυτών των, τόσο σύνθετων, μοριακών σηματοδοτικών μηχανισμών. Η ανάπτυξη προγνωστικών βιολογικών δεικτών και βέλτιστων προσεγγίσεων αναστολής, του βιολογικού συστήματος των αυξητικών παραγόντων IGF-I/EGF, θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στον καλύτερο σχεδιασμό στοχευμένων θεραπειών για τον καρκίνο του μαστού. Ακόμα, η επίδραση ουσιών καθημερινής χρήσης, όπως είναι η καφεΐνη, ίσως δώσει νέα στοιχεία, ιδιαίτερος, χρήσιμα στη βελτίωση της ποιότητας ζωής αλλά και στη θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενών με καρκίνο του μαστού.

Τέλος, ξετυλίγοντας το κουβάρι των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κρίσιμων μοριακών σηματοδοτικών μονοπατιών στη βιολογία του καρκίνου του μαστού, όπως

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

αυτά που σας παρουσιάσαμε παραπάνω, νομίζουμε ότι προσθέτουμε νέες ιδέες για τον σχεδιασμό συνδυαστικών θεραπευτικών στρατηγικών.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abramovitch S, Werner H. 2003. Functional and physical interactions between BRCA1 and p53 in transcriptional regulation of the IGF-IR gene. *Horm Metab Res* 35:758-762.
- Adams BD, Cowee DM, White BA. 2009. The role of miR-206 in the epidermal growth factor (EGF) induced repression of estrogen receptor-alpha (ERalpha) signaling and a luminal phenotype in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 23:1215-1230.
- Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW. 2000. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci* 57:1050-1093.
- Adams TE, McKern NM, Ward CW. 2004. Signalling by the type 1 insulin-like growth factor receptor: interplay with the epidermal growth factor receptor. *Growth Factors* 22:89-95.
- Afratis N, Gialeli C, Nikitovic D, Tsegenidis T, Karousou E, Theocharis AD, Pavao MS, Tzanakakis GN, Karamanos NK. 2012. Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. *FEBS J* 279:1177-1197.
- Afratis NA, Bouris P, Skandalis SS, Mulhaupt HA, Couchman JR, Theocharis AD, Karamanos NK. 2017. IGF-IR cooperates with ERalpha to inhibit breast cancer cell aggressiveness by regulating the expression and localisation of ECM molecules. *Sci Rep* 7:40138.
- Ahmad S, Singh N, Glazer RI. 1999. Role of AKT1 in 17beta-estradiol- and insulin-like growth factor I (IGF-I)-dependent proliferation and prevention of apoptosis in MCF-7 breast carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 58:425-430.
- Al-Ansari MM, Aboussekhra A. 2014. Caffeine mediates sustained inactivation of breast cancer-associated myofibroblasts via up-regulation of tumor suppressor genes. *PLoS One* 9:e90907.
- Al Otaibi HH. 2017. Breast Cancer Risk Assessment Using the Gail Model and It's Predictors in Saudi Women. *Asian Pac J Cancer Prev* 18:2971-2975.
- Alexaki VI, Charalampopoulos I, Kampa M, Vassalou H, Theodoropoulos P, Stathopoulos EN, Hatzoglou A, Gravanis A, Castanas E. 2004. Estrogen exerts neuroprotective effects via membrane estrogen receptors and rapid Akt/NOS activation. *FASEB J* 18:1594-1596.
- Ali S, Buluwela L, Coombes RC. 2011. Antiestrogens and their therapeutic applications in breast cancer and other diseases. *Annu Rev Med* 62:217-232.
- Ali S, Coombes RC. 2000. Estrogen receptor alpha in human breast cancer: occurrence and significance. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5:271-281.
- Amin S, Kumar A, Nilchi L, Wright K, Kozlowski M. 2011. Breast cancer cells proliferation is regulated by tyrosine phosphatase SHP1 through c-jun N-terminal kinase and cooperative induction of RFX-1 and AP-4 transcription factors. *Mol Cancer Res* 9:1112-1125.
- Andersson S, D'Arcy P, Larsson O, Sehat B. 2009. Focal adhesion kinase (FAK) activates and stabilizes IGF-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 387:36-41.
- Anido J, Matar P, Albanell J, Guzman M, Rojo F, Arribas J, Averbuch S, Baselga J. 2003. ZD1839, a specific epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, induces the formation of inactive EGFR/HER2 and EGFR/HER3 heterodimers and prevents heregulin signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 9:1274-1283.
- Arab L. 2010. Epidemiologic evidence on coffee and cancer. *Nutr Cancer* 62:271-283.
- Arbet-Engels C, Tartare-Deckert S, Eckhart W. 1999. C-terminal Src kinase associates with ligand-stimulated insulin-like growth factor-I receptor. *J Biol Chem* 274:5422-5428.
- Arthur R, Wang Y, Ye K, Glass AG, Ginsberg M, Loudig O, Rohan T. 2017. Association between lifestyle, menstrual/reproductive history, and histological factors and risk of breast cancer in women biopsied for benign breast disease. *Breast Cancer Res Treat*.
- Baba F, Swartz K, van Buren R, Eickhoff J, Zhang Y, Wolberg W, Friedl A. 2006. Syndecan-1 and syndecan-4 are overexpressed in an estrogen receptor-negative, highly proliferative breast carcinoma subtype. *Breast Cancer Res Treat* 98:91-98.
- Badr G, Garraud O, Daghestani M, Al-Khalifa MS, Richard Y. 2012. Human breast carcinoma cells are induced to apoptosis by samsun ant venom through an IGF-1-dependant pathway, PI3K/AKT and ERK signaling. *Cell Immunol* 273:10-16.
- Balakrishnan N, Teo SH, Sinnadurai S, Bhoo Pathy NT, See MH, Taib NA, Yip CH, Bhoo Pathy N. 2017. Impact of Time Since Last Childbirth on Survival of Women with Premenopausal and Postmenopausal Breast Cancers. *World J Surg*.

- Barbareschi M, Maisonneuve P, Aldovini D, Cangi MG, Pecciarini L, Angelo Mauri F, Veronese S, Caffo O, Lucenti A, Palma PD, Galligioni E, Doglioni C. 2003. High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis. *Cancer* 98:474-483.
- Baron V, Calleja V, Ferrari P, Alengrin F, Van Obberghen E. 1998. p125Fak focal adhesion kinase is a substrate for the insulin and insulin-like growth factor-I tyrosine kinase receptors. *J Biol Chem* 273:7162-7168.
- Barrios C, Forbes JF, Jonat W, Conte P, Gradishar W, Buzdar A, Gelmon K, Gnant M, Bonnetterre J, Toi M, Hudis C, Robertson JF. 2012. The sequential use of endocrine treatment for advanced breast cancer: where are we? *Ann Oncol* 23:1378-1386.
- Baserga R, Hongo A, Rubini M, Prisco M, Valentinis B. 1997. The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1332:F105-126.
- Baserga R, Peruzzi F, Reiss K. 2003. The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int J Cancer* 107:873-877.
- Beauvais DM, Rapraeger AC. 2004. Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reprod Biol Endocrinol* 2:3.
- Becker MA, Hou X, Harrington SC, Weroha SJ, Gonzalez SE, Jacob KA, Carboni JM, Gottardis MM, Haluska P. 2012. IGF1R ratio confers resistance to IGF targeting and correlates with increased invasion and poor outcome in breast tumors. *Clin Cancer Res* 18:1808-1817.
- Beckmann MW, Bani MR, Fasching PA, Strick R, Lux MP. 2007. Risk and risk assessment for breast cancer: molecular and clinical aspects. *Maturitas* 57:56-60.
- Bellizzi A, Greco MR, Rubino R, Paradiso A, Forciniti S, Zeeberg K, Cardone RA, Reshkin SJ. 2015. The scaffolding protein NHERF1 sensitizes EGFR-dependent tumor growth, motility and invadopodia function to gefitinib treatment in breast cancer cells. *Int J Oncol* 46:1214-1224.
- Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M. 1999. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 68:729-777.
- Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ. 1992. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* 8:365-393.
- Bianchi F, Magnifico A, Olgiatei C, Zanesi N, Pekarsky Y, Tagliabue E, Croce CM, Menard S, Campiglio M. 2006. FHIT-proteasome degradation caused by mitogenic stimulation of the EGF receptor family in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18981-18986.
- Bissell MJ, Radisky D. 2001. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 1:46-54.
- Bloom HJ, Richardson WW. 1957. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 11:359-377.
- Bohn SK, Blomhoff R, Paur I. 2014. Coffee and cancer risk, epidemiological evidence, and molecular mechanisms. *Mol Nutr Food Res* 58:915-930.
- Bohula EA, Playford MP, Macaulay VM. 2003. Targeting the type 1 insulin-like growth factor receptor as anti-cancer treatment. *Anticancer Drugs* 14:669-682.
- Bouris P, Skandalis SS, Piperigkou Z, Afratis N, Karamanou K, Aletras AJ, Moustakas A, Theocharis AD, Karamanos NK. 2015. Estrogen receptor alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of specific matrix effectors and functional properties of breast cancer cells. *Matrix Biol* 43:42-60.
- Brand TM, Iida M, Dunn EF, Luthar N, Kostopoulos KT, Corrigan KL, Wleklinski MJ, Yang D, Wisinski KB, Salgia R, Wheeler DL. 2014. Nuclear epidermal growth factor receptor is a functional molecular target in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther* 13:1356-1368.
- Brand TM, Iida M, Li C, Wheeler DL. 2011. The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer. *Discov Med* 12:419-432.
- Bucci B, D'Agnano I, Botti C, Mottotese M, Carico E, Zupi G, Vecchione A. 1997. EGF-R expression in ductal breast cancer: proliferation and prognostic implications. *Anticancer Res* 17:769-774.
- Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, Picard D. 1996. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* 15:2174-2183.
- Burtrum D, Zhu Z, Lu D, Anderson DM, Prewett M, Pereira DS, Bassi R, Abdullah R, Hooper AT, Koo H, Jimenez X, Johnson D, Aplett R, Kussie P, Bohlen P, Witte L, Hicklin DJ, Ludwig DL. 2003. A fully human monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor blocks ligand-dependent signaling and inhibits human tumor growth in vivo. *Cancer Res* 63:8912-8921.
- Butcher DT, Alliston T, Weaver VM. 2009. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer* 9:108-122.
- Byron SA, Horwitz KB, Richer JK, Lange CA, Zhang X, Yee D. 2006. Insulin receptor substrates mediate distinct biological responses to insulin-like growth factor receptor activation in breast cancer cells. *Br J Cancer* 95:1220-1228.
- Casamassima A, Rozengurt E. 1998. Insulin-like growth factor I stimulates tyrosine phosphorylation of p130(Cas), focal adhesion kinase, and paxillin. Role of phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a p130(Cas).Crk complex. *J Biol Chem* 273:26149-26156.

- Cesarone G, Edupuganti OP, Chen CP, Wickstrom E. 2007. Insulin receptor substrate 1 knockdown in human MCF7 ER+ breast cancer cells by nuclease-resistant IRS1 siRNA conjugated to a disulfide-bridged D-peptide analogue of insulin-like growth factor 1. *Bioconjug Chem* 18:1831-1840.
- Chalkiadaki G, Nikitovic D, Berdiaki A, Katonis P, Karamanos NK, Tzanakakis GN. 2011a. Heparin plays a key regulatory role via a p53/FAK-dependent signaling in melanoma cell adhesion and migration. *IUBMB Life* 63:109-119.
- Chalkiadaki G, Nikitovic D, Katonis P, Berdiaki A, Tsatsakis A, Kotsikogianni I, Karamanos NK, Tzanakakis GN. 2011b. Low molecular weight heparin inhibits melanoma cell adhesion and migration through a PKCa/JNK signaling pathway inducing actin cytoskeleton changes. *Cancer Lett* 312:235-244.
- Chaudhary P, Thamake SI, Shetty P, Vishwanatha JK. 2014. Inhibition of triple-negative and Herceptin-resistant breast cancer cell proliferation and migration by Annexin A2 antibodies. *Br J Cancer* 111:2328-2341.
- Cheskis BJ. 2004. Regulation of cell signalling cascades by steroid hormones. *J Cell Biochem* 93:20-27.
- Chhabra ES, Higgs HN. 2007. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol* 9:1110-1121.
- Chu PY, Li TK, Ding ST, Lai IR, Shen TL. 2010. EGF-induced Grb7 recruits and promotes Ras activity essential for the tumorigenicity of Sk-Br3 breast cancer cells. *J Biol Chem* 285:29279-29285.
- Chung J, Chen RH, Blenis J. 1991. Coordinate regulation of pp90rsk and a distinct protein-serine/threonine kinase activity that phosphorylates recombinant pp90rsk in vitro. *Mol Cell Biol* 11:1868-1874.
- Cieply B, Koontz C, Frisch SM. 2015. CD44S-hyaluronan interactions protect cells resulting from EMT against anoikis. *Matrix Biol* 48:55-65.
- Cook DG, Peacock JL, Feyerabend C, Carey IM, Jarvis MJ, Anderson HR, Bland JM. 1996. Relation of caffeine intake and blood caffeine concentrations during pregnancy to fetal growth: prospective population based study. *BMJ* 313:1358-1362.
- Coppola D, Ferber A, Miura M, Sell C, D'Ambrosio C, Rubin R, Baserga R. 1994. A functional insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 14:4588-4595.
- Craparo A, O'Neill TJ, Gustafson TA. 1995. Non-SH2 domains within insulin receptor substrate-1 and SHC mediate their phosphotyrosine-dependent interaction with the NPEY motif of the insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem* 270:15639-15643.
- Curran CS, Keely PJ. 2013. Breast tumor and stromal cell responses to TGF-beta and hypoxia in matrix deposition. *Matrix Biol* 32:95-105.
- Daughaday WH, Rotwein P. 1989. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 10:68-91.
- DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. 2014. Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 64:52-62.
- Di Agostino S, Strano S, Emiliozzi V, Zerbini V, Mottolese M, Sacchi A, Blandino G, Piaggio G. 2006. Gain of function of mutant p53: the mutant p53/NF-Y protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycle regulation. *Cancer Cell* 10:191-202.
- Dickson RB, Lippman ME. 1987. Estrogenic regulation of growth and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma. *Endocr Rev* 8:29-43.
- Dong XF, Berthois Y, Martin PM. 1991. Effect of epidermal growth factor on the proliferation of human epithelial cancer cell lines: correlation with the level of occupied EGF receptor. *Anticancer Res* 11:737-743.
- Dufourny B, Alblas J, van Teeffelen HA, van Schaik FM, van der Burg B, Steenbergh PH, Sussenbach JS. 1997. Mitogenic signaling of insulin-like growth factor I in MCF-7 human breast cancer cells requires phosphatidylinositol 3-kinase and is independent of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272:31163-31171.
- Dumay A, Feugeas JP, Wittmer E, Lehmann-Che J, Bertheau P, Espie M, Plassa LF, Cottu P, Marty M, Andre F, Sotiriou C, Pusztai L, de The H. 2013. Distinct tumor protein p53 mutants in breast cancer subgroups. *Int J Cancer* 132:1227-1231.
- Dumit VI, Dengel J. 2014. The cup of youth. *Cell Cycle* 13:2021.
- Dupont J, Fernandez AM, Glackin CA, Helman L, LeRoith D. 2001. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)-induced twist expression is involved in the anti-apoptotic effects of the IGF-1 receptor. *J Biol Chem* 276:26699-26707.
- Earp HS, 3rd, Calvo BF, Sartor CI. 2003. The EGF receptor family--multiple roles in proliferation, differentiation, and neoplasia with an emphasis on HER4. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 114:315-333; discussion 333-314.
- Eberwein P, Laird D, Schulz S, Reinhard T, Steinberg T, Tomakidi P. 2015. Modulation of focal adhesion constituents and their down-stream events by EGF: On the cross-talk of integrins and growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta* 1853:2183-2198.

- Edderkaoui M, Hong P, Vaquero EC, Lee JK, Fischer L, Friess H, Buchler MW, Lerch MM, Pandol SJ, Gukovskaya AS. 2005. Extracellular matrix stimulates reactive oxygen species production and increases pancreatic cancer cell survival through 5-lipoxygenase and NADPH oxidase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289:G1137-1147.
- Elumalai P, Arunkumar R, Benson CS, Sharmila G, Arunakaran J. 2014. Nimbolide inhibits IGF-I-mediated PI3K/Akt and MAPK signalling in human breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231). *Cell Biochem Funct* 32:476-484.
- Engel LW, Young NA, Tralka TS, Lippman ME, O'Brien SJ, Joyce MJ. 1978. Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer Res* 38:3352-3364.
- Engeland K. 2018. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. *Cell Death Differ* 25:114-132.
- Fagherazzi G, Touillaud MS, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Romieu I. 2011. No association between coffee, tea or caffeine consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Public Health Nutr* 14:1315-1320.
- Fattah OM, Cloutier SM, Kundig C, Felber LM, Gygi CM, Jichlinski P, Leisinger HJ, Gauthier ER, Mach JP, Deperthes D. 2006. Peptabody-EGF: a novel apoptosis inducer targeting ErbB1 receptor overexpressing cancer cells. *Int J Cancer* 119:2455-2463.
- Faulds MH, Olsen H, Helguero LA, Gustafsson JA, Haldosen LA. 2004. Estrogen receptor functional activity changes during differentiation of mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol* 18:412-421.
- Fears CY, Woods A. 2006. The role of syndecans in disease and wound healing. *Matrix Biol* 25:443-456.
- Fillmore CM, Kuperwasser C. 2008. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res* 10:R25.
- Filmus J, Pollak MN, Cailleau R, Buick RN. 1985. MDA-468, a human breast cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors, has an amplified EGF receptor gene and is growth inhibited by EGF. *Biochem Biophys Res Commun* 128:898-905.
- Folsom AR, McKenzie DR, Bisgard KM, Kushi LH, Sellers TA. 1993. No association between caffeine intake and postmenopausal breast cancer incidence in the Iowa Women's Health Study. *Am J Epidemiol* 138:380-383.
- Fox EM, Andrade J, Shupnik MA. 2009. Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways. *Steroids* 74:622-627.
- Fox EM, Bernaciak TM, Wen J, Weaver AM, Shupnik MA, Silva CM. 2008. Signal transducer and activator of transcription 5b, c-Src, and epidermal growth factor receptor signaling play integral roles in estrogen-stimulated proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 22:1781-1796.
- Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. 2010. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 123:4195-4200.
- Frykberg ER, Santiago F, Betsill WL, Jr., O'Brien PH. 1987. Lobular carcinoma in situ of the breast. *Surg Gynecol Obstet* 164:285-301.
- Fu X, Osborne CK, Schiff R. 2013. Biology and therapeutic potential of PI3K signaling in ER+/HER2-negative breast cancer. *Breast* 22 Suppl 2:S12-18.
- Fukushima Y, Ohie T, Yonekawa Y, Yonemoto K, Aizawa H, Mori Y, Watanabe M, Takeuchi M, Hasegawa M, Taguchi C, Kondo K. 2009. Coffee and green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population. *J Agric Food Chem* 57:1253-1259.
- Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, Bennett LM, Haugen-Strano A, Swensen J, Miki Y, et al. 1994. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 266:120-122.
- Gaben AM, Sabbah M, Redeuilh G, Bedin M, Mester J. 2012. Ligand-free estrogen receptor activity complements IGF1R to induce the proliferation of the MCF-7 breast cancer cells. *BMC Cancer* 12:291.
- Ganmaa D, Willett WC, Li TY, Feskanich D, van Dam RM, Lopez-Garcia E, Hunter DJ, Holmes MD. 2008. Coffee, tea, caffeine and risk of breast cancer: a 22-year follow-up. *Int J Cancer* 122:2071-2076.
- Gauci E, Altieri F, Turano C, Chichiarelli S. 2013. The protein ERp57 contributes to EGF receptor signaling and internalization in MDA-MB-468 breast cancer cells. *J Cell Biochem* 114:2461-2470.
- Gee JM, Robertson JF, Gutteridge E, Ellis IO, Pinder SE, Rubini M, Nicholson RI. 2005. Epidermal growth factor receptor/HER2/insulin-like growth factor receptor signalling and oestrogen receptor activity in clinical breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 12 Suppl 1:S99-S111.
- Gehm BD, McAndrews JM, Jordan VC, Jameson JL. 2000. EGF activates highly selective estrogen-responsive reporter plasmids by an ER-independent pathway. *Mol Cell Endocrinol* 159:53-62.
- Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:793-805.
- Geiger B, Yamada KM. 2011. Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.

- Ghosh S, Narla RK, Zheng Y, Liu XP, Jun X, Mao C, Sudbeck EA, Uckun FM. 1999. Structure-based design of potent inhibitors of EGF-receptor tyrosine kinase as anti-cancer agents. *Anticancer Drug Des* 14:403-410.
- Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. 2011. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* 278:16-27.
- Giorgetti S, Pelicci PG, Pelicci G, Van Obberghen E. 1994. Involvement of Src-homology/collagen (SHC) proteins in signaling through the insulin receptor and the insulin-like-growth-factor-I-receptor. *Eur J Biochem* 223:195-202.
- Gomez-Raposo C, Zambrana Tevar F, Sereno Moyano M, Lopez Gomez M, Casado E. 2010. Male breast cancer. *Cancer Treat Rev* 36:451-457.
- Grady KE. 1992. The efficacy of breast self-examination. *J Gerontol* 47 Spec No:69-74.
- Grant DS, Yenisey C, Rose RW, Tootell M, Santra M, Iozzo RV. 2002a. Decorin suppresses tumor cell-mediated angiogenesis. *Oncogene* 21:4765-4777.
- Grant SL, Hammacher A, Douglas AM, Goss GA, Mansfield RK, Heath JK, Begley CG. 2002b. An unexpected biochemical and functional interaction between gp130 and the EGF receptor family in breast cancer cells. *Oncogene* 21:460-474.
- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P. 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320:134-139.
- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. 2002. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 346:340-352.
- Gualberto A, Hixon ML, Karp DD, Li D, Green S, Dolled-Filhart M, Paz-Ares LG, Novello S, Blakely J, Langer CJ, Pollak MN. 2011. Pre-treatment levels of circulating free IGF-1 identify NSCLC patients who derive clinical benefit from figitumumab. *Br J Cancer* 104:68-74.
- Gude RP, Menon LG, Rao SG. 2001. Effect of Caffeine, a xanthine derivative, in the inhibition of experimental lung metastasis induced by B16F10 melanoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* 20:287-292.
- Guvakova MA, Adams JC, Boettiger D. 2002. Functional role of alpha-actinin, PI 3-kinase and MEK1/2 in insulin-like growth factor I receptor kinase regulated motility of human breast carcinoma cells. *J Cell Sci* 115:4149-4165.
- Guvakova MA, Surmacz E. 1997. Overexpressed IGF-I receptors reduce estrogen growth requirements, enhance survival, and promote E-cadherin-mediated cell-cell adhesion in human breast cancer cells. *Exp Cell Res* 231:149-162.
- Haberthür F, Saurenmann E, Schmid J. 1990. [Does breast self-examination affect the stage of breast carcinoma?]. *Schweiz Rundsch Med Prax* 79:1644-1648.
- Hall JM, Couse JF, Korach KS. 2001. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 276:36869-36872.
- Halvorsen BL, Carlsen MH, Phillips KM, Bohn SK, Holte K, Jacobs DR, Jr., Blomhoff R. 2006. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *Am J Clin Nutr* 84:95-135.
- Hanks SK, Polte TR. 1997. Signaling through focal adhesion kinase. *Bioessays* 19:137-145.
- Hanks SK, Ryzhova L, Shin NY, Brabek J. 2003. Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Front Biosci* 8:d982-996.
- Harburger DS, Calderwood DA. 2009. Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci* 122:159-163.
- Hart S, Fischer OM, Prenzel N, Zwick-Wallasch E, Schneider M, Hennighausen L, Ullrich A. 2005. GPCR-induced migration of breast carcinoma cells depends on both EGFR signal transactivation and EGFR-independent pathways. *Biol Chem* 386:845-855.
- Hawsawi Y, El-Gendy R, Twelves C, Speirs V, Beattie J. 2013. Insulin-like growth factor - oestradiol crosstalk and mammary gland tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1836:345-353.
- Holbro T, Civenni G, Hynes NE. 2003. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 284:99-110.
- Hong IK, Jin YJ, Byun HJ, Jeoung DI, Kim YM, Lee H. 2006. Homophilic interactions of Tetraspanin CD151 up-regulate motility and matrix metalloproteinase-9 expression of human melanoma cells through adhesion-dependent c-Jun activation signaling pathways. *J Biol Chem* 281:24279-24292.
- Huang WC, Chen YJ, Li LY, Wei YL, Hsu SC, Tsai SL, Chiu PC, Huang WP, Wang YN, Chen CH, Chang WC, Chang WC, Chen AJ, Tsai CH, Hung MC. 2011. Nuclear translocation of epidermal growth factor receptor by Akt-dependent phosphorylation enhances breast cancer-resistant protein expression in gefitinib-resistant cells. *J Biol Chem* 286:20558-20568.
- Hudelist G, Wagner T, Rosner M, Fink-Retter A, Gschwantler-Kaulich D, Czerwenka K, Kroiss R, Tea M, Pischinger K, Kostler WJ, Attems J, Mueller R, Blaukopf C, Kubista E, Hengstschlager M, Singer CF. 2007. Intratumoral IGF-I protein expression is selectively upregulated in breast cancer patients with BRCA1/2 mutations. *Endocr Relat Cancer* 14:1053-1062.
- Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. 2006. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* 119:3901-3903.

- Hynes NE, Stern DF. 1994. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1198:165-184.
- Ibrahim SA, Yip GW, Stock C, Pan JW, Neubauer C, Poeter M, Pujalis D, Koo CY, Kelsch R, Schule R, Rescher U, Kiesel L, Gotte M. 2012. Targeting of syndecan-1 by microRNA miR-10b promotes breast cancer cell motility and invasiveness via a Rho-GTPase- and E-cadherin-dependent mechanism. *Int J Cancer* 131:E884-896.
- Iglehart JD, Kraus MH, Langton BC, Huper G, Kerns BJ, Marks JR. 1990. Increased erbB-2 gene copies and expression in multiple stages of breast cancer. *Cancer Res* 50:6701-6707.
- Ignatz RA, Massague J. 1986. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261:4337-4345.
- Imamichi Y, Menke A. 2007. Signaling pathways involved in collagen-induced disruption of the E-cadherin complex during epithelial-mesenchymal transition. *Cells Tissues Organs* 185:180-190.
- Ioachim E, Charchanti A, Briasoulis E, Karavasilis V, Tsanou H, Arvanitis DL, Agnantis NJ, Pavlidis N. 2002. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. *Eur J Cancer* 38:2362-2370.
- Iozzo RV, Murdoch AD. 1996. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J* 10:598-614.
- Iozzo RV, Schaefer L. 2010. Proteoglycans in health and disease: novel regulatory signaling mechanisms evoked by the small leucine-rich proteoglycans. *FEBS J* 277:3864-3875.
- Iozzo RV, Schaefer L. 2015. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol* 42:11-55.
- Jarvelainen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R. 2009. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 61:198-223.
- Jensen EV, Jordan VC. 2003. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin Cancer Res* 9:1980-1989.
- Jeon Y, Song S, Kim H, Cheon YP. 2013. Diphlorethohydroxycarmalol of *Ishige okamurae* and Caffeine Modified the Expression of Extracellular Fibrillars during Adipogenesis of Mouse Subcutaneous Adipose Derived Stem Cell. *Dev Reprod* 17:275-287.
- Jeong EK, Lee SY, Jeon HM, Ju MK, Kim CH, Kang HS. 2010. Role of extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 in multicellular resistance to docetaxel in MCF-7 cells. *Int J Oncol* 37:655-661.
- Jiang W, Wu Y, Jiang X. 2013. Coffee and caffeine intake and breast cancer risk: an updated dose-response meta-analysis of 37 published studies. *Gynecol Oncol* 129:620-629.
- Johnson GL, Lapadat R. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298:1911-1912.
- Kahlert S, Nuedling S, van Eickels M, Vetter H, Meyer R, Grohe C. 2000. Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J Biol Chem* 275:18447-18453.
- Kasangian AA, Gherardi G, Biagioli E, Torri V, Moretti A, Bernardin E, Cordovana A, Farina G, Bramati A, Piva S, Dazzani MC, Paterno E, La Verde NM. 2017. The prognostic role of tumor size in early breast cancer in the era of molecular biology. *PLoS One* 12:e0189127.
- Kato H, Faria TN, Stannard B, Roberts CT, Jr., LeRoith D. 1994. Essential role of tyrosine residues 1131, 1135, and 1136 of the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor in IGF-I action. *Mol Endocrinol* 8:40-50.
- Kelsey JL. 1993. Breast cancer epidemiology: summary and future directions. *Epidemiol Rev* 15:256-263.
- Kim S, Lee J, Oh SJ, Nam SJ, Lee JE. 2015. Differential effect of EGFR inhibitors on tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Oncol Rep* 34:1613-1619.
- Kirkland SC. 2009. Type I collagen inhibits differentiation and promotes a stem cell-like phenotype in human colorectal carcinoma cells. *Br J Cancer* 101:320-326.
- Kirkpatrick CA, Selleck SB. 2007. Heparan sulfate proteoglycans at a glance. *J Cell Sci* 120:1829-1832.
- Klijn JG, Berns PM, Bontenbal M, Alexieva-Figusch J, Foekens JA. 1992. Clinical breast cancer, new developments in selection and endocrine treatment of patients. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43:211-221.
- Kousidou O, Berdiaki A, Kletsas D, Zafiroopoulos A, Theocharis AD, Tzanakakis GN, Karamanos NK. 2008. Estradiol-estrogen receptor: a key interplay of the expression of syndecan-2 and metalloproteinase-9 in breast cancer cells. *Mol Oncol* 2:223-232.
- Kouvidi K, Berdiaki A, Nikitovic D, Katonis P, Afratis N, Hascall VC, Karamanos NK, Tzanakakis GN. 2011. Role of receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM) in low molecular weight hyaluronan (LMWHA)-mediated fibrosarcoma cell adhesion. *J Biol Chem* 286:38509-38520.
- Kouvidi K, Berdiaki A, Tzardi M, Karousou E, Passi A, Nikitovic D, Tzanakakis GN. 2016. Receptor for hyaluronic acid- mediated motility (RHAMM) regulates HT1080 fibrosarcoma cell proliferation via a beta-catenin/c-myc signaling axis. *Biochim Biophys Acta* 1860:814-824.

- Kouvidi K, Nikitovic D, Berdiaki A, Tzanakakis GN. 2014. Hyaluronan/RHAMM interactions in mesenchymal tumor pathogenesis: role of growth factors. *Adv Cancer Res* 123:319-349.
- Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5925-5930.
- Lagios MD. 1990. Duct carcinoma in situ. *Pathology and treatment. Surg Clin North Am* 70:853-871.
- Lambaerts K, Wilcox-Adelman SA, Zimmermann P. 2009. The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans. *Curr Opin Cell Biol* 21:662-669.
- Lee WJ, Zhu BT. 2006. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis* 27:269-277.
- Lee YT. 1983. Breast carcinoma: pattern of metastasis at autopsy. *J Surg Oncol* 23:175-180.
- Leivonen M, Lundin J, Nordling S, von Boguslawski K, Haglund C. 2004. Prognostic value of syndecan-1 expression in breast cancer. *Oncology* 67:11-18.
- Lemmon MA, Ferguson KM, Schlessinger J. 1996. PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* 85:621-624.
- Lendorf ME, Manon-Jensen T, Kronqvist P, Mulhaupt HA, Couchman JR. 2011. Syndecan-1 and syndecan-4 are independent indicators in breast carcinoma. *J Histochem Cytochem* 59:615-629.
- Leon D, Albasanz JL, Ruiz MA, Fernandez M, Martin M. 2002. Adenosine A1 receptor down-regulation in mothers and fetal brain after caffeine and theophylline treatments to pregnant rats. *J Neurochem* 82:625-634.
- LeRoith D, Roberts CT, Jr. 2003. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 195:127-137.
- LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT, Jr. 1995. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16:143-163.
- Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, Fong SF, Csiszar K, Giaccia A, Wenginger W, Yamauchi M, Gasser DL, Weaver VM. 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139:891-906.
- Levin ER. 2003. Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor. *Mol Endocrinol* 17:309-317.
- Levin ER. 2005. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 19:1951-1959.
- Li J, Seibold P, Chang-Claude J, Flesch-Janys D, Liu J, Czene K, Humphreys K, Hall P. 2011. Coffee consumption modifies risk of estrogen-receptor negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 13:R49.
- Liu TJ, LaFortune T, Honda T, Ohmori O, Hatakeyama S, Meyer T, Jackson D, de Groot J, Yung WK. 2007. Inhibition of both focal adhesion kinase and insulin-like growth factor-I receptor kinase suppresses glioma proliferation in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 6:1357-1367.
- Liu W, Bloom DA, Cance WG, Kurenova EV, Golubovskaya VM, Hochwald SN. 2008. FAK and IGF-IR interact to provide survival signals in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis* 29:1096-1107.
- Lluch A, Eroles P, Perez-Fidalgo JA. 2014. Emerging EGFR antagonists for breast cancer. *Expert Opin Emerg Drugs* 19:165-181.
- Lowcock EC, Cotterchio M, Anderson LN, Boucher BA, El-Sohemy A. 2013. High coffee intake, but not caffeine, is associated with reduced estrogen receptor negative and postmenopausal breast cancer risk with no effect modification by CYP1A2 genotype. *Nutr Cancer* 65:398-409.
- Lu YP, Lou YR, Xie JG, Peng QY, Zhou S, Lin Y, Shih WJ, Conney AH. 2007. Caffeine and caffeine sodium benzoate have a sunscreen effect, enhance UVB-induced apoptosis, and inhibit UVB-induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice. *Carcinogenesis* 28:199-206.
- Lyu H, Yang XH, Edgerton SM, Thor AD, Wu X, He Z, Liu B. 2016. The erbB3- and IGF-1 receptor-initiated signaling pathways exhibit distinct effects on lapatinib sensitivity against trastuzumab-resistant breast cancer cells. *Oncotarget* 7:2921-2935.
- Maeda T, Alexander CM, Friedl A. 2004. Induction of syndecan-1 expression in stromal fibroblasts promotes proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Res* 64:612-621.
- Malavaki CJ, Roussidis AE, Gialeli C, Kletsas D, Tsegenidis T, Theocharis AD, Tzanakakis GN, Karamanos NK. 2013. Imatinib as a key inhibitor of the platelet-derived growth factor receptor mediated expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans and functional properties of breast cancer cells. *FEBS J* 280:2477-2489.
- Mamay CL, Mingo-Sion AM, Wolf DM, Molina MD, Van Den Berg CL. 2003. An inhibitory function for JNK in the regulation of IGF-I signaling in breast cancer. *Oncogene* 22:602-614.
- Martin EC, Bratton MR, Zhu Y, Rhodes LV, Tilghman SL, Collins-Burow BM, Burow ME. 2012. Insulin-like growth factor-1 signaling regulates miRNA expression in MCF-7 breast cancer cell line. *PLoS One* 7:e49067.
- Martin JL, de Silva HC, Lin MZ, Scott CD, Baxter RC. 2014. Inhibition of insulin-like growth factor-binding protein-3 signaling through sphingosine kinase-1 sensitizes triple-negative breast cancer cells to EGF receptor blockade. *Mol Cancer Ther* 13:316-328.

- Masiakowski P, Breathnach R, Bloch J, Gannon F, Krust A, Chambon P. 1982. Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res* 10:7895-7903.
- Massague J, Pandiella A. 1993. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* 62:515-541.
- Mathew TS, Ferris RK, Downs RM, Kinsey ST, Baumgarner BL. 2014. Caffeine promotes autophagy in skeletal muscle cells by increasing the calcium-dependent activation of AMP-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 453:411-418.
- Matlashewski G, Lamb P, Pim D, Peacock J, Crawford L, Benchimol S. 1984. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J* 3:3257-3262.
- McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Lee JT, Chang F, Bertrand FE, Navolanic PM, Terrian DM, Franklin RA, D'Assoro AB, Salisbury JL, Mazzarino MC, Stivala F, Libra M. 2006. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul* 46:249-279.
- McDonnell DP, Norris JD. 2002. Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* 296:1642-1644.
- McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, Frame MC. 2005. The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer* 5:505-515.
- McPherson K, Steel CM, Dixon JM. 2000. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 321:624-628.
- Melnikow J, Fenton JJ, Whitlock EP, Miglioretti DL, Weyrich MS, Thompson JH, Shah K. 2016. Supplemental Screening for Breast Cancer in Women With Dense Breasts: A Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 164:268-278.
- Mendelsohn J, Baselga J. 2000. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 19:6550-6565.
- Mendoza RA, Moody EE, Enriquez MI, Mejia SM, Thordarson G. 2011. Tumorigenicity of MCF-7 human breast cancer cells lacking the p38alpha mitogen-activated protein kinase. *J Endocrinol* 208:11-19.
- Metalli D, Lovat F, Tripodi F, Genua M, Xu SQ, Spinelli M, Alberghina L, Vanoni M, Baffa R, Gomella LG, Iozzo RV, Morrione A. 2010. The insulin-like growth factor receptor I promotes motility and invasion of bladder cancer cells through Akt- and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of paxillin. *Am J Pathol* 176:2997-3006.
- Meyer D, Birchmeier C. 1995. Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378:386-390.
- Mezi S, Todi L, Orsi E, Angeloni A, Mancini P. 2012. Involvement of the Src-cortactin pathway in migration induced by IGF-1 and EGF in human breast cancer cells. *Int J Oncol* 41:2128-2138.
- Michels KB, Holmberg L, Bergkvist L, Wolk A. 2002. Coffee, tea, and caffeine consumption and breast cancer incidence in a cohort of Swedish women. *Ann Epidemiol* 12:21-26.
- Milani A, Geuna E, Mittica G, Valabrega G. 2014. Overcoming endocrine resistance in metastatic breast cancer: Current evidence and future directions. *World J Clin Oncol* 5:990-1001.
- Minton JP, Foeking MK, Webster DJ, Matthews RH. 1979. Caffeine, cyclic nucleotides, and breast disease. *Surgery* 86:105-109.
- Mitropoulou TN, Theocharis AD, Nikitovic D, Karamanos NK, Tzanakakis GN. 2004. IGF-I affects glycosaminoglycan/proteoglycan synthesis in breast cancer cells through tyrosine kinase-dependent and -independent pathways. *Biochimie* 86:251-259.
- Morrione A, Valentini B, Li S, Ooi JY, Margolis B, Baserga R. 1996. Grb10: A new substrate of the insulin-like growth factor I receptor. *Cancer Res* 56:3165-3167.
- Mundhenke C, Meyer K, Drew S, Friedl A. 2002. Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 receptor binding in breast carcinomas. *Am J Pathol* 160:185-194.
- Myers MG, Jr., Sun XJ, Cheatham B, Jachna BR, Glasheen EM, Backer JM, White MF. 1993. IRS-1 is a common element in insulin and insulin-like growth factor-I signaling to the phosphatidylinositol 3'-kinase. *Endocrinology* 132:1421-1430.
- Myers MG, Jr., Sun XJ, White MF. 1994a. The IRS-1 signaling system. *Trends Biochem Sci* 19:289-293.
- Myers MG, Jr., Wang LM, Sun XJ, Zhang Y, Yenush L, Schlessinger J, Pierce JH, White MF. 1994b. Role of IRS-1-GRB-2 complexes in insulin signaling. *Mol Cell Biol* 14:3577-3587.
- Mytilinaiou M, Bano A, Nikitovic D, Berdiaki A, Voudouri K, Kalogeraki A, Karamanos NK, Tzanakakis GN. 2013. Syndecan-2 is a key regulator of transforming growth factor beta 2/Smad2-mediated adhesion in fibrosarcoma cells. *IUBMB Life* 65:134-143.
- Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW. 2006. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10:515-527.

- Nguyen KT, Wang WJ, Chan JL, Wang LH. 2000. Differential requirements of the MAP kinase and PI3 kinase signaling pathways in Src- versus insulin and IGF-1 receptors-induced growth and transformation of rat intestinal epithelial cells. *Oncogene* 19:5385-5397.
- Nikitovic D, Assouti M, Sifaki M, Katonis P, Krasagakis K, Karamanos NK, Tzanakakis GN. 2008. Chondroitin sulfate and heparan sulfate-containing proteoglycans are both partners and targets of basic fibroblast growth factor-mediated proliferation in human metastatic melanoma cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* 40:72-83.
- Nikitovic D, Kouvidi K, Karamanos NK, Tzanakakis GN. 2013. The roles of hyaluronan/RHAMM/CD44 and their respective interactions along the insidious pathways of fibrosarcoma progression. *Biomed Res Int* 2013:929531.
- Nikitovic D, Kouvidi K, Voudouri K, Berdiaki A, Karousou E, Passi A, Tzanakakis GN. 2014a. The motile breast cancer phenotype roles of proteoglycans/glycosaminoglycans. *Biomed Res Int* 2014:124321.
- Nikitovic D, Mytilinaiou M, Berdiaki A, Karamanos NK, Tzanakakis GN. 2014b. Heparan sulfate proteoglycans and heparin regulate melanoma cell functions. *Biochim Biophys Acta* 1840:2471-2481.
- Nikitovic D, Papoutsidakis A, Karamanos NK, Tzanakakis GN. 2014c. Lumican affects tumor cell functions, tumor-ECM interactions, angiogenesis and inflammatory response. *Matrix Biol* 35:206-214.
- Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81:1535-1565.
- Nkondjock A. 2009. Coffee consumption and the risk of cancer: an overview. *Cancer Lett* 277:121-125.
- O'Mahony M, Comber H, Fitzgerald T, Corrigan MA, Fitzgerald E, Grunfeld EA, Flynn MG, Hegarty J. 2017. Interventions for raising breast cancer awareness in women. *Cochrane Database Syst Rev* 2:CD011396.
- Okano J, Nagahara T, Matsumoto K, Murawaki Y. 2008. Caffeine inhibits the proliferation of liver cancer cells and activates the MEK/ERK/EGFR signalling pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102:543-551.
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. 2000. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19:3159-3167.
- Oliveira CA, Nie R, Carnes K, Franca LR, Prins GS, Saunders PT, Hess RA. 2003. The antiestrogen ICI 182,780 decreases the expression of estrogen receptor-alpha but has no effect on estrogen receptor-beta and androgen receptor in rat efferent ductules. *Reprod Biol Endocrinol* 1:75.
- Ondrusek N, Warner E, Goel V. 1999. Development of a knowledge scale about breast cancer and heredity (BCHK). *Breast Cancer Res Treat* 53:69-75.
- Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS. 1997. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 277:1508-1510.
- Pankov R, Yamada KM. 2002. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 115:3861-3863.
- Park J, Schwarzbauer JE. 2014. Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 33:1649-1657.
- Parrizas M, Gazit A, Levitzki A, Wertheimer E, LeRoith D. 1997. Specific inhibition of insulin-like growth factor-1 and insulin receptor tyrosine kinase activity and biological function by tyrphostins. *Endocrinology* 138:1427-1433.
- Parsons JT. 2003. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 116:1409-1416.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747-752.
- Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. 2007. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 28:622-629.
- Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA. 1997. Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* 11:1486-1496.
- Pietras RJ. 2003. Interactions between estrogen and growth factor receptors in human breast cancers and the tumor-associated vasculature. *Breast J* 9:361-373.
- Pietrocola F, Malik SA, Marino G, Vacchelli E, Senovilla L, Chaba K, Niso-Santano M, Maiuri MC, Madeo F, Kroemer G. 2014. Coffee induces autophagy in vivo. *Cell Cycle* 13:1987-1994.
- Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Klapper L, Lavi S, Seger R, Ratzkin BJ, Sela M, Yarden Y. 1996. Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J* 15:2452-2467.
- Piperigkou Z, Bouris P, Onisto M, Franchi M, Kletsas D, Theocharis AD, Karamanos NK. 2016. Estrogen receptor beta modulates breast cancer cells functional properties, signaling and expression of matrix molecules. *Matrix Biol* 56:4-23.
- Playdon MC, Ziegler RG, Sampson JN, Stolzenberg-Solomon R, Thompson HJ, Irwin ML, Mayne ST, Hoover RN, Moore SC. 2017. Nutritional metabolomics and breast cancer risk in a prospective study. *Am J Clin Nutr*.

- Poirier E, Desbiens C, Poirier B, Boudreau D, Jacob S, Lemieux J, Doyle C, Diorio C, Hogue JC, Provencher L. 2017. Characteristics and long-term survival of patients diagnosed with pure tubular carcinoma of the breast. *J Surg Oncol*.
- Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. 2004. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 4:505-518.
- Prisco M, Hongo A, Rizzo MG, Sacchi A, Baserga R. 1997. The insulin-like growth factor I receptor as a physiologically relevant target of p53 in apoptosis caused by interleukin-3 withdrawal. *Mol Cell Biol* 17:1084-1092.
- Probst-Hensch NM, Steiner JH, Schraml P, Varga Z, Zurrer-Hardi U, Storz M, Korol D, Fehr MK, Fink D, Pestalozzi BC, Lutolf UM, Theurillat JP, Moch H. 2010. IGFBP2 and IGFBP3 protein expressions in human breast cancer: association with hormonal factors and obesity. *Clin Cancer Res* 16:1025-1032.
- Ravi D, Muniyappa H, Das KC. 2008. Caffeine inhibits UV-mediated NF-kappaB activation in A2058 melanoma cells: an ATM-PKCdelta-p38 MAPK-dependent mechanism. *Mol Cell Biochem* 308:193-200.
- Ricketts WA, Rose DW, Shoelson S, Olefsky JM. 1996. Functional roles of the Shc phosphotyrosine binding and Src homology 2 domains in insulin and epidermal growth factor signaling. *J Biol Chem* 271:26165-26169.
- Riese DJ, 2nd, Stern DF. 1998. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 20:41-48.
- Ronnov-Jessen L, Petersen OW, Bissell MJ. 1996. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol Rev* 76:69-125.
- Rosendahl AH, Perks CM, Zeng L, Markkula A, Simonsson M, Rose C, Ingvar C, Holly JM, Jernstrom H. 2015. Caffeine and Caffeic Acid Inhibit Growth and Modify Estrogen Receptor and Insulin-like Growth Factor I Receptor Levels in Human Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 21:1877-1887.
- Rosianu A, Tudose N. 1998. Correlation between p53 expression and other prognostic factors in breast cancer. *Rom J Morphol Embryol* 44:133-140.
- Roskoski R, Jr. 2014. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res* 79:34-74.
- Rozario T, DeSimone DW. 2010. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol* 341:126-140.
- Ruderman JV. 1993. MAP kinase and the activation of quiescent cells. *Curr Opin Cell Biol* 5:207-213.
- Saiki S, Sasazawa Y, Imamichi Y, Kawajiri S, Fujimaki T, Tanida I, Kobayashi H, Sato F, Sato S, Ishikawa K, Imoto M, Hattori N. 2011. Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. *Autophagy* 7:176-187.
- Sarfstein R, Maor S, Reizner N, Abramovitch S, Werner H. 2006. Transcriptional regulation of the insulin-like growth factor-I receptor gene in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 252:241-246.
- Sarfstein R, Pasmanik-Chor M, Yeheskel A, Edry L, Shomron N, Warman N, Wertheimer E, Maor S, Shochat L, Werner H. 2012. Insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) translocates to nucleus and autoregulates IGF-IR gene expression in breast cancer cells. *J Biol Chem* 287:2766-2776.
- Sarkissyan S, Sarkissyan M, Wu Y, Cardenas J, Koeffler HP, Vadgama JV. 2014. IGF-1 regulates Cyr61 induced breast cancer cell proliferation and invasion. *PLoS One* 9:e103534.
- Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. 2011. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Scalbert A, Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130:2073S-2085S.
- Schaefer L, Schaefer RM. 2010. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res* 339:237-246.
- Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Parsons JT. 1992. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5192-5196.
- Schmidt S, Friedl P. 2010. Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell Tissue Res* 339:83-92.
- Schnarr B, Strunz K, Ohsam J, Benner A, Wacker J, Mayer D. 2000. Down-regulation of insulin-like growth factor-I receptor and insulin receptor substrate-1 expression in advanced human breast cancer. *Int J Cancer* 89:506-513.
- Schwarzbauer JE, Sechler JL. 1999. Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. *Curr Opin Cell Biol* 11:622-627.
- Sepp-Lorenzino L. 1998. Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor. *Breast Cancer Res Treat* 47:235-253.
- Shaffrey ME, Mut M, Asher AL, Burri SH, Chahlavi A, Chang SM, Farace E, Fiveash JB, Lang FF, Lopes MB, Markert JM, Schiff D, Siomin V, Tatter SB, Vogelbaum MA. 2004. Brain metastases. *Curr Probl Surg* 41:665-741.
- Shao D, Lazar MA. 1999. Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J Clin Invest* 103:1617-1618.

- Shukla V, Coumoul X, Cao L, Wang RH, Xiao C, Xu X, Ando S, Yakar S, Leroith D, Deng C. 2006. Absence of the full-length breast cancer-associated gene-1 leads to increased expression of insulin-like growth factor signaling axis members. *Cancer Res* 66:7151-7157.
- Shupnik MA. 2004. Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation. *Oncogene* 23:7979-7989.
- Skandalis SS, Afratis N, Smirlaki G, Nikitovic D, Theocharis AD, Tzanakakis GN, Karamanos NK. 2014. Cross-talk between estradiol receptor and EGFR/IGF-IR signaling pathways in estrogen-responsive breast cancers: focus on the role and impact of proteoglycans. *Matrix Biol* 35:182-193.
- Skolnik EY, Lee CH, Batzer A, Vicentini LM, Zhou M, Daly R, Myers MJ, Jr., Backer JM, Ullrich A, White MF, et al. 1993. The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. *EMBO J* 12:1929-1936.
- Smith DF, Toft DO. 1993. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 7:4-11.
- Smith ML, Gourdon D, Little WC, Kubow KE, Eguiluz RA, Luna-Morris S, Vogel V. 2007. Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells. *PLoS Biol* 5:e268.
- Song RX, Barnes CJ, Zhang Z, Bao Y, Kumar R, Santen RJ. 2004. The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2076-2081.
- Song RX, Chen Y, Zhang Z, Bao Y, Yue W, Wang JP, Fan P, Santen RJ. 2010. Estrogen utilization of IGF-1-R and EGF-R to signal in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 118:219-230.
- Song RX, Zhang Z, Chen Y, Bao Y, Santen RJ. 2007. Estrogen signaling via a linear pathway involving insulin-like growth factor I receptor, matrix metalloproteinases, and epidermal growth factor receptor to activate mitogen-activated protein kinase in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 148:4091-4101.
- Stanley MJ, Stanley MW, Sanderson RD, Zera R. 1999. Syndecan-1 expression is induced in the stroma of infiltrating breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 112:377-383.
- Stern DF, Heffernan PA, Weinberg RA. 1986. p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity. *Mol Cell Biol* 6:1729-1740.
- Stevanovic A, Lee P, Wilcken N. 2006. Metastatic breast cancer. *Aust Fam Physician* 35:309-312.
- Stevens KN, Vachon CM, Couch FJ. 2013. Genetic susceptibility to triple-negative breast cancer. *Cancer Res* 73:2025-2030.
- Suh YA, Kim JH, Sung MA, Boo HJ, Yun HJ, Lee SH, Lee HJ, Min HY, Suh YG, Kim KW, Lee HY. 2013. A novel antitumor activity of deguelin targeting the insulin-like growth factor (IGF) receptor pathway via up-regulation of IGF-binding protein-3 expression in breast cancer. *Cancer Lett* 332:102-109.
- Surmacz E. 2000. Function of the IGF-I receptor in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5:95-105.
- Suva LJ, Griffin RJ, Makhoul I. 2009. Mechanisms of bone metastases of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 16:703-713.
- Taliaferro-Smith L, Oberlick E, Liu T, McGlothen T, Alcaide T, Tobin R, Donnelly S, Commander R, Kline E, Nagaraju GP, Havel L, Marcus A, Nahta R, O'Regan R. 2015. FAK activation is required for IGF1R-mediated regulation of EMT, migration, and invasion in mesenchymal triple negative breast cancer cells. *Oncotarget* 6:4757-4772.
- Tang N, Zhou B, Wang B, Yu R. 2009. Coffee consumption and risk of breast cancer: a metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol* 200:290 e291-299.
- Tanis PJ, Nieweg OE, Valdes Olmos RA, Kroon BB. 2001. Anatomy and physiology of lymphatic drainage of the breast from the perspective of sentinel node biopsy. *J Am Coll Surg* 192:399-409.
- Tavani A, Pregnolato A, La Vecchia C, Favero A, Franceschi S. 1998. Coffee consumption and the risk of breast cancer. *Eur J Cancer Prev* 7:77-82.
- Tennant MK, Thrasher JB, Twomey PA, Drivdahl RH, Birnbaum RS, Plymate SR. 1996. Protein and messenger ribonucleic acid (mRNA) for the type 1 insulin-like growth factor (IGF) receptor is decreased and IGF-II mRNA is increased in human prostate carcinoma compared to benign prostate epithelium. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3774-3782.
- Teranishi S, Kimura K, Nishida T. 2009. Role of formation of an ERK-FAK-paxillin complex in migration of human corneal epithelial cells during wound closure in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:5646-5652.
- Theissig F, Kunze KD, Haroske G, Meyer W. 1990. Histological grading of breast cancer. Interobserver, reproducibility and prognostic significance. *Pathol Res Pract* 186:732-736.
- Theocharis AD, Skandalis SS, Neill T, Multhaupt HA, Hubo M, Frey H, Gopal S, Gomes A, Afratis N, Lim HC, Couchman JR, Filmus J, Sanderson RD, Schaefer L, Iozzo RV, Karamanos NK. 2015. Insights into the key roles of proteoglycans in breast cancer biology and translational medicine. *Biochim Biophys Acta* 1855:276-300.
- Theocharis AD, Skandalis SS, Tzanakakis GN, Karamanos NK. 2010. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *FEBS J* 277:3904-3923.

- Trebaul A, Chan EK, Midwood KS. 2007. Regulation of fibroblast migration by tenascin-C. *Biochem Soc Trans* 35:695-697.
- Trotter TN, Yang Y. 2016. Matricellular proteins as regulators of cancer metastasis to bone. *Matrix Biol* 52-54:301-314.
- Tsang KY, Cheung MC, Chan D, Cheah KS. 2010. The developmental roles of the extracellular matrix: beyond structure to regulation. *Cell Tissue Res* 339:93-110.
- Tsonis AI, Afratis N, Gialeli C, Ellina MI, Piperigkou Z, Skandalis SS, Theocharis AD, Tzanakakis GN, Karamanos NK. 2013. Evaluation of the coordinated actions of estrogen receptors with epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor in the expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans and cell motility in breast cancer cells. *FEBS J* 280:2248-2259.
- Tucker RP, Chiquet-Ehrismann R. 2009. The regulation of tenascin expression by tissue microenvironments. *Biochim Biophys Acta* 1793:888-892.
- Turkoz FP, Solak M, Petekkaya I, Keskin O, Kertmen N, Sarici F, Arik Z, Babacan T, Ozisik Y, Altundag K. 2013. Association between common risk factors and molecular subtypes in breast cancer patients. *Breast* 22:344-350.
- Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E, et al. 1986. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 5:2503-2512.
- van Agthoven T, Timmermans M, Foekens JA, Dorssers LC, Henzen-Logmans SC. 1994. Differential expression of estrogen, progesterone, and epidermal growth factor receptors in normal, benign, and malignant human breast tissues using dual staining immunohistochemistry. *Am J Pathol* 144:1238-1246.
- van Agthoven T, Veldscholte J, Smid M, van Agthoven TL, Vreede L, Broertjes M, de Vries I, de Jong D, Sarwari R, Dorssers LC. 2009. Functional identification of genes causing estrogen independence of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 114:23-30.
- Voudouri K, Berdiaki A, Tzardi M, Tzanakakis GN, Nikitovic D. 2015. Insulin-like growth factor and epidermal growth factor signaling in breast cancer cell growth: focus on endocrine resistant disease. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2015:975495.
- Voudouri K, Nikitovic D, Berdiaki A, Kletsas D, Karamanos NK, Tzanakakis GN. 2016. IGF-I/EGF and E2 signaling crosstalk through IGF-IR conduit point affects breast cancer cell adhesion. *Matrix Biol* 56:95-113.
- Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. 2014. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch* 465:1-14.
- Wang Q, Zhang H, Fishel R, Greene MI. 2000. BRCA1 and cell signaling. *Oncogene* 19:6152-6158.
- Webster NJ, Resnik JL, Reichart DB, Strauss B, Haas M, Seely BL. 1996. Repression of the insulin receptor promoter by the tumor suppressor gene product p53: a possible mechanism for receptor overexpression in breast cancer. *Cancer Res* 56:2781-2788.
- Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LF, de Jong D, Van de Vijver MJ, Van't Veer LJ, Peterse JL. 2008. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol* 216:141-150.
- Weiner TM, Liu ET, Craven RJ, Cance WG. 1993. Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet* 342:1024-1025.
- Werner H, Bach MA, Stannard B, Roberts CT, Jr., LeRoith D. 1992. Structural and functional analysis of the insulin-like growth factor I receptor gene promoter. *Mol Endocrinol* 6:1545-1558.
- Werner H, Karnieli E, Rauscher FJ, LeRoith D. 1996. Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8318-8323.
- Werner H, Maor S. 2006. The insulin-like growth factor-I receptor gene: a downstream target for oncogene and tumor suppressor action. *Trends Endocrinol Metab* 17:236-242.
- White MF, Kahn CR. 1994. The insulin signaling system. *J Biol Chem* 269:1-4.
- Whyte J, Bergin O, Bianchi A, McNally S, Martin F. 2009. Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development. *Breast Cancer Res* 11:209.
- Witkowska HE, Carlquist M, Engstrom O, Carlsson B, Bonn T, Gustafsson JA, Shackleton CH. 1997. Characterization of bacterially expressed rat estrogen receptor beta ligand binding domain by mass spectrometry: structural comparison with estrogen receptor alpha. *Steroids* 62:621-631.
- Woodward TL, Xie J, Fendrick JL, Haslam SZ. 2000. Proliferation of mouse mammary epithelial cells in vitro: interactions among epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, ovarian hormones, and extracellular matrix proteins. *Endocrinology* 141:3578-3586.
- Wu X, Hawse JR, Subramaniam M, Goetz MP, Ingle JN, Spelsberg TC. 2009. The tamoxifen metabolite, endoxifen, is a potent antiestrogen that targets estrogen receptor alpha for degradation in breast cancer cells. *Cancer Res* 69:1722-1727.

- Wu YM, Chen ZJ, Liu H, Wei WD, Lu LL, Yang XL, Liang WT, Liu T, Liu HL, Du J, Wang HS. 2015. Inhibition of ER α suppresses epithelial mesenchymal transition of triple negative breast cancer cells by directly targeting fibronectin. *Oncotarget* 6:25588-25601.
- Yakar S, Leroith D, Brodt P. 2005. The role of the growth hormone/insulin-like growth factor axis in tumor growth and progression: Lessons from animal models. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:407-420.
- Yang Y, Yee D. 2012. Targeting insulin and insulin-like growth factor signaling in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 17:251-261.
- Yao W, Feng D, Bian W, Yang L, Li Y, Yang Z, Xiong Y, Zheng J, Zhai R, He J. 2012. EBP50 inhibits EGF-induced breast cancer cell proliferation by blocking EGFR phosphorylation. *Amino Acids* 43:2027-2035.
- Yarden Y, Sliwkowski MX. 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:127-137.
- Yee D. 2012. Insulin-like growth factor receptor inhibitors: baby or the bathwater? *J Natl Cancer Inst* 104:975-981.
- Yee D, Lee AV. 2000. Crosstalk between the insulin-like growth factors and estrogens in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5:107-115.
- Yen TW, Hunt KK, Ross MI, Mirza NQ, Babiera GV, Meric-Bernstam F, Singletary SE, Symmans WF, Giordano SH, Feig BW, Ames FC, Kuerer HM. 2005. Predictors of invasive breast cancer in patients with an initial diagnosis of ductal carcinoma in situ: a guide to selective use of sentinel lymph node biopsy in management of ductal carcinoma in situ. *J Am Coll Surg* 200:516-526.
- Yu Z, Gao W, Jiang E, Lu F, Zhang L, Shi Z, Wang X, Chen L, Lv T. 2013. Interaction between IGF-IR and ER induced by E2 and IGF-I. *PLoS One* 8:e62642.
- Zhan Y, Zhang Y, Liu C, Zhang J, Smith WW, Wang N, Chen Y, Zheng L, He L. 2012. A novel taspine derivative, HMQ1611, inhibits breast cancer cell growth via estrogen receptor alpha and EGF receptor signaling pathways. *Cancer Prev Res (Phila)* 5:864-873.
- Zhang S, Li X, Burghardt R, Smith R, 3rd, Safe SH. 2005. Role of estrogen receptor (ER) alpha in insulin-like growth factor (IGF)-I-induced responses in MCF-7 breast cancer cells. *J Mol Endocrinol* 35:433-447.
- Zhang X, Deng H, Wang ZY. 2014. Estrogen activation of the mitogen-activated protein kinase is mediated by ER-alpha36 in ER-positive breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 143:434-443.
- Zhang X, Meng J, Wang ZY. 2012. A switch role of Src in the biphasic EGF signaling of ER-negative breast cancer cells. *PLoS One* 7:e41613.
- Zhang Y, Moerkens M, Ramaiahgari S, de Bont H, Price L, Meerman J, van de Water B. 2011. Elevated insulin-like growth factor 1 receptor signaling induces antiestrogen resistance through the MAPK/ERK and PI3K/Akt signaling routes. *Breast Cancer Res* 13:R52.
- Zhang Y, Ren H. 2017. Meta-analysis of diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging and mammography for breast cancer. *J Cancer Res Ther* 13:862-868.
- Zhang Z. 2015. Platelet indices in the prognostication of critically ill patients: another piece of the puzzle. *J Crit Care* 30:434-435.
- Zhang Z, Chen Q, Zhang J, Wang Y, Hu X, Yin S, He M, Guan S, Qin W, Xiao Q, Zhao H, Yao W, Wu H, Wei M. 2017. Associations of genetic polymorphisms in pTEN/AKT/mTOR signaling pathway genes with cancer risk: A meta-analysis in Asian population. *Sci Rep* 7:17844.
- Zheng D, Kurenova E, Ucar D, Golubovskaya V, Magis A, Ostrov D, Cance WG, Hochwald SN. 2009. Targeting of the protein interaction site between FAK and IGF-1R. *Biochem Biophys Res Commun* 388:301-305.
- Zigmond SH. 1996. Signal transduction and actin filament organization. *Curr Opin Cell Biol* 8:66-73.

Review Article

Insulin-Like Growth Factor and Epidermal Growth Factor Signaling in Breast Cancer Cell Growth: Focus on Endocrine Resistant Disease

Kallirroi Voudouri,¹ Aikaterini Berdiaki,¹ Maria Tzardi,²
George N. Tzanakakis,¹ and Dragana Nikitovic¹

¹Laboratory of Anatomy-Histology-Embryology, School of Medicine, University of Crete, 71003 Heraklion, Greece

²Laboratory of Pathology, School of Medicine, University of Crete, 71003 Heraklion, Greece

Correspondence should be addressed to Dragana Nikitovic; dnikitovic@med.uoc.gr

Received 30 April 2015; Accepted 5 July 2015

Academic Editor: Matthias Stope

Copyright © 2015 Kallirroi Voudouri et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Breast cancer is the most common type of cancer for women worldwide with a lifetime risk amounting to a staggering total of 10%. It is well established that the endogenous synthesis of insulin-like growth factor (IGF) and epidermal growth factor (EGF) polypeptide growth factors are closely correlated to malignant transformation and all the steps of the breast cancer metastatic cascade. Numerous studies have demonstrated that both estrogens and growth factors stimulate the proliferation of steroid-dependent tumor cells, and that the interaction between these signaling pathways occurs at several levels. Importantly, the majority of breast cancer cases are estrogen receptor- (ER-) positive which have a more favorable prognosis and pattern of recurrence with endocrine therapy being the backbone of treatment. Unfortunately, the majority of patients progress to endocrine therapy resistant disease (acquired resistance) whereas a proportion of patients may fail to respond to initial therapy (de novo resistance). The IGF-I and EGF downstream signaling pathways are closely involved in the process of progression to therapy resistant disease. Modifications in the bioavailability of these growth factors contribute critically to disease progression. In the present review therefore, we will discuss in depth how IGF and EGF signaling participate in breast cancer pathogenesis and progression to endocrine resistant disease.

1. Introduction

Breast cancer is the most common type of cancer for women worldwide. Its lifetime risk amounts to a staggering total of 10% where approximately 15–20% of all breast cancers are associated with genetic predisposition [1]. It is well established that breast cancer growth is regulated by the endogenous synthesis of polypeptide growth factors [2] and by growth factors produced at distant sites [3]. Both growth factors and steroids can stimulate proliferation of steroid-dependent tumor cells, and interaction between these signaling pathways occurs at several levels. Indeed, breast cancer is categorized into histopathologic subtypes based on estrogen (ER) and progesterone (PR) hormone receptor status and HER2/ErbB2 epidermal growth factor (EGF) receptors' expression levels. Namely, about 75% of all breast cancers

are estrogen receptor- (ER-) positive [4]. This type of breast cancer generally has a more favorable prognosis and pattern of recurrence with endocrine therapy being the backbone of treatment. Antiestrogens and aromatase inhibitors can effectively induce tumor responses in a large proportion of these patients. However, the majority of patients progress during endocrine therapy to resistant disease (acquired resistance) and a proportion of patients may fail to respond to initial therapy (de novo resistance) [4]. Importantly, several steroid responses have now been functionally linked to other intracellular signaling pathways, including c-Src or tyrosine kinase receptors [5]. Moreover, endocrine resistant breast cancer has been correlated to the activation of other signaling pathways, including insulin-like growth factor (IGF) and epidermal growth factor (EGF) pathway [4]. Indeed, endocrine resistance is associated with overexpression of IGF and EGF

signaling pathway components, including EGFR, HER2, IGF-IR, and c-Src [6]. Dissecting signaling pathways involved in endocrine and targeted therapy resistant disease is critical for developing novel, more efficient strategies.

2. Epidermal Growth Factors Family

The significant role of EGF family members and their respective ErbB receptors in breast cancer cell pathogenesis is well established [7]. The EGF family consists of EGF, transforming growth factor- α (TGF- α), heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF), amphiregulin (AR), epiregulin (EPR), betacellulin (BTC) and neuregulins (NRGs) [8, 9]. All family members are synthesized as membrane-anchored precursors and their ectodomains cleaved to release the soluble form of growth factor, subsequent to a proteolytic process [7, 10].

The ErbB family of receptors structurally related to EGFR, is composed of ErbB1 (also known as EGFR or HER1), ErbB2 (HER2/Neu), ErbB3 (HER3), and ErbB4 (HER4) [8, 11]. Structurally, the ErbB receptors are composed of an extracellular domain rich in cysteine, a single membrane region and a large cytoplasmic domain [7]. All specific ErbB ligands have an EGF-like domain that endows them with high binding specificity [11, 12]. The extracellular domain is the ligand-binding site of ErbB receptors whereas the cytoplasmic domain has tyrosine protein kinase activity. Mechanistically, the binding of ligands to ErbB receptors leads to their dimerization and subsequent tyrosine phosphorylation of specific tyrosine residues within the cytoplasmic tail [11]. These structural modifications enhance docking of effector proteins whose recruitment induces the activation of downstream signal transduction pathways, including Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI-3K) pathways [7, 13, 14].

2.1. EGF Signaling in Breast Cancer Cell Proliferation. ErbB receptors are positively correlated with breast cancer cell proliferation [15, 16]. They are activated by the EGF ligands, EGF, a potent mitogen, being the basic ligand of these receptors, particularly in cells overexpressing EGFR [17, 18]. In addition the ErbB receptors can autophosphorylate or be phosphorylated by other kinases [11]. The activated ErbB receptors bind to Grb2 and Sos downstream mediators, resulting in the activation of intracellular signaling pathways such as Ras/Raf, MAPK, and the PI-3K/Akt pathways which are involved in cell growth, apoptosis, invasion, and migration of breast cancer cells [13, 14, 19, 20]. Specifically, the formation of EGFR-Grb2-Ras complex enhances breast cancer cell proliferation [21].

The key role of EGFR in tumor growth is evident from the antiproliferative effects of monoclonal antibodies specific for this receptor [22]. Furthermore, there is evidence that EGFR activator proteins contribute to EGFR-dependent breast cancer cell proliferation. For example, ERp57 protein, a member of the disulfide isomerase family, participates in the activation of EGFR signaling and in the modulation of its internalization leading to enhanced breast cancer cell proliferation [23]. Moreover, the stimulation of proliferation

through activation of EGFR promotes degradation of Fhit protein (the product of tumor suppressor gene *FHIT*) [24].

A concentration-dependent effect of EGF on breast cancer cell proliferation has also been proposed [25–27]. Thus, EGF at concentrations that stimulate most other cell lines reduced the growth of MDA-468 breast cancer cells [25]. Additionally Zhang et al. [28] indicated a biphasic effect of EGF on breast cancer cell proliferation and demonstrated that Src functions as a switch of EGF signaling, depending on EGF concentration. Moreover, EGF seems to induce an inhibition of proliferation through the stimulation of an interleukin 6 type cytokine, oncostatin M, in both estrogen receptor positive and negative breast cancer cells [26]. A novel role for EGF has been proposed by Adams et al. [27]. Specifically, it was found that EGF treatments enhanced miR-206 (microRNA-206) levels in MCF-7 cells, which resulted in reduced cell proliferation, enhanced apoptosis, and reduced expression of multiple estrogen-responsive genes [27].

On the other hand, ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein-50 (EBP50) suppresses breast cancer cell proliferation [29]. Indeed, EBP50 can suppress EGF-induced proliferation of breast cancer cells by inhibiting EGFR phosphorylation and blocking EGFR downstream signaling [30].

3. Insulin-Like Growth Factor Family Members

The biological activities of IGF family not only affect the normal development of the organism but have been strongly implicated in tumorigenesis [31, 32]. This important signaling family consists of the IGF ligands (IGF-I and IGF-II), *their cell membrane* receptors (IGF-IR, IGF-IIR, and IR), and a group of IGF-binding proteins (IGFBPs) [33].

Structurally, whereas insulin is composed of two domains denominated A and B, the IGFs are single-chain molecules that maintain the equivalent of the connecting C-peptide of proinsulin between A and B domains [34]. IGFs are reported to play significant role in cancer progression and according to LeRoith et al. [33] high levels of circulating IGF-I *have been indicated* to constitute a risk factor for the development of breast, prostate, colon, and lung cancer. However, further clinical studies are needed to clarify these first indications.

Importantly, the expression of IGF-I is predictive of breast cancer progression, prognosis, and outcome [32]. The antiapoptotic and mitogenic actions of IGF-I are mediated by its receptor IGF-IR [33, 35]. The IGF-IR activation and overexpression have been implicated in many cellular processes, including cell migration, proliferation, and attenuation of cell survival and are related to the malignant phenotype [31, 36, 37]. IGF-IR is a heterotetrameric transmembrane glycoprotein. Structurally, it forms a $\alpha_2\beta_2$ structure, the β subunits endowed with intrinsic tyrosine kinase activity, whereas the α subunits are the ligand-binding sites [38, 39]. Binding of ligands to the receptor results in its conformational change and a subsequent autophosphorylation of tyrosine residues 1131, 1135, and 1136 in the kinase domain, juxtamembrane tyrosines, and C-terminal serines [40].

IGF-binding proteins and their respective concentrations regulate the bioavailability of the IGFs and IGF-induced proliferation through IGF/IGFBP complex formation [41–43]. Six high-affinity IGFBPs have been identified to date. Specifically, IGFBP-1 to IGFBP-4 have similar affinities for IGF-I and IGF-II, whereas IGFBP-5 and IGFBP-6 bind IGF-II with higher affinity [44, 45]. All IGFBPs (six proteins) are expressed in mammary tumors [46, 47]. Specifically, IGFBP-4 and IGFBP-5 are expressed in primary breast cancer [46, 47]. Thus, IGFBP-3 provides most of the IGF-binding capacity of serum and greatly prolongs the circulating half-life of the IGFs [48]. Generally, IGFBPs modulate the interactions between IGF ligands and cell-surface receptors [48].

3.1. IGF Signaling in Breast Cancer Cell Proliferation. IGF family members (including IGF-I, IGF-II, and their receptors) are overexpressed in breast cancer tumor cells and were shown to promote these cells' survival and growth through various signaling pathways [32]. The principal transduction routes of the IGF signaling are MAPK and PI-3K pathways [49–51]. It is noteworthy that the MAPK and PI-3K/Akt are key mediators of cell proliferation [52–54]. Also, recent data have shown that ERK (MAPK44/42) plays an important role in the resistance of MCF-7 cells to cell apoptosis, which shows the importance of ERK signaling in the extended survival of breast cancer cells [54]. On the other hand, there is evidence that c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling negatively regulates IGF-I induced breast cancer cell proliferation [55].

The majority of IGF-I cellular actions are mediated by the key signaling component of the IGF-I system, the IGF-IR [33]. The activation of IGF-IR by IGF-I results in its autophosphorylation at tyrosine residues [33, 56]. Consecutively, the activated IGF-IR directly phosphorylates other substrates such as IRS-1, IRS-2, and IRS-4 [57]. Upon activation IRS-1 becomes a “docking” protein for other molecules, exhibiting binding sites for SH2 domain-containing proteins [58]. As a consequence, after IRS-1 phosphorylation, many downstream signaling pathways associated with mitogenesis, such as PI-3K [59] and MAPK cascade [60, 61], are activated. Other substrates which are phosphorylated by IGF-IR are src-homology 2/collagen- α proteins (Shc) [62], growth factor receptor-binding protein 10 [63], focal adhesion kinase (FAK) [64], and carboxyl-terminal src kinase (CSK) [65].

The importance of IGF signaling in breast cancer is highlighted by reports showing that the IGF-I induced proliferation of MCF-7 breast cancer cells is attenuated with the PI-3K inhibitor LY294002 and the antiestrogen ICI 182780 [66]. In addition, Ahmad et al. [49] suggested that Akt is a downstream mediator of estrogen- and IGF-I-dependent proliferation in hormone-responsive MCF-7 breast carcinoma cells. IGF-I also upregulates Cyr61, a family member of CCN family proteins with many roles in cancer progression, which is characterized by various homologous domains, including the IGF-binding protein domain, through activation of the PI-3K/Akt pathway [67]. This increase in Cyr61 leads to stimulation of breast cancer cell growth and invasion [67]. Furthermore, the inhibition of MAPK or Akt pathways prior to IGF-I stimulation prevents the expression of specific tumor suppressor miRNAs. In a novel report, [51] suggest that IGF-I

signaling regulates the expression of specific miRNAs in the estrogen receptor positive MCF-7 breast cancer cell line and indicate kinase signaling as a modulator of expression for a small subset of microRNAs.

Burtrum et al. [68] show that the inhibition of IGF-I signaling, via IGF-IR blockade (generation of specific monoclonal antibody), inhibits the activation of downstream MAPK and Akt signaling pathways. As a result, the proliferative potential effect of IGF-I and IGF-II was reduced. Moreover, IGF-IR deficient mice show a reduced rate of tumor growth and cell migration [69], indicating the central role of IGF-IR in breast cancer cell proliferation. Additionally, the IGF-IR suppression increases apoptosis through p38MAPK phosphorylation in MCF-7 cells [70]. Preclinical findings however have not been translated to date in effective treatment strategies [71]. The function of tumor suppressor genes influences the IGF-IR signals and their downstream proliferative effects on breast cancer cells [48]. Transcription of IGF-IR gene is negatively regulated by tumor suppressors, including the Breast Cancer Gene-1 (BRCA1), p53, and Wilms' tumor protein-1 (WT1) [72, 73]. The role of BRCA1 and BRCA2 in breast cancer progression and prognosis is well documented [74]. BRCA1 inhibits IGF-I action, so BRCA1 deficiency also leads to increased expression of several IGF-I signaling pathway components in multiple experimental systems, including mice, mammary tumors, and cultured human cells [75, 76]. As a result, mutation or deficiency of BRCA1 leads to stimulated IGF-I activity and, consequently, increased cell proliferation. Apart from this, the loss of p53 tumor suppressor gene has also been demonstrated to increase IGF-IR expression [77, 78]. This mechanism however does not involve direct DNA binding to IGF-IR promoter sequences [73]. Another example is loss of function of tumor suppressor gene *PTEN* which encodes a phosphatase that attenuates signals originating at tyrosine kinase receptors such as IGF-IR [32, 48].

3.2. Insulin-Like Growth Factor and Epidermal Growth Factor Signaling in Endocrine and Targeted Therapy Resistant Breast Cancer Proliferation. It is well established that both steroids and growth factors stimulate proliferation of steroid-dependent tumor cells and that the interaction between these signaling pathways occurs at several levels [6, 49]. The steroid ligands are transferred to the nucleus where they bind steroid receptors, which are classified as ligand-activated transcription factors, to activate target gene transcription and cell growth. Several steroid responses have now been functionally linked to other intracellular signaling pathways, including tyrosine kinase receptors or c-Src. Steroids such as 17 beta-estradiol (E2) via binding to cytoplasmic or membrane-associated receptors were also shown to rapidly activate intracellular signaling cascades including ERK, PI-3K, and STATs [79]. These E2-stimulated phosphorylation-mediated cascades can then contribute to altered tumor cell function [80]. ER- α targeted therapy is routinely used to treat breast cancer. However, patient responses are limited by resistance to endocrine therapy [81, 82]. The development of resistance to endocrine therapy often results in uncontrollable growth and dissemination of breast cancer

[82]. Therefore, identifying mechanisms that drive endocrine resistance is a high clinical priority.

A large body of experimental evidence indicates that oncogenic signaling pathways underlie endocrine resistance, including EGFR, HER2, IGF-IR, c-Src, and ER itself [6]. The crosstalk between estrogen, IGF-I, and EGF signaling pathways and its involvement in endocrine resistance is well documented in breast cancer [83, 84]. Indeed, breast cancer cells resistant to the pure steroidal ER antagonist fulvestrant demonstrate increased activation of EGFR family members and downstream ERK signaling. Moreover, EGFR has been identified as one of main genes conferring estrogen independence to human breast cancer cells [85]. E2 signaling interacts with IGF-I and EGF pathways, at different levels, for example, through the rapid activation of IGF-IR and EGFR receptors and with the consequent induction of MAPK activation in breast cancer cells [86–88]. Thus, E2 and EGF cues are obligatory in the proliferation of ductal epithelial breast cancer cells and they have synergistic effects [5, 80]. Furthermore, the knockout of EGFR (or IGF-IR) abolished the E2-proliferative response in mice, and the inhibition of EGFR activity suppressed the proliferative effect of E2 in breast cancer cells *in vitro* [79, 89]. In addition, the selective inhibitors or knockdown of both receptors diminished E2-induced MAPK activation but also blocked E2-proliferative action [90]. It is proposed that E2 stimulates the expression of IGF and EGF ligands and receptors in rodent tissues and human cell lines [91]. The ER suppression in breast cancer cells prevents both EGF (and E2) stimulation of DNA synthesis [92]. However, the mitogenic effects of EGF are not mediated by ER, but it is suggested that the crosstalk between the estrogen and EGF signaling pathways may occur by other mechanisms [93]. Notably, both EGFR and c-Src stimulated pathways can induce activation of a transcription factor STAT5, which is needed for E2-induced breast cancer cell proliferation, in some cell lines [79]. Growth factor mediated ER activation is a major route through which breast cancer cells exhibit endocrine resistance to antiestrogen therapies [94]. During the genomic action of E2, binding of E2 to ER α results in its activation through separation from heat-shock protein 90 (Hsp90). Active ER-E2 dimer binds directly or indirectly to ERE genes (genes containing estrogen response elements) [95]. On the other hand, the nongenomic actions of E2 lead to the rapid activation of independent signaling pathways, such as IGF-IR and EGFR, depending on cell type [96]. In MCF-7 cells, estrogen potentiates the effect of IGF-I on IGF-IR signaling in the promotion of cell proliferation and protection against apoptosis [97]. Specifically, ER α binds to the IGF-IR and activates downstream signaling pathways [98]. Moreover, Yu et al. [99] recently reported the IGF-I induced association of IGF-IR and ER α . Furthermore, ER α regulates the IGF-I signaling pathways through phosphorylation of ERK1/2 and Akt where the interaction of ER-IGF-IR potentiates breast cancer cell growth [99]. Selective inhibitors or knockdown of IGF-IR (and EGFR) decreased E2-induced MAPK activation and blocked E2 mitogenic effect, confirming crosstalk signaling between IGF-IR, E2, and EGFR [90]. Moreover, E2 was found to utilize a signaling

pathway which involves the interactions between ER α , IGF-IR, matrix metalloproteinases, and EGF-R to activate MAPK phosphorylation [88]. A consecutive study indicated that the transcriptional activity of ligand free ER is sufficient to complement the mitogenic action of IGF-IR-induced PI-3K/Akt activation [100]. On the other hand, Amin et al. [101] suggested that proliferation of MCF-7 breast cancer cells is suppressed by IGF-I-activated JNK MAPK pathway, through the induction of the SHP1 phosphatase expression.

Approximately, 15% of breast tumors are classified as triple-negative breast cancers (TNBC), a term that denotes their lack of estrogen receptor and progesterone receptor and nonamplification of the HER2 [102]. Therefore, TNBC patients cannot be treated with endocrine therapy or targeted therapies due to lack of related receptors which results in the poor prognosis. Characteristically, these patients overexpress the EGFR and IGF-IR proteins [103] but are resistant to tyrosine kinase inhibitors (TKIs) and anti-EGFR therapies. Up to date different mechanisms have been suggested for resistance to TKIs including EGFR independence, mutations and alterations in EGFR, and its downstream signaling pathways [104]. Efforts have focused on overcoming targeted therapy resistance. Thus, in TNBC cells a Src Family Kinases (SFKs) influenced EGFR translocation to nucleus has been reported, which in turn enhances breast cancer cell growth [105]. Within the nucleus, EGFR can function as a cotranscription factor to regulate genes involved in tumor progression [106], which has been linked to anti-EGFR therapies resistance [107]. Importantly, EGFR contributes to chemo- and radioresistance by enhancing DNA damage repair [107]. Inhibition of EGFR translocation led to a subsequent accumulation of EGFR on the plasma membrane, which greatly enhanced sensitivity of TNBC cells to anti-EGFR therapy [105]. Therefore, targeting both the nuclear EGFR signaling pathway, through the inhibition of its nuclear transport, and the classical EGFR signaling pathway may prove a viable therapeutic approach. Moreover, recently it has been demonstrated that the scaffolding protein NHERF1 sensitizes EGFR-dependent tumor growth, motility, and invadopodia function to anti-EGFR (gefitinib) treatment in TNBC cells [104]. Inhibition of IGF-IR signaling through sphingosine kinase-1 sensitizes TNBC cells to EGF receptor blockade [108]. Furthermore, the blocking of annexin A2 (a calcium-dependent phospholipid binding protein, present at the surface of triple-negative breast cancer cells) by a specific antibody suppressed the EGF-induced EGFR tyrosine phosphorylation and internalization. Treatment with this antibody also inhibited the EGFR-dependent PI3K-Akt and Raf-MEK-ERK downstream pathways, resulting in reduced cell proliferation [109]. The main IGF/EGF-related signaling mechanisms in breast cancer disease are schematically depicted in Figure 1.

4. Bioavailability of Growth Factors

The cellular microenvironment and modifications of extracellular matrix components (ECM) are closely correlated to malignant transformation and all the steps of the metastatic cascade [110, 111]. Namely, the tumor cells do not exist

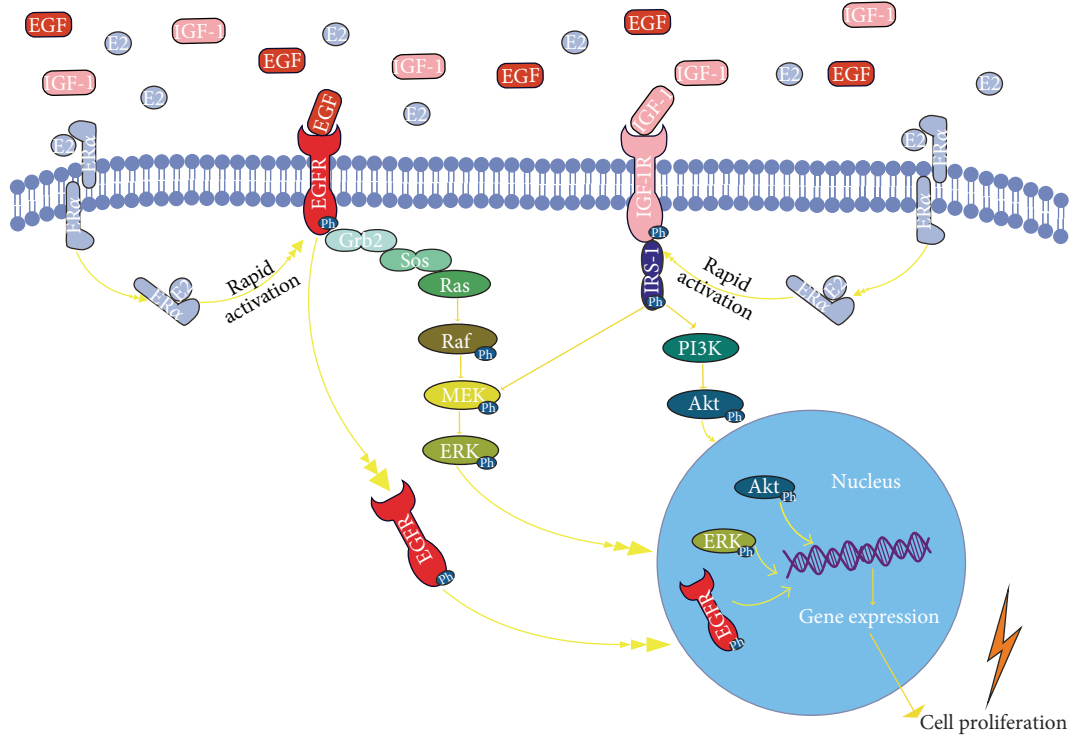


FIGURE 1: Schematic representation of IGF/EGF signaling, crosstalk with ERs. IGF-I binding to IGF-IR results in its activation and the consequent activation of PI-3K and ERK mediators. EGF-induced activation of EGFR activates the ERK and may lead to gene expression of proliferative genes via internalization of activated EGFR to nucleus. E2-ER α binding leads to rapid activation of EGFR and/or IGF-IR. The activation of IGF/EGF signaling pathways stimulates cell proliferation.

in isolation but rather subsist in a rich microenvironment provided by resident fibroblasts, endothelial cells, pericytes, leukocytes, and ECM components. Indeed, interactions with the tumor microenvironment or stroma are recognized as one of important “hallmarks of cancer.”

In addition the ECM is characterized as a big “tank” containing various mediators including growth factors and cytokine which are either soluble or bound into structural ECM components [112]. We discuss here the fact that bioavailability of EGF and IGF-I, provided by the tumor microenvironment, modulates phenotypic plasticity, gene expression, and the recurrence rate of certain TNBC tumors. Combinatorial therapy with EGFR and IGF-IR inhibitors prevents disease progression by interrupting paracrine interactions between TNBC tumor cells and their microenvironment.

The ECM turnover and remodeling are extremely active in the tumor microenvironment [111]. The ECM components are modified through the actions of various proteases and glycosidases which results in altered ECM structure and bioavailability of key mediators [113]. Indeed, the proteolytic action of various enzymes modulates the bioavailability of soluble growth factors which via the activation of specific intracellular signaling pathways regulate critical tumor cell functions, such as migration and proliferation. The matrix metalloproteinase’s family (MMP) which consists of 24 (known) zinc-dependent endopeptidases has a key role in the ECM reorganization that occurs during cancer progression

[114]. Specifically, the MMPs’ action in the tumor microenvironment creates space for cancer cell migration and regulates their cell proliferation by proteolytical release and activation of the ECM-stored growth factors [114].

5. Therapeutic Approach

Targeting of EGF/IGF signaling pathway components has been characterized as a promising approach for breast cancer treatment. Many research groups have focused on the utilization of natural and synthetic inhibitors as well as specific antibodies for EGF family proteins as a strategy to attenuate breast cancer cell proliferation [115–117]. Gefitinib, a tyrosine kinase inhibitor, has been shown to reduce cell proliferation and tumor growth in breast cancer cell lines or *in vivo* conditions in xenografted animals with different levels of EGFR or HER2 expression [118]. Different combinatorial regimes have been approached; thus, the combination of gefitinib with calcitriol or their synthetic analogs resulted in a greater antiproliferative effect than with either of the agents alone in EGFR and HER2 positive breast cancer cells. These effects were due to downregulation of MAPK signaling pathway, decrease of cells in G2/M phase, and induction of apoptosis mediated by upregulation of BIM and activation of caspase 3 [119]. The utilization of monoclonal antibodies is a well-documented approach. Thus, trastuzumab, pertuzumab, and ado-trastuzumabemtansine, which are given intravenously, are monoclonal antibodies that target the ErbB extracellular

domains and are used for the treatment of ErbB2-positive breast cancer [120]. The effects of natural products on EGF signaling have also been investigated. Indeed, HMQ1611, a taspine derivative, with anticancer properties, has been shown to reduce the phosphorylation of EGFR and the activation of its downstream signaling mediators ERK1/2 and Akt [117]. Additionally, extracts of *Livistona chinensis* R seeds, with both anticancer and protein kinase inhibitor activity, can attenuate EGF signaling events mainly through EGFR modification [121]. Another agent, (+)-aeropylsinin-1 (a natural metabolite from a type of marine sponge), abolished the proliferative effect of EGF on breast cancer cells and inhibited the ligand-induced endocytosis of the EGFR *in vitro* [122]. However, even though anti-EGFR or combinatorial treatments have been endorsed they are unfortunately meeting with resistance. Current research is focused on increasing our understanding on the mechanisms of response and the discovery of predictive markers. Due to overlapping and redundancy targeting several pathways simultaneously seem essential [123].

Many research groups have endeavored to inhibit the IGF-I signaling, via IGF-IR blockade [68, 124, 125]. This strategy resulted in antiproliferative effects and conclusion that IGF-IR blockade may provide a number of clinical benefits [68]. Furthermore, the effects of natural products on IGF-induced cell proliferation have also been widely studied [124–126]. Thus, it has been reported that samsun ant venom (SAV) inhibits the IGF-I mediated phosphorylation of ERK and AKT, but not p38MAPK [126]. Moreover, deguelin, a natural product isolated from several plant species, has antitumor activity, targeting IGF-IR signaling pathway via upregulation of IGFBP-3 expression [124]. Nimbolide is a terpenoid lactone derived from *Azadirachta indica* (Neem tree) displaying a variety of biological activities. Nimbolide decreases the proliferation of breast cancer cells by modulating the IGF signaling molecules [125]. Calycosin, a natural phytoestrogen with similar structure to estrogen, successfully induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. Calycosin tends to inhibit growth by ER β -induced inhibition of IGF-IR, along with the selective regulation of MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K)/Akt pathways [127]. However, even though IGF-IR appeared to be one of promising new targets and early results from clinical trials that targeted the IGF-IR and showed some evidence of response, larger randomized phase III trials have not shown clear clinical benefit of targeting this pathway in combination with conventional strategies [71, 128]. These findings may partly be explained by the complexity of the IGF/insulin system. Thus, surface composition of the receptors, preferential expressions of IRS adaptor proteins, and expression of respective ligands may affect therapeutic outcomes and disease prognosis [129–131]. Therefore, assessment of above factors may be necessary for identification of patients who would benefit from anti-IGFR therapy.

6. Conclusions

The bridging between preclinical studies and useful clinical strategies seems to demand a deeper understanding of

these complex pathways. Development of predictive molecular biomarkers and optimal inhibitory approaches of the IGF/EGF systems should yield better clinical strategies. In conclusion, unraveling the interaction between the critical signaling pathways in breast cancer biology including ER α , EGFR, and IGF components should provide additional new concepts in designing combination therapies.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

Part of this research has been cofinanced by the European Union (European Social Fund (ESF)) and Greek national funds through the Operational Program “Education and Lifelong Learning” of the National Strategic Reference Framework (NSRF), Research Funding Program THALES, investing in knowledge society through the European Social Fund MIS 380222.

References

- [1] M. W. Beckmann, M. R. Bani, P. A. Fasching, R. Strick, and M. P. Lux, “Risk and risk assessment for breast cancer: molecular and clinical aspects,” *Maturitas*, vol. 57, no. 1, pp. 56–60, 2007.
- [2] R. B. Dickson and M. E. Lippman, “Estrogenic regulation of growth and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma,” *Endocrine Reviews*, vol. 8, no. 1, pp. 29–43, 1987.
- [3] C. L. Arteaga, L. J. Kitten, E. B. Coronado et al., “Blockade of the type I somatomedin receptor inhibits growth of human breast cancer cells in athymic mice,” *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 84, no. 5, pp. 1418–1423, 1989.
- [4] A. Milani, E. Geuna, G. Mittica et al., “Overcoming endocrine resistance in metastatic breast cancer: current evidence and future directions,” *World Journal of Clinical Oncology*, vol. 5, no. 5, pp. 990–1001, 2014.
- [5] M. A. Shupnik, “Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation,” *Oncogene*, vol. 23, no. 48, pp. 7979–7989, 2004.
- [6] J. M. Gee, J. F. Robertson, E. Gutteridge et al., “Epidermal growth factor receptor/HER2/insulin-like growth factor receptor signalling and oestrogen receptor activity in clinical breast cancer,” *Endocrine-Related Cancer*, vol. 12, supplement 1, pp. S99–S111, 2005.
- [7] D. J. Riese II and D. F. Stern, “Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network,” *BioEssays*, vol. 20, no. 1, pp. 41–48, 1998.
- [8] N. E. Hynes and D. F. Stern, “The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer,” *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1198, no. 2–3, pp. 165–184, 1994.
- [9] D. Meyer and C. Birchmeier, “Multiple essential functions of neuregulin in development,” *Nature*, vol. 378, no. 6555, pp. 386–390, 1995.
- [10] J. Massagué and A. Pandiella, “Membrane-anchored growth factors,” *Annual Review of Biochemistry*, vol. 62, pp. 515–541, 1993.

- [11] T. Holbro, G. Civenni, and N. E. Hynes, "The ErbB receptors and their role in cancer progression," *Experimental Cell Research*, vol. 284, no. 1, pp. 99–110, 2003.
- [12] R. Pinkas-Kramarski, L. Soussan, H. Waterman et al., "Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions," *The EMBO Journal*, vol. 15, no. 10, pp. 2452–2467, 1996.
- [13] M. A. Olayioye, R. M. Neve, H. A. Lane, and N. E. Hynes, "The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer," *The EMBO Journal*, vol. 19, no. 13, pp. 3159–3167, 2000.
- [14] Y. Yarden and M. X. Sliwkowski, "Untangling the ErbB signalling network," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 2, no. 2, pp. 127–137, 2001.
- [15] B. Bucci, I. D'Agnano, C. Botti et al., "EGF-R expression in ductal breast cancer: proliferation and prognostic implications," *Anticancer Research*, vol. 17, no. 1, pp. 769–774, 1997.
- [16] S. S. Skandalis, N. Afratis, G. Smirlaki et al., "Cross-talk between estradiol receptor and EGFR/IGF-IR signaling pathways in estrogen-responsive breast cancers: focus on the role and impact of proteoglycans," *Matrix Biology*, vol. 35, pp. 182–193, 2014.
- [17] D. F. Stern, P. A. Heffernan, and R. A. Weinberg, "P185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 6, no. 5, pp. 1729–1740, 1986.
- [18] X.-F. Dong, Y. Berthois, and P. M. Martin, "Effect of epidermal growth factor on the proliferation of human epithelial cancer cell lines: correlation with the level of occupied EGF receptor," *Anticancer Research*, vol. 11, no. 2, pp. 737–743, 1991.
- [19] E. R. Levin, "Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor," *Molecular Endocrinology*, vol. 17, no. 3, pp. 309–317, 2003.
- [20] X. Fu, C. K. Osborne, and R. Schiff, "Biology and therapeutic potential of PI3K signaling in ER+/HER2-negative breast cancer," *The Breast*, vol. 22, pp. S12–S18, 2013.
- [21] P.-Y. Chu, T.-K. Li, S.-T. Ding, I.-R. Lai, and T.-L. Shen, "EGF-induced Grb7 recruits and promotes ras activity essential for the tumorigenicity of Sk-Br3 breast cancer cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 38, pp. 29279–29285, 2010.
- [22] J. Mendelsohn and J. Baselga, "The EGF receptor family as targets for cancer therapy," *Oncogene*, vol. 19, no. 56, pp. 6550–6565, 2000.
- [23] E. Gaucci, F. Altieri, C. Turano, and S. Chichiarelli, "The protein ERp57 contributes to EGF receptor signaling and internalization in MDA-MB-468 breast cancer cells," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 114, no. 11, pp. 2461–2470, 2013.
- [24] F. Bianchi, A. Magnifico, C. Olgiati et al., "FHIT-proteasome degradation caused by mitogenic stimulation of the EGF receptor family in cancer cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 50, pp. 18981–18986, 2006.
- [25] J. Filmus, M. N. Pollak, R. Cailleau, and R. N. Buick, "MDA-468, a human breast cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors, has an amplified EGF receptor gene and is growth inhibited by EGF," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 128, no. 2, pp. 898–905, 1985.
- [26] S. L. Grant, A. Hammacher, A. M. Douglas et al., "An unexpected biochemical and functional interaction between gp130 and the EGF receptor family in breast cancer cells," *Oncogene*, vol. 21, no. 3, pp. 460–474, 2002.
- [27] B. D. Adams, D. M. Cowee, and B. A. White, "The role of miR-206 in the epidermal growth factor (EGF) induced repression of estrogen receptor-alpha (EERalpha) signaling and a luminal phenotype in MCF-7 breast cancer cells," *Molecular Endocrinology*, vol. 23, no. 8, pp. 1215–1230, 2009.
- [28] X. Zhang, J. Meng, and Z.-Y. Wang, "A switch role of Src in the biphasic EGF signaling of ER-negative breast cancer cells," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 8, Article ID e41613, 2012.
- [29] J.-F. Zheng, L.-C. Sun, H. Liu, Y. Huang, Y. Li, and J. He, "EBP50 exerts tumor suppressor activity by promoting cell apoptosis and retarding extracellular signal-regulated kinase activity," *Amino Acids*, vol. 38, no. 4, pp. 1261–1268, 2010.
- [30] W. Yao, D. Feng, W. Bian et al., "EBP50 inhibits EGF-induced breast cancer cell proliferation by blocking EGFR phosphorylation," *Amino Acids*, vol. 43, no. 5, pp. 2027–2035, 2012.
- [31] R. Baserga, A. Hongo, M. Rubini, M. Prisco, and B. Valentinis, "The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1332, no. 3, pp. F105–F126, 1997.
- [32] D. LeRoith and C. T. Roberts Jr., "The insulin-like growth factor system and cancer," *Cancer Letters*, vol. 195, no. 2, pp. 127–137, 2003.
- [33] D. LeRoith, H. Werner, D. Beitner-Johnson, and C. T. Roberts Jr., "Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor," *Endocrine Reviews*, vol. 16, no. 2, pp. 143–163, 1995.
- [34] W. H. Daughaday and P. Rotwein, "Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations," *Endocrine Reviews*, vol. 10, no. 1, pp. 68–91, 1989.
- [35] L. Sepp-Lorenzino, "Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 47, no. 3, pp. 235–253, 1998.
- [36] E. Surmacz, "Function of the IGF-I receptor in breast cancer," *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, vol. 5, no. 1, pp. 95–105, 2000.
- [37] E. A. Bohula, M. P. Playford, and V. M. Macaulay, "Targeting the type 1 insulin-like growth factor receptor as anti-cancer treatment," *Anti-Cancer Drugs*, vol. 14, no. 9, pp. 669–682, 2003.
- [38] A. Ullrich, A. Gray, A. W. Tam et al., "Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity," *The EMBO Journal*, vol. 5, no. 10, pp. 2503–2512, 1986.
- [39] R. Baserga, F. Peruzzi, and K. Reiss, "The IGF-1 receptor in cancer biology," *International Journal of Cancer*, vol. 107, no. 6, pp. 873–877, 2003.
- [40] H. Kato, T. N. Faria, B. Stannard, C. T. Roberts Jr., and D. LeRoith, "Essential role of tyrosine residues 1131, 1135, and 1136 of the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor in IGF-I action," *Molecular Endocrinology*, vol. 8, no. 1, pp. 40–50, 1994.
- [41] A. Grimberg and P. Cohen, "Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 183, no. 1, pp. 1–9, 2000.
- [42] S. M. Firth and R. C. Baxter, "Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins," *Endocrine Reviews*, vol. 23, no. 6, pp. 824–854, 2002.
- [43] L. S. Laursen, K. Kjaer-Sorensen, M. H. Andersen, and C. Oxvig, "Regulation of insulin-like growth factor (IGF) bioactivity by sequential proteolytic cleavage of IGF binding protein-4 and -5," *Molecular Endocrinology*, vol. 21, no. 5, pp. 1246–1257, 2007.

- [44] J. I. Jones and D. R. Clemmons, "Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions," *Endocrine Reviews*, vol. 16, no. 1, pp. 3–34, 1995.
- [45] C. M. Perks and J. M. P. Holly, "Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) in breast cancer," *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, vol. 5, no. 1, pp. 75–84, 2000.
- [46] F. Pekonen, T. Nyman, V. Ilvesmaki, and S. Partanen, "Insulin-like growth factor binding proteins in human breast cancer tissue," *Cancer Research*, vol. 52, no. 19, pp. 5204–5207, 1992.
- [47] S. E. McGuire, S. G. Hilsenbeck, J. A. Figueroa, J. G. Jackson, and D. Yee, "Detection of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) by ligand blotting in breast cancer tissues," *Cancer Letters*, vol. 77, no. 1, pp. 25–32, 1994.
- [48] M. N. Pollak, E. S. Schernhammer, and S. E. Hankinson, "Insulin-like growth factors and neoplasia," *Nature Reviews Cancer*, vol. 4, no. 7, pp. 505–518, 2004.
- [49] S. Ahmad, N. Singh, and R. I. Glazer, "Role of AKT1 in 17 β -estradiol- and insulin-like growth factor I (IGF-I)-dependent proliferation and prevention of apoptosis in MCF-7 breast carcinoma cells," *Biochemical Pharmacology*, vol. 58, no. 3, pp. 425–430, 1999.
- [50] T. E. Adams, V. C. Epa, T. P. J. Garrett, and C. W. Ward, "Structure and function of the type I insulin-like growth factor receptor," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 57, no. 7, pp. 1050–1093, 2000.
- [51] E. C. Martin, M. R. Bratton, Y. Zhu et al., "Insulin-like growth factor-I signaling regulates miRNA expression in MCF-7 breast cancer cell line," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 11, Article ID e49067, 2012.
- [52] J. A. McCubrey, L. S. Steelman, S. L. Abrams et al., "Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance," *Advances in Enzyme Regulation*, vol. 46, no. 1, pp. 249–279, 2006.
- [53] J. Whyte, O. Bergin, A. Bianchi, S. McNally, and F. Martin, "Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development," *Breast Cancer Research*, vol. 11, no. 5, article 209, 2009.
- [54] E. K. Jeong, S. Y. Lee, H. M. Jeon, M. K. Ju, C. H. Kim, and H. S. Kang, "Role of extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 in multicellular resistance to docetaxel in MCF-7 cells," *International Journal of Oncology*, vol. 37, no. 3, pp. 655–661, 2010.
- [55] C. L. Mamay, A. M. Mingo-Sion, D. M. Wolf, M. D. Molina, and C. L. Van Den Berg, "An inhibitory function for JNK in the regulation of IGF-I signaling in breast cancer," *Oncogene*, vol. 22, no. 4, pp. 602–614, 2003.
- [56] H. Kato, T. N. Faria, B. Stannard, C. T. Roberts Jr., and D. LeRoith, "Role of tyrosine kinase activity in signal transduction by the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor: characterization of kinase-deficient IGF-I receptors and the action of an IGF-I-mimetic antibody (α IR-3)," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, no. 4, pp. 2655–2661, 1993.
- [57] M. G. Myers Jr., X. J. Sun, and M. F. White, "The IRS-1 signaling system," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 19, no. 7, pp. 289–293, 1994.
- [58] M. G. Myers Jr., X. J. Sun, B. Cheatham et al., "IRS-1 is a common element in insulin and insulin-like growth factor-I signaling to the phosphatidylinositol 3'-kinase," *Endocrinology*, vol. 132, no. 4, pp. 1421–1430, 1993.
- [59] M. G. Myers Jr., L.-M. Wang, X. J. Sun et al., "Role of IRS-1-GRB-2 complexes in insulin signaling," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 14, no. 6, pp. 3577–3587, 1994.
- [60] E. Y. Skolnik, C. H. Lee, A. Batzer et al., "The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling," *The EMBO Journal*, vol. 12, no. 5, pp. 1929–1936, 1993.
- [61] R. Baserga, C. Sell, P. Porcu, and M. Rubini, "The role of the IGF-I receptor in the growth and transformation of mammalian cells," *Cell Proliferation*, vol. 27, no. 2, pp. 63–71, 1994.
- [62] S. Giorgetti, P. G. Pelicci, G. Pelicci, and E. Von Obberghen, "Involvement of Src-homology/collagen (SHC) proteins in signaling through the insulin receptor and the insulin-like-growth-factor-I-receptor," *European Journal of Biochemistry*, vol. 223, no. 1, pp. 195–202, 1994.
- [63] A. Morrione, B. Valentinis, S. Li, J. Y. T. Ooi, B. Margolis, and R. Baserga, "Grb10: a new substrate of the insulin-like growth factor I receptor," *Cancer Research*, vol. 56, no. 14, pp. 3165–3167, 1996.
- [64] V. Baron, V. Calléja, P. Ferrari, F. Alengrin, and E. Van Obberghen, "p125(Fak) focal adhesion kinase is a substrate for the insulin and insulin-like growth factor-I tyrosine kinase receptors," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 12, pp. 7162–7168, 1998.
- [65] C. Arbet-Engels, S. Tartare-Deckert, and W. Eckhart, "C-terminal Src kinase associates with ligand-stimulated insulin-like growth factor-I receptor," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 9, pp. 5422–5428, 1999.
- [66] S. Zhang, X. Li, R. Burghardt, R. Smith III, and S. H. Safe, "Role of estrogen receptor (ER) alpha in insulin-like growth factor (IGF)-I-induced responses in MCF-7 breast cancer cells," *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 35, no. 3, pp. 433–447, 2005.
- [67] S. Sarkissyan, M. Sarkissyan, Y. Wu, J. Cardenas, H. P. Koeffler, and J. V. Vadgama, "IGF-I regulates Cyr61 induced breast cancer cell proliferation and invasion," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 7, Article ID e103534, 2014.
- [68] D. Burtrum, Z. Zhu, D. Lu et al., "A fully human monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor blocks ligand-dependent signaling and inhibits human tumor growth in vivo," *Cancer Research*, vol. 63, no. 24, pp. 8912–8921, 2003.
- [69] S. Yakar, D. LeRoith, and P. Brodt, "The role of the growth hormone/insulin-like growth factor axis in tumor growth and progression: lessons from animal models," *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 16, no. 4–5, pp. 407–420, 2005.
- [70] R. A. Mendoza, E. E. Moody, M. I. Enriquez, S. M. Mejia, and G. Thordarson, "Tumorigenicity of MCF-7 human breast cancer cells lacking the p38alpha mitogen-activated protein kinase," *Journal of Endocrinology*, vol. 208, no. 1, pp. 11–19, 2011.
- [71] D. Yee, "Insulin-like growth factor receptor inhibitors: baby or the bathwater?" *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 104, no. 13, pp. 975–981, 2012.
- [72] S. Abramovitch and H. Werner, "Functional and physical interactions between BRCA1 and p53 in transcriptional regulation of the IGF-IR gene," *Hormone and Metabolic Research*, vol. 35, no. 11–12, pp. 758–762, 2003.
- [73] R. Sarfstein, S. Maor, N. Reizner, S. Abramovitch, and H. Werner, "Transcriptional regulation of the insulin-like growth factor-I receptor gene in breast cancer," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 252, no. 1–2, pp. 241–246, 2006.

- [74] Q. Wang, H. Zhang, R. Fishel, and M. I. Greene, "BRCA1 and cell signaling," *Oncogene*, vol. 19, no. 53, pp. 6152–6158, 2000.
- [75] V. Shukla, X. Coumoul, L. Cao et al., "Absence of the full-length breast cancer-associated gene-1 leads to increased expression of insulin-like growth factor signaling axis members," *Cancer Research*, vol. 66, no. 14, pp. 7151–7157, 2006.
- [76] G. Hudelist, T. Wagner, M. Rosner et al., "Intratumoral IGF-I protein expression is selectively upregulated in breast cancer patients with BRCA1/2 mutations," *Endocrine-Related Cancer*, vol. 14, no. 4, pp. 1053–1062, 2007.
- [77] N. J. G. Webster, J. L. Resnik, D. B. Reichart, B. Strauss, M. Haas, and B. L. Seely, "Repression of the insulin receptor promoter by the tumor suppressor gene product p53: a possible mechanism for receptor overexpression in breast cancer," *Cancer Research*, vol. 56, no. 12, pp. 2781–2788, 1996.
- [78] H. Werner and S. Maor, "The insulin-like growth factor-I receptor gene: a downstream target for oncogene and tumor suppressor action," *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 17, no. 6, pp. 236–242, 2006.
- [79] E. M. Fox, T. M. Bernaciak, J. Wen, A. M. Weaver, M. A. Shupnik, and C. M. Silva, "Signal transducer and activator of transcription 5b, c-Src, and epidermal growth factor receptor signaling play integral roles in estrogen-stimulated proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells," *Molecular Endocrinology*, vol. 22, no. 8, pp. 1781–1796, 2008.
- [80] E. M. Fox, J. Andrade, and M. A. Shupnik, "Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways," *Steroids*, vol. 74, no. 7, pp. 622–627, 2009.
- [81] S. Ali, L. Buluwela, and R. C. Coombes, "Antiestrogens and their therapeutic applications in breast cancer and other diseases," *Annual Review of Medicine*, vol. 62, pp. 217–232, 2011.
- [82] C. Barrios, J. F. Forbes, W. Jonat et al., "The sequential use of endocrine treatment for advanced breast cancer: where are we?" *Annals of Oncology*, vol. 23, no. 6, pp. 1378–1386, 2012.
- [83] V.-I. Alexaki, I. Charalampopoulos, M. Kampa et al., "Estrogen exerts neuroprotective effects via membrane estrogen receptors and rapid Akt/NOS activation," *The FASEB Journal*, vol. 18, no. 13, pp. 1594–1596, 2004.
- [84] B. Dufourny, J. Alblas, H. A. A. M. van Teeffelen et al., "Mitogenic signaling of insulin-like growth factor I in MCF-7 human breast cancer cells requires phosphatidylinositol 3-kinase and is independent of mitogen-activated protein kinase," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 49, pp. 31163–31171, 1997.
- [85] T. van Agthoven, J. Veldscholte, M. Smid et al., "Functional identification of genes causing estrogen independence of human breast cancer cells," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 114, no. 1, pp. 23–30, 2009.
- [86] S. Kahlert, S. Nuedling, M. van Eickels, H. Vetter, R. Meyer, and C. Grohé, "Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 24, pp. 18447–18453, 2000.
- [87] R. J. Pietras, "Interactions between estrogen and growth factor receptors in human breast cancers and the tumor-associated vasculature," *Breast Journal*, vol. 9, no. 5, pp. 361–373, 2003.
- [88] R. X.-D. Song, Y. Chen, Z. Zhang et al., "Estrogen utilization of IGF-1-R and EGF-R to signal in breast cancer cells," *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 118, no. 4-5, pp. 219–230, 2010.
- [89] J. M. Hall, J. F. Couse, and K. S. Korach, "The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 40, pp. 36869–36872, 2001.
- [90] R. X.-D. Song, Z. Zhang, Y. Chen, Y. Bao, and R. J. Santen, "Estrogen signaling via a linear pathway involving insulin-like growth factor I receptor, matrix metalloproteinases, and epidermal growth factor receptor to activate mitogen-activated protein kinase in MCF-7 breast cancer cells," *Endocrinology*, vol. 148, no. 8, pp. 4091–4101, 2007.
- [91] M. H. Faulds, H. Olsen, L. A. Helguero, J.-Å. Gustafsson, and L.-A. Haldosén, "Estrogen receptor functional activity changes during differentiation of mammary epithelial cells," *Molecular Endocrinology*, vol. 18, no. 2, pp. 412–421, 2004.
- [92] A. Migliaccio, M. Di Domenico, G. Castoria et al., "Steroid receptor regulation of epidermal growth factor signaling through Src in breast and prostate cancer cells: steroid antagonist action," *Cancer Research*, vol. 65, no. 22, pp. 10585–10593, 2005.
- [93] B. D. Gehm, J. M. McAndrews, V. C. Jordan, and J. L. Jameson, "EGF activates highly selective estrogen-responsive reporter plasmids by an ER-independent pathway," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 159, no. 1-2, pp. 53–62, 2000.
- [94] Y. Hawsawi, R. El-Gendy, C. Twelves, V. Speirs, and J. Beattie, "Insulin-like growth factor—oestradiol crosstalk and mammary gland tumorigenesis," *Biochimica et Biophysica Acta—Reviews on Cancer*, vol. 1836, no. 2, pp. 345–353, 2013.
- [95] S. Nilsson, S. Mäkelä, E. Treuter et al., "Mechanisms of estrogen action," *Physiological Reviews*, vol. 81, no. 4, pp. 1535–1565, 2001.
- [96] D. Yee and A. V. Lee, "Crosstalk between the insulin-like growth factors and estrogens in breast cancer," *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, vol. 5, no. 1, pp. 107–115, 2000.
- [97] J. Dupont and D. Le Roith, "Insulin-like growth factor 1 and oestradiol promote cell proliferation of MCF-7 breast cancer cells: new insights into their synergistic effects," *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology*, vol. 54, no. 3, pp. 149–154, 2001.
- [98] R. X. Song, C. J. Barnes, Z. Zhang, Y. Bao, R. Kumar, and R. J. Santen, "The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor α to the plasma membrane," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 7, pp. 2076–2081, 2004.
- [99] Z. Yu, W. Gao, E. Jiang et al., "Interaction between IGF-IR and ER Induced by E2 and IGF-1," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 5, Article ID e62642, 2013.
- [100] A.-M. Gaben, M. Sabbah, G. Redeuilh, M. Bedin, and J. Mester, "Ligand-free estrogen receptor activity complements IGF1R to induce the proliferation of the MCF-7 breast cancer cells," *BMC Cancer*, vol. 12, article 291, 2012.
- [101] S. Amin, A. Kumar, L. Nilchi, K. Wright, and M. Kozlowski, "Breast cancer cells proliferation is regulated by tyrosine phosphatase SHP1 through c-jun N-terminal kinase and cooperative induction of RFX-1 and AP-4 transcription factors," *Molecular Cancer Research*, vol. 9, no. 8, pp. 1112–1125, 2011.
- [102] K. N. Stevens, C. M. Vachon, and F. J. Couch, "Genetic susceptibility to triple-negative breast cancer," *Cancer Research*, vol. 73, no. 7, pp. 2025–2030, 2013.
- [103] N. M. Probst-Hensch, J. H. B. Steiner, P. Schraml et al., "IGFBP2 and IGFBP3 protein expressions in human breast cancer: association with hormonal factors and obesity," *Clinical Cancer Research*, vol. 16, no. 3, pp. 1025–1032, 2010.
- [104] A. Bellizzi, M. R. Greco, R. Rubino et al., "The scaffolding protein NHERF1 sensitizes EGFR-dependent tumor growth,

- motility and invadopodia function to gefitinib treatment in breast cancer cells," *International Journal of Oncology*, vol. 46, no. 3, pp. 1214–1224, 2015.
- [105] T. M. Brand, M. Iida, E. F. Dunn et al., "Nuclear epidermal growth factor receptor is a functional molecular target in triple-negative breast cancer," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 13, no. 5, pp. 1356–1368, 2014.
- [106] T. M. Brand, M. Iida, C. Li, and D. L. Wheeler, "The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer," *Discovery Medicine*, vol. 12, no. 66, pp. 419–432, 2011.
- [107] W.-C. Huang, Y.-J. Chen, L.-Y. Li et al., "Nuclear translocation of epidermal growth factor receptor by Akt-dependent phosphorylation enhances breast cancer-resistant protein expression in gefitinib-resistant cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 23, pp. 20558–20568, 2011.
- [108] J. L. Martin, H. C. De Silva, M. Z. Lin, C. D. Scott, and R. C. Baxter, "Inhibition of insulin-like growth factor-binding protein-3 signaling through sphingosine kinase-1 sensitizes triple-negative breast cancer cells to egf receptor Blockade," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 13, no. 2, pp. 316–328, 2014.
- [109] P. Chaudhary, S. I. Thamake, P. Shetty, and J. K. Vishwanatha, "Inhibition of triple-negative and Herceptin-resistant breast cancer cell proliferation and migration by Annexin A2 antibodies," *British Journal of Cancer*, vol. 111, no. 12, pp. 2328–2341, 2014.
- [110] N. Afratis, C. Gialeli, D. Nikitovic et al., "Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment," *The FEBS Journal*, vol. 279, no. 7, pp. 1177–1197, 2012.
- [111] D. Nikitovic, K. Kouvidi, K. Voudouri et al., "The motile breast cancer phenotype roles of proteoglycans/glycosaminoglycans," *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 124321, 13 pages, 2014.
- [112] C. A. Kirkpatrick and S. B. Selleck, "Heparan sulfate proteoglycans at a glance," *Journal of Cell Science*, vol. 120, no. 11, pp. 1829–1832, 2007.
- [113] C. Gialeli, A. D. Theocharis, and N. K. Karamanos, "Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting," *The FEBS Journal*, vol. 278, no. 1, pp. 16–27, 2011.
- [114] K. Kessenbrock, V. Plaks, and Z. Werb, "Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment," *Cell*, vol. 141, no. 1, pp. 52–67, 2010.
- [115] S. Ghosh, R. K. Narla, Y. Zheng et al., "Structure-based design of potent inhibitors of EGF-receptor tyrosine kinase as anti-cancer agents," *Anti-Cancer Drug Design*, vol. 14, no. 5, pp. 403–410, 1999.
- [116] O. M. Fattah, S. M. Cloutier, C. Kündig et al., "Peptabody-EGF: a novel apoptosis inducer targeting ErbB1 receptor overexpressing cancer cells," *International Journal of Cancer*, vol. 119, no. 10, pp. 2455–2463, 2006.
- [117] Y. Zhan, Y. Zhang, C. Liu et al., "A novel taspine derivative, HMQ1611, inhibits breast cancer cell growth via estrogen receptor α and EGF receptor signaling pathways," *Cancer Prevention Research*, vol. 5, no. 6, pp. 864–873, 2012.
- [118] J. Anido, P. Matar, J. Albanell et al., "ZD1839, a specific epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, induces the formation of inactive EGFR/HER2 and EGFR/HER3 heterodimers and prevents heregulin signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells," *Clinical Cancer Research*, vol. 9, no. 4, pp. 1274–1283, 2003.
- [119] M. Segovia-Mendoza, L. Díaz, M. E. González-González et al., "Calcitriol and its analogues enhance the antiproliferative activity of gefitinib in breast cancer cells," *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 148, pp. 122–131, 2015.
- [120] R. Roskoski, "The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer," *Pharmacological Research*, vol. 79, pp. 34–74, 2014.
- [121] W.-C. Huang, R.-M. Hsu, L.-M. Chi, Y.-L. Leu, Y.-S. Chang, and J.-S. Yu, "Selective downregulation of EGF receptor and downstream MAPK pathway in human cancer cell lines by active components partially purified from the seeds of *Livistona chinensis* R. Brown," *Cancer Letters*, vol. 248, no. 1, pp. 137–146, 2007.
- [122] M.-H. Kreuter, R. E. Leake, F. Rinaldi et al., "Inhibition of intrinsic protein tyrosine kinase activity of EGF-receptor kinase complex from human breast cancer cells by the marine sponge metabolite (+)-aeropylsinin-1," *Comparative Biochemistry and Physiology—Part B: Biochemistry and Physiology*, vol. 97, no. 1, pp. 151–158, 1990.
- [123] A. Lluch, P. Eroles, and J.-A. Perez-Fidalgo, "Emerging EGFR antagonists for breast cancer," *Expert Opinion on Emerging Drugs*, vol. 19, no. 2, pp. 165–181, 2014.
- [124] Y.-A. Suh, J.-H. Kim, M. A. Sung et al., "A novel antitumor activity of deguelin targeting the insulin-like growth factor (IGF) receptor pathway via up-regulation of IGF-binding protein-3 expression in breast cancer," *Cancer Letters*, vol. 332, no. 1, pp. 102–109, 2013.
- [125] P. Elumalai, R. Arunkumar, C. S. Benson, G. Sharmila, and J. Arunakaran, "Nimbolide inhibits IGF-I-mediated PI3K/Akt and MAPK signalling in human breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231)," *Cell Biochemistry & Function*, vol. 32, no. 5, pp. 476–484, 2014.
- [126] G. Badr, O. Garraud, M. Daghestani, M. S. Al-Khalifa, and Y. Richard, "Human breast carcinoma cells are induced to apoptosis by samsun ant venom through an IGF-1-dependant pathway, PI3K/AKT and ERK signaling," *Cellular Immunology*, vol. 273, no. 1, pp. 10–16, 2012.
- [127] J. Chen, R. Hou, X. Zhang, Y. Ye, Y. Wang, and J. Tian, "Calycosin suppresses breast cancer cell growth via ER β -dependent regulation of IGF-1R, p38 MAPK and PI3K/Akt pathways," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 3, Article ID e91245, 2014.
- [128] Y. Yang and D. Yee, "Targeting insulin and insulin-like growth factor signaling in breast cancer," *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, vol. 17, no. 3–4, pp. 251–261, 2012.
- [129] S. A. Byron, K. B. Horwitz, J. K. Richer, C. A. Lange, X. Zhang, and D. Yee, "Insulin receptor substrates mediate distinct biological responses to insulin-like growth factor receptor activation in breast cancer cells," *British Journal of Cancer*, vol. 95, no. 9, pp. 1220–1228, 2006.
- [130] A. Gualberto, M. L. Hixon, D. D. Karp et al., "Pre-treatment levels of circulating free IGF-1 identify NSCLC patients who derive clinical benefit from figitumumab," *British Journal of Cancer*, vol. 104, no. 1, pp. 68–74, 2011.
- [131] M. A. Becker, X. Hou, S. C. Harrington et al., "IGFBP ratio confers resistance to IGF targeting and correlates with increased invasion and poor outcome in breast tumors," *Clinical Cancer Research*, vol. 18, no. 6, pp. 1808–1817, 2012.



IGF-I/EGF and E2 signaling crosstalk through IGF-IR conduit point affects breast cancer cell adhesion



Kallirroi Voudouri^a, Dragana Nikitovic^a, Aikaterini Berdiaki^a, Dimitris Kletsas^b, Nikos K. Karamanos^c and George N. Tzanakakis^a

a - Laboratory of Anatomy-Histology-Embryology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece

b - Laboratory of Cell Proliferation and Ageing, Institute of Biology, National Center of Scientific Research "Demokritos", Athens, Greece

c - Biochemistry, Biochemical Analysis and Matrix Pathobiology Res. Group, Laboratory of Biochemistry, Department of Chemistry, University of Patras, 26110 Patras, Greece

Correspondence to George N. Tzanakakis: at: Faculty of Medicine, University of Crete, 71003, Voutes, Heraklion, Greece. tzanakak@med.uoc.gr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2016.06.005>

Abstract

Epidermal growth factor (EGF)/insulin like growth factor-I (IGF-I) and Estradiol (E2) can regulate biological functions of hormone-dependent tumor cells. Fibronectin (FN) is a large glycoprotein abundantly expressed in breast cancer extracellular matrices (ECMs) postulated to be a marker of aggressiveness during cancer pathogenesis. In this study we demonstrate that IGF-I/EGF as well E2 strongly increase the adhesion of the MCF-7 breast cancer cells onto FN. Moreover, IGF-IR is necessary for the IGF-I-/EGF- and E2-induced cell adhesion. Erk1/2 inhibition abolished the IGF-I-/EGF-/E2-induced MCF-7 cell adhesion, suggesting that this regulation of cell adhesion is perpetrated through Erk1/2 downstream signaling. Erk1/2 signaling was shown to modulate IGF-IR status as its' inhibition attenuates both IGF-IR expression and activation. Notably, EGF and E2 enhanced the mRNA as well as protein expression of IGF-IR in MCF-7 cells. Confocal microscopy demonstrated that treatment of MCF-7 cells with IGF-I or EGF induced actin reorganization, which was attenuated with Erk1/2 inhibition. Interestingly, IGF-I treatment induced a co-localization of IGF-IR and FAK, which was evident mostly at the cell membranes of MCF-7 cells. In summary, IGF-IR was shown to be a convergence point for the IGF-/EGF- and E2-dependent MCF-7 cell adhesion onto FN.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Breast cancer is the most common cancer and the second cause of cancer mortality among women [1,2]. Indeed, breast cancer cells have an increased ability to proliferate, invade the surrounding tissues and metastasize [3]. The interaction of the cells with their microenvironment, the extracellular matrix (ECM), is a critical step in carcinogenesis [4,5]. Moreover, accumulating evidence indicates that ECM components are strongly involved in the processes of cancer metastasis [6]. Cancer cells adhere to ECM components through specific binding of their respective transmembrane proteins and this process crucially affects their behavior. Focal adhe-

sions are highly organized contact points at the cell-ECM interface, directly communicating with the cell actin cytoskeleton [7].

Fibronectin (FN) is a large glycoprotein abundantly expressed in breast cancer ECMs, which interacts with different cell membrane proteins and thus modulates cell adhesion and migration [8]. Importantly, FN has been postulated as a marker of aggressiveness during cancer pathogenesis [9]. Thus, in breast cancer, expression of FN is positively correlated with increased aggressiveness and motile phenotype of cells [10,11]. Furthermore, the expression of FN is regulated by estrogen receptor α (ER α), as ER α depleted MCF-7 breast cancer cells show enhanced FN expression [10]. Noteworthy, tamoxifen-resistant

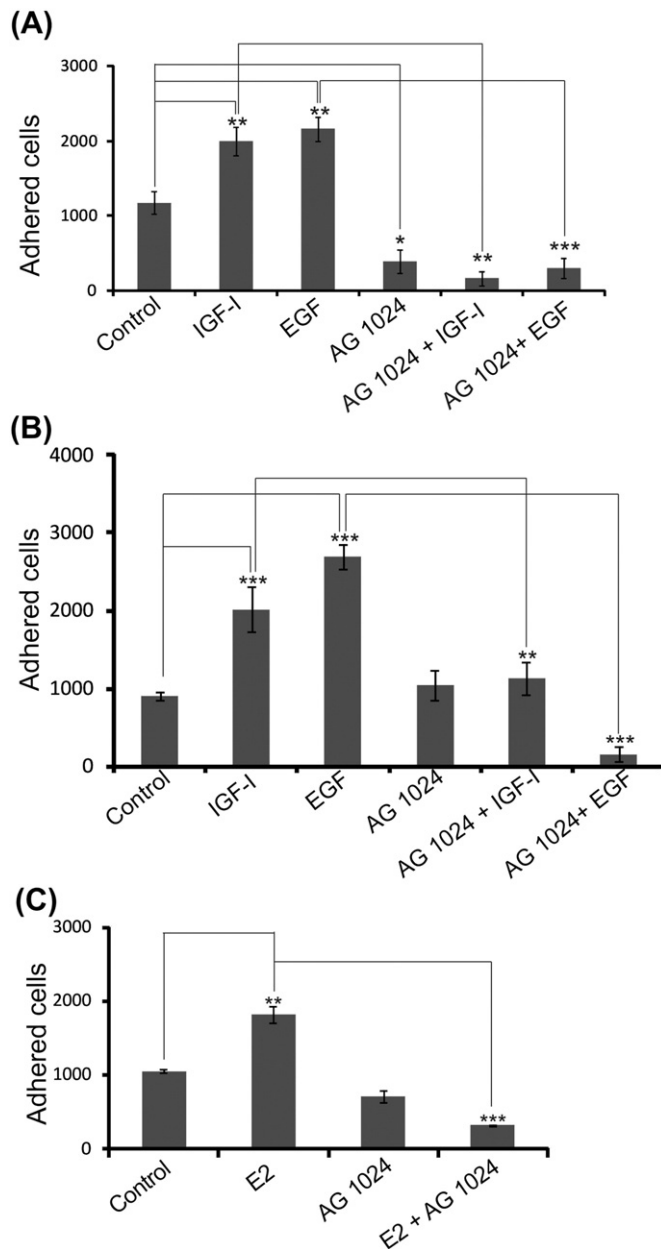


Fig. 1. IGF-IR affects IGF-I/EGF-and E2-induced cell adhesion. (A), MCF-7 cells were treated with IGF-I (10 ng/ml), EGF (5 ng/ml), AG1024 (inhibitor of IGF-IR) (1 μ M) for 48 h before harvesting and reseeding for 1 h on 96 well-plates coated with FN; (B), ZR-75-1 cells were treated with IGF-I (10 ng/ml), EGF (5 ng/ml), AG1024 (inhibitor of IGF-IR) (1 μ M) for 48 h before harvesting and reseeding for 1 h on 96 well-plates coated with FN; (C), MCF-7 cells were treated with E2 (10 nM), AG1024 (inhibitor of IGF-IR) (1 μ M) and their combination for 48 h before harvesting and reseeding for 1 h on 96 well-plates coated with FN. The number of attached cells was determined using fluometricCY-QUANT Assay Kit (Molecular Probes). The results represent the average of three separate experiments in triplicate. Means \pm SEM plotted; Statistical significance * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

cells exhibit increased expression of FN and other mesenchymal markers [12].

Both growth factors and steroids can activate steroid-dependent tumor cells, thus; interaction between these signaling molecules stimulates growth and dissemination pathways at several levels [13–16]. Importantly, the categorization of breast cancer into histopathologic subtypes is based on ER and progesterone (PR) hormone receptor status and HER2/ErbB2 epidermal growth factor (EGF) receptors' expression levels [17]. ER α targeted therapy is commonly used for breast cancer treatment [14].

However, the majority of patients progress, during endocrine therapy, to resistant disease (acquired resistance) and a proportion of patients may fail to respond to initial therapy (de novo resistance) [14]. Resistance may increase the aggressiveness and bestow protection against apoptosis to breast cancer cells [18]. Importantly, several steroid responses have been functionally linked to other intracellular signaling pathways, including c-Src or tyrosine kinase receptors [14,15,19].

IGF-IR is a hetero-tetrameric transmembrane glycoprotein that involves two α - and two β - subunits;

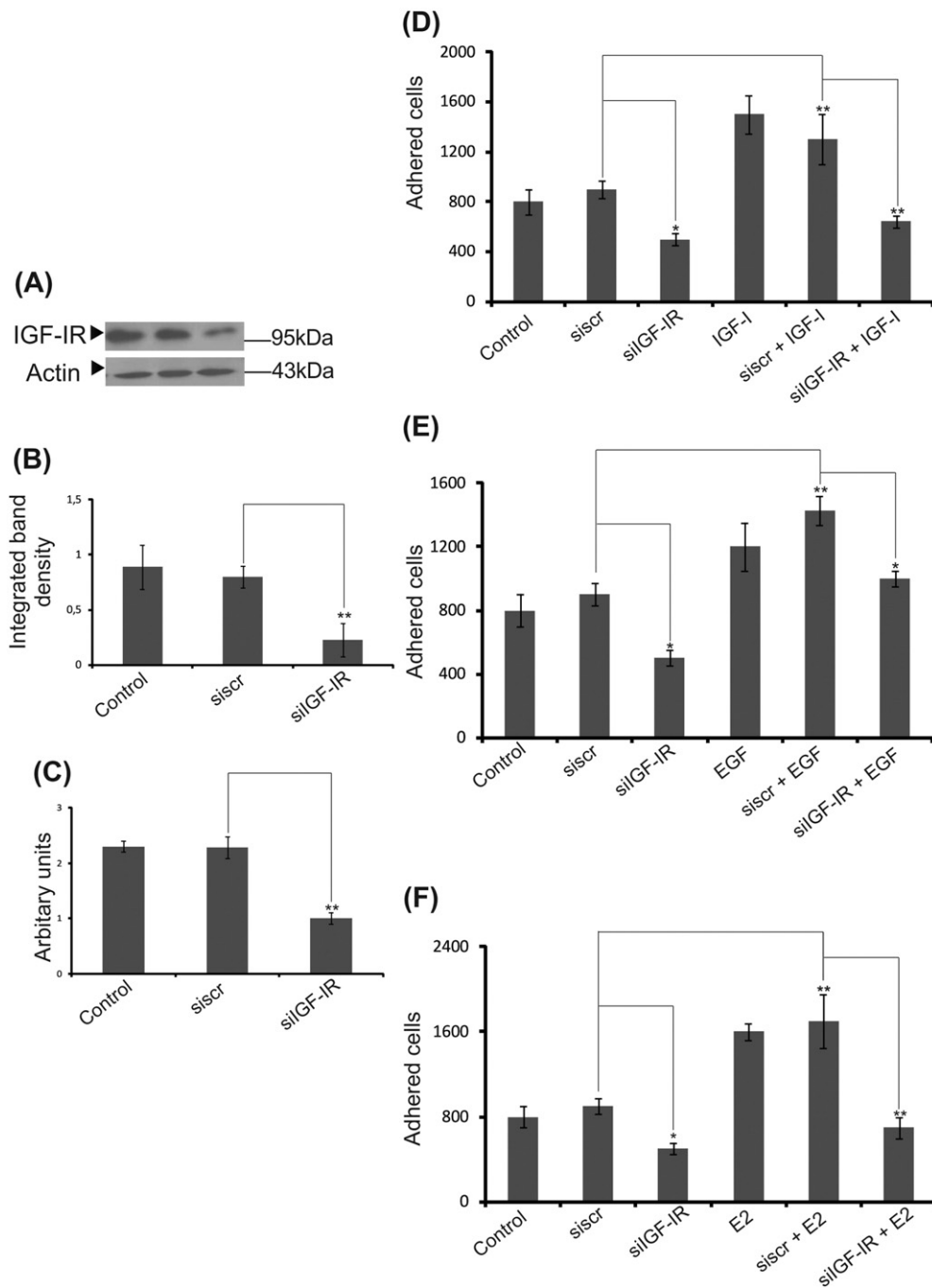


Fig. 2. IGF-IR downregulation affects IGF-I/EGF- and E2 dependent adhesion. (A), MCF-7 cells were transfected with IGF-IR short interfering RNA (siIGF-IR) whereas scramble RNA (siScr) was used as a negative control. The cells were cultured for 48 h before harvest. Representative blot of IGF-IR protein (95 kDa band) is presented;(B), IGF-IR protein bands were densitometrically analyzed and adjusted against actin; (C), MCF-7 cells were transfected with IGF-IR short interfering RNA (siIGF-IR) with the use of scramble RNA (siScr) as a negative control. The cells were cultured for 48 h before harvest and IGF-IR mRNA level expression was verified by real time PCR. Next, 24 h after transfection MCF-7 cells were treated with IGF-I (10 ng/ml) (D), EGF (5 ng/ml) (E), and E2 (10 nM) (F), for 48 h before harvesting and reseeding for 1 h on 96 well-plates coated with FN. The number of attached cells was determined using fluometricCyQUANT Assay Kit (Molecular Probes). The results represent the average of three separate experiments in triplicate. Means \pm SEM plotted; Statistical significance * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

the α subunits are the ligand binding domains and the β subunits have tyrosine kinase activity [20,21]. Ligand binding on IGF-IR induces its' conformational change and autophosphorylation at tyrosine residues 1131, 1135, 1136 of kinase domain [22]. Binding of IGF-I to IGF-IR leads to recruitment of adaptor proteins belonging to the insulin-receptor substrate (IRS) family of proteins to autophosphorylated regions within the cytosolic domain of IGF-IR with subsequent activation of downstream signaling molecules including Shc/Grb10 [23,24], Ras/Raf-1, MAPK/Erk and PI3-K/Akt [25,26]. In addition, ECM-derived cues, including the small leucine rich proteoglycan decorin, discretely regulate IGF-IR signaling between physiological and pathological cellular models [27]. Importantly, both IGF-I downstream signaling and EGF downstream signaling affect the organization of the cytoskeleton [28,29], which is critical for cell adhesion, motility and invasion. Moreover, at the level of functional properties, E2 in combination with IGF-I/EGF promotes proliferation of breast cancer cells in the presence of collagen type I and FN [30]. Indeed, the crosstalk among these signaling pathways has been suggested to modify the cell-ECM interface and ultimately to regulate breast cancer cell behavior [15,31].

Based on the above, we found of importance to investigate the crosstalk between E2 and IGF/EGF signaling pathways in breast cancer cell adhesion. The obtained results clearly demonstrate that E2 and IGF-I/EGF are positive regulators of breast cancer cell adhesion using IGF-IR downstream signaling as a common conduit.

Results

IGF-I/EGF- and E2-mediated cell adhesions onto fibronectin are regulated by IGF-IR

Taking into account the well-established role of IGF-I, EGF/ IGF-IR signaling in breast cancer pathogenesis we examined the ability of these mediators to regulate the adhesion capability of hormone responsive MCF-7 and ZR-75-1 breast cancer cells [32]. The utilization of a specific cell adhesion assay, as shown in Fig. 1A and B, demonstrated that IGF-I and EGF strongly increased the adhesion of these cells onto FN ($p < 0.01$; $p < 0.001$). Utilizing the specific IGF-IR inhibitor, AG1024, both basal ($p < 0.05$) as well as the IGF-I-and EGF-dependent MCF-7 cell adhesion was abolished ($p < 0.01$; $p < 0.001$, respectively). Likewise, both IGF-I- and EGF- dependent ZR-75-1cell adhesion was strongly attenuated in the presence of AG1024 ($p < 0.01$; $p < 0.001$, respectively). These data show that IGF-I as well as

EGF modulate MCF-7 and ZR-75-1 cell adhesion through IGF-IR downstream signaling, suggesting thus, the existence of crosstalk. The AG1024 has a low binding affinity to other insulin receptors (IR), hence ruling out their contribution in the shown effects [33]. In control experiment AG1024 was verified to inhibit IGF-IR activation (Supplemental Fig. 1A & B). The adhesion experiments were also performed at the 24 h time point with similar to 48 h effects of IGF-I, E2 and EGF stimulation (Supplemental Fig. 1C). Moreover, utilizing the specific EGFR inhibitor, AG1478, E2-dependent MCF-7 cell adhesion was abolished ($p < 0.01$); whereas no effect was evident in the enhancement of adhesion due to IGF-I stimulation ($p = ns$) (Supplemental Fig. 2).

Earlier studies demonstrated the existence of crosstalk among E2 and IGF-IR/EGF-R signaling in MCF-7 cells [34]. Therefore in continuation, taking into account that they share genomic and transcriptional features with primary tumor cells [35] MCF-7 cells were chosen as a representative model system of hormone responsive growth [34]. In the present study E2 significantly increases the ability of MCF-7 cells to adhere onto FN ($p < 0.01$) (Fig. 1C). Moreover, IGF-IR participation seems to be necessary for the E2-induced cell adhesion (Fig. 1C), as demonstrated through the use of a specific IGF-IR inhibitor ($p < 0.001$).

IGF-IR-deficient cells' adhesion is not responsive to IGF-I/EGF- and E2 stimulation

To corroborate the direct role of IGF-IR on MCF-7 cell adhesion, we utilized siRNA specific for the IGF-IR gene. Transfection of MCF-7 cells with siIGF-IR resulted in a satisfactory 55% decrease of IGF-IR mRNA expression and protein expression ($p \leq 0.01$) (Fig. 2A, B, C). Down-regulation of IGF-IR expression correlated with a significant inhibition of MCF-7 cell adhesion ($p \leq 0.05$) (Fig. 2D,E, F). Moreover, the IGF-I/EGF- and E2-stimulation of MCF-7 adhesion capacity was strongly attenuated in IGF-IR-deficient cells ($p \leq 0.01$; $p \leq 0.05$; $p \leq 0.01$ respectively) (Fig. 2D, E, F). These data verify that IGF-IR is a convergence point in the regulation of MCF-7 cell adhesion.

The effects of IGF-I/EGF- and E2 on IGF-IR expression

In control experiments and in accordance with earlier studies [36,37], MCF-7 cells were verified to highly express IGF-IR (Fig. 3A, B) and IGF-I was found to induce the phosphorylation of this receptor at the Tyr1165/1166 residue ($p < 0.001$). Notably, EGF and E2 were found to enhance the mRNA ($p < 0.01$; $p < 0.05$) as well as protein expression of IGF-IR in MCF-7 cells ($p < 0.05$) (Fig. 3C,D,E). On the other hand, mRNA and western blot analysis showed

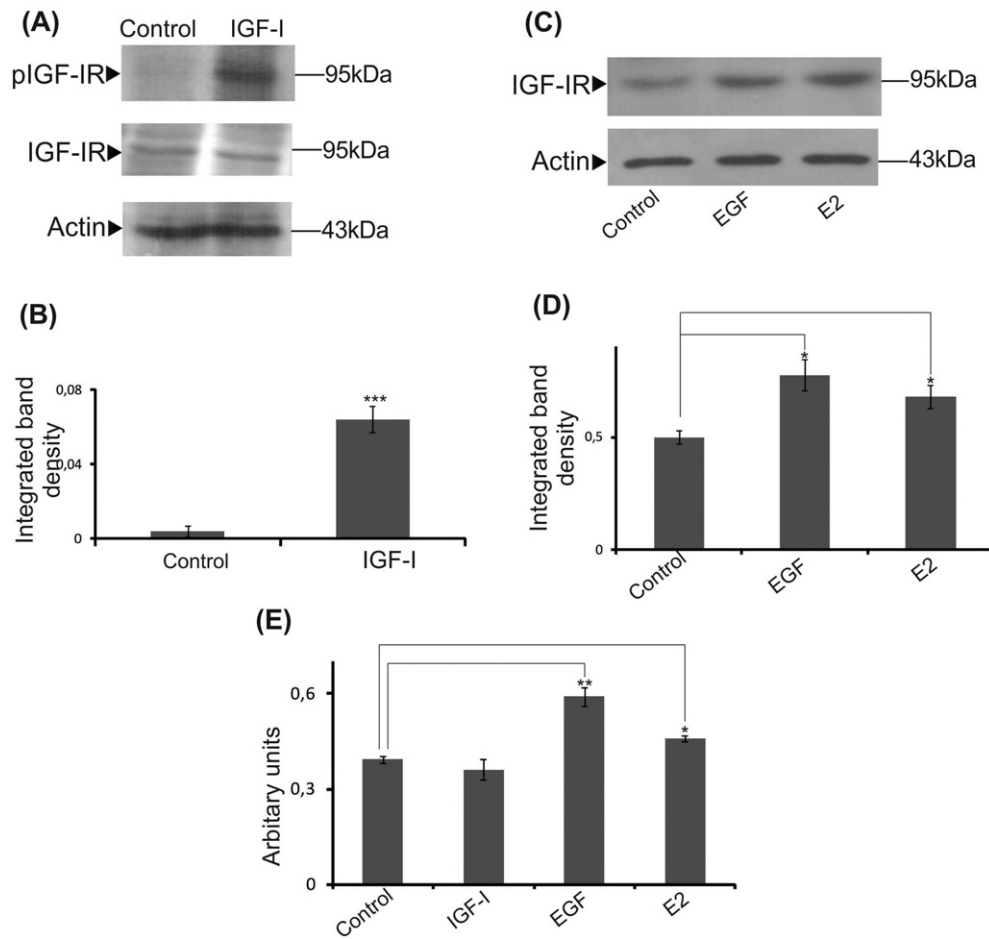


Fig. 3. IGF-I/EGF- and E2 affect IGF-IR expression. (A), MCF-7 cells were treated with IGF-I (10 ng/ml) for 48 h. A representative blot of IGF-IR protein (95 kDa) and p-IGF-IR (95 kDa) is presented; (B), IGF-I and p-IGF-IR protein bands were densitometrically analyzed and adjusted against actin; (C), MCF-7 cells were treated with IGF-I (10 ng/ml), EGF (5 ng/ml) or E2 (10 nM) for 48 h and representative blot of IGF-IR (95 kDa) is presented; (D) Protein bands were densitometrically analyzed and adjusted against actin; (E), IGF-IR mRNA expression after IGF, EGF and E2 treatments were determined by real time PCR. The results represent the average of three separate experiments in triplicate. Means \pm SEM plotted; Statistical significance * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

that neither IGF-I/EGF nor E2 treatment affected the expression of EGFR (Supplemental Fig. 3).

Erk1/2 is the downstream regulator of IGF-I/EGF- and E2-induced breast cancer cell adhesion and IGF-IR expression and activation

Ligand induced activation of IGF-IR can initiate several signaling mechanisms including the Ras/Raf/Erk pathway implicated in receptor mediated mitogenesis and transformation [38]. In this study and in accordance with previous, IGF-I and EGF significantly increased Erk1/2 activation ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) (Fig. 4A,B,C,D). We show that this activation was executed in an IGF-IR dependent manner, as the inhibition of IGF-IR downstream signaling strongly attenuated

both the IGF-I- and EGF-induced activations of Erk1/2 ($p < 0.01$ and $p < 0.01$) (Fig. 4A,B,C,D). Likewise E2, induced activation of Erk1/2 was abolished upon inhibiting IGF-IR downstream signaling ($p < 0.05$) (Fig. 4E,F).

These data prompted us to further examine the possible participation of Erk1/2 in IGF-I/EGF-/E2-induced breast cancer cell adhesion. As demonstrated in Fig. 5A, the use of Erk1/2 inhibitor strongly decreased both the IGF-I ($p < 0.01$) and EGF-dependent ($p < 0.05$) cell adhesions. These results suggest that the IGF-I-/EGF-dependent regulation of MCF-7 cell adhesion may well be perpetrated through the Erk1/2 downstream signaling. Moreover, as shown in Fig. 5B, Erk1/2 inhibition resulted in the inhibition of E2-dependent MCF-7 cell adhesion ($p < 0.001$). In separate experiments

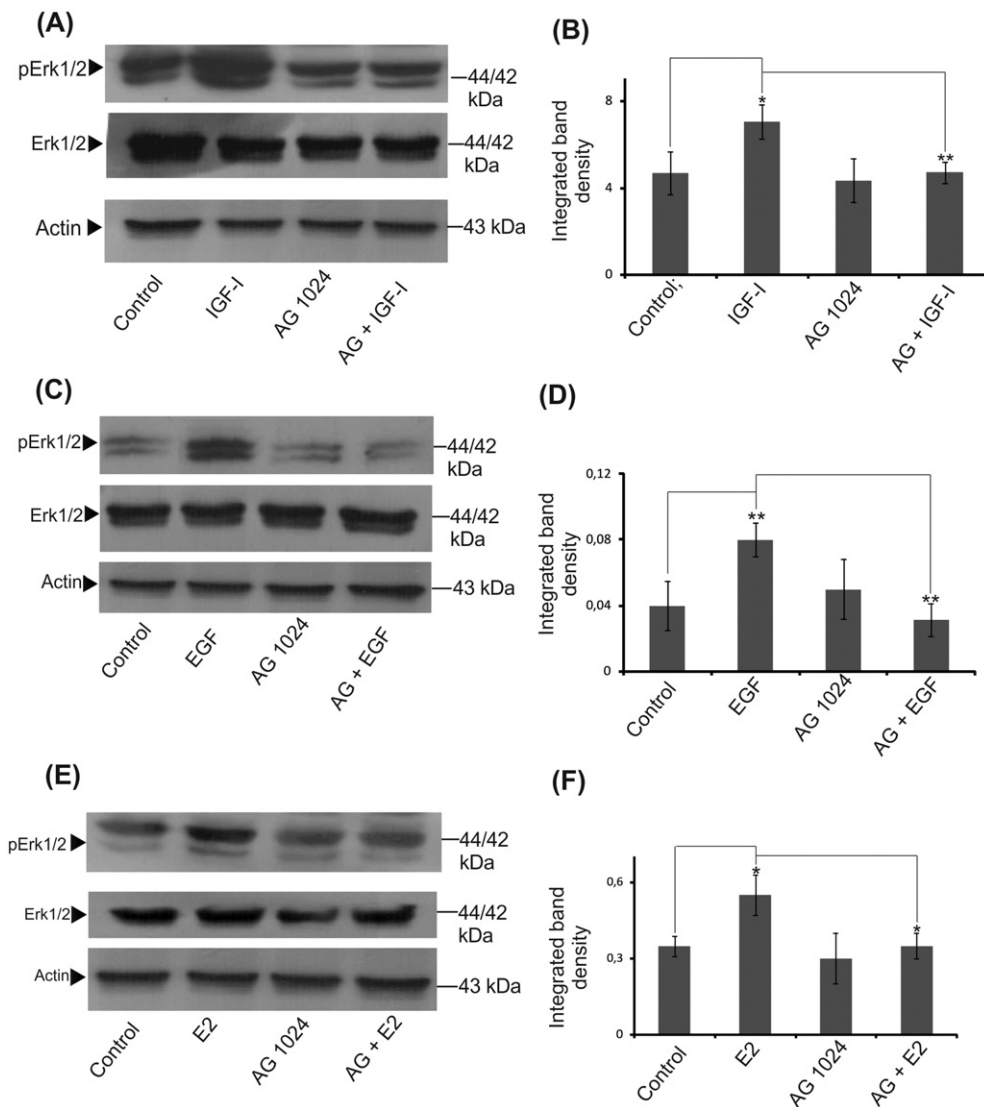


Fig. 4. IGF-IR affects Erk1/2 activation. (A), MCF-7 cells were treated with IGF-I (10 ng/ml), AG1024 (inhibitor of IGF-IR) (1 μ M) and their combination for 48 h before harvest. Representative blots of Erk1/2 protein (42/44 kDa) and p-ERK1/2 (44/42 kDa) are presented; (B), Erk1/2, p-Erk1/2 protein bands were densitometrically analyzed and adjusted against actin; (C), MCF-7 cells were treated with EGF (5 ng/ml) and AG1024 (inhibitor of IGF-IR) (1 μ M), for 48 h before harvest. Representative blots of Erk1/2 protein (42/44 kDa) and p-Erk1/2 (44/42 kDa) are presented; (D), Erk1/2 and p-Erk1/2 protein bands were densitometrically analyzed and adjusted against actin; (E), MCF-7 cells were treated with E2 (10 nM), AG1024 (inhibitor of IGF-IR) (1 μ M) and their combination for 48 h before harvest. Representative blots of Erk1/2 protein (42/44 kDa) and p-Erk1/2 (44/42 kDa) are presented; (F), Erk1/2 and p-Erk1/2 protein bands were densitometrically analyzed and adjusted against actin. The results represent the average of three separate experiments in triplicate. Means \pm SEM plotted; Statistical significance * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

IGF-I-dependent PI-3K downstream signaling was shown to participate in the regulation of MCF-7 cell adhesion (Fig. 5C, D, E). The utilization of LY294002 inhibitor of PI-3K, strongly decreased both the IGF-I ($p < 0.05$) and E2-dependent ($p < 0.01$) cell adhesion (Fig. 5C, E).

It is well established that the IGF-I-induced MAPK activation [39], may mediate oncogenic signaling

[40]. In continuation, we examined possible feedback regulation between Erk1/2 downstream signaling and IGF-IR expression/activation utilizing a specific Erk1/2 inhibitor. This approach demonstrates a key role of Erk1/2 signaling on IGF-IR status as inhibition of Erk1/2 signaling attenuates both the IGF-IR expression and activation ($p < 0.001$) (Fig. 6A, B and C).

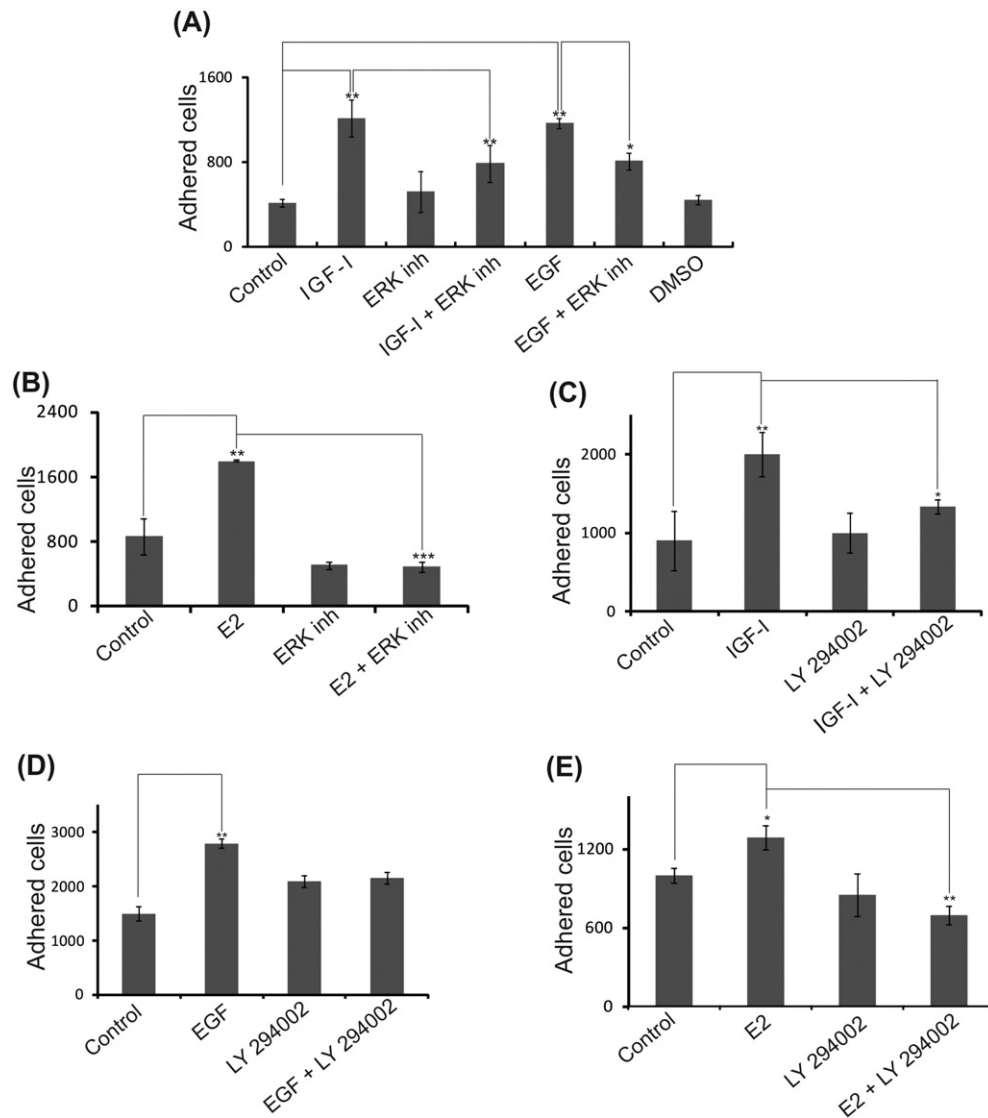


Fig. 5. Erk1/2 and PI-3kinase regulate MCF-7 cell adhesion. (A), MCF-7 cells were treated with IGF-I (10 ng/ml), EGF (5 ng/ml), Erk1/2 inhibitor (5 μ M) and their combinations for 48 h before harvesting and reseeding for 1 h on 96 well-plates coated with FN; (B), MCF-7 cells were treated with E2 (10 nM) and Erk1/2 inhibitor (5 μ M) and their combination for 48 h before harvesting and reseeding for 1 h on 96 well-plates coated with FN. (C), MCF-7 cells were treated with IGF-I (10 ng/ml) and PI3-kinase inhibitor (LY294002) (10 μ M) for 48 h before harvesting and reseeding for 1 h on 96 well-plates coated with FN. (D), MCF-7 cells were treated with EGF (5 ng/ml) and PI3-kinase inhibitor (LY294002) (10 μ M) for 48 h before harvesting and reseeding for 1 h on 96 well-plates coated with FN; (E), MCF-7 cells were treated with E2 (10 nM) and PI3-kinase inhibitor (LY294002) (10 μ M) for 48 h before harvesting and reseeding for 1 h on 96 well-plates coated with FN; and the number of attached cells was determined using the CyQUANT Assay Kit (Molecular Probes). The results represent the average of three separate experiments in triplicate. Means \pm SEM plotted; Statistical significance * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

IGF-I/EGF affects the organization of cytoskeleton of breast cancer cells in an Erk1/2 dependent manner

The “transformed tumor cell phenotype” based on specific cytoskeleton rearrangements and correlated with their growth, efficient adhesion and migration,

results ultimately in successful metastatic dissemination [41]. Therefore, we examined possible effects of IGF-I/EGF on breast cancer cell actin cytoskeleton arrangement. Rhodamine conjugated phalloidin staining was used for F-actin detection. A significant increase in actin polymerization (green color) is evident in IGF-I and EGF stimulated cells (Fig. 7C,

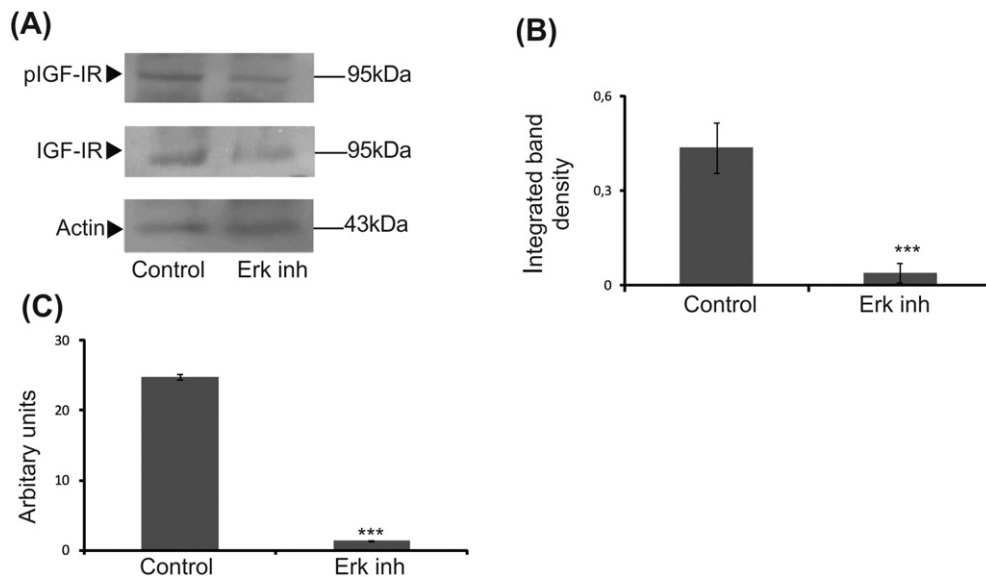


Fig. 6. The role of Erk1/2 on IGF-IR expression and activation. (A), MCF-7 cells were treated with Erk1/2 inhibitor (5 μ M) for 48 h before harvest. Representative blot of IGF-IR protein (95 kDa), p-IGF-IR (95 kDa) is presented; (B), IGF-IR and p-IGF-IR protein bands were densitometrically analyzed and adjusted against actin; (C), MCF-7 cells were treated with Erk1/2 inhibitor (5 μ M) for 48 h before harvest and IGF-IR mRNA expression was determined by real time PCR. The results represent the average of three separate experiments in triplicate. Means \pm SEM plotted; Statistical significance * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

E). Moreover, confocal microscopy demonstrates that treatment of MCF-7 cells with IGF-I or EGF resulted in the fully spread, adhesive phenotype with the cells being stretched by the tensile forces of actin stress fibers (Fig. 7C, E). In contrast, control cells had less well organized actin stress fibers (Fig. 7A). Importantly, Erk1/2 inhibition attenuated IGF-I/EGF-dependent actin reorganization (Fig. 7D, F).

IGF-I/EGF-induced increase in breast cancer cell adhesion depends on the presence and activation of FAK

Focal Adhesion Kinase (FAK) is a 125-kDa cytoplasmic tyrosine kinase protein localized at adhesion sites with critical role in processes of cell adhesion, motility and survival [42,43] and importantly is the main transducer of the integrin signaling required to stabilize the actin cytoskeleton. To examine the putative participation of FAK signaling on the IGF-I/EGF-dependent adhesion, we transfected MCF-7 cells with FAK siRNA (siFAK) designed according to Hong et al., [44] and demonstrated to be specific for the FAK gene [45]. As shown in Fig. 8A, B and C, treatment of MCF-7 cells with siFAK for 48 h resulted in the statistically significant (p < 0.01) inhibition of FAK at both mRNA and protein expression levels. The inhibition of FAK expression decreases their adhesion capability (50%) as compared to cells treated with scramble siRNA (Fig. 8D, E, F). Notably, IGF-I-, EGF-

and E2-dependent adhesion was significantly inhibited in FAK-deficient cells MCF-7 cells (p < 0.001; p < 0.01; p < 0.001, respectively), indicating that the stimulatory effect that IGF-I/EGF and E2 exerted on MCF-7 cells is FAK-dependent (Fig. 8D, E, F). These data demonstrate that active FAK signaling was obligatory for the IGF-I, EGF- and E2-induced effects on MCF-7 cell adhesion.

We examined the putative IGF/EGF effects on FAK activation and the possible participation of Erk1/2 in this action. It has been previously established that the activation of FAK can be enhanced by growth factor signaling [46]. In the present study both IGF and EGF strongly induced FAK phosphorylation at Tyr397 with a statistical significance of p < 0.001 and p < 0.01, respectively (Fig. 9A, B). Furthermore, we demonstrate in MCF-7 cells that IGF-I- and EGF-induced FAK activation was accomplished through Erk1/2 signaling (Figs. 9A, B) well in line with earlier reports showing that Erk1/2 can regulate the activation of FAK in other model systems [47]. Utilization of a specific PI-3K inhibitor demonstrated the participation of PI-3K downstream signaling in IGF-I modulation of FAK activation (Fig. 9C, D). Integrins, and particularly β 1, have been demonstrated to be major membrane receptors, which in co-operation with FAK, participate in adhesion onto the FN substrate. In control experiments it was demonstrated that IGF-I, EGF and E2 do not affect integrin β 1 expression (Supplemental Fig. 4).

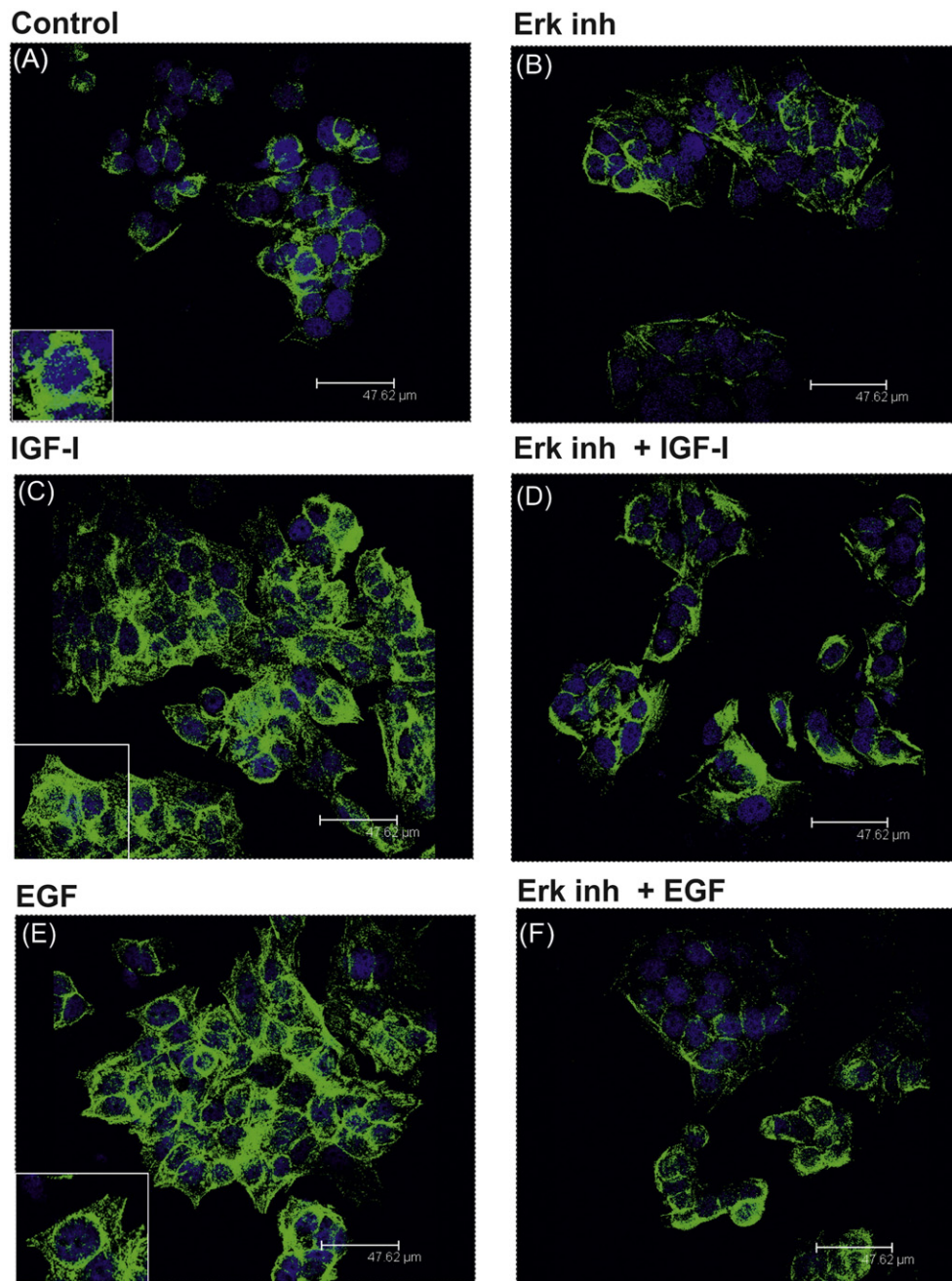


Fig. 7. The role of Erk1/2 on actin organization. MCF-7 cells were treated with IGF-I (10 ng/ml), EGF (5 ng/ml) and Erk1/2 inhibitor (5 μ M) as well as their combinations for 48 h, seeded onto glass coverslips, fixed, permeabilized, and then stained using phalloidin to visualize the actin filaments (green color). The nuclei were stained using TO-PRO-3. The signals against phalloidin and TO-PRO-3 were superimposed. Slides were analyzed by confocal microscopy, and pictures were taken using $\times 40$.

IGF-IR and FAK co-localization

Taking into account, the above showed IGF-IR and FAK co-operation in the regulation of cell adhesion and the demonstrated FAK activation through IGF-I

downstream signaling, in alignment with previous reports [48]; we examined their cellular localization. Utilization of immunofluorescence demonstrated an abundant deposition of IGF-IR and FAK in MCF-7 cells (Fig. 10). IGF-I treatment induced a co-localization of

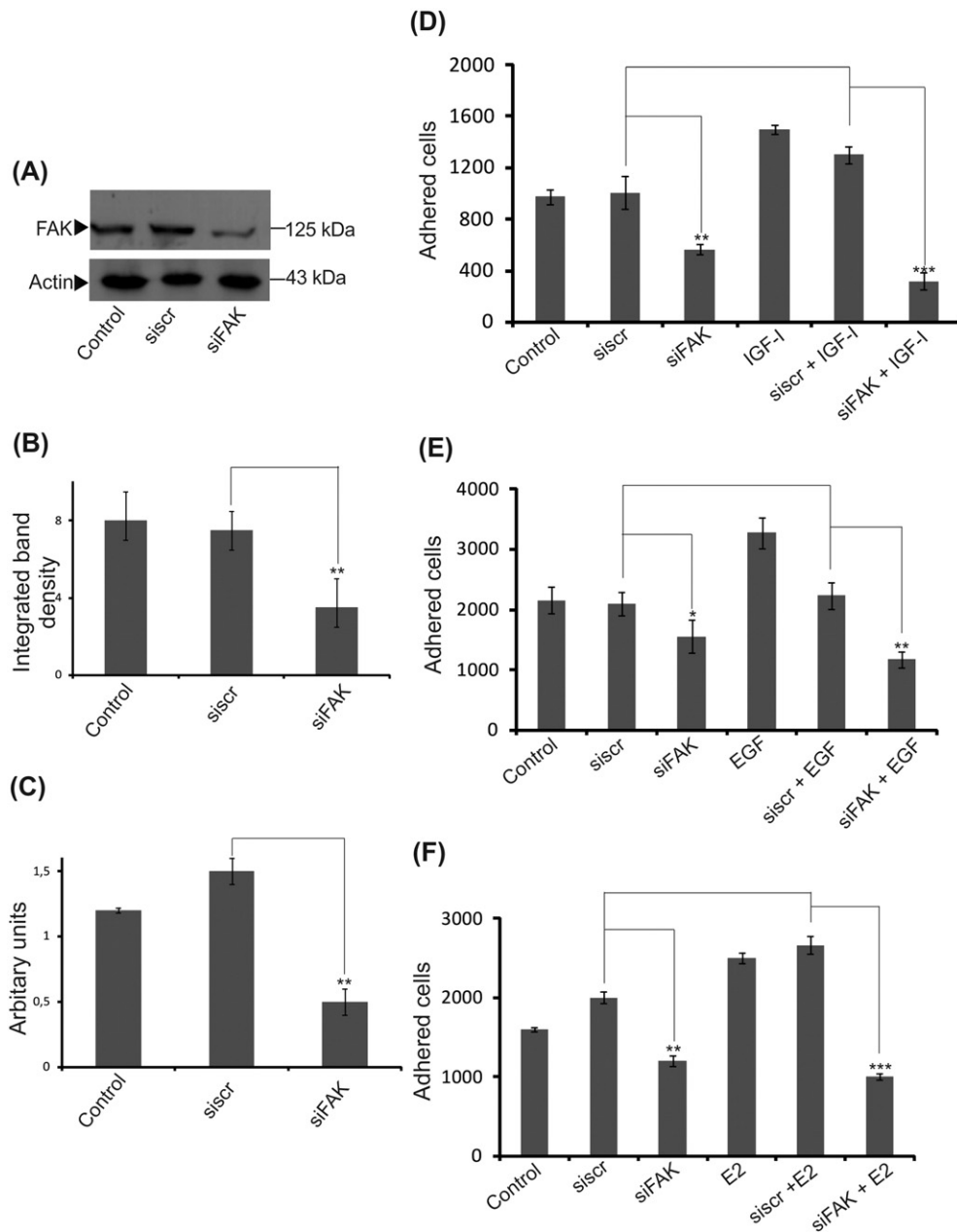


Fig. 8. The role of FAK on breast cancer cell adhesion. (A), MCF-7 cells were transfected with FAK short interfering RNA (siFAK) whereas scramble RNA (siScr) was used as a negative control. The cells were cultured for 48 h before harvest. FAK mRNA expression was determined utilizing real time PCR; (B), Representative blot of FAK protein (125 kDa band) is presented. FAK protein bands were densitometrically analyzed and adjusted against actin. (C), MCF-7 cells were transfected with FAK short interfering RNA (siFAK) with the use of scramble RNA (siScr) as a negative control. The cells were cultured for 48 h before harvest and FAK mRNA levels expression was verified by real time PCR. Next, 24 h after transfection MCF-7 cells were treated with IGF-I (10 ng/ml) (D), EGF (5 ng/ml) (E), and E2 (10 nM) (F), for 48 h before harvesting and reseeding for 1 h on 96 well-plates coated with FN. The number of attached cells was determined using fluometricCyQUANT Assay Kit (Molecular Probes). The results represent the average of three separate experiments in triplicate. Means \pm SEM plotted; Statistical significance * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

IGF-IR and FAK evident mostly at the cell membranes of MCF-7 cells (Fig. 10). Erk1/2 inhibition caused a downregulation of IGF-IR expression and unattenuation of IGF-IR and FAK co-localization (Fig. 10).

Discussion

In the present study, we show that IGF-I, EGF and E2 increase the capacity of MCF-7 cells to adhere

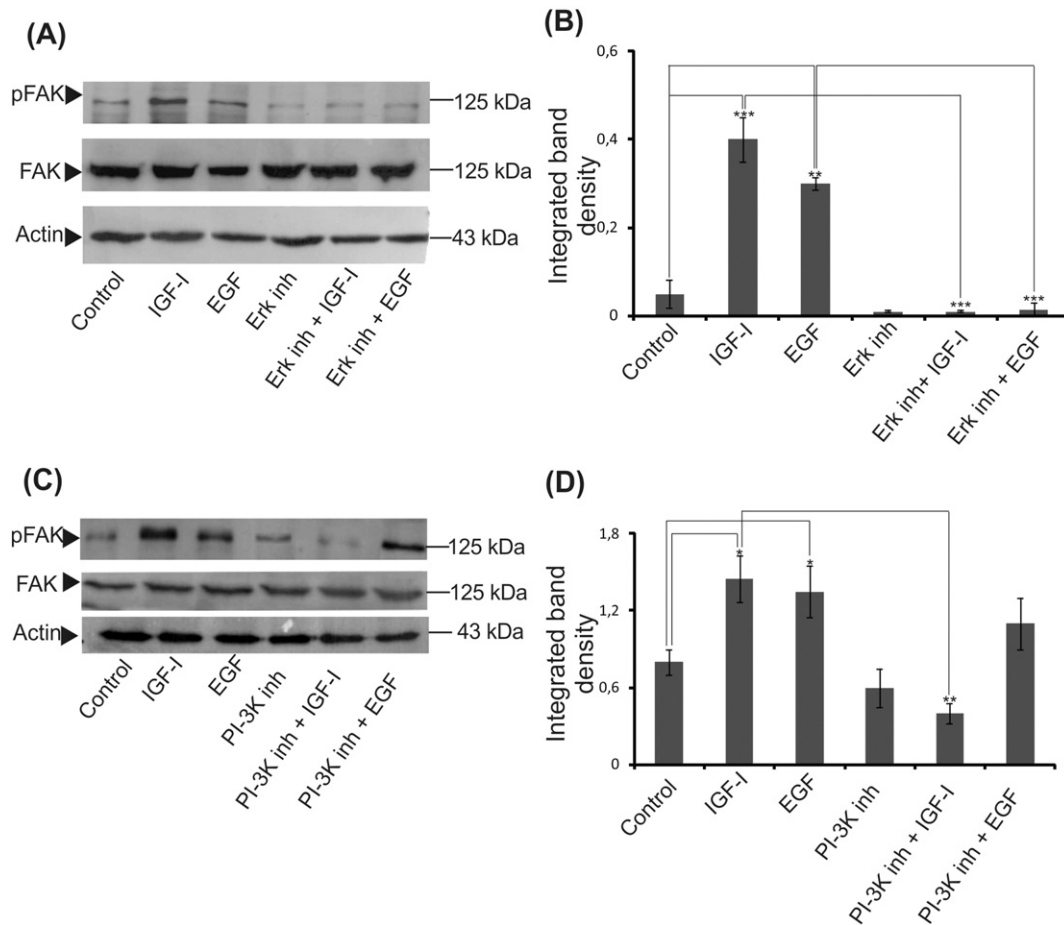


Fig. 9. The role of Erk1/2 on the FAK activation. (A), MCF-7 cells were treated with IGF-I (10 ng/ml), EGF (5 ng/ml) and Erk1/2 inhibitor (5 μ M), for 48 h before harvest. Representative blot of FAK and p-FAK protein (125 kDa), are presented; (B), FAK and p-FAK protein bands were densitometrically analyzed and adjusted against actin. (C), MCF-7 cells were treated with IGF-I (10 ng/ml), EGF (5 ng/ml) and PI-3 K inhibitor (5 μ M), for 48 h before harvest. Representative blot of FAK and p-FAK protein (125 kDa), are presented; (D), FAK and p-FAK protein bands were densitometrically analyzed and adjusted against actin. The results represent the average of three separate experiments in triplicate. Means \pm SEM plotted; Statistical significance *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

onto FN in a manner dependent on IGF-IR downstream signaling, involving Erk1/2, IGF-IR/FAK co-localization, actin reorganization and changes in cell morphology.

IGF-I and EGF are significant regulators of breast cancer cell biological processes; including cell proliferation, invasion and migration [38,49,50]. Moreover, their contribution is critical for the maintenance of malignant transformation and protection against apoptosis [21,51]. Cell adhesion is a critical event in the migration/invasion step of cancer progression [52]. Cancer cell motility is highly dependent on components of the surrounding extracellular matrix [53,54]. FN is an abundant component of breast cancer cell microenvironment directly correlated to this cancer type progression [8,9]. In the present study we demonstrate that IGF-I, EGF and E2 enhance FN-dependent MCF-7 cell

adhesion through IGF-IR effects. Initially, we verify that IGF-I and EGF significantly increase Erk1/2 activation, common downstream mediators of IGF-IR [38] and EGFR [55,56]. Our data suggests that the IGF-I- and EGF-induced activation of Erk1/2 was IGF-IR dependent.

In hormone-dependent breast cancers, E2 plays a significant role in numerous cell functions, such as breast cancer cell proliferation and survival [57,58]. E2 and IGF-I/EGF signaling crosstalk have been suggested to regulate breast cancer progression [59,60] and expression of matrix macromolecules implicated in cancer progression [15,31]. Emerging evidence suggests that ER α participates in extracellular signaling via formation of a multiprotein complex collectively called a "signalosome" [61]. Indeed, it is suggested that EGFR, ErbB2 and IGF-IR tyrosine kinase receptors "tether" ER α to

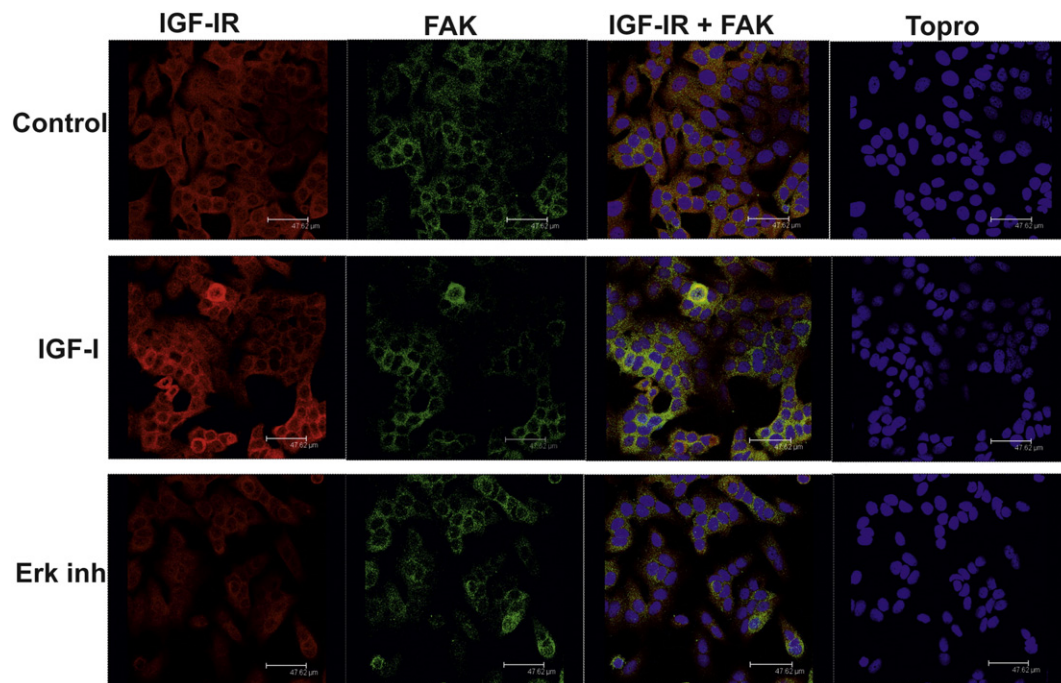


Fig. 10. IGF-IR and FAK co-localization. MCF-7 cells were treated with IGF-I (10 ng/ml), and Erk1/2 inhibitor (5 μ m), for 48 h, were seeded onto round coverslips, fixed, permeabilized, and then stained using antibodies specific for FAK (green color) and IGF-IR (red color). Alexa Fluor anti-rabbit and anti-mouse peptides were added for 1 h. The nuclei were stained using TO-PRO-3. The signals against IGF-IR, FAK and TO-PRO-3 were superimposed. Slides were analyzed by confocal microscopy, and pictures were taken using $\times 40$.

the cell membrane and participate in E2 biological actions by interacting with ER “signalosome” [62]. Interestingly, IGF-IR and ER α often show parallel overexpression in breast cancer with the IGF-IR-mediated signaling pathway being important in E2 action [62]. This pattern of IGF-IR/ER α expression of MCF-7 cells was verified in the present study, since they are both highly expressed. On the other hand, the expression of EGFR correlates inversely with the expression of ER α as it was shown in the present study; and in accordance with recently reported data [10]. However, a number of reports demonstrate that both receptors are functional in the regulation of breast cancer growth regardless of which one is dominantly expressed [63,64]. Furthermore, Coppola et al. [65] have shown that EGFR requires the participation of an active IGF-IR for its mitogenic and transforming activities. Here we demonstrate that both EGF and E2 upregulate the expression of IGF-IR, which would result in increased Erk1/2 activation and enhanced downstream signaling. Noteworthy, it has previously been shown in MCF-7 cells that IGF-I and EGF activate the A/B domain of ER α via the MEK/Erk1/2 pathway [61,66]. In the present study, it was demonstrated that E2 enhanced the ability of MCF-7 cells to adhere onto FN. Furthermore,

IGF-IR participation was necessary for the E2-induced adhesion, as the IGF-IR specific inhibitor AG1024 decreased the E2-induced adhesion. According to earlier studies E2 action involves both IGF-IR and EGFR signaling [62]. This biological effect of E2 in MCF-7 cell adhesion is attributed to non-genomic action of E2, which results in rapid phosphorylation of IGF-IR and in the activation of its downstream signaling pathways (MAPK and Akt) [60,67].

A significant contribution of ER α , through Erk signaling, in the regulation of breast cancer cell motility properties has been suggested by Bouris et al. [10]. Moreover, the same authors have recently indicated a key role of ER β in the regulation of breast cancer cell behavior [68]. Researchers have shown, in an urothelial cancer model system, that IGF-IR dependent motility and invasion require the PI-3kinase and MAPK signaling activation [69]. Further focusing on the role of Erk1/2 signaling pathway in the action of IGF-I, EGF and E2 in breast cancer cell adhesion, demonstrated that the increase of breast cancer cell adhesion by IGF, EGF and E2 is dependent on the IGF-IR/Erk1/2-signaling axis. In an earlier report E2 was shown to modulate the expression of IGF-signaling pathway components enhancing MAPK activation and this resulted

in increased MCF-7 cell growth [60]. Thus, cross-talk between IGF- and ER-signaling pathways results in synergistic growth.

ER is a key transcription factor that drives gene expression in ER-positive breast cancers [70]. In this study both genomic and non-genomic ER actions [71,72] are implied as E2 was shown to transactivate IGF-IR as well as to upregulate and maintain high levels of IGF-IR expression; which facilitate the ability of MCF-7 cell to adhere onto FN. Specifically, E2 activates ER α , which in turn transactivates IGF-IR that mediates adhesion through Erk1/2 [72,73].

Additionally, upon activation of receptor protein tyrosine kinases (RPTK) like IGF-IR and EGFR, the PI-3K lipid kinase may be recruited to the cell membrane to trigger activation of downstream signaling pathways [74]. The possible participation of PI3-kinase in the IGF/EGF and E2 action in MCF-7 cell adhesion was also investigated in this study; and we show that PI-3kinase mediated IGF and E2 signal activation in breast cancer cell adhesion. These results suggest that PI-3K downstream signaling participates in the IGF/E2-dependent MCF-7 adhesion. Data presented in earlier reports on epithelial malignancies indicate that RPTK downstream signaling may have differential requirements regarding MAP kinase and PI-3K participation [25,75]. On the other hand, the expression of IRS-1, a major downstream signaling effector for IGF1 receptors known to convey signals to PI-3K/Akt and ERK1/2 pathways, is regulated by ER activities [76]. These studies demonstrate selective overlapping of Erk1/2 and PI-3K signaling in the regulation of breast cancer cell function that is well correlated to the present report.

The inhibition of Erk1/2 downregulates the expression and activation of IGF-IR, indicating the existence of a feedback loop between IGF-IR and Erk1/2. Specifically, IGF-I activates the Erk1/2 via IGF-IR regulation and at the same time the Erk1/2 regulates the gene expression of IGF-IR. It is known that Erk1/2 regulates numerous genes associated with cancer progression [77]. Importantly, IGF-IR gene lacks TATA box and CAAT sequences which are required for accurate transcription, thus the IGF-IR gene can be subjected to multiple regulation through a unique 'initiator' motif [78]. Moreover it has been suggested that in ER α -positive cells increased cellular IGF-IR expression results in its nuclear translocation and transcriptional upregulation of IGF-IR gene [79]. Importantly, it is generally well established, that IGF-IR expression is a fundamental prerequisite for the progression of oncogenesis [80]. Moreover, IGF-IR gene expression in breast and prostate cancer shows a strict correlation to the disease stage [81,82]. It can be hypothesized thus, that the protracted overexpression of IGF-IR at early stages of carcinogenesis bestows advantageous traits upon transformed cells.

The presence of growth factors and the alteration in adhesive properties of cells can lead to changes in the cytoskeleton organization [83]. MCF-7 cells are poorly invasive and non-metastatic cells with an epithelial profile [84]. According to the results of the present study the increased adhesion by IGF-I and EGF to FN was accompanied by modulation of actin filament organization. The effect of these growth factors on the cytoskeleton organization was Erk1/2 dependent. Thus, the IGF-I/EGF signaling induced the fully spread, adhesive phenotype with the cells being stretched by the tensile forces of actin stress fiber characteristic of the "transformed tumor cell phenotype" and resulting in efficient adhesion and migration. FAK is a protein located near the cell membrane with a regulatory role in breast cancer cell adhesion, motility and survival [43,85]. Tyrosine kinase phosphorylation of FAK at the Y397 residue [86,87] and the subsequent phosphorylation of FAK binding proteins, such as paxillin and Cas [85] cause cytoskeletal changes and activation of Ras-MAPK and PI3-kinase signaling pathways [87,88]. In this study, we have shown that both IGF and EGF activate the FAK at Y397 in an Erk1/2 dependent manner. According to earlier reports, the activation of FAK can be enhanced by the stimulation of growth factor signaling [46]. Moreover, FAK activation has been suggested to be mediated by IGF-IR in fibroblasts [89] and by EGFR in keratinocytes [90]. Likewise, previous studies show that Erk1/2 participates in FAK activation [47,91].

FAK and IGF-IR physical association has earlier been demonstrated in pancreatic and glioma cancers [92,93]. Moreover, Zheng et al., [91] show that the FERM domain of FAK can bind to the β subunit of IGF-IR. FAK activation is necessary for IGF-IR mediated regulation of EMT and regulation of motility properties of triple negative breast cancer cells [94]. In this study FAK and IGF-IR were found to co-localize in MCF-7 cells. In addition, IGF-I was found to enhance the merged signal demonstrating that the co-localization was dependent on downstream IGF-IR signaling. Upon Erk1/2 inhibition the co-localization decreased significantly. Thus, the results of this study suggest that Erk1/2 through the regulation of IGF-IR and FAK expression and a probable complex formation significantly affects actin re-organization and modulates MCF-7 cell adhesion onto FN. These findings therefore introduce a novel "concept" where IGF-I/EGF and E2 crosstalk facilitated by mechanistic feedback from the cancer cell microenvironment, during the adhesion process, maintain IGF-IR overexpression essential for the early steps of cancer progression. The roles of IGF-I/EGF and E2 crosstalk on breast cancer cell adhesion phenotype are schematically depicted in Fig. 11.

In summary, IGF-IR was shown to be a convergence point for IGF-I/EGF- and E2-induced MCF-7 cell adhesions onto FN. Common downstream

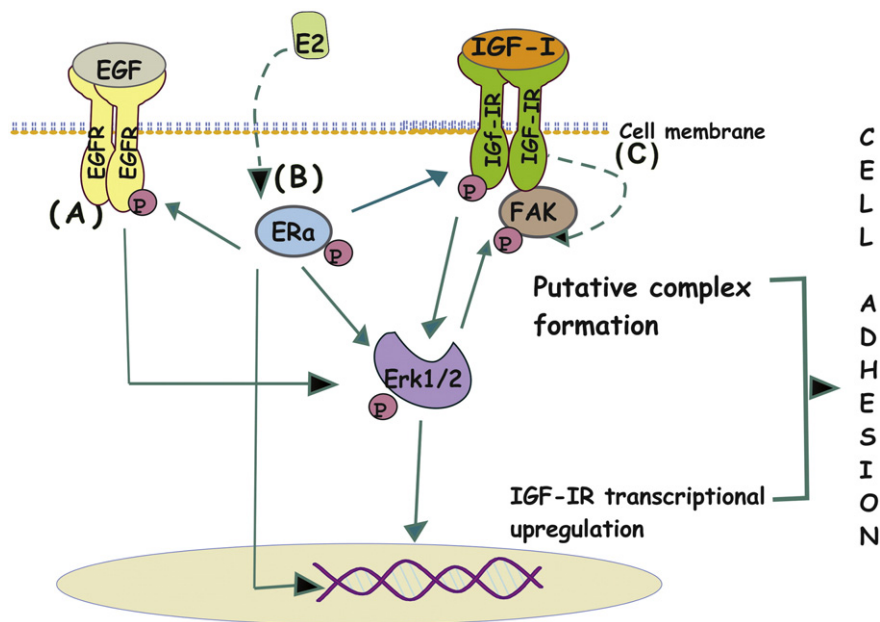


Fig. 11. IGF-IR is a major conduit point for IGF/EGF and E2 crosstalk in the regulation of breast cancer cell adhesion. (A), Binding of the EGF ligand activates EGFR and downstream Erk1/2 signaling to enhance IGF-IR expression; (B), E2 enters the cytoplasm to activate ER which may transactivate EGFR and IGF-IR (non-genomic action) or localize to nucleus to transcriptionally regulate IGF-IR expression (genomic action); (C), Binding of the IGF-I ligand activates IGF-IR to transactivate FAK and putative complex formation and/or to enhance Erk1/2 activation and resulting FAK phosphorylation. Through feedback regulation Erk1/2 maintains high levels of IGF-IR expression. The crosstalk of above mentioned pathways results in increased breast cancer cell adhesion.

mediators including Erk1/2 and FAK were activated to affect the cytoskeleton organization. Complex formation among IGF-IR–FAK and ER cannot be excluded and this is currently under study in our laboratories.

Materials & methods

Chemicals, biochemicals and reagents

IGF (insulin-like growth factor) was supplied by R&D Diagnostics MN, stock solutions of 10 µg/ml were prepared, by dissolving IGF in sterile Phosphate Buffered Saline (PBS), EGF (epidermal growth factor) was supplied by Sigma Chemicals (Germany), stock solutions of 5 µg/ml were prepared, by dissolving EGF in sterile Phosphate Buffered Saline (PBS), E2 (Estradiol) was supplied by Sigma Chemicals (Germany), stock solutions of 200 nM were prepared, by dissolving E2 in medium. Allosteric inhibitor of IGF-IR and EGFR (AG1024 and AG1478 respectively) supplied by Sigma Chemicals (Germany), stock solutions were prepared, by dissolving inhibitors in DEPC H₂O. Selective inhibitor of ERK1/2 (U0126) was supplied by Cell Signaling Life technologies and utilized as previously described [95,96]. Selective inhibitor of PI-3kinase (LY294002) was supplied by

Cayman Chemical. Dubblecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High glucose and penicillin–streptomycin were obtained from Biosera, Fetal Bovine Serum (FBS) by Gibco CA and human plasma fibronectin (1 mg/ml) from Millipore.

Cell line and cell culture conditions

In this study we used MCF-7 (ERα positive) and ZR-75-1 (ERα/β) breast cancer cell lines [32]. Cells were cultured as monolayers at 37 °C and humidity of 5% v/v CO₂. Cells were seeded in 75 cm² plastic flasks and cultured in DMEM High glucose, supplemented with Fetal Bovine Serum (FBS) 10% v/v and antimicrobial agent (100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin).

Prior to experiments the cells were starved for 24 h and in continuation all experiments were conducted in serum-free conditions. It is noted that treatment with the IGF-IR inhibitor (AG1024) (1 µM) for 30 min was made prior to the IGF (10 ng/ml), EGF (5 ng/ml), E2(10 nM) and treatment with ERK1/2 inhibitor (5 µM) for 1 h was made prior to the IGF (10 ng/ml), EGF (5 ng/ml) and E2 (10 nM) treatment for 48 h. Experiments were also performed by using cells transfected with siRNA specific for FAK (siFAK) or IGF-IR (siIGF-IR) and control scramble (siScr)

Table 1. Primer sequences used for quantitative RT-PCR.

Gene	Primer Sequencing
IGF-IR_F	5'-TCTCTTCTACCTGGCGCTGT-3'
IGF-IR_R	5'-AAGCAGCAGTCATCCACGAT-3'
FAK_F	5'-GTGCTCTTGGTTCAAGCTGGAT-3'
FAK_R	5'-ACTTGAGTGAAGTCAGCAAGATGTGT-3'
GAPDH_F	5'-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3'
GAPDH_R	5'-GTCATTGATGGCAACAATATCCACT-3'

which were in continuation also treated with IGF (10 ng/ml), EGF (5 ng/ml) and E2 (10 nM) for 48 h.

Western blot

After 48 h of respective treatments, the cells were lysed with RIPA solution. The samples were electrophoresed in 8% polyacrylamide gel and after that transferred to nitrocellulose membrane in 10 mM CAPS, pH 11 and 10% methanol. Membranes were blocked and incubated overnight at 4 °C with PBS containing 0.1% Tween and 5% v/v low fat milk powder. After that, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with the primary antibodies: anti-IGF-IR (1:1000) Millipore, anti-pIGF-IR (Tyr 1165/1166) (1:200) Millipore, anti-Erk1/2 (1:1000) Millipore, anti-pErk1/2 (Thr202/Tyr204, Thr185/Tyr187) (1:200) Santa Cruz Biotechnology, anti-FAK (1:200) Santa Cruz Biotechnology, anti-pFAK (Tyr397) (1:200) Acris and anti-actin (1:250) Millipore in PBS containing 0.1% Tween and 1% v/v low fat milk powder. The immune complexes were detected after incubation with the peroxidase-conjugated secondary anti-goat, anti-rabbit and anti-mouse antibodies (1:10,000) Millipore in PBS containing 0.1% Tween and 1% v/v low fat milk powder with the Super Signal West Pico Chemiluminescent substrate (Pierce, IL).

Cell adherence assay

For this assay we used 96-well plates that coated with FN (5 µg/cm²) and incubated for 1 h at 37 °C to create FN substrate onto the bottom of wells. The non-specific binding sites of wells were blocked with 1% BSA for 30 min at room temperature. MCF-7 cells were cultured and treated as described in [Cell line and cell culture conditions](#) section. The cells were detached with 5 mM PBS/EDTA and 6,000 cells/well were seeded onto the FN-coated 96-well plates for 1 h. The cell number and the time point were chosen after preliminary experiments. Non adherent cells were removed with two washes using serum-free medium. All experiments were also performed on BSA-coated plates, and we calculated the cells attached specifically to fibronectin by subtracting the number of cells attached to BSA

from the number of cells attached to fibronectin. The numbers of adherent cells were measured using the CyQUANT fluorometric assay (Molecular Probes, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Fluorescence was measured in a Fluorometer (BioTek) using the 485/528 nm excitation and emission filters. For converting sample fluorescence values into cell numbers, a reference standard curve were created, using serial dilutions of known cell numbers. All adhesion experiments were repeated at least three times and performed in triplicate.

RNA isolation and real-time PCR

Total RNA isolated by the use of Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. 1 µg of total RNA was used for cDNA synthesis using the Takara Reverse Transcription reagent kit (Takara, Japan) according to the manufacturer's instructions.

For Real-time PCR we used an Mx3005P cycler (Stratagene). The KAPA SYBR® FAST Universal qPCR kit (KAPA Biosystems) was used for Real-time PCR in a total volume of 20 µl with suitable specific gene primers ([Table 1](#)). The PCR conditions used for amplification were: 94 °C for 15 min and then 40 cycles at 94 °C for 20 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, followed by 72 °C for 10 min. Standard curves were run in each optimized assay, which produced a linear plot of threshold cycle (*C_t*) against log (dilution). The amount of each gene was quantified according to the concentrations of a standard curve and was presented as arbitrary units. As housekeeping gene for the comparison between treatments, GAPDH ([Table 1](#)) was utilized.

Immunofluorescence

MCF-7 cells were seeded onto glass coverslips in 24-well plates and cultured in 10% FBS DMEM for 24 h. After 48 h treatment the cells were fixed in 5% formaldehyde and 2% sucrose in PBS (incubation 10 min at room temperature). After three washes with PBS, Triton X permeabilizing agent was added for 10 min at room temperature and washed before the addition of primary antibodies anti-FAK (1:100) (Santa Cruz Biotechnology) and anti-IGF-IR (1:100) (Millipore) for 1 h at room temperature. After the incubation coverslips were washed three times with PBS 1% bovine serum and secondary antibodies anti-goat (1:500) (Alexa Fluor 488), anti-rabbit (1:800) (Alexa Fluor 488) (Invitrogen) were incubated for 1 h in the dark at room temperature. Topro-3 for the nucleus staining was applied for 20 min in the dark. Actin filaments were detected using fluorescent phalloidin (1:100) (Molecular Probes) for 20 min. Finally, the coverslips were placed on slides using glycerol and visualized by confocal microscopy.

siRNA

MCF-7 cells in suitable dilution plated in T25 flasks in serum and antibiotics free DMEM, and incubated with siRNA (100 nM) sequences specific for the FAK [44,45] and IGF-IR gene (ON-TARGET plus SMART pool siRNA by Dharmacon) and with siRNA negative control sequences (siscrumble). Specific siRNA (Invitrogen) and Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) (1 µl/50 µl medium) were added to Opti-MEM® (Invitrogen) for 5 min at room temperature. After that incubation, diluted Lipofectamine™ 2000 was mixed with diluted siRNA for 20 min at RT to allow the formation of siRNA–liposome complexes. Medium containing siRNA or control siscrumble were removed from culture flasks after 6 h of incubation and replaced with fresh DMEM 0% FBS containing antibiotics and incubation continued. The optimal transfection protocol conditions were chosen after primary experiments.

Statistical analysis

The statistical significance was evaluated by Student's test or one-way ANOVA analysis with Tukey's post-test, using GraphPad Prism (version 4.0) software.

Acknowledgments

This research has been co-financed by the European Union (European Social Fund—ESF) (MIS 380222) and Greek National Funds through the Operational Program “Education and Lifelong Learning” of the National Strategic Reference Framework (NSRF) Research Funding Program: Thales; Investing in knowledge society through the European Social Fund (MIS 380222).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2016.06.005>.

Received 9 March 2016;

Received in revised form 22 June 2016;

Accepted 22 June 2016

Available online 25 June 2016

Keywords:

Breast cancer;
Adhesion;
IGF-IR;
IGF-I;
EGF;
E2

Abbreviations used:

IGF-I, insulin like growth factor-I; EGF, epidermal growth factor; E2, Estradiol; ERα, estrogen receptor α; Erk1/2, extracellular signal-regulated kinases; FAK, Focal Adhesion Kinase.

References

- [1] F.P. Turkoz, M. Solak, I. Petekkaya, O. Keskin, N. Kertmen, F. Sarici, Z. Arik, T. Babacan, Y. Ozisik, K. Altundag, Association between common risk factors and molecular subtypes in breast cancer patients, *Breast* 22 (3) (2013) 344–350.
- [2] IARC, GLOBOCAN: Estimated Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Worldwide in 2012, World Health Organization, Chicago, 2014.
- [3] X. Zhang, D. Yee, Tyrosine kinase signalling in breast cancer: insulin-like growth factors and their receptors in breast cancer, *Breast Cancer Res.* 2 (3) (2000) 170–175.
- [4] D. Nikitovic, A. Papoutsidakis, N.K. Karamanos, G.N. Tzanakakis, Lumican affects tumor cell functions, tumor-ECM interactions, angiogenesis and inflammatory response, *Matrix Biol.: J. Int. Soc. Matrix Biol* 35 (2014) 206–214.
- [5] C.S. Curran, P.J. Keely, Breast tumor and stromal cell responses to TGF-beta and hypoxia in matrix deposition, *Matrix Biol.: J. Int. Soc. Matrix Biol* 32 (2) (2013) 95–105.
- [6] T.N. Trotter, Y. Yang, Matricellular proteins as regulators of cancer metastasis to bone, *Matrix Biol.* 52–54 (2016) 301–314.
- [7] E.S. Chhabra, H.N. Higgs, The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures, *Nat. Cell Biol.* 9 (10) (2007) 1110–1121.
- [8] R. Pankov, K.M. Yamada, Fibronectin at a glance, *J. Cell Sci.* 115 (Pt 20) (2002) 3861–3863.
- [9] M. Edderkaoui, P. Hong, E.C. Vaquero, J.K. Lee, L. Fischer, H. Friess, M.W. Buchler, M.M. Lerch, S.J. Pandol, A.S. Gukovskaya, Extracellular matrix stimulates reactive oxygen species production and increases pancreatic cancer cell survival through 5-lipoxygenase and NADPH oxidase, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289 (6) (2005) G1137–G1147.
- [10] P. Bouris, S.S. Skandalis, Z. Piperigkou, N. Afratis, K. Karamanou, A.J. Aletras, A. Moustakas, A.D. Theocharis, N.K. Karamanos, Estrogen receptor alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of specific matrix effectors and functional properties of breast cancer cells, *Matrix Biol.: J. Int. Soc. Matrix Biol.* 43 (2015) 42–60.
- [11] Y.M. Wu, Z.J. Chen, H. Liu, W.D. Wei, L.L. Lu, X.L. Yang, W.T. Liang, T. Liu, H.L. Liu, J. Du, H.S. Wang, Inhibition of ERα suppresses epithelial mesenchymal transition of triple negative breast cancer cells by directly targeting fibronectin, *Oncotarget* 6 (28) (2015) 25588–25601.
- [12] S. Kim, J. Lee, S.J. Oh, S.J. Nam, J.E. Lee, Differential effect of EGFR inhibitors on tamoxifen-resistant breast cancer cells, *Oncol. Rep.* 34 (3) (2015) 1613–1619.
- [13] R.B. Dickson, M.E. Lippman, Estrogenic regulation of growth and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma, *Endocr. Rev.* 8 (1) (1987) 29–43.
- [14] A. Milani, E. Geuna, G. Mittica, G. Valabrega, Overcoming endocrine resistance in metastatic breast cancer: current evidence and future directions, *World J Clin Oncol* 5 (5) (2014) 990–1001.

- [15] S.S. Skandalis, N. Afratis, G. Smirlaki, D. Nikitovic, A.D. Theocharis, G.N. Tzanakakis, N.K. Karamanos, Cross-talk between estradiol receptor and EGFR/IGF-IR signaling pathways in estrogen-responsive breast cancers: focus on the role and impact of proteoglycans, *Matrix Biol.: J. Int. Soc. Matrix Biol.* 35 (2014) 182–193.
- [16] K. Voudouri, A. Berdiaki, M. Tzardi, G.N. Tzanakakis, D. Nikitovic, Insulin-like growth factor and epidermal growth factor signaling in breast cancer cell growth: focus on endocrine resistant disease, *Anal. Cell. Pathol. (Amst)* 2015 (2015) 975495.
- [17] C.M. Perou, T. Sorlie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, J.R. Pollack, D.T. Ross, H. Johnsen, L.A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S.X. Zhu, P.E. Lonning, A.L. Borresen-Dale, P.O. Brown, D. Botstein, Molecular portraits of human breast tumours, *Nature* 406 (6797) (2000) 747–752.
- [18] C. Barrios, J.F. Forbes, W. Jonat, P. Conte, W. Gradishar, A. Buzdar, K. Gelmon, M. Gnant, J. Bonnetterre, M. Toi, C. Hudis, J.F. Robertson, The sequential use of endocrine treatment for advanced breast cancer: where are we? *Ann. Oncol.* 23 (6) (2012) 1378–1386.
- [19] M.A. Shupnik, Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation, *Oncogene* 23 (48) (2004) 7979–7989.
- [20] A. Ullrich, A. Gray, A.W. Tam, T. Yang-Feng, M. Tsubokawa, C. Collins, W. Henzel, T. Le Bon, S. Kathuria, E. Chen, et al., Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity, *EMBO J.* 5 (10) (1986) 2503–2512.
- [21] R. Baserga, F. Peruzzi, K. Reiss, The IGF-1 receptor in cancer biology, *Int. J. Cancer* 107 (6) (2003) 873–877.
- [22] H. Kato, T.N. Faria, B. Stannard, C.T. Roberts Jr., D. LeRoith, Essential role of tyrosine residues 1131, 1135, and 1136 of the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor in IGF-I action, *Mol. Endocrinol.* 8 (1) (1994) 40–50.
- [23] A. Craparo, T.J. O'Neill, T.A. Gustafson, Non-SH2 domains within insulin receptor substrate-1 and SHC mediate their phosphotyrosine-dependent interaction with the NPEY motif of the insulin-like growth factor I receptor, *J. Biol. Chem.* 270 (26) (1995) 15639–15643.
- [24] W.A. Ricketts, D.W. Rose, S. Shoelson, J.M. Olefsky, Functional roles of the Shc phosphotyrosine binding and Src homology 2 domains in insulin and epidermal growth factor signaling, *J. Biol. Chem.* 271 (42) (1996) 26165–26169.
- [25] K.T. Nguyen, W.J. Wang, J.L. Chan, L.H. Wang, Differential requirements of the MAP kinase and PI3 kinase signaling pathways in Src- versus insulin and IGF-1 receptors-induced growth and transformation of rat intestinal epithelial cells, *Oncogene* 19 (47) (2000) 5385–5397.
- [26] M.F. White, C.R. Kahn, The insulin signaling system, *J. Biol. Chem.* 269 (1) (1994) 1–4.
- [27] A. Morrione, T. Neill, R.V. Iozzo, Dichotomy of decorin activity on the insulin-like growth factor-I system, *FEBS J.* 280 (10) (2013) 2138–2149.
- [28] M.A. Guvakova, J.C. Adams, D. Boettiger, Functional role of alpha-actinin, PI 3-kinase and MEK1/2 in insulin-like growth factor I receptor kinase regulated motility of human breast carcinoma cells, *J. Cell Sci.* 115 (Pt 21) (2002) 4149–4165.
- [29] S. Mezi, L. Todi, E. Orsi, A. Angeloni, P. Mancini, Involvement of the Src-cortactin pathway in migration induced by IGF-1 and EGF in human breast cancer cells, *Int. J. Oncol.* 41 (6) (2012) 2128–2138.
- [30] T.L. Woodward, J. Xie, J.L. Fendrick, S.Z. Haslam, Proliferation of mouse mammary epithelial cells in vitro: interactions among epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, ovarian hormones, and extracellular matrix proteins, *Endocrinology* 141 (10) (2000) 3578–3586.
- [31] T.N. Mitropoulou, A.D. Theocharis, D. Nikitovic, N.K. Karamanos, G.N. Tzanakakis, IGF-I affects glycosaminoglycan/proteoglycan synthesis in breast cancer cells through tyrosine kinase-dependent and -independent pathways, *Biochimie* 86 (4–5) (2004) 251–259.
- [32] L.W. Engel, N.A. Young, T.S. Tralka, M.E. Lippman, S.J. O'Brien, M.J. Joyce, Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas, *Cancer Res.* 38 (10) (1978) 3352–3364.
- [33] M. Parrizas, A. Gazit, A. Levitzki, E. Wertheimer, D. LeRoith, Specific inhibition of insulin-like growth factor-1 and insulin receptor tyrosine kinase activity and biological function by tyrphostins, *Endocrinology* 138 (4) (1997) 1427–1433.
- [34] P. Masiakowski, R. Breathnach, J. Bloch, F. Gannon, A. Krust, P. Chambon, Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line, *Nucleic Acids Res.* 10 (24) (1982) 7895–7903.
- [35] R.M. Neve, K. Chin, J. Fridlyand, J. Yeh, F.L. Baehner, T. Fevr, L. Clark, N. Bayani, J.P. Coppe, F. Tong, T. Speed, P.T. Spellman, S. DeVries, A. Lapuk, N.J. Wang, W.L. Kuo, J.L. Stilwell, D. Pinkel, D.G. Albertson, F.M. Waldman, F. McCormick, R.B. Dickson, M.D. Johnson, M. Lippman, S. Ethier, A. Gazdar, J.W. Gray, A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes, *Cancer Cell* 10 (6) (2006) 515–527.
- [36] M.A. Guvakova, E. Surmacz, Overexpressed IGF-I receptors reduce estrogen growth requirements, enhance survival, and promote E-cadherin-mediated cell–cell adhesion in human breast cancer cells, *Exp. Cell Res.* 231 (1) (1997) 149–162.
- [37] Y. Zhang, M. Moerkens, S. Ramaiahgari, H. de Bont, L. Price, J. Meerman, B. van de Water, Elevated insulin-like growth factor 1 receptor signaling induces antiestrogen resistance through the MAPK/ERK and PI3K/Akt signaling routes, *Breast Cancer Res.* 13 (3) (2011) R52.
- [38] R. Baserga, A. Hongo, M. Rubini, M. Prisco, B. Valentinis, The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta* 1332 (3) (1997) F105–F126.
- [39] J. Chung, R.H. Chen, J. Blenis, Coordinate regulation of pp90rsk and a distinct protein-serine/threonine kinase activity that phosphorylates recombinant pp90rsk in vitro, *Mol. Cell. Biol.* 11 (4) (1991) 1868–1874.
- [40] J.V. Ruderman, MAP kinase and the activation of quiescent cells, *Curr. Opin. Cell Biol.* 5 (2) (1993) 207–213.
- [41] B. Geiger, K.M. Yamada, Molecular architecture and function of matrix adhesions, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3 (5) (2011).
- [42] M.D. Schaller, C.A. Borgman, B.S. Cobb, R.R. Vines, A.B. Reynolds, J.T. Parsons, pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (11) (1992) 5192–5196.
- [43] T.M. Weiner, E.T. Liu, R.J. Craven, W.G. Cance, Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer, *Lancet* 342 (8878) (1993) 1024–1025.
- [44] I.K. Hong, Y.J. Jin, H.J. Byun, D.I. Jeoung, Y.M. Kim, H. Lee, Homophilic interactions of Tetraspanin CD151 up-regulate motility and matrix metalloproteinase-9 expression of human melanoma cells through adhesion-dependent c-Jun activation signaling pathways, *J. Biol. Chem.* 281 (34) (2006) 24279–24292.

- [45] G. Chalkiadaki, D. Nikitovic, A. Berdiaki, P. Katonis, N.K. Karamanos, G.N. Tzanakakis, Heparin plays a key regulatory role via a p53/FAK-dependent signaling in melanoma cell adhesion and migration, *IUBMB Life* 63 (2) (2011) 109–119.
- [46] J.T. Parsons, Focal adhesion kinase: the first ten years, *J. Cell Sci.* 116 (Pt 8) (2003) 1409–1416.
- [47] S. Teranishi, K. Kimura, T. Nishida, Role of formation of an ERK-FAK-paxillin complex in migration of human corneal epithelial cells during wound closure in vitro, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50 (12) (2009) 5646–5652.
- [48] S. Andersson, P. D'Arcy, O. Larsson, B. Sehat, Focal adhesion kinase (FAK) activates and stabilizes IGF-1 receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387 (1) (2009) 36–41.
- [49] B. Bucci, I. D'Agnano, C. Botti, M. Mottolese, E. Carico, G. Zupi, A. Vecchione, EGF-R expression in ductal breast cancer: proliferation and prognostic implications, *Anticancer Res.* 17 (1B) (1997) 769–774.
- [50] D. LeRoith, R. Baserga, L. Helman, C.T. Roberts Jr., Insulin-like growth factors and cancer, *Ann. Intern. Med.* 122 (1) (1995) 54–59.
- [51] S. Hart, O.M. Fischer, N. Prenzel, E. Zwick-Wallasch, M. Schneider, L. Hennighausen, A. Ullrich, GPCR-induced migration of breast carcinoma cells depends on both EGFR signal transactivation and EGFR-independent pathways, *Biol. Chem.* 386 (9) (2005) 845–855.
- [52] B. Cieply, C. Koontz, S.M. Frisch, CD44S-hyaluronan interactions protect cells resulting from EMT against anoikis, *Matrix Biol.: J. Int. Soc. Matrix Biol.* 48 (2015) 55–65.
- [53] R.V. Iozzo, L. Schaefer, Proteoglycan form and function: a comprehensive nomenclature of proteoglycans, *Matrix Biol.* 42 (2015) 11–55.
- [54] D. Nikitovic, K. Kouvidi, K. Voudouri, A. Berdiaki, E. Karousou, A. Passi, G.N. Tzanakakis, The Motile Breast Cancer Phenotype Roles of Proteoglycans/Glycosaminoglycans, *BioMed Research International* 2014, 2014.
- [55] T.E. Adams, N.M. McKern, C.W. Ward, Signalling by the type 1 insulin-like growth factor receptor: interplay with the epidermal growth factor receptor, *Growth Factors* 22 (2) (2004) 89–95.
- [56] H.S. Earp 3rd, B.F. Calvo, C.I. Sartor, The EGF receptor family—multiple roles in proliferation, differentiation, and neoplasia with an emphasis on HER4, *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 114 (2003) 315–333 (discussion 333-4).
- [57] S. Ahmad, N. Singh, R.I. Glazer, Role of AKT1 in 17beta-estradiol- and insulin-like growth factor I (IGF-I)-dependent proliferation and prevention of apoptosis in MCF-7 breast carcinoma cells, *Biochem. Pharmacol.* 58 (3) (1999) 425–430.
- [58] D.P. McDonnell, J.D. Norris, Connections and regulation of the human estrogen receptor, *Science* 296 (5573) (2002) 1642–1644.
- [59] J. Dupont, A.M. Fernandez, C.A. Glackin, L. Helman, D. LeRoith, Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)-induced twist expression is involved in the anti-apoptotic effects of the IGF-1 receptor, *J. Biol. Chem.* 276 (28) (2001) 26699–26707.
- [60] D. Yee, A.V. Lee, Crosstalk between the insulin-like growth factors and estrogens in breast cancer, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5 (1) (2000) 107–115.
- [61] E.R. Levin, Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen, *Mol. Endocrinol.* 19 (8) (2005) 1951–1959.
- [62] R.X. Song, C.J. Barnes, Z. Zhang, Y. Bao, R. Kumar, R.J. Santen, The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (7) (2004) 2076–2081.
- [63] J.G. Klijn, P.M. Berns, M. Bontenbal, J. Alexieva-Figusch, J.A. Foekens, Clinical breast cancer, new developments in selection and endocrine treatment of patients, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43 (1–3) (1992) 211–221.
- [64] T. van Agthoven, M. Timmermans, J.A. Foekens, L.C. Dorssers, S.C. Henzen-Logmans, Differential expression of estrogen, progesterone, and epidermal growth factor receptors in normal, benign, and malignant human breast tissues using dual staining immunohistochemistry, *Am. J. Pathol.* 144 (6) (1994) 1238–1246.
- [65] D. Coppola, A. Ferber, M. Miura, C. Sell, C. D'Ambrosio, R. Rubin, R. Baserga, A functional insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the epidermal growth factor receptor, *Mol. Cell. Biol.* 14 (7) (1994) 4588–4595.
- [66] G. Bunone, P.A. Briand, R.J. Miksicek, D. Picard, Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation, *EMBO J.* 15 (9) (1996) 2174–2183.
- [67] B.J. Cheskis, Regulation of cell signalling cascades by steroid hormones, *J. Cell. Biochem.* 93 (1) (2004) 20–27.
- [68] Z. Piperigkou, P. Bouris, M. Onisto, M. Franchi, D. Kletsas, A.D. Theocharis, N.K. Karamanos, Estrogen receptor beta modulates breast cancer cells functional properties, signaling and expression of matrix molecules, *Matrix Biol.* (2016).
- [69] D. Metalli, F. Lovat, F. Tripodi, M. Genua, S.Q. Xu, M. Spinelli, L. Alberghina, M. Vanoni, R. Baffa, L.G. Gomella, R.V. Iozzo, A. Morrione, The insulin-like growth factor receptor I promotes motility and invasion of bladder cancer cells through Akt- and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of paxillin, *Am. J. Pathol.* 176 (6) (2010) 2997–3006.
- [70] S. Ali, R.C. Coombes, Estrogen receptor alpha in human breast cancer: occurrence and significance, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5 (3) (2000) 271–281.
- [71] X. Zhang, H. Deng, Z.Y. Wang, Estrogen activation of the mitogen-activated protein kinase is mediated by ER-alpha36 in ER-positive breast cancer cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 143 (2014) 434–443.
- [72] R.X. Song, Z. Zhang, Y. Chen, Y. Bao, R.J. Santen, Estrogen signaling via a linear pathway involving insulin-like growth factor I receptor, matrix metalloproteinases, and epidermal growth factor receptor to activate mitogen-activated protein kinase in MCF-7 breast cancer cells, *Endocrinology* 148 (8) (2007) 4091–4101.
- [73] Z. Zhang, Platelet indices in the prognostication of critically ill patients: another piece of the puzzle, *J. Crit. Care* 30 (2) (2015) 434–435.
- [74] M.A. Lemmon, K.M. Ferguson, J. Schlessinger, PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface, *Cell* 85 (5) (1996) 621–624.
- [75] H. Lyu, X.H. Yang, S.M. Edgerton, A.D. Thor, X. Wu, Z. He, B. Liu, The erbB3- and IGF-1 receptor-initiated signaling pathways exhibit distinct effects on lapatinib sensitivity against trastuzumab-resistant breast cancer cells, *Oncotarget* 7 (3) (2016) 2921–2935.
- [76] G. Cesarone, O.P. Edupuganti, C.P. Chen, E. Wickstrom, Insulin receptor substrate 1 knockdown in human MCF7 ER+ breast cancer cells by nuclease-resistant IRS1 siRNA conjugated to a disulfide-bridged D-peptide analogue of

- insulin-like growth factor 1, *Bioconjug. Chem.* 18 (6) (2007) 1831–1840.
- [77] G.L. Johnson, R. Lapadat, Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases, *Science* 298 (5600) (2002) 1911–1912.
- [78] H. Werner, M.A. Bach, B. Stannard, C.T. Roberts Jr., D. LeRoith, Structural and functional analysis of the insulin-like growth factor I receptor gene promoter, *Mol. Endocrinol.* 6 (10) (1992) 1545–1558.
- [79] R. Sarfstein, M. Pasmanik-Chor, A. Yeheskel, L. Edry, N. Shomron, N. Warman, E. Wertheimer, S. Maor, L. Shochat, H. Werner, Insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) translocates to nucleus and autoregulates IGF-IR gene expression in breast cancer cells, *J. Biol. Chem.* 287 (4) (2012) 2766–2776.
- [80] H. Werner, S. Maor, The insulin-like growth factor-I receptor gene: a downstream target for oncogene and tumor suppressor action, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 17 (6) (2006) 236–242.
- [81] B. Schnarr, K. Strunz, J. Ohsam, A. Benner, J. Wacker, D. Mayer, Down-regulation of insulin-like growth factor-I receptor and insulin receptor substrate-1 expression in advanced human breast cancer, *Int. J. Cancer* 89 (6) (2000) 506–513.
- [82] M.K. Tennant, J.B. Thrasher, P.A. Twomey, R.H. Drivdahl, R.S. Birnbaum, S.R. Plymate, Protein and messenger ribonucleic acid (mRNA) for the type 1 insulin-like growth factor (IGF) receptor is decreased and IGF-II mRNA is increased in human prostate carcinoma compared to benign prostate epithelium, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 (10) (1996) 3774–3782.
- [83] S.H. Zigmond, Signal transduction and actin filament organization, *Curr. Opin. Cell Biol.* 8 (1) (1996) 66–73.
- [84] C.M. Fillmore, C. Kuperwasser, Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy, *Breast Cancer Res.* 10 (2) (2008) R25.
- [85] M.D. Schaller, J.D. Hildebrand, J.T. Parsons, Complex formation with focal adhesion kinase: a mechanism to regulate activity and subcellular localization of Src kinases, *Mol. Biol. Cell* 10 (10) (1999) 3489–3505.
- [86] S.K. Hanks, T.R. Polte, Signaling through focal adhesion kinase, *BioEssays* 19 (2) (1997) 137–145.
- [87] G.W. McLean, N.O. Carragher, E. Avizienyte, J. Evans, V.G. Brunton, M.C. Frame, The role of focal-adhesion kinase in cancer — a new therapeutic opportunity, *Nat. Rev. Cancer* 5 (7) (2005) 505–515.
- [88] S.K. Hanks, L. Ryzhova, N.Y. Shin, J. Brabek, Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility, *Front. Biosci.* 8 (2003) d982–d996.
- [89] A. Casamassima, E. Rozengurt, Insulin-like growth factor I stimulates tyrosine phosphorylation of p130(Cas), focal adhesion kinase, and paxillin. Role of phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a p130(Cas).Crk complex, *J. Biol. Chem.* 273 (40) (1998) 26149–26156.
- [90] P. Eberwein, D. Laird, S. Schulz, T. Reinhard, T. Steinberg, P. Tomakidi, Modulation of focal adhesion constituents and their down-stream events by EGF: On the cross-talk of integrins and growth factor receptors, *Biochim. Biophys. Acta* 1853 (10 Pt A) (2015) 2183–2198.
- [91] D. Zheng, E. Kurenova, D. Ucar, V. Golubovskaya, A. Magis, D. Ostrov, W.G. Cance, S.N. Hochwald, Targeting of the protein interaction site between FAK and IGF-1R, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388 (2) (2009) 301–305.
- [92] T.J. Liu, T. LaFortune, T. Honda, O. Ohmori, S. Hatakeyama, T. Meyer, D. Jackson, J. de Groot, W.K. Yung, Inhibition of both focal adhesion kinase and insulin-like growth factor-I receptor kinase suppresses glioma proliferation in vitro and in vivo, *Mol. Cancer Ther.* 6 (4) (2007) 1357–1367.
- [93] W. Liu, D.A. Bloom, W.G. Cance, E.V. Kurenova, V.M. Golubovskaya, S.N. Hochwald, FAK and IGF-IR interact to provide survival signals in human pancreatic adenocarcinoma cells, *Carcinogenesis* 29 (6) (2008) 1096–1107.
- [94] L. Taliaferro-Smith, E. Oberlick, T. Liu, T. McGlothen, T. Alcaide, R. Tobin, S. Donnelly, R. Commander, E. Kline, G.P. Nagaraju, L. Havel, A. Marcus, R. Nahta, R. O'Regan, FAK activation is required for IGF1R-mediated regulation of EMT, migration, and invasion in mesenchymal triple negative breast cancer cells, *Oncotarget* 6 (7) (2015) 4757–4772.
- [95] K. Kouvidi, A. Berdiaki, D. Nikitovic, P. Katonis, N. Afratis, V.C. Hascall, N.K. Karamanos, G.N. Tzanakakis, Role of receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM) in low molecular weight hyaluronan (LMWHA)-mediated fibrosarcoma cell adhesion, *J. Biol. Chem.* 286 (44) (2011) 38509–38520.
- [96] K. Kouvidi, A. Berdiaki, M. Tzardi, E. Karousou, A. Passi, D. Nikitovic, G.N. Tzanakakis, Receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM) regulates HT1080 fibrosarcoma cell proliferation via a beta-catenin/c-myc signaling axis, *Biochim. Biophys. Acta* 1860 (4) (2016) 814–824.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Data in Brief

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dib

Data Article

Data on the putative role of p53 in breast cancer cell adhesion: Technical information for adhesion assay



Kallirroï Voudouri^a, Dragana Nikitovic^a, Aikaterini Berdiaki^a,
John Tsiaoussis^a, Dimitris Kletsas^b, Nikos K. Karamanos^c,
George N. Tzanakakis^{a,*}

^a Department of Anatomy-Histology-Embryology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece

^b Laboratory of Cell Proliferation and Ageing, Institute of Biology, National Center of Scientific Research "Demokritos", Athens, Greece

^c Biochemistry, Biochemical Analysis and Matrix Pathobiology Res. Group, Laboratory of Biochemistry, Department of Chemistry, University of Patras, 26110 Patras, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 June 2016

Received in revised form

19 September 2016

Accepted 24 September 2016

Available online 30 September 2016

Keywords:

Breast cancer cell adhesion

Fibronectin

Insulin growth factor receptor -I (IGF-IR)

p53 tumor suppressor gene

ABSTRACT

In this data article, the potential role of p53 tumor suppressor gene (p53) on the attachment ability of MCF-7 breast cancer cells was investigated. In our main article, "IGF-I/ EGF and E2 signaling crosstalk through IGF-IR conduit point affect breast cancer cell adhesion" (K. Voudouri, D. Nikitovic, A. Berdiaki, D. Kletsas, N.K. Karamanos, G.N. Tzanakakis, 2016) [1], we describe the key role of IGF-IR in breast cancer cell adhesion onto fibronectin (FN). p53 tumor suppressor gene is a principal regulator of cancer cell proliferation. Various data have demonstrated an association between p53 and IGF-IR actions on cell growth through its' putative regulation of IGF-IR expression. According to our performed experiments, p53 does not modify IGF-IR expression and does not affect basal MCF-7 cells adhesion onto FN. Moreover, technical details about the performance of adhesion assay onto the FN substrate were provided.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

DOI of original article: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2016.06.005>

* Corresponding author.

E-mail address: tzanakak@uoc.gr (G.N. Tzanakakis).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2016.09.038>

2352-3409/© 2016 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Specifications Table

Subject area	<i>Biology</i>
More specific subject area	<i>Cell functions and signaling</i>
Type of data	<i>Graphs, figures</i>
How data was acquired	<i>Adhesion assay, Real time PCR, Western blot</i>
Data format	<i>Analyzed</i>
Experimental factors	<i>Fibronectin as a substrate for the adhesion assay, transfection with siRNA specific for p53</i>
Experimental features	<i>Various numbers of cells were plated onto FN to optimize cell number and adhesion time in order to design a tailor-made adhesion assay for MCF-7 cells. The attachment ability of cells and the expression of IGF-IR were assessed after transfection of cells with siRNA specific for p53 gene.</i>
Data source location	<i>Department of Anatomy- Histology- Embryology, School of Medicine, University of Crete</i>
Data accessibility	<i>Data are provided with this article</i>

Value of the data

- There is an established connection between p53 and IGF-IR activities in cancer; specifically p53 mutant forms are known to enhance *IGF-IR* gene expression (2–5). The assessment of p53/IGF-IR interactions in breast cancer cell adhesion can be of value for research groups from related fields.
- These data can be compared to other scientific data addressing the connection between various tumor suppressor genes and IGF-IR expression and/or to data of this interaction in other cell lines and functions.
- These data facilitates other researchers to execute the optimum adhesion assay for the evaluation of MCF-7 cell adhesion onto FN.

1. Data

This article contains graphs presenting data on the role of p53 tumor-suppressor gene[2-5] in IGF-IR expression and breast cancer cell adhesion (Fig. 1). Furthermore, technical details for the performance of the MCF-7 cells' adhesion assay including number of plated cells and the adherence time for the MCF-7 cell adhesion protocol, are included (Fig. 2). Utilized reagents are presented in Table 1.

2. Experimental design, materials and methods

In order to optimize the adhesion assay protocol we utilized various cell seeding numbers and adhesion times. Cell lines and cell culture conditions are presented in [1]. In this article additional technical features of cell adhesion assay are provided.

2.1. Real time PCR, Western blot, adhesion assay

Adhesion assay, siRNA transfection with siRNA specific for p53, real time PCR and western blot experiments were designed to examine the role of p53 in MCF-7 FN-dependent adhesion. RNA interference, Western Blot, Real time PCR and adhesion assay protocols were described in [1]. Here, we provide extra information describing the characteristics of utilized siRNA specific for p53, p53 antibody and p53 primer (Table 1).

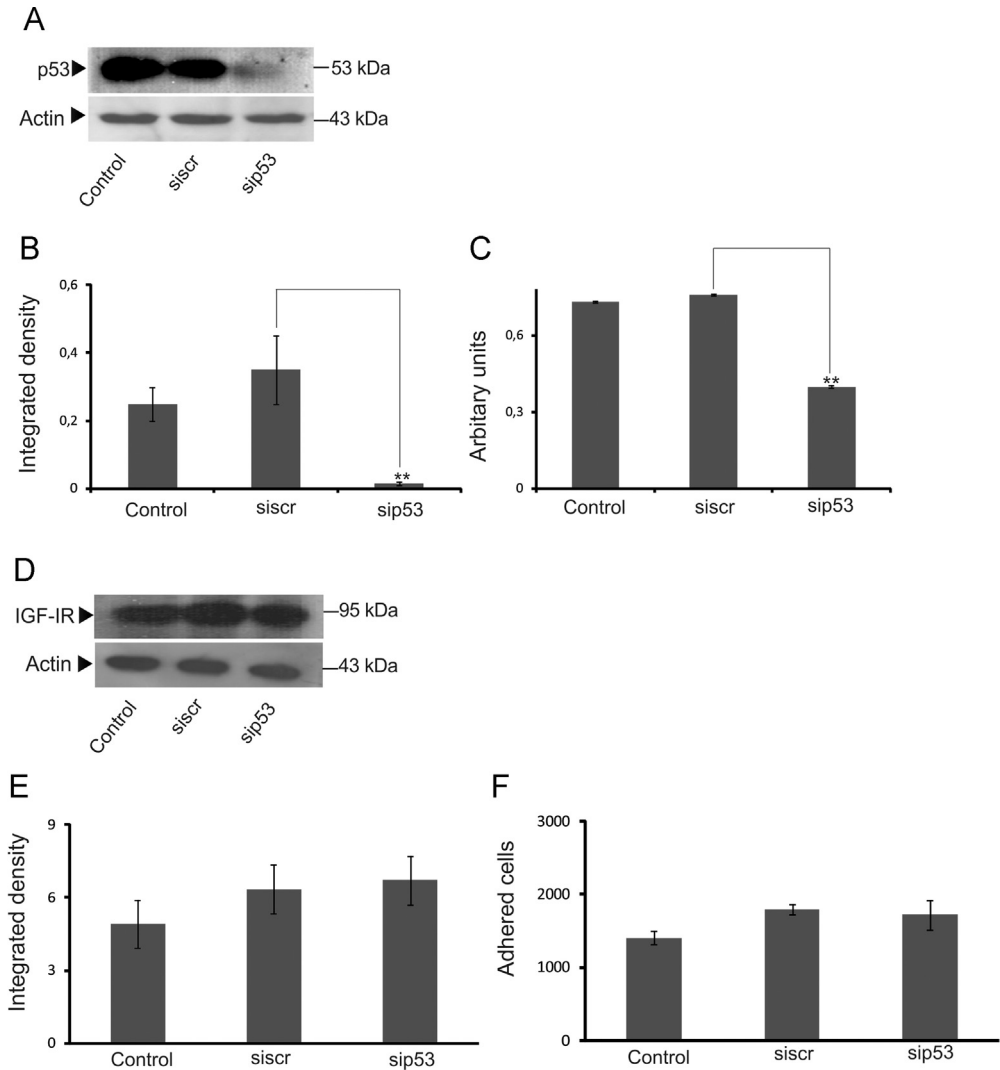


Fig. 1. The role of p53 in breast cancer cell adhesion and IGF-IR expression. MCF-7 cells were transfected with p53 short interfering RNA (sip53), where scramble RNA (siScr) was used as a negative control. The cells were cultured for 48 h before harvesting. (A), Representative blot of p53 protein (53kDa) band is presented; (B) p53 protein bands were densitometrically analyzed and adjusted against actin. (C), p53 mRNA levels expression was verified by real time PCR; (D), MCF-7 cells were transfected with p53 short interfering RNA (si53) with the use of scramble RNA (siScr) as a negative control. The cells were cultured for 48 h before harvest and IGF-IR protein levels were verified with Western blotting; (E), p53 protein bands (p53kDa) were densitometrically analyzed and adjusted against actin. The results represent the average of three separate experiments in triplicates. Mean \pm SEM plotted; (F), MCF-7 cells were transfected with p53 short interfering RNA (sip53) with the use of scramble RNA (siScr) as a negative control. The cells were cultured for 48 h before harvesting and reseeding for 1 h on 96 well-plates coated with FN. The number of attached cells was determined using fluometric CyQUANT Assay Kit (Molecular Probes).

2.2. Cell adherence assay- optimization of cell number and time to adhere

The 96-well plates were coated with FN (Milipore) (5 μ g/ml) as described in (1). MCF-7 cells were detached with 5 mM PBS EDTA. Cells at 3000, 6000 and 9000 cell/well were seeded onto FN coated 96-well plate. In this experiment, the cells were allowed to adhere or 30 min. The 6000 cells/well

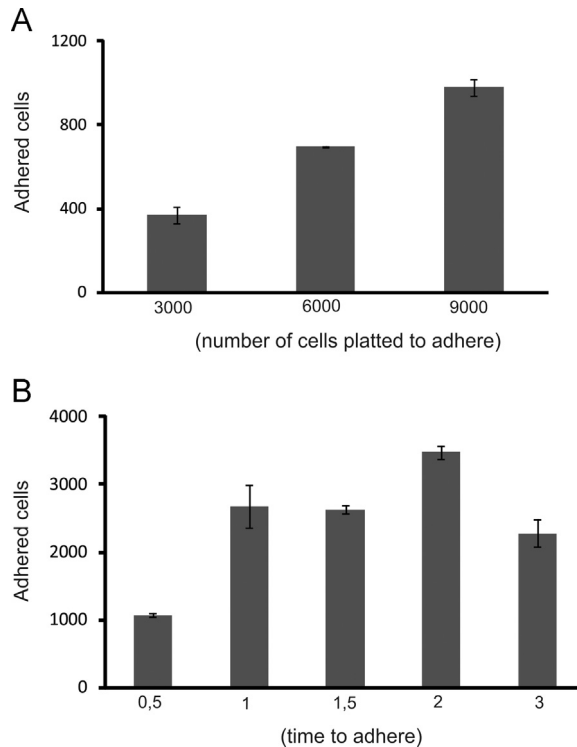


Fig. 2. Adhesion assay optimization. MCF-7 cells were cultured for 48 h in serum- free conditions, before harvesting and reseeding on 96-well plates coated with FN for 30 min at three different concentrations (3.000, 6.000 and 9.000 cells/well) (A). 6000 cells/well seeded for 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 3 h on 96-well plates coated with FN for 1 h (B). The number of attached cells was determined by fluometric CyQUANT Assay Kit (Molecular Probes). The results represent the average of three separate experiments in triplicates. Mean \pm SEM plotted.

Table 1
Biochemical reagents utilized for the p53 experiment.

p53 antibody (Santa Cruz Biotechnology)	Sc-126
p53 primer (VBC- Biotech)	F 5'- CGT CTG GGC TTC TTG CAT TC-3' R 5'- AAG ACC TGC CCT GTG CAG C-3'
p53 siRNA	5'-CAGTCTACCTCCCGCCATA-3' 5'-GAAGAAACCACTGGATGGA-3'

approach was chosen as having the optimum seeded cells number / adhered cell number ratio. To determine the optimum adhesion time the 6000 cells/well were allowed to adhere during 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h and 3 h, respectively. The number of adherent cells was determined as described in (1)

Acknowledgements

This research has been co- financed by the European Union (European Social Fund, Belgium-SF) and Greek National Funds through the Operational Program “Education and Lifelong Learning” of the

National Strategic Reference Framework (NSRF) Research Funding Program: Thales; Investing in knowledge society through the European Social Fund (MIS 380222).

Transparency document. Supporting information

Transparency data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2016.09.038>.

References

- [1] K. Voudouri, D. Nikitovic, A. Berdiaki, D. Kletsas, N.K. Karamanos, G.N. Tzanakakis, IGF-I/EGF and E2 signaling crosstalk through IGF-IR conduit point affects breast cancer cell adhesion, *Matrix Biol.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2016.06.005>.
- [2] S. Di Agostino, S. Strano, V. Emiliozzi, V. Zerbini, M. Mottolese, A. Sacchi, et al., Gain of function of mutant p53: the mutant p53/NF- κ B protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycle regulation, *Cancer Cell* 10 (3) (2006) 191–202.
- [3] H. Werner, E. Karnieli, F.J. Rauscher, D. LeRoith, Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (16) (1996) 8318–8323.
- [4] M. Prisco, A. Hongo, M.G. Rizzo, A. Sacchi, R. Baserga, The insulin-like growth factor I receptor as a physiologically relevant target of p53 in apoptosis caused by interleukin-3 withdrawal, *Mol. Cell. Biol.* 17 (3) (1997) 1084–1092.
- [5] H. Werner, S. Maor, The insulin-like growth factor-I receptor gene: a downstream target for oncogene and tumor suppressor action, *Trends Endocrinol. Metab.: TEM* 17 (6) (2006) 236–242.

Review Article

The Motile Breast Cancer Phenotype Roles of Proteoglycans/Glycosaminoglycans

Dragana Nikitovic,¹ Katerina Kouvidi,¹ Kallirroï Voudouri,¹ Aikaterini Berdiaki,¹ Evgenia Karousou,² Alberto Passi,² and George N. Tzanakakis¹

¹ *Laboratory of Anatomy-Histology-Embryology, Medical School, University of Crete, 71003 Heraklion, Greece*

² *Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Morfologiche, Università degli Studi dell'Insubria, Via J.H. Dunant 5, 21100 Varese, Italy*

Correspondence should be addressed to George N. Tzanakakis; tzanakak@med.uoc.gr

Received 9 May 2014; Accepted 2 July 2014; Published 22 July 2014

Academic Editor: Ilona Kovalszky

Copyright © 2014 Dragana Nikitovic et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The consecutive stages of cancer growth and dissemination are obligatorily perpetrated through specific interactions of the tumor cells with their microenvironment. Importantly, cell-associated and tumor microenvironment glycosaminoglycans (GAGs)/proteoglycan (PG) content and distribution are markedly altered during tumor pathogenesis and progression. GAGs and PGs perform multiple functions in specific stages of the metastatic cascade due to their defined structure and ability to interact with both ligands and receptors regulating cancer pathogenesis. Thus, GAGs/PGs may modulate downstream signaling of key cellular mediators including insulin growth factor receptor (IGFR), epidermal growth factor receptor (EGFR), estrogen receptors (ERs), or Wnt members. In the present review we will focus on breast cancer motility in correlation with their GAG/PG content and critically discuss mechanisms involved. Furthermore, new approaches involving GAGs/PGs as potential prognostic/diagnostic markers or as therapeutic agents for cancer-related pathologies are being proposed.

1. Introduction

Cancer Microenvironment. It is now increasingly recognized that the microenvironment plays a critical role in the progression of tumors. The consecutive steps of tumor growth, local invasion, intravasation, extravasation, and invasion of anatomically distant sites are obligatorily perpetrated through specific interactions of the tumor cells with their microenvironment. Free glycosaminoglycans (GAGs) and proteoglycan- (PG-) containing GAGs, key effectors of cell surface, pericellular and extracellular microenvironments, perform multiple functions in cancer by virtue of their coded structure and their ability to interact with both ligands and receptors that regulate cancer growth [1–4]. Specifically, these extracellular matrix (ECM) components critically modulate the tumor cell “motile phenotype” affecting their adhesive/migratory abilities which are directly correlated to the metastatic cascade [5, 6].

Glycosaminoglycans (GAGs) comprise a class of linear, negatively charged polysaccharides composed of repeating disaccharide units of acetylated hexosamines (N-acetyl-galactosamine in the case of chondroitin sulphate and dermatan sulfate or N-acetyl-glucosamine in the case of heparin sulphate and heparin) and mainly of uronic acids (D-glucuronic acid or L-iduronic acid) being sulfated at various positions. The exception constitutes keratan sulphate whose uronic acid is substituted by galactose. Based on the epimeric form of uronic acid and the type of hexosamine in their repeating disaccharide units, GAGs are classified into four major types; hyaluronan (HA), chondroitin sulfate (CS) and dermatan sulfate (DS), heparin and heparan sulphate (HS), and keratan sulfate (KS). HA is synthesized in the absence of a protein core at the inner face of the plasma membrane and consequently found in the form of free chains whereas other GAG types are covalently bound into protein cores to form proteoglycans (PGs). With the exception of HA, all

GAG types are variably sulfated which contributes to the intricate complexity of their structures. Free GAGs chains are secreted to the extracellular space and distributed both in the pericellular matrix and extracellular matrix proper. GAGs bound into PGs are located to the extracellular matrix, basal membrane, and cell surface [7]. Cell type and tissue specific alterations in fine GAG structure, which are strictly predetermined [8–10], allow these molecules to modulate with high specificity different cellular processes [7]. Cell-associated and tumor microenvironment GAG content and distribution is markedly altered during tumor pathogenesis and progression [11, 12].

PGs, molecules which consist of a protein core that is covalently modified with GAG chains, are distributed both to the ECM “proper” associated with the cell membrane as well as located to intracellular compartment. These main PG groups are further classified into families according to their gene homology, core protein properties, size, and modular composition. Thus, secreted to the ECM PGs include large aggregating PGs, named hyalactans, small leucine-rich PGs (SLRPs), and basement membrane PGs. Cell-surface-associated PGs are distributed into two main families (syndecans and glypicans), whereas serglycin is the only intracellular PG characterized to date [13, 14]. The wide molecular diversity of PGs is derived from the multitude of possible combinations of protein cores and GAG chains. Thus, PGs are also classified, regarding their GAG content, into heparan sulfate PGs (HSPG), chondroitin/dermatan sulfate PGs, (CS/DSPGs), and keratan sulphate PGs. The specific structural characteristics of both the protein cores and GAG types provide the structural basis for the plethora of their biological functions which include acting as structural components in tissue organization or dynamic regulators of cellular behaviour [3].

2. Is the Expression of PGs/GAGs in Breast Cancer Correlated to Disease Progression?

Importantly, ECM components, including PGs and GAGs, are involved in the molecular events that are associated with tumor progression. It is well established that during malignant transformation, significant changes can be observed in the structural and mechanical properties of respective ECM components. Indeed, the alteration of cell shape and changes in the interactions with the ECM are considered as important hallmarks of cancer cells [15, 16]. Changes in the composition and organization of ECM regulate cancer progression by promoting cellular transformation and metastasis. Moreover, altered expression of ECM molecules also deregulates the behavior of stromal cells and promotes tumor-associated angiogenesis and inflammation, leading to the generation of a tumorigenic microenvironment [17–19].

HSPGs have been closely correlated to breast cancer tumorigenesis. Major HSPGs members are the transmembrane proteins syndecans (SDCs), with the SDC family consisting of four members: SDC1, SDC2, SDC3, and SDC4 [20]. A complex pattern describing SDCs’ expression in tumor and stroma compartments during the progression of malignancy is emerging. Most reports have focused on the involvement

of SDC1, an epithelial marker, during the progression of this insidious disease. Thus, increased expression of SDC1 was demonstrated in the stroma of invasive breast cancer [21–23]. Moreover, the expression of SDC1 in both epithelium and stroma may be a predictor of unfavorable prognosis in breast cancer, whereas loss of epithelial SDC1 was associated with a more favorable outcome [21]. Importantly, SDC1 has also been linked with the promotion of proliferation of human breast cancer cells *in vitro* [23]. The distribution of SDC1 to cell membrane has predominantly been described in breast cancer; however, shed SDC1 in other tumor types has been directly associated with increased invasion and cancer progression [24, 25]. Indeed in breast cancer, SDC1 is suggested to be a poor prognostic factor for breast cancer since its upregulation at both the mRNA and protein levels has been associated with higher histological tumor grade, as well as increased mitotic index and tumor size [26]. The expression of other SDC family members in breast cancer tissues has also been studied. Thus, in estrogen receptor-negative and highly proliferative breast carcinoma subtypes, SDC1 and SDC4 were found to be overexpressed [27]. Similarly, the overexpression of these two PGs has been demonstrated in a highly invasive breast cancer cell line (MDA-MB-231) [28]. However, another report suggests that SDC4 expression is downregulated in malignant breast tissue [29]. The data on SDC1’ roles seem to be more uniform as high expression of SDC1 has been linked with increased tumor aggressiveness and poorer prognosis in breast carcinomas [30]. Functionally, this correlates well with the proposed role of SDC1 as a coreceptor which activates mitogenic growth factor signaling which in turn modulates tumor angiogenesis, cell adhesion, and motility [31]. Moreover, a study conducted in postmenopausal women with breast cancer or dense-mammographic breast tissue demonstrated that the distribution of SDC1 changes from the epithelium to the stroma [32, 33]. Interestingly, SDC1 expressing breast carcinomas show decreased response to chemotherapy [34], whereas it has also been indicated that the loss of SDC1 expression may be a potential predictive factor for response to preoperative systemic therapy [35]. These data define SDC1 as a potentially significant therapy target.

The glypicans (GPCs) are HSPGs anchored through the glycosylphosphatidylinositol (GPI) link to the outer layer of cell membranes. GPCs have been shown to regulate the binding properties of bone morphogenetic protein (BMP) and fibroblast growth factor (FGF) [36]. Most of the studies concerning the roles of GPCs in breast cancer progression focus on the role of the GPC3 member. Intriguingly, the GPC3 gene silencing has been identified in human breast cancer cells, through a mechanism which involves the hypermethylation of the GPC3 promoter. Thus, GPC3 seems to be a negative regulator of breast cancer cell proliferation, since it was shown that its ectopic expression inhibited the growth rates of 8 in a panel of 10 breast cancer cell lines [37]. Furthermore, it has been established that GPC3 guides MCF-7 breast cancer cells to apoptosis through a mechanism that involves the anchorage of the GPC3 core protein to the cell membrane [38]. The role of the other members of the GPC family in breast cancer pathogenesis has not been widely

investigated. The up to now obtained data suggest that the expression of GPC3 and GPC4 was negligibly increased in tumor as compared to normal tissues, whereas the expression of GPC5 and GPC6 was below the level of detection in both normal and cancerous breast tissues. On the contrary, in the same study GPC1 was found to be strongly expressed in human breast cancers with a low expression in normal breast tissues [39].

The family of PGs secreted to the ECM and known as hyalactans is comprised of versican, aggrecan, neurocan, and brevican [12]. Versican seems to have a prominent role in breast cancer progression due to its ability to interact with molecules determined to be regulators of key cellular processes [40]. Importantly, extracellular versican has been found to be elevated in a variety of human tumors including breast carcinoma [41–43]. The distribution of versican in tissue samples is mostly allocated to breast cancer margins. Indeed, the high expression of versican has been described in the interstitium at the invasive margins of breast carcinoma. Versican is suggested to be a prognostic marker as it has been found to be predictive of cancer relapse, negatively affecting overall survival rates of breast cancer patients [44]. On the other hand, the increased expression of versican within peritumoral stromal matrix was predictive of relapse-free disease prognosis, in women with node-negative breast cancer. These authors therefore propose that versican may be a predictor for risk and rate of relapse, independent of tumor size in patients with node negative disease [45]. Recently, various histotypes of breast *in situ* carcinomas have been examined in order to assess the immunohistochemical expression of versican in the stroma and correlate these findings to disease progression. This study provided evidence that versican is strongly expressed in the perilesional stroma of a subclass of ductal *in situ* carcinomas and that the extension of versican immunostaining is statistically related to the high grade. On the other hand, the expression of versican in the cases of classic lobular *in situ* carcinomas was confined to the anatomical structures that usually contain this PG in adult breast tissues [46]. Thus, Canavese et al. suggest that various histotypes of breast *in situ* carcinomas could follow different pathways of epithelial stromal interactions. Structure-function studies focusing on versican suggest that its G3 domain is closely correlated to breast cancer progression. Thus expression of versican G3 domain both increases breast cancer cell proliferation *in vitro* and *in vivo* and also enhances tumor cell migration *in vitro* and systemic metastasis *in vivo* [47, 48]. The exogenous expression of a versican G3 construct in breast cancer cell lines enhanced their resistance to anthracycline-dependent apoptosis when cultured in serum free medium by upregulating pERK and GSK-3b (S9P) [49]. On the other hand, versican G3 promoted cell apoptosis induced by C2-ceramide or Docetaxel by enhancing expression of pSAPK/JNK and decreasing expression of GSK-3 β (S9P). Inhibition of endogenous versican expression by siRNA or reduction of versican G3's expression by linking G3 with 3'UTR prevented G3 modulated cell apoptosis. Thus, the G3 domain appears to have a dual role in modulating breast cancer cell resistance to chemotherapeutic agents [49]. The importance of versican in breast cancer pathogenesis is well

illustrated in a recent study by Kischel et al. These authors demonstrate that all known versican isoforms as well as new alternatively spliced versican isoform, named V4, were significantly overexpressed in the malignant lesions [50].

The small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) are characterized by a relatively small protein core with leucine rich-repeat (LRR) motifs into which GAG chains are covalently bound [13, 51, 52]. These secreted proteins have the ability to interact with collagen, modifying the deposition and organization of collagen fibers in the extracellular matrix. A study on SLRP expression in breast tumors showed that lumican and decorin are the most frequently expressed SLRPs, whereas biglycan and fibromodulin are rarely detected [53]. Decorin is physiologically secreted by stromal fibroblasts of normal breast tissue [54]. Indeed, the expression of decorin, which is abundant in the stroma, can be used as an indicator of tumor progression [55]. Specifically, low expression of decorin has been correlated to large tumor size, a shorter time to progression, and poorer survival [55]. In a study by Reed et al., it has been shown that the primary tumor growth was strongly diminished after treatment with decorin protein core. In the same study, the utilization of an adenoviral vector containing the decorin transgene caused the elimination of metastases [56]. Decorin has also been shown to decrease tumor growth in experiments conducted in a rat model [56]. Moreover, it has been indicated that decorin inactivates the oncogenic ErbB2 protein [57]. Another important member of the SLRP family, lumican, is specifically expressed in breast cancer tissues, but not in normal breast tissues. Furthermore, it has been proposed that lumican is differentially expressed during breast tumor progression [58]. The overexpression of lumican in breast cancer tissues is associated with a high tumor grade, a low estrogen receptor (ER) expression level, and young age of patients [58].

Hyaluronan (HA) is an anionic, nonsulfated GAG which differs from the other members of the GAG family as it neither contains sulfate groups nor is it covalently linked into a core protein [59]. This GAG is synthesized by three types of integral membrane proteins denominated hyaluronan synthases: HAS1, HAS2, and HAS3. The degradation of HA within tissues, on the other hand, is performed by enzymes known as hyaluronidases (HYAL). A significant number of studies demonstrate that HA deposition is elevated in various types of cancer tissues including breast cancer [60]. Specifically, immunochemistry revealed elevated amounts of HA in the stroma of human breast cancer, correlating with tumor invasion, metastasis, and adverse clinical outcome [61, 62]. The magnitude of the HA accumulation in the tumor stroma (breast, ovarian, and prostate cancers) strongly correlates with an unfavorable prognosis of the patient, that is, advancement of the malignancy [59]. HYAL1 and HYAL2 are found to be overexpressed in breast cancer tumors, downregulating the expression of HA [63].

Taking into consideration all the above, it can be concluded that PGs/GAGs, which are abundantly present in the stromal compartment of breast cancer cells, play a major role in several biological processes of carcinogenesis. The overexpression of many of these molecules has been

associated with the malignant phenotype and with poor prognosis. The *de facto* contribution of these molecules to tumor cells' malignant properties defines them as relevant therapeutic agents.

3. The “Motile” Phenotype

Tumors of solid organs (carcinomas, sarcomas, and central nervous system tumors) kill patients mainly by dissemination from the primary site as once the cells migrate beyond the primary site into adjacent or distant tissue, they are difficult to extirpate. This dissemination may take two forms: (i) localized invasion throughout the tissue and into the adnexa or (ii) metastatic dissemination [64]. An obligatory component of the dissemination process is the obtaining of a “motile phenotype.” In order for the tumor cells to efficiently migrate, specific cytoskeleton modifications must be executed. First, actin cytoskeleton organization has a well-established role in cell migration and is regulated by a plethora of extensively studied molecular mediators. Specifically, Rho GTPases, cAMP/PKA, and integrins were found to have a central role in modulating the actin cytoskeleton alterations during migration and have been shown to be closely regulated during epithelial to mesenchymal transition (EMT) processes [65, 66]. Integrins are heterodimeric cell-surface molecules that on one side link the actin cytoskeleton to the cell membrane and on the other side mediate cell-matrix interactions [67]. In addition to their structural functions, integrins mediate signaling from the extracellular space into the cell through integrin-associated signalling and adaptor molecules such as FAK (focal adhesion kinase) [68] or ILK (integrin-linked kinase) [69]. Intermediate filaments (IFs) play a central role in maintaining cell structure, stiffness, and integrity. The IF network of epithelial cells comprises cytokeratins, while the mesenchymal IF network is primarily constituted of vimentin. During EMTs, many cytokeratins are downregulated and vimentin is upregulated [70]. Overexpression of vimentin IFs in the breast carcinoma model leads to augmentation of motility and invasiveness *in vitro*, which can be transiently downregulated by treatment with antisense oligonucleotides to vimentin. Additional experimental evidence suggests that the mechanism(s) responsible for the differential expression of metastatic properties associated with the interconverted phenotype rest(s) in the unique interaction, either direct or indirect, of IFs with specific integrins interacting with the extracellular matrix [71].

The “motile phenotype” of cancer cells is expressed only through direct interactions with the tumor environment as inevitably the tumor cells will respond to local stimuli. These stimuli include cues for motility and migration, which normally appear in tissues undergoing formation, remodeling, or healing. Carcinoma cells are likely to be sensitive to the motility cues that normally regulate epithelial morphogenetic movements such as ingression, delamination, invagination, and tube or sheet migration [72]. Understanding how such motility cues arise and act, in tumor tissue, may provide one of the key “answers” in cancer research.

4. The Role of Matrix Molecules in Breast Cancer Cell Epithelial-to-Mesenchymal Transition

The huge proliferative ability of tumor cells leads to genetic diversity which facilitates their responsiveness to microenvironmental factors resulting in an increased degree of phenotypic plasticity [73, 74]. Therefore, during primary growth, some tumor cells can acquire traits that endow them with a malignant phenotype that leads to increased tumor cell motility, invasiveness, and propensity to metastasize [75]. Importantly, during epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), tumor cells acquire a phenotype that encompasses all these traits as EMT is characterized by a loss of cell polarity and adhesion and gain of motile characteristics. Thus, the EMT promotes the detachment of cells from the primary tumor, facilitating their migration and metastatic dissemination [76]. Moreover, a strong link between EMT and acquisition of a tumor-initiating phenotype is suggested [77]. Early studies suggested the involvement of EMT in aggressive breast cancer behaviour as cells exhibiting a mesenchymal-like phenotype (vimentin expression, lack of cell border associated uvomorulin) show dramatically increased motility, invasiveness, and metastatic potential in nude mice [78]. Moreover, using an intravital imaging approach, Giampieri et al. showed that single breast tumor motile cells that have an active TGF- β -Smad2/3 EMT promoting signaling were capable of hematogenous metastasis to distal organs, while those lacking this signaling pathway were prone to passive lymph metastasis [79]. However, EMT is not the “ultimate” event as it involves various morphological and functional alterations [80] and is not always correlated to a more aggressive phenotype [81]. In addition, an apparent contradiction to the association between EMT and metastasis comes from clinical observations that distant metastases derived from a variety of primary carcinomas resemble an epithelial phenotype.

Importantly the EMT as well as the mesenchymal to epithelial transition (MET) is partly regulated through the “crosstalk” between the tumor microenvironment and the cancer cells [82]. Growth factor stimulation appears to be a part of this “crosstalk” as epidermal growth factor (EGF) leads to epitheliomesenchymal transition-like changes in human breast cancer cells including upregulation of vimentin and downregulation of E-cadherin. EMT was associated with increased ability of these cells to adhere to ECM molecules as well as to migrate [78]. Furthermore, TGF- β -mediated breast cancer invasion is associated with EMT and matrix proteolysis [83]. Likewise, constitutively active type I insulin-like growth factor receptor causes transformation and xenograft growth of immortalized mammary epithelial cells and is accompanied by an epithelial-to-mesenchymal transition mediated by NF- κ B and snail [84]. Interestingly, TGF β -dependent hyaluronan synthase expression (HAS2) expression, but not extracellular hyaluronan, has an important regulatory role in TGF β -induced EMT [85]. Furthermore, when breast cells were induced to exhibit EMT, there was a strong upregulation of HAS2 [86].

Indeed, the implication of matrix molecules contribution to EMT was evident even from early studies [87]. LOX is a secreted amine oxidase that catalyses collagen and elastin cross-linking in the extracellular matrix, previously shown to regulate breast cancer metastasis, and is correlated to EMT [88]. Enhanced tenascin-C expression and matrix deposition during Ras/TGF- β -induced EMT of mammary tumor cells was reported [89]. Noteworthy, there seems to be a shift in proteoglycans expression as significant correlation was found between the loss of the HSPG, SDC1, and epithelial expression during EMT. This loss was correlated with increased SDC1 stromal expression and a high grade of malignancy ($P = 0.011$). Therefore, the authors concluded that the loss of SDC1 epithelial expression was of strong prognostic value in breast carcinomas [90]. Along the same lines, SDC1 coexpression with E-cadherin was found to be synchronously regulated during EMT in breast cancer [91].

Importantly, the mesenchymal to epithelial transition (MET) of metastatic breast cancer cells upon reaching distant metastatic sites appears also to be regulated by ECM molecules as a unique paracrine crosstalk between the microenvironment and the cancer cells has been identified [92]. Thus, versican stimulated MET of metastatic breast cancer cells by attenuating phospho-Smad2 levels, which resulted in elevated cell proliferation and accelerated metastases. Analysis of clinical specimens showed elevated versican expression within the metastatic lung of patients with breast cancer [92]. Thus, mechanisms regulating both the EMT and MET processes are dependent on PG/GAG participation highlighting their relevance in breast cancer progression.

5. The Roles of GAGs/PGs in Breast Cancer Cell Motility

Breast cancer is characterized by significant quantitative changes of extracellular network constituents. Previously, it has been well established that changes in unique ECM properties of tumor cells and their microenvironment may lead to changes in cell behavior during cancer progression [12, 93]. The PG component of the ECM has been shown to participate in and regulate key cellular events, acting either directly on cells or modulating growth factor activities [94].

Thus, HSPGs are involved in multiple cellular events and functions such as cell adhesion, ECM assembly, and growth factors storage [95]. Their HS chains have the ability to bind not only to numerous "heparin-" binding growth factors and morphogens, [31] but also to "heparin-" binding sites present in matrix ligands, including fibronectin, vitronectin, laminins, and the fibrillar collagens [31]. The SDCs are believed to have roles in cell adhesion and signaling possibly as coreceptors with integrins and cell-cell adhesion molecules [96].

Each of the four SDCs has been proposed to connect to the actin cytoskeleton, via their cytoplasmic domains [97, 98], for example, through ezrin in SDC2 and α -actinin in the case of SDC4. For SDC1, SDC2, and SDC4 at least, the external core protein can trigger integrin-mediated cell adhesion events, which may be direct or, in the case of SDC4, probably indirect [98].

Many studies indicate a strong correlation between the expression of specific HSPGs and the metastatic and invasive potential of breast cancer cells [26, 99, 100]. In fact, the expression of SDC4 and the overexpression of SDC2 are associated with the high invasive potential of MDA-MB-231 cell line [29]. Interestingly, estradiol (E2) as well as IGF and EGF signaling pathways have significant roles in regulating the expression of certain cell surface HSPGs, such as SDC2, SDC4, and GPC1, which are crucial for cell motility [101].

SDC1 participates in the generation of a proangiogenic microenvironment, supporting tumor growth and metastatic spread [11, 12, 102]. This HSPG, regulates downstream signaling pathways that are traditionally associated with the integrins [12, 103, 104], thus mediating cell migration by creating a dynamic linkage between the ECM and the cytoskeleton and by modulating Rho family members that control the activation of focal adhesion kinase (FAK). Indeed, it has been observed that in MDA-MB-231 human breast cancer cells SDC1 physically interacts with FAK [105]. Furthermore, SDC1 regulates the activation of $\alpha\nu\beta3$ and/or $\alpha\nu\beta5$ integrins. This activation stimulates adhesion, spreading, and migration of tumor cells, with clear consequences on tumor progression [106]. Beauvais and Rapraeger, [106] also demonstrated that SDC1 collaborates with $\alpha\nu\beta3$ integrin to initiate a positive adhesion signal, which is integrin ligand independent. The activation of $\beta1$ integrins is not required for SDC1 mediated cell spreading; consequently SDC1 is sufficient for adhesion. Actually, the inhibition of $\beta1$ integrins activity induces cells spreading presumably by attenuating the suppression of SDC1 binding perpetrated by integrins. Additionally, SDC1 participates in the IGF-I receptor (IGF-IR) signaling pathway on adhesion. Specifically, it colocalizes with the integrin and IGF-IR and regulates activation of $\alpha\nu\beta3$ and $\alpha\nu\beta5$ integrins by coupling these integrins to the IGF-IR in human mammary carcinoma and endothelial cells, resulting in the activation of an inside-out signaling pathway [107]. Therefore, SDC1 is an obligatory component in the formation of this adhesion complex [107]. Additionally, SDC1 expression coordinates β -integrin dependent and interleukin-6 (IL-6) dependent cell functions, such as cell adhesion, migration, and resistance to irradiation, in MDA-MB-231 breast cancer cells [108].

SDC2 has likewise been implicated in cell adhesion and signaling [109] as well as in the progression of cancer [96]. The expression of SDC2 in breast cancer cells is regulated by estradiol (E2) through the action of estrogen receptor alpha ($ER\alpha$) [110]. The increased levels of SDC2 after E2 treatment may be connected with the ability of SDC2 to modulate the tumorigenic and invasive behavior of breast cancer cells [110].

SDC3 has not been widely studied with respect to either breast or ovarian carcinoma [111], but its aberrant upregulation in vasculature associated with ovarian carcinoma has been noted [112].

SDC4 is a focal adhesion component in a range of cell types, adherent to different matrix molecules, including fibronectin [113, 114] and mediating breast cancer cell adhesion and spreading [103, 106]. The attachment of SDC4 to fibronectin triggers intracellular signaling, including protein kinase $C\alpha$ and focal adhesion kinase activation, to promote

focal adhesion formation [115, 116]. SDC4 null cells are deficient in phosphorylated FAK and show impaired cell migration [116, 117]. When overexpressed, SDC4 promotes excess focal adhesion formation resulting in reduced cell migration [118]. Huang et al. [119] reported that tenascin-C, an adhesion-modulatory ECM molecule [120], binds to fibronectin (specifically to the FNIII3 of the HepII site), thereby specifically blocking cell adhesion to fibronectin through SDC4. This binding inhibits the coreceptor function of SDC4 in integrin signaling [119]. Nevertheless, the role of SDC4 on tumor progression needs more investigation, as different facets of its actions remain unclear.

An important feature of the SDC molecule necessary for signaling appears to be its ectodomain [96, 121]. Indeed, depleting epithelia of cell surface SDC1 alters cell morphology and organization, the arrangement and expression of adhesion molecules, and anchorage-dependent growth controls [121]. Therefore, Kato et al. [121] suggested a regulatory role for SDC1 ectodomain in the control of epithelial cell morphology. Soluble murine SDC4 ectodomain competes with the endogenous SDC4 for a critical cell surface interaction required for signaling during cell spreading [122, 123]. The ability of SDC4 to interact with molecules at the cell surface via its core protein as well as its GAG chains may uniquely regulate the formation of cell surface signaling complexes following engagement of this PG with its extracellular ligands [122, 123]. Moreover, shedding and membrane-associated SDC1 play distinct roles in different stages of ER α + breast cancer cell progression. Proteolytic conversion of SDC1 from a membrane bound into a soluble molecule marks a switch from a proliferative to an invasive phenotype, with implications for breast cancer diagnostics and potential GAG-based therapies [124].

A number of mutations related to SDCs have been recorded in breast carcinomas [111]. The mutations may influence the sequence of amino acids of the core protein and the enzymes that are involved in GAG chains synthesis. Importantly, these mutations may affect the interactions between SDCs and growth factors resulting in altered behavior of cells [125] including cell motility.

The expression of the GPC1 gene in the MDA-MB-231 may be indicative of its higher metastatic potential [29]. The expression of GPC3 is silenced in human breast cancer, but ectopic expression of GPC3 revealed that this molecule can act as a negative regulator of breast cancer cell growth [37, 39]. GPC3 may inhibit IGF and Wnt signaling, which are critical for cell motility and tumor progression, indicating that GPC3 may act as a metastasis suppressor [126, 127]. Another member of GPC family, GPC6, seems to have a key role in promoting the invasive migration of MDA-MB-231 cells through the inhibition of canonical- β -catenin and Wnt signaling and upregulation of noncanonical Wnt5a signaling through the activation of JNK (c-Jun-N-terminal kinase) and p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) [128]. Evidence suggests that GPCs are important in growth factor and morphogens responses, whereas roles in cell adhesion seem to be the prerogative of SDCs [111].

An important member of hyalactans, versican, is able to interact with ECM components and to bind to the cell-surface

proteins CD44, integrin β 1, and epidermal growth factor receptor (EGFR) [129, 130] to regulate cell processes such as adhesion, proliferation, migration, and ECM assembly [40, 130]. The expression of versican in breast carcinomas has been correlated to invasiveness [131]. Moreover, versican G3 domain enhanced breast cancer cell growth, migration, and metastasis by upregulating the EGFR mediated signaling pathways that contribute to a more metastatic phenotype [48]. Also, versican enhances breast cancer cell metastasis in mouse breast cancer cell lines, not only through facilitating cell motility and invasion but also by inhibiting preosteoblast cell growth and differentiation which supply favourable microenvironments for tumor metastases [132]. Enhanced understanding of the regulation and the involvement of versican in cancer may offer a novel approach to cancer therapy by targeting the tumor microenvironment [12].

The overexpression of decorin in the stroma of solid tumors counteracts cell growth, indicating that decorin may have a protective role in tumor progression [133]. Also, it seems to be a negative regulator for EGF signaling. Decorin's binding to EGFR initially leads to receptor's prolonged activation, followed by EGFR internalization and degradation, eliminating tumor growth and metastases [134]. Iozzo et al. [135] suggest that decorin loss may contribute to increased IGF-IR activity in the progression of breast cancer, where IGF plays a role on cell motility. Another member of SLRPs, lumican, may act as an inhibitor of migration, angiogenesis, and invasion by interfering with α 2 β 1 integrin activity and downregulating MMP-14 expression to induce apoptosis [136]. Moreover, winter action of lumican with growth factors affects mobility, adhesion, and cell growth [137, 138].

Serglycin is the only characterized intracellular PG found in hepatopoietic and endothelial cells [12]. It carries either heparan sulfate or chondroitin sulfate chains depending on cell type. Korpetinou et al. [139] have shown for the first time that serglycin is highly expressed in an aggressive breast cancer cell line (MDA-MB-231). The same authors demonstrated that the overexpression of serglycin promotes breast cancer cell growth, migration, and invasion [139]. Interestingly, overexpression of serglycin lacking the GAG attachment sites failed to promote these cellular functions, suggesting that glycanation of serglycin is necessary for its oncogenic properties. This study suggests that serglycin promotes a more aggressive cancer cell phenotype and may protect breast cancer cells from complement attack supporting their survival and expansion.

HA is one of the principal ECM molecules and together with its CD44 cell surface receptor, it is implicated in cancer cell invasion and metastasis [62]. Indeed, high levels of HA are documented in malignant tumors, not only to the tumor stroma but also at the cell surface [62]. The elevated levels of the HA degrading, HYAL1 seems to regulate cell growth, adhesion, invasion, and angiogenesis of breast cancer [63]. Basal-like breast cancers (BL-BCa) have the worst prognosis of all subgroups of this disease. Indicatively, HA-induced CD44 signaling increases a diverse spectrum of protease activity including MTI-MMP and cathepsin K, to facilitate the invasion associated with BL-BCa cells, providing new insights into the molecular basis of CD44-promoted

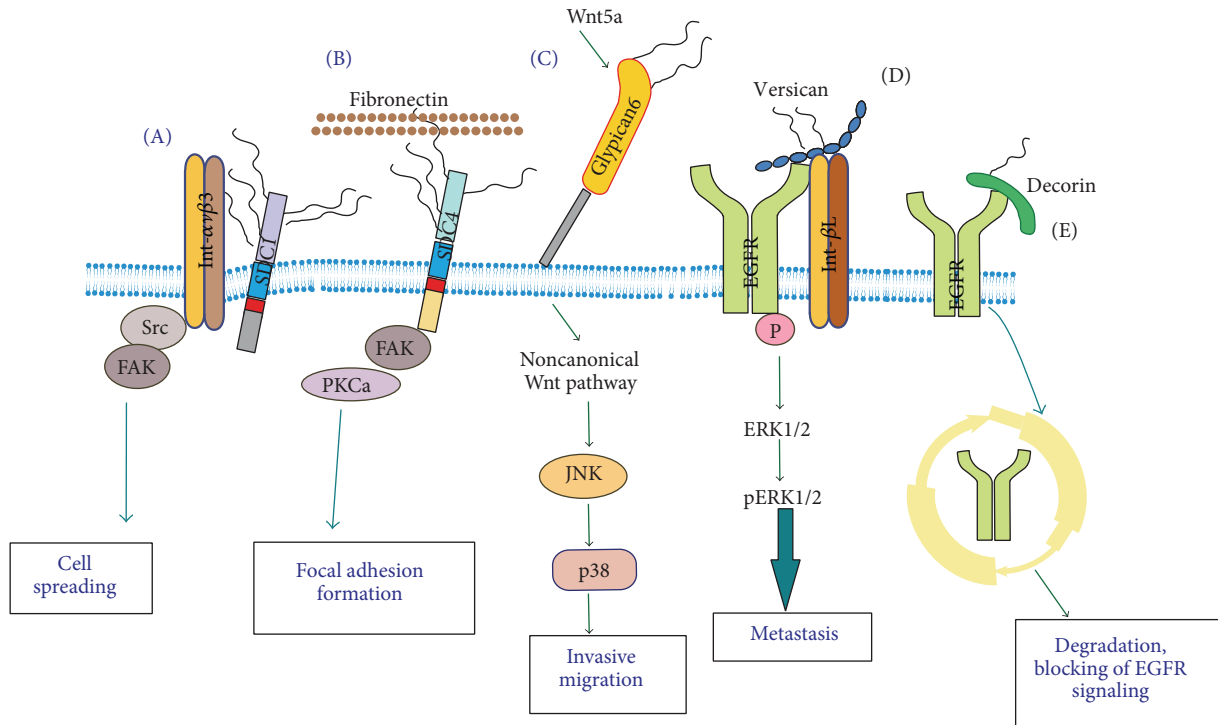


FIGURE 1: Roles of PGs/GAGs on the breast cancer motile phenotype. (A) Complex formation between syndecan1 (SDC1) and integrin- $\alpha\upsilon\beta\text{3}$ activate focal adhesion kinase to facilitate breast cancer cell spreading. (B) The specific binding of SDC4, through its HS chains, to fibronectin activates FAK/protein kinase Ca (PKCa) downstream signaling to initiate focal adhesion formation. (C) Wnt5a attaches to glypican6 in order to enhance breast cancer cell invasive migration through the involvement of noncanonical Wnt pathway and JNK/p38 downstream signaling. (D) Complex formation among versican, EGFR, and Int- βL activates extracellular matrix regulated kinase (ERK1/2) signaling to promote breast cancer metastasis. (E) Binding of decorin to EGFR causes receptor internalization, degradation, and subsequent inhibition of EGFR signaling.

invasion [140]. Moreover, the cell surface HA, which is secreted by breast cancer cells, increases the adhesion ability of tumor cells, to lymphatic endothelial receptor (LYVE-1) [132]. Importantly, the molecular weight of HA seems to play a key role in the process of cell adhesion [141, 142], and particularly low molecular weight of HA promotes cell adhesion, while high molecular weight HA has no effect [143]. Indeed, LMW-HA plays an important role in CD44-TLR-associated AFAP-110-actin interaction and MyD88-NF- κB signaling required for tumor cell behaviors, which may contribute to the progression of breast cancer [143]. The roles of PGs/GAGs on breast cancer cell motile phenotype are schematically depicted in Figure 1.

6. PGs/GAGs Potential Targets in Breast Cancer

In many *in vitro* studies breast cancer cells were treated with various anticancer agents, including inhibitors of tyrosine kinase receptors and other molecules, such as small peptides, which are related to the expression of proteoglycans, in order to observe changes in cell functions [29, 144, 145]. Thus, a new generation of bisphosphonate, zoledronate (zoledronic acid, Zometa), downregulates the expression levels of SDC1, SDC2, and GPC1 and upregulates the expression of SDC4

in breast cancer cells of low and high metastatic capability [144]. Furthermore, the downregulation in the expression of HA and its receptor CD44 which is directly associated with the migration and matrix-associated invasion of breast cancer cells was also observed [144]. Imatinib, a specific tyrosine kinase inhibitor, which targets PDGFRs, had a similar effect on breast cancer cells. Imatinib resulted in an inhibition of the PDGF-BB mediated expression of HSPGs, which is associated with its inhibitory effect on the invasive and migratory potential of breast cancer cells [29]. A different approach was utilized by Rapraeger [145]. These authors used a small peptide, synstatin, to target SDC1. Thus, the site in the SDC1 ectodomain that is responsible for capture and activation of the $\alpha\upsilon\beta\text{3}$ or $\alpha\upsilon\beta\text{5}$ integrins by IGF1R can be mimicked by this short peptide which competitively displaces the integrin and IGF1R kinase from the syndecan and inactivates the complex. The blocking in the formation of the receptor complex attenuates breast cancer cell metastasis [145].

It has been demonstrated that degradation of HS chains by heparanase 1 (HPSE-1) reveals cryptic HS fragments that play a significant role in controlling tumor cell growth and metastasis. It is thus likely that enzymatic degradation of HS could be used as a potential treatment against carcinogenesis since HS chains are involved in fundamental biological processes of both normal and metastatic cells [146].

Synthetic proteoglycans such as neoheparin and neoCS produced by carbodiimide (EDAC) conjugation of glycosaminoglycan (GAG) chains to a protein scaffold reduce cell viability by induction of apoptosis of myeloma and breast cancer cells *in vitro*. These results demonstrate the anticancer activities of this new class of GAG-based molecules [147].

In summary, this review focused on the roles of PGs/GAGs on breast cancer motility in order to identify possible therapeutic targets. The emerging mechanisms of PG/GAG action could potentially be exploited for designating discrete therapy targets for specific breast cancer grades.

Abbreviations

(PG):	Proteoglycan
(GAG):	Glycosaminoglycan
(ECM):	Extracellular matrix
(SLRPs):	Small leucine-rich PGs
(GPC):	Glypican
(SDC):	Syndecan
(HYAL):	Hyaluronidase
(HAS):	Hyaluronan synthase
(EMT):	Epithelial-to-mesenchymal transition
(MET):	Mesenchymal to epithelial transition
(E2):	Estradiol
(ERs):	Estrogen receptors.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This research has been cofinanced by the European Union (European Social Fund (ESF)) and Greek national funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF), Research Funding Program: THALES. Investing in knowledge society through the European Social Fund.

References

- [1] D. Nikitovic, A. Papoutsidakis, N. K. Karamanos, and G. N. Tzanakakis, "Lumican affects tumor cell functions, tumor-ECM interactions, angiogenesis and inflammatory response," *Matrix Biology*, vol. 35, pp. 206–214, 2014.
- [2] D. Nikitovic, K. Kouvidi, N. K. Karamanos, and G. N. Tzanakakis, "The roles of hyaluronan/RHAMM/CD44 and their respective interactions along the insidious pathways of fibrosarcoma progression," *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 929531, 12 pages, 2013.
- [3] D. Nikitovic, M. Mytilinaiou, A. Berdiaki, N. K. Karamanos, and G. N. Tzanakakis, "Heparan sulfate proteoglycans and heparin regulate melanoma cell functions," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1840, no. 8, pp. 2471–2481, 2014.
- [4] K. Kouvidi, A. Berdiaki, D. Nikitovic et al., "Role of Receptor for Hyaluronic Acid-mediated Motility (RHAMM) in Low Molecular Weight Hyaluronan (LMWHA)-mediated fibrosarcoma cell adhesion," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 44, pp. 38509–38520, 2011.
- [5] M. Mytilinaiou, A. Bano, D. Nikitovic et al., "Syndecan-2 is a key regulator of transforming growth factor beta 2/smad2-mediated adhesion in fibrosarcoma cells," *IUBMB Life*, vol. 65, no. 2, pp. 134–143, 2013.
- [6] G. Chalkiadaki, D. Nikitovic, P. Katonis et al., "Low molecular weight heparin inhibits melanoma cell adhesion and migration through a PKCa/JNK signaling pathway inducing actin cytoskeleton changes," *Cancer Letters*, vol. 312, no. 2, pp. 235–244, 2011.
- [7] J. D. S. Antonio and R. V. Iozzo, "Glycosaminoglycans: Structure and Biological Functions," eLS, 2001.
- [8] A. Syrokou, G. Tzanakakis, T. Tseggenidis, A. Hjerpe, and N. K. Karamanos, "Effects of glycosaminoglycans on proliferation of epithelial and fibroblast human malignant mesothelioma cells: a structure-function relationship," *Cell Proliferation*, vol. 32, no. 2-3, pp. 85–99, 1999.
- [9] T. N. Mitropoulou, G. N. Tzanakakis, D. Nikitovic, A. Tsatsakis, and N. K. Karamanos, "In vitro effects of genistein on the synthesis and distribution of glycosaminoglycans / proteoglycans by estrogen receptor-positive and -negative human breast cancer epithelial cells," *Anticancer Research*, vol. 22, no. 5, pp. 2841–2846, 2002.
- [10] C. B. N. Mendes de Aguiar, B. Lobão-Soares, M. Alvarez-Silva, and A. Gonçalves Trentin, "Glycosaminoglycans modulate C6 glioma cell adhesion to extracellular matrix components and alter cell proliferation and cell migration," *BMC Cell Biology*, vol. 6, article 31, 2005.
- [11] N. Afratis, C. Gialeli, D. Nikitovic et al., "Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment," *The FEBS Journal*, vol. 279, no. 7, pp. 1177–1197, 2012.
- [12] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, G. N. Tzanakakis, and N. K. Karamanos, "Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting," *FEBS Journal*, vol. 277, no. 19, pp. 3904–3923, 2010.
- [13] R. V. Iozzo, "Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 67, pp. 609–652, 1998.
- [14] L. Schaefer and R. M. Schaefer, "Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules," *Cell and Tissue Research*, vol. 339, no. 1, pp. 237–246, 2010.
- [15] P. P. Provenzano, K. W. Eliceiri, J. M. Campbell, D. R. Inman, J. G. White, and P. J. Keely, "Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion," *BMC Medicine*, vol. 4, article 38, 2006.
- [16] K. R. Levental, H. Yu, L. Kass et al., "Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling," *Cell*, vol. 139, no. 5, pp. 891–906, 2009.
- [17] P. Lu, V. M. Weaver, and Z. Werb, "The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression," *Journal of Cell Biology*, vol. 196, no. 4, pp. 395–406, 2012.
- [18] R. V. Iozzo, "The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 27, pp. 18843–18846, 1999.
- [19] J. L. Andres, D. DeFalcis, M. Noda, and J. Massague, "Binding of two growth factor families to separate domains of the proteoglycan betaglycan," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no. 9, pp. 5927–5930, 1992.

- [20] M. Bernfield, R. Kokenyesi, M. Kato et al., "Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans," *Annual Review of Cell Biology*, vol. 8, pp. 365–393, 1992.
- [21] M. Leivonen, J. Lundin, S. Nordling, K. von Boguslawski, and C. Haglund, "Prognostic value of syndecan-1 expression in breast cancer," *Oncology*, vol. 67, no. 1, pp. 11–18, 2004.
- [22] M. J. Stanley, M. W. Stanley, R. D. Sanderson, and R. Zera, "Syndecan-1 expression is induced in the stroma of infiltrating breast carcinoma," *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 112, no. 3, pp. 377–383, 1999.
- [23] T. Maeda, C. M. Alexander, and A. Friedl, "Induction of syndecan-1 expression in stromal fibroblasts promotes proliferation of human breast cancer cells," *Cancer Research*, vol. 64, no. 2, pp. 612–621, 2004.
- [24] M. V. Dhodapkar, T. Kelly, A. Theus, A. B. Athota, B. Barlogie, and R. D. Sanderson, "Elevated levels of shed syndecan-1 correlate with tumour mass and decreased matrix metalloproteinase-9 activity in the serum of patients with multiple myeloma," *British Journal of Haematology*, vol. 99, no. 2, pp. 368–371, 1997.
- [25] Y. Yang, S. Yaccoby, W. Liu et al., "Soluble syndecan-1 promotes growth of myeloma tumors in vivo," *Blood*, vol. 100, no. 2, pp. 610–617, 2002.
- [26] M. E. Lendorf, T. Manon-Jensen, P. Kronqvist, H. A. B. Multhaupt, and J. R. Couchman, "Syndecan-1 and syndecan-4 are independent indicators in breast carcinoma," *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 59, no. 6, pp. 615–629, 2011.
- [27] F. Baba, K. Swartz, R. van Buren et al., "Syndecan-1 and syndecan-4 are overexpressed in an estrogen receptor-negative, highly proliferative breast carcinoma subtype," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 98, no. 1, pp. 91–98, 2006.
- [28] C. J. Malavaki, A. E. Roussidis, C. Gialeli et al., "Imatinib as a key inhibitor of the platelet-derived growth factor receptor mediated expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans and functional properties of breast cancer cells," *FEBS Journal*, vol. 280, no. 10, pp. 2477–2489, 2013.
- [29] C. Mundhenke, K. Meyer, S. Drew, and A. Friedl, "Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 receptor binding in breast carcinomas," *American Journal of Pathology*, vol. 160, no. 1, pp. 185–194, 2002.
- [30] M. Barbareschi, P. Maisonneuve, D. Aldovini et al., "High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis," *Cancer*, vol. 98, no. 3, pp. 474–483, 2003.
- [31] M. Bernfield, M. Götte, P. W. Park et al., "Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 68, pp. 729–777, 1999.
- [32] E. Lundström, L. Sahlin, L. Skoog et al., "Expression of Syndecan-1 in histologically normal breast tissue from postmenopausal women with breast cancer according to mammographic density," *Climacteric*, vol. 9, no. 4, pp. 277–282, 2006.
- [33] L. Löfgren, L. Sahlin, S. Jiang et al., "Expression of syndecan-1 in paired samples of normal and malignant breast tissue from postmenopausal women," *Anticancer Research*, vol. 27, no. 5, pp. 3045–3050, 2007.
- [34] M. Götte, C. Kersting, M. Ruggiero et al., "Predictive value of syndecan-1 expression for the response to neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer," *Anticancer Research*, vol. 26, no. 1, pp. 621–627, 2006.
- [35] A. M. Tokes, A. M. Szasz, A. Farkas et al., "Stromal matrix protein expression following preoperative systemic therapy in breast cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 2, pp. 731–739, 2009.
- [36] J. Filmus, M. Capurro, and J. Rast, "Glypicans," *Genome Biology*, vol. 9, no. 5, article 224, 2008.
- [37] Y. Y. Xiang, V. Ladedda, and J. Filmus, "Glypican-3 expression is silenced in human breast cancer," *Oncogene*, vol. 20, no. 50, pp. 7408–7412, 2001.
- [38] A. D. Gonzalez, M. Kaya, W. Shi et al., "OCI-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner," *Journal of Cell Biology*, vol. 141, no. 6, pp. 1407–1414, 1998.
- [39] K. Matsuda, H. Maruyama, F. Guo et al., "Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells," *Cancer Research*, vol. 61, no. 14, pp. 5562–5569, 2001.
- [40] T. N. Wight, "Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 14, no. 5, pp. 617–623, 2002.
- [41] A. R. Jeffs, A. C. Glover, L. J. Slobbe et al., "A gene expression signature of invasive potential in metastatic melanoma cells," *PLoS ONE*, vol. 4, no. 12, Article ID e8461, 2009.
- [42] Y. Nara, Y. Kato, Y. Torii et al., "Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human breast tumours with special reference to PG-M/versican," *Histochemical Journal*, vol. 29, no. 1, pp. 21–30, 1997.
- [43] C. Ricciardelli, J. H. Brooks, S. Suwiwat et al., "Regulation of stromal versican expression by breast cancer cells and importance to relapse-free survival in patients with node-negative primary breast cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 8, no. 4, pp. 1054–1060, 2002.
- [44] C. Ricciardelli, K. Mayne, P. J. Sykes et al., "Elevated levels of versican but not decorin predict disease progression in early-stage prostate cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 4, no. 4, pp. 963–971, 1998.
- [45] S. Suwiwat, C. Ricciardelli, R. Tammi et al., "Expression of extracellular matrix components versican, chondroitin sulfate, tenascin, and hyaluronan, and their association with disease outcome in node-negative breast cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 10, no. 7, pp. 2491–2498, 2004.
- [46] G. Canavese, G. Candelaresi, I. Castellano, and M. P. Mano, "Expression of proteoglycan versican in in situ breast lesions: relations between stromal changes, histotype, and invasion," *Pathology Research and Practice*, vol. 207, no. 2, pp. 97–103, 2011.
- [47] A. J. M. Yee, M. Akens, B. L. Yang, J. Finkelstein, P. Zheng, and Z. Deng, "The effect of versican G3 domain on local breast cancer invasiveness and bony metastasis," *Breast Cancer Research*, vol. 9, no. 4, article R42, 2007.
- [48] W. W. Du, B. B. Yang, T. A. Shatseva et al., "Versican G3 promotes mouse mammary tumor cell growth, migration, and metastasis by influencing EGF receptor signaling," *PLoS ONE*, vol. 5, no. 11, Article ID e13828, 2010.
- [49] W. W. Du, B. B. Yang, B. L. Yang et al., "Versican G3 domain modulates breast cancer cell apoptosis: a mechanism for breast cancer cell response to chemotherapy and egfr therapy," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 11, Article ID e26396, 2011.

- [50] P. Kischel, D. Waltregny, B. Dumont et al., "Versican overexpression in human breast cancer lesions: known and new isoforms for stromal tumor targeting," *International Journal of Cancer*, vol. 126, no. 3, pp. 640–650, 2010.
- [51] P. A. McEwan, P. G. Scott, P. N. Bishop, and J. Bella, "Structural correlations in the family of small leucine-rich repeat proteins and proteoglycans," *Journal of Structural Biology*, vol. 155, no. 2, pp. 294–305, 2006.
- [52] L. Schaefer and R. V. Iozzo, "Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 31, pp. 21305–21309, 2008.
- [53] E. Leygue, L. Snell, H. Dotzlaw et al., "Lumican and decorin are differentially expressed in human breast carcinoma," *The Journal of Pathology*, vol. 192, pp. 313–320, 2000.
- [54] P. Boström, A. Sainio, T. Kakko, M. Savontaus, M. Söderström, and H. Järveläinen, "Localization of decorin gene expression in normal human breast tissue and in benign and malignant tumors of the human breast," *Histochemistry and Cell Biology*, vol. 139, no. 1, pp. 161–171, 2013.
- [55] S. Troup, C. Njue, E. V. Klierer et al., "Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 9, no. 1, pp. 207–214, 2003.
- [56] C. C. Reed, A. Waterhouse, S. Kirby et al., "Decorin prevents metastatic spreading of breast cancer," *Oncogene*, vol. 24, no. 6, pp. 1104–1110, 2005.
- [57] M. Santra, I. Eichstetter, and R. V. Iozzo, "An anti-oncogenic role for decorin: down-regulation of ErbB2 leads to growth suppression and cytodifferentiation of mammary carcinoma cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 45, pp. 35153–35161, 2000.
- [58] E. Leygue, L. Snell, H. Dotzlaw et al., "Expression of lumican in human breast carcinoma," *Cancer Research*, vol. 58, no. 7, pp. 1348–1352, 1998.
- [59] R. H. Tammi, A. Kultti, V. Kosma, R. Pirinen, P. Auvinen, and M. I. Tammi, "Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 18, no. 4, pp. 288–295, 2008.
- [60] B. P. Toole, T. N. Wight, and M. I. Tammi, "Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 7, pp. 4593–4596, 2002.
- [61] M. Jojovic, B. Delpach, P. Prehm, and U. Schumacher, "Expression of hyaluronate and hyaluronate synthase in human primary tumours and their metastases in scid mice," *Cancer Letters*, vol. 188, no. 1-2, pp. 181–189, 2002.
- [62] P. Auvinen, R. Tammi, J. Parkkinen et al., "Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival," *The American Journal of Pathology*, vol. 156, no. 2, pp. 529–536, 2000.
- [63] J. X. Tan, X. Y. Wang, H. Y. Li et al., "HYAL1 overexpression is correlated with the malignant behavior of human breast cancer," *International Journal of Cancer*, vol. 128, no. 6, pp. 1303–1315, 2011.
- [64] A. Wells, J. Grahovac, S. Wheeler, B. Ma, and D. Lauffenburger, "Targeting tumor cell motility as a strategy against invasion and metastasis," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 34, no. 5, pp. 283–289, 2013.
- [65] A. J. Ridley, "Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking," *Trends in Cell Biology*, vol. 16, no. 10, pp. 522–529, 2006.
- [66] A. K. Howe, "Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1692, no. 2-3, pp. 159–174, 2004.
- [67] S. Gehler, S. M. Ponik, K. M. Ricking, and P. J. Keely, "Bi-Directional signaling: Extracellular matrix and integrin regulation of breast tumor progression," *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, vol. 23, no. 2, pp. 139–157, 2013.
- [68] J. Zhao and J. Guan, "Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 28, no. 1-2, pp. 35–49, 2009.
- [69] G. Hannigan, A. A. Troussard, and S. Dedhar, "Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK," *Nature Reviews Cancer*, vol. 5, no. 1, pp. 51–63, 2005.
- [70] P. Savagner, "The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon," *Annals of Oncology*, vol. 21, supplement 7, pp. vii89–vii92, 2010.
- [71] M. J. C. Hendrix, E. A. SefTOR, Y. Chu, K. T. Trevor, and R. E. B. SefTOR, "Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 15, no. 4, pp. 507–525, 1996.
- [72] V. Quaranta, "Motility cues in the tumor microenvironment," *Differentiation*, vol. 70, no. 9-10, pp. 590–598, 2002.
- [73] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer," *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, 2000.
- [74] A. V. Marusyk, A. Almendro, and K. Polyak, "Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer?" *Nature Reviews Cancer*, vol. 12, no. 5, pp. 323–334, 2013.
- [75] F. Marcucci, M. Bellone, C. A. Caserta, and A. Corti, "Pushing tumor cells towards a malignant phenotype: stimuli from the microenvironment, intercellular communications and alternative roads," *International Journal of Cancer*, vol. 135, no. 6, pp. 1265–1276, 2014.
- [76] J. P. Thiery, H. Aclouque, R. Y. J. Huang, and M. A. Nieto, "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease," *Cell*, vol. 139, no. 5, pp. 871–890, 2009.
- [77] A. Morel, M. Lièvre, C. Thomas, G. Hinkal, S. Ansieau, and A. Puisieux, "Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition," *PLoS ONE*, vol. 3, no. 8, Article ID e2888, 2008.
- [78] M. L. Ackland, D. F. Newgreen, M. Fridman et al., "Epidermal growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition in human breast carcinoma cells," *Laboratory Investigation*, vol. 83, no. 3, pp. 435–448, 2003.
- [79] S. Giampieri, C. Manning, S. Hooper, L. Jones, C. S. Hill, and E. Sahai, "Localized and reversible TGF β signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility," *Nature Cell Biology*, vol. 11, no. 11, pp. 1287–1296, 2009.
- [80] A. Wicki, F. Lehenbre, N. Wick, B. Hantusch, D. Kerjaschki, and G. Christofori, "Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton," *Cancer Cell*, vol. 9, no. 4, pp. 261–272, 2006.
- [81] M. Marsan, G. van den Eynden, R. Limame et al., "A core invasiveness gene signature reflects epithelial-to-mesenchymal transition but not metastatic potential in breast cancer cell lines and tissue samples," *PLoS ONE*, vol. 21, Article ID e89262, 2014.

- [82] D. Gao, L. T. Vahdat, S. Wong, J. C. Chang, and V. Mittal, "Microenvironmental regulation of epithelial-mesenchymal transitions in cancer," *Cancer Research*, vol. 72, no. 19, pp. 4883–4889, 2012.
- [83] Q. Zheng, A. Safina, and A. V. Bakin, "Role of high-molecular weight tropomyosins in TGF- β -mediated control of cell motility," *International Journal of Cancer*, vol. 122, no. 1, pp. 78–90, 2008.
- [84] H. Kim, B. C. Litzenburger, X. Cui et al., "Constitutively active type I insulin-like growth factor receptor causes transformation and xenograft growth of immortalized mammary epithelial cells and is accompanied by an epithelial-to-mesenchymal transition mediated by NF- κ B and snail," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 27, no. 8, pp. 3165–3175, 2007.
- [85] H. Porsch, B. Bernert, M. Mehić, A. D. Theocharis, C. Heldin, and P. Heldin, "Efficient TGF β -induced epithelial-mesenchymal transition depends on hyaluronan synthase HAS2," *Oncogene*, vol. 32, pp. 4355–4365, 2013.
- [86] H. C. Lien, Y. H. Lee, Y. M. Jeng, C. H. Lin, Y. S. Lu, and Y. T. Yao, "Differential expression of hyaluronan synthase 2 in breast carcinoma and its biological significance," *Histopathology*, 2014.
- [87] A. K. Kiemer, K. Takeuchi, and M. P. Quinlan, "Identification of genes involved in epithelial-mesenchymal transition and tumor progression," *Oncogene*, vol. 20, no. 46, pp. 6679–6688, 2001.
- [88] C. Thomas and A. E. Karnoub, "Lysyl oxidase at the crossroads of mesenchymal stem cells and epithelial-mesenchymal transition," *Oncotarget*, vol. 4, no. 3, pp. 376–377, 2013.
- [89] S. Maschler, S. Grunert, A. Danielopol, H. Beug, and G. Wirl, "Enhanced tenascin-C expression and matrix deposition during Ras/TGF- β -induced progression of mammary tumor cells," *Oncogene*, vol. 23, no. 20, pp. 3622–3633, 2004.
- [90] D. Loussouarn, L. Champion, C. Sagan et al., "Prognostic impact of syndecan-1 expression in invasive ductal breast carcinomas," *British Journal of Cancer*, vol. 98, no. 12, pp. 1993–1998, 2008.
- [91] M. Götte, C. Kersting, I. Radke, L. Kiesel, and P. Wülfing, "An expression signature of syndecan-1 (CD138), E-cadherin and c-met is associated with factors of angiogenesis and lymphangiogenesis in ductal breast carcinoma in situ," *Breast Cancer Research*, vol. 9, no. 1, article R8, 2007.
- [92] D. Gao, N. Joshi, H. Choi et al., "Myeloid progenitor cells in the premetastatic lung promote metastases by inducing mesenchymal to epithelial transition," *Cancer Research*, vol. 72, no. 6, pp. 1384–1394, 2012.
- [93] C. Gialeli, A. D. Theocharis, and N. K. Karamanos, "Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting," *The FEBS Journal*, vol. 278, no. 1, pp. 16–27, 2011.
- [94] R. V. Iozzo, "The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth," *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 32, no. 2, pp. 141–174, 1997.
- [95] S. Sarrazin, W. C. Lamanna, and J. D. Esko, "Heparan sulfate proteoglycans," *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 3, no. 7, Article ID a004952, 2011.
- [96] D. M. Beauvais and A. C. Rapraeger, "Syndecans in tumor cell adhesion and signaling," *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 2, article 3, 2004.
- [97] J. R. Couchman, "Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains?" *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 4, no. 12, pp. 926–937, 2003.
- [98] J. R. Couchman, "Transmembrane signaling proteoglycans," *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 26, pp. 89–114, 2010.
- [99] T. Manon-Jensen, Y. Itoh, and J. R. Couchman, "Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding," *FEBS Journal*, vol. 277, no. 19, pp. 3876–3889, 2010.
- [100] X. Xian, S. Gopal, and J. R. Couchman, "Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix," *Cell and Tissue Research*, vol. 339, no. 1, pp. 31–46, 2010.
- [101] A. I. Tsonis, N. Afratis, C. Gialeli et al., "Evaluation of the coordinated actions of estrogen receptors with epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor in the expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans and cell motility in breast cancer cells," *FEBS Journal*, vol. 280, no. 10, pp. 2248–2259, 2013.
- [102] G. W. Yip, M. Smollich, and M. Götte, "Therapeutic value of glycosaminoglycans in cancer," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 5, no. 9, pp. 2139–2148, 2006.
- [103] C. Y. Fears and A. Woods, "The role of syndecans in disease and wound healing," *Matrix Biology*, vol. 25, no. 7, pp. 443–456, 2006.
- [104] K. Lambaerts, S. A. Wilcox-Adelman, and P. Zimmermann, "The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 21, no. 5, pp. 662–669, 2009.
- [105] S. A. Ibrahim, G. W. Yip, C. Stock et al., "Targeting of syndecan-1 by microRNA miR-10b promotes breast cancer cell motility and invasiveness via a Rho-GTPase- and E-cadherin-dependent mechanism," *International Journal of Cancer*, vol. 131, no. 6, pp. E884–E896, 2012.
- [106] D. M. Beauvais and A. C. Rapraeger, "Syndecan-1-mediated cell spreading requires signaling by α v β 3 integrins in human breast carcinoma cells," *Experimental Cell Research*, vol. 286, no. 2, pp. 219–232, 2003.
- [107] D. M. Beauvais and A. C. Rapraeger, "Syndecan-1 couples the insulin-like growth factor-1 receptor to inside-out integrin activation," *Journal of Cell Science*, vol. 123, no. 21, pp. 3796–3807, 2010.
- [108] H. Hassan, B. Greve, M. S. G. Pavao, L. Kiesel, S. A. Ibrahim, and M. Götte, "Syndecan-1 modulates β -integrin-dependent and interleukin-6-dependent functions in breast cancer cell adhesion, migration, and resistance to irradiation," *FEBS Journal*, vol. 280, no. 10, pp. 2216–2227, 2013.
- [109] E. Tkachenko, J. M. Rhodes, and M. Simons, "Syndecans: new kids on the signaling block," *Circulation Research*, vol. 96, no. 5, pp. 488–500, 2005.
- [110] O. C. Kousidou, A. Berdiaki, D. Kletsas et al., "Estradiol-estrogen receptor: a key interplay of the expression of syndecan-2 and metalloproteinase-9 in breast cancer cells," *Molecular Oncology*, vol. 2, no. 3, pp. 223–232, 2008.
- [111] A. Yoneda, M. E. Lendorf, J. R. Couchman, and H. A. B. Multhaupt, "Breast and ovarian cancers: a survey and possible roles for the cell surface heparan sulfate proteoglycans," *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 60, no. 1, pp. 9–21, 2012.
- [112] E. J. Davies, F. H. Blackhall, J. H. Shanks et al., "Distribution and clinical significance of heparan sulfate proteoglycans in ovarian cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 10, no. 15, pp. 5178–5186, 2004.

- [113] A. Woods and J. R. Couchman, "Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 5, no. 2, pp. 183–192, 1994.
- [114] A. Woods, R. L. Longley, S. Tumova, and J. R. Couchman, "Syndecan-4 binding to the high affinity heparin-binding domain of fibronectin drives focal adhesion formation in fibroblasts," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 374, no. 1, pp. 66–72, 2000.
- [115] A. C. Rapraeger, "Syndecan-regulated receptor signaling," *Journal of Cell Biology*, vol. 149, no. 5, pp. 995–997, 2000.
- [116] A. Woods, "Syndecans: transmembrane modulators of adhesion and matrix assembly," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 107, no. 8, pp. 935–941, 2001.
- [117] L. A. Cary, J. F. Chang, and J. Guan, "Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn," *Journal of Cell Science*, vol. 109, no. 7, pp. 1787–1794, 1996.
- [118] R. L. Longley, A. Woods, A. Fleetwood, G. J. Cowling, J. T. Gallagher, and J. R. Couchman, "Control of morphology, cytoskeleton and migration by syndecan-4," *Journal of Cell Science*, vol. 112, no. 20, pp. 3421–3431, 1999.
- [119] W. Huang, R. Chiquet-Ehrismann, J. V. Moyano, A. Garcia-Pardo, and G. Orend, "Interference of tenascin-C with syndecan-4 binding to fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation," *Cancer Research*, vol. 61, no. 23, pp. 8586–8594, 2001.
- [120] G. Vollmer, M. I. Tan, W. Wunsche, and K. Frank, "Expression of tenascin-C by human endometrial adenocarcinoma and stroma cells: heterogeneity of splice variants and induction by TGF- β ," *Biochemistry and Cell Biology*, vol. 75, no. 6, pp. 759–769, 1997.
- [121] M. Kato, S. Saunders, H. Nguyen, and M. Bernfield, "Loss of cell surface syndecan-1 causes epithelia to transform into anchorage-independent mesenchyme-like cells," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 6, no. 5, pp. 559–576, 1995.
- [122] A. J. McFall and A. C. Rapraeger, "Identification of an adhesion site within the syndecan-4 extracellular protein domain," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 20, pp. 12901–12904, 1997.
- [123] A. J. McFall and A. C. Rapraeger, "Characterization of the high affinity cell-binding domain in the cell surface proteoglycan syndecan-4," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 43, pp. 28270–28276, 1998.
- [124] V. Nikolova, C. Koo, S. A. Ibrahim et al., "Differential roles for membrane-bound and soluble syndecan-1 (CD138) in breast cancer progression," *Carcinogenesis*, vol. 30, no. 3, pp. 397–407, 2009.
- [125] I. Vlodayvsky, M. Elkin, and N. Ilan, "Impact of heparanase and the tumor microenvironment on cancer metastasis and angiogenesis: basic aspects and clinical applications," *Rambam Maimonides Medical Journal*, vol. 2, no. 1, Article ID e0019, 2011.
- [126] M. G. Peters, E. Farias, L. Colombo, J. Filmus, L. Puricelli, and E. Bal de Kier Joffé, "Inhibition of invasion and metastasis by glypican-3 in a syngeneic breast cancer model," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 80, no. 2, pp. 221–232, 2003.
- [127] I. Stigliano, L. Puricelli, J. Filmus, M. C. Sogayar, E. B. de Kier Joffé, and M. G. Peters, "Glypican-3 regulates migration, adhesion and actin cytoskeleton organization in mammary tumor cells through Wnt signaling modulation," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 114, no. 2, pp. 251–262, 2009.
- [128] G. K. Yiu, A. Kaunisto, Y. R. Chin, and A. Toker, "NFAT promotes carcinoma invasive migration through glypican-6," *Biochemical Journal*, vol. 440, no. 1, pp. 157–166, 2011.
- [129] Y. J. Wu, D. P. La Pierre, J. Wu, A. J. Yee, and B. B. Yang, "The interaction of versican with its binding partners," *Cell Research*, vol. 15, no. 7, pp. 483–494, 2005.
- [130] A. D. Theocharis, "Versican in health and disease," *Connective Tissue Research*, vol. 49, no. 3–4, pp. 230–234, 2008.
- [131] S. S. Skandalis, V. T. Labropoulou, P. Ravazoula et al., "Versican but not decorin accumulation is related to malignancy in mammographically detected high density and malignant-appearing microcalcifications in non-palpable breast carcinomas," *BMC Cancer*, vol. 11, article 314, 2011.
- [132] W. W. Du, L. Fang, W. Yang et al., "The role of versican G3 domain in regulating breast cancer cell motility including effects on osteoblast cell growth and differentiation in vitro—evaluation towards understanding breast cancer cell bone metastasis," *BMC Cancer*, vol. 12, article 341, 2012.
- [133] S. S. Skandalis, N. Afratis, G. Smirlaki, D. Nikitovic, A. D. Theocharis, and G. N. Tzanakakis, "Cross-talk between estradiol receptor and EGFR/IGF-IR signaling pathways in estrogen-responsive breast cancers: focus on the role and impact of proteoglycans," *Matrix Biology*, vol. 35, pp. 182–193, 2014.
- [134] J. Zhu, S. Goldoni, G. Bix et al., "Decorin evokes protracted internalization and degradation of the epidermal growth factor receptor via caveolar endocytosis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 37, pp. 32468–32479, 2005.
- [135] R. V. Iozzo, S. Buraschi, M. Genua et al., "Decorin antagonizes IGF receptor I (IGF-IR) function by interfering with IGF-IR activity and attenuating downstream signaling," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 40, pp. 34712–34721, 2011.
- [136] B. Vuillermoz, A. Khoruzhenko, M. D'Onofrio et al., "The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression," *Experimental Cell Research*, vol. 296, no. 2, pp. 294–306, 2004.
- [137] S. Brezillon, C. Zeltz, L. Schneider et al., "Lumican inhibits B16F1 melanoma cell lung metastasis," *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 60, pp. 15–22, 2009.
- [138] C. Zeltz, S. Brezillon, J. Käpylä et al., "Lumican inhibits cell migration through α 2B1 integrin," *Experimental Cell Research*, vol. 316, no. 17, pp. 2922–2931, 2010.
- [139] A. Korpetinou, S. S. Skandalis, A. Moustakas et al., "Serglycin is implicated in the promotion of aggressive phenotype of breast cancer cells," *PLoS ONE*, vol. 8, Article ID e78157, 2013.
- [140] N. Montgomery, A. Hill, S. McFarlane et al., "CD44 enhances invasion of basal-like breast cancer cells by upregulating serine protease and collagen-degrading enzymatic expression and activity," *Breast Cancer Research*, vol. 14, no. 3, article R84, 2012.
- [141] L. E. Dickinson, C. C. Ho, G. M. Wang, K. J. Stebe, and S. Gerecht, "Functional surfaces for high-resolution analysis of cancer cell interactions on exogenous hyaluronic acid," *Biomaterials*, vol. 31, no. 20, pp. 5472–5478, 2010.
- [142] C. Yang, M. Cao, H. Liu et al., "The high and low molecular weight forms of hyaluronan have distinct effects on CD44 clustering," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 51, pp. 43094–43107, 2012.
- [143] L. Y. W. Bourguignon, G. Wong, C. A. Earle, and W. Xia, "Interaction of low molecular weight hyaluronan with CD44 and toll-like receptors promotes the actin filament-associated protein 110-actin binding and MyD88-NF κ B signaling leading

- to proinflammatory cytokine/chemokine production and breast tumor invasion,” *Cytoskeleton*, vol. 68, no. 12, pp. 671–693, 2011.
- [144] P. G. Dedes, C. Gialeli, A. I. Tsonis et al., “Expression of matrix macromolecules and functional properties of breast cancer cells are modulated by the bisphosphonate zoledronic acid,” *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1820, no. 12, pp. 1926–1939, 2012.
- [145] A. C. Rapraeger, “Synstatin: A selective inhibitor of the syndecan-1-coupled IGF1R- α v β 3 integrin complex in tumorigenesis and angiogenesis,” *The FEBS Journal*, vol. 280, no. 10, pp. 2207–2215, 2013.
- [146] D. Liu, Z. Shriver, G. Venkataraman, Y. El Shabrawi, and R. Sasisekharan, “Tumor cell surface heparan sulfate as cryptic promoters or inhibitors of tumor growth and metastasis,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 2, pp. 568–573, 2002.
- [147] C. Y. Pumphrey, A. M. Theus, S. Li, R. S. Parrish, and R. D. Sanderson, “Neoglycans, carbodiimide-modified glycosaminoglycans: a new class of anticancer agents that inhibit cancer cell proliferation and induce apoptosis,” *Cancer Research*, vol. 62, no. 13, pp. 3722–3728, 2002.