



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΣΤΗΡΙΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΘΕΜΑ: Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ GATA3 ΜΕ ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ
NF-κΒ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ:

ΘΕΑΚΟΥ ΜΑΡΙΑ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ

A.M.: 18678233

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΑ ΚΑΘΗΓΗΤΗ:

**ΠΑΠΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ, MD, PhD, PharmD, MSc – ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**

ΑΘΗΝΑ, 2022



UNIVERSITY OF WEST ATTICA

FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES

DIVISION OF MEDICAL LABORATORIES

DISSERTATION

**SUBJECT: THE INTERACTION OF GATA3 PROTEIN WITH THE NF- κ B
PATHWAY IN BREAST CANCER**

STUDENT NAME:

THEAKOU MARIA PANAGIOTA

C.N.: 18678233

NAME OF SUPERVISOR:

**PAPANASTASIOU ANASTASIOS, MD, PhD, PharmD, MSc – ASSISTANT
PROFESSOR IN THE DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES OF
UNIVERSITY OF WEST ATTICA**

ATHENS, 2022



Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ GATA3 ΜΕ ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ NF-κΒ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής:

Η πτυχιακή εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

Α/Α	ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1	ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΠΑΠΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ	Δ.Ε.Π., Επίκουρος Καθηγητής στο Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών	
2	ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΧΑΝΙΩΤΗΣ	Δ.Ε.Π., Καθηγητής και Πρόεδρος του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών	
3	ΜΑΡΙΑ ΤΡΑΠΑΛΗ	Δ.Ε.Π., Λέκτορας στο Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Θεάκου Μαρία Παναγιώτα του Παναγιώτη με αριθμό μητρώου 18678233 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών και λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	III
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	IV
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	IX
ABSTRACT	XI
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΜΑΖΙΚΟΣ ΑΔΕΝΑΣ.....	2
1.1 Ανατομία Μαστού.....	2
1.2 Φυσιολογία μαστού.....	8
1.3 Ιστολογία μαζικού αδένα.....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 «ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ»	12
2.1 Εισαγωγή.....	12
2.2 Καρκινογένεση	13
2.3 Γενετική Βάση Καρκίνου.....	14
2.4 Επιδημιολογία.....	14
2.5 Παράγοντες Κινδύνου.....	16
2.6 Μοριακή Ταξινόμηση Καρκίνου Μαστού	18
2.7 Ιστοπαθολογική Ταξινόμηση.....	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 «ΟΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ GATA3 ΚΑΙ NF-κΒ»	26
3.1 Η οικογένεια GATA.....	26
3.1.2 GATA3.....	29
3.1.3 Έκφραση του GATA3 στον μαζικό αδένα.....	30
3.2 Η οικογένεια Rel/NF-κΒ	31
3.2.2 Μονοπάτια Μεταγωγής Σήματος.....	33
3.2.3 Ο NF-κΒ στον καρκίνο.....	36
3.3 Η οικογένεια TRAF.....	37
3.3.2 TRAF2.....	38
ΣΚΟΠΟΣ.....	41
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	41
Ιστορικό υλικού	41
Ανοσοκατακρήμνιση.....	41
Ανοσοϊστοχημεία.....	43
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	49
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	57

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	59
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	64
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	65

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ανατομίας – Παθολογικής Ανατομίας και Φυσιολογίας – Διατροφής του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Δρ. Αναστάσιου Παπαναστασίου. Η ανάληψη της εργασίας έγινε τον μήνα Φεβρουάριο του έτους 2022 και ολοκληρώθηκε τον μήνα Σεπτέμβριο του έτους 2022.

Μέρος της πειραματικής διαδικασίας της ανοσοκατακρήμνισης πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ογκολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αναθέτοντάς μου τη συγκεκριμένη μελέτη. Τόσο κατά τη διάρκεια της συγγραφής, όσο και κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων, ήταν παρών και πρόθυμος να λύσει οποιαδήποτε απορία μου. Χάρης τον ζήλο, την αγάπη του για το αντικείμενο, της άριστης συνεργασίας και της προτροπής του, ολοκλήρωσα με επιτυχία την προσπάθειά μου. Τον ευχαριστώ επίσης, για την έμπνευση, την υποστήριξη και την ευκαιρία που μου έδωσε απλόχερα, ώστε να ασχοληθώ με τον κλάδο της μοριακής παθολογικής ανατομικής. Όλο αυτό το διάστημα, αποτέλεσε πρότυπο για εμένα.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Χάιδω Σιρινιάν, για τη συνεργασία στην πραγματοποίηση του πειράματος της ανοσοκατακρήμνισης, για τον χρόνο που μου διέθεσε και για τις γνώσεις που μοιράστηκε μαζί μου, ώστε να τις αξιοποιήσω κατάλληλα κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους, για την αβάσταχτη υποστήριξη, κατανόηση και πίστη προς εμένα, όλο αυτό το διάστημα.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

10p14: Θέση 14 μικρού βραχίονα (p) του χρωμοσώματος 10

16q: Μακρύς βραχίονας (q) του χρωμοσώματος 16

AKT: Protein Kinase B (PKB)

ANK: Ankyrin Repeats

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated

BR3: B-cell Receptor 3

BRCA1: Breast Cancer Type 1 Susceptibility Gene

BRCA2: Breast Cancer Type 2 Susceptibility Gene

CC: Colloid Carcinoma

CD40: Cluster of Differentiation 40

CF: COOH-Final

CK14: Cytokeratin 14

CK17: Cytokeratin 17

CK2: Casein Kinase 2

CK5: Cytokeratin 5

Co-IP: Co-Immunoprecipitation

DAB: 3,3'-Diaminobenzidine

DCIS: Ductal Carcinoma In Situ

DD: Death Domain

dH₂O: Distilled Water

DNA: Deoxyribonucleic Acid

E3: Ubiquitin Ligase

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

ER: Estrogen Receptor

Er α : Estrogen Receptor Alpha

FGF: Fibroblast Growth Factors

FOG: Friend of GATA

GATA3: GATA-binding Factor

GR: Glycine-rich Domain

H₂O₂: Hydrogen Peroxide

HDR: Hypoparathyroidism, Sensorineural Deafness and Renal Disease

HER-2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HRP: Horseradish Peroxidase

IC: Inflammatory Carcinoma

IDC: Invasive Ductal Carcinoma

IFN: Interferon Type I

IgA: Immunoglobulin A

IgG: Immunoglobulin G

IHC: Immunohistochemistry

IKK: I κ B α Kinase

IKK α : I κ B α Kinase α

IKK β : I κ B α Kinase β

IKK γ : I κ B α Kinase γ

IL-1: Interleukin-1

IL-17: Interleukin-17

IL-1R: Interleukin-1 Receptor

IL-2: Interleukin-2

IL-8: Interleukin-8

ILC: Invasive Lobular Carcinoma

I κ B α : Inhibitor of Nuclear Factor- κ B

kDa: kilodalton (kg/mol)

Ki-67: Marker of Proliferation Ki-67

LCIS: Lobular Carcinoma In Situ

LI: Lower Inner

LO: Lower Outer

LT β R: Lymphotoxin β Receptor

LZ: Leucine Zipper

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MC: Medullary Carcinoma

NEMO: NF- κ B Essential Modulator

NF: NH₂- Final

NF- κ B: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NGF: Nerve Growth Factor

NIK: NF- κ B Inducing Kinase

NLRs: NOD-like Receptors

NLS: Nuclear Localization Signal

O/N: Overnight

PD: Paget Disease

PDGF: Platelet Derived Growth Factor

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

PI3CA: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha

PR: Progesterone Receptor

PTEN: Phosphatase and Tensin Homolog

RANK: Receptor Activator of Nuclear Factor κ B

RANKL: Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand

RHD: Rel Homology Domain

RING: Really Interesting New Gene

RLRs: Retinoic acid-inducible gene-I-(RIG)-like Receptors

TADs: Transactivation Domains

TAI: Transactivation Domain I

TAII: Transactivation Domain II

TBS: Tris-Buffered Saline

TC: Tubular Carcinoma

TEBs: Terminal End Buds

TFs: Transcription Factors

TGF- α : Tumor Growth Factor Alpha

TGF- β : Tumor Growth Factor Beta

TLRs: Toll-like Receptors

TNC: Triple Negative Carcinoma

TNFR: Tumor Necrosis Factor Receptor

TP53: Tumor Protein 53

TRAF: TNF Receptor Associated Factors

TRAF-C: TRAF-COOH

TRAF-N: TRAF-NH₂

UI: Upper Inner

UO: Upper Outer

UV: Ultraviolet

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

ZNI: Zinc Finger I

ZNII: Zinc Finger II

A&H: Αιματοξυλίνη & Ηωσίνη

Θ6-Θ12: Θωρακικοί Σπόνδυλοι 6-12

ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

Ο1-Ο5: Οσφυϊκοί Σπόνδυλοι 1-5

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Η πρωτεΐνη GATA3 έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των αυλικών κυττάρων του μαζικού αδένα και στον ER-θετικό (Estrogen Receptor) καρκίνο μαστού. Το μονοπάτι NF-κB διαμεσολαβεί πληθώρα μοριακών και κυτταρικών λειτουργιών σε έναν μεγάλο αριθμό κυττάρων και ιστών. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της πιθανής λειτουργικής αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης GATA3 με συστατικά του μονοπατιού NF-κB. Για τον σκοπό αυτό αναλύθηκαν προηγούμενα ερευνητικά αποτελέσματα και εφαρμόστηκε η τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης (Immunoprecipitation, IP) για την πρωτεΐνη TRAF2 σε κυτταρικές σειρές καρκινωμάτων μαστού. Παράλληλα έγινε ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών GATA3 και RelB, TRAF2, ως συστατικά του μονοπατιού NF-κB, σε 10 περιστατικά καρκίνου του μαστού.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ: Για τη διεξαγωγή της μελέτης, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση με ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης TRAF2 σε εκχυλίσματα της κυτταρικής σειράς BT474 (ER+, PR+, HER2+) και ελέγχθηκε η φυσική αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη GATA3. Εν συνεχεία, χρησιμοποιήθηκαν 10 ιστοπαθολογικά δείγματα ασθενών με ER-θετικό καρκίνωμα μαστού. Με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας και χρήση των αντίστοιχων ειδικών αντισωμάτων, μελετήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών GATA3, RelB και TRAF2 σε τομές παραφίνης. Ακολούθησε η κατηγοριοποίησή τους ανάλογα με τον βαθμό έκφρασης της κάθε πρωτεΐνης και ανάλογα με τον εντοπισμό της στον πυρήνα ή το κυτταρόπλασμα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Η ανάλυση των υπαρχόντων δεδομένων φασματομετρίας μάζας και η ανοσοκατακρήμνιση του TRAF2 κατέδειξαν την πιθανή ύπαρξη σε κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού της φυσικής αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης TRAF2 και GATA3. Τα δεδομένα αυτά δεν μπορούν να αποκλείσουν την παρουσία ενός μεγαλύτερου πρωτεϊνικού συμπλόκου το οποίο περιλαμβάνει και άλλες πρωτεΐνες, πέραν αυτών που αναγνωρίστηκαν. Εν συνεχεία, αναλύθηκε ανοσοϊστοχημικά η πιθανή λειτουργική αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης GATA3 με συστατικά του μονοπατιού NF-κB (TRAF2, RelB) σε τομές ER-θετικού καρκίνου μαστού. Αναγνωρίστηκε μια πιθανή αρνητική συσχέτιση της παρουσίας της πρωτεΐνης RelB με την πρωτεΐνη GATA3 στον καρκίνο του μαστού.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Σύμφωνα με τα αποτελέσματα και τις αναλύσεις των ήδη υπαρχόντων δεδομένων, η πρωτεΐνη TRAF2 φαίνεται να αλληλεπιδρά φυσικά με την πρωτεΐνη GATA3,

αναδεικνύοντας μια πιθανή λειτουργική αλληλεπίδραση του GATA3 με το μονοπάτι NF-κB. Επίσης, σύμφωνα με τα ανοσοϊστοχημικά δεδομένα, παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση της παρουσίας της πρωτεΐνης RelB με την πρωτεΐνη GATA3 στα δείγματα καρκίνου μαστού. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες και περισσότερα δείγματα ασθενών για την κατανόηση της σχέσης της πρωτεΐνης GATA3 με το μονοπάτι του NF-κB και την αξιοποίηση αυτών των αποτελεσμάτων στην πρόγνωση και κλινική εξέλιξη της νόσου.

Λέξεις κλειδιά: Καρκίνος μαστού, ανοσοϊστοχημεία, συν-ανοσοκατακρήμνιση, GATA3, NF-κB, BT474, TRAF2, RelB, επιδημιολογία, μοριακή ταξινόμηση, ιστοπαθολογική ταξινόμηση, διηθητικό καρκίνωμα, *in situ* καρκίνωμα, ER, PR, HER2, τριπλά αρνητικό καρκίνωμα, μαζικός αδένας, ανατομία, φυσιολογία, ιστολογία

ABSTRACT

INTRODUCTION: GATA3 protein has an important role in mammary gland luminal cell development and ER-positive (Estrogen Receptor, ER) breast cancer. The NF- κ B pathway mediates a multitude of molecular and cellular functions in a large number of cells and tissues. The aim of this thesis is to study the possible functional interaction of the GATA3 protein with components of the NF- κ B pathway. For this purpose, previous research results were analyzed and the technique of IP (Immunoprecipitation, IP) was applied for TRAF2 protein in breast carcinoma cell lines. At the same time, an immunohistochemical study of the expression of the GATA3 protein and RelB, TRAF2 proteins, as components of the NF- κ B pathway, was performed in 10 cases of breast cancer.

MATERIALS AND METHODS: To conduct the study, it was performed immunoprecipitation with a specific antibody against the TRAF2 protein in BT474 (ER+, PR+, HER2+) cell line extracts and it was checked the physical interaction with the GATA3 protein. Subsequently, they were used 10 histopathological samples from patients with ER-positive breast carcinoma. With the method of immunohistochemistry and using the corresponding specific antibodies, it was studied the expression of GATA3, RelB and TRAF2 proteins in paraffin sections. This was followed by their categorization according to the grade of expression of each protein and according to its localization in the nucleus or the cytoplasm.

RESULTS: Analysis of existing mass spectrometry data and immunoprecipitation of TRAF2 demonstrated the possibility of natural interaction of TRAF2 and GATA3 protein existence in breast cancer cell lines. These data cannot exclude the presence of a larger protein complex that includes other proteins besides those who identified. Afterwards, it was analyzed immunohistochemically the possible functional interaction of GATA3 protein with NF- κ B pathway components (TRAF2, RelB) in ER-positive breast cancer sections. It was identified a rather negative correlation of the presence of RelB with GATA3 in breast cancer.

CONCLUSIONS: According to the results and the analyzes of the existing data, TRAF2 protein seems to physically interact with GATA3 protein, highlighting a possible functional interaction of GATA3 with the NF- κ B pathway. Also, according to the immunohistochemical data, it was observed a negative correlation of the RelB protein presence with the GATA3 in the breast cancer samples. Further studies and more patient

samples are needed to understand the relationship of the GATA3 protein with the NF- κ B pathway and to utilize these results in the prognosis and clinical progression of the disease.

Key words: Breast cancer, immunohistochemistry, co-immunoprecipitation, GATA3, NF- κ B, BT474, TRAF2, RelB, epidemiology, molecular classification, histopathological classification, invasive carcinoma, in situ carcinoma, ER, PR, HER2, triple negative carcinoma, mammary gland, anatomy, physiology, histology

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος είναι μία ασθένεια με μεγάλη ετερογένεια. Προκειμένου να μπορέσει να γίνει γνωστός και κατανοητός ο μηχανισμός του, απαιτείται η συνεργασία πολλών επιστημονικών κλάδων της Βιολογίας και της Ιατρικής. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η κακοήθεια που έχει μελετηθεί περισσότερο είναι ο **καρκίνος του μαστού**. Πρόκειται για την συχνότερη μορφή κακοήθειας στις γυναίκες, με ποσοστό εμφάνισης ~13%, ενώ σε μικρότερο ποσοστό ~0,1% απασχολεί τους άντρες. Με την πρόοδο της Μοριακής Βιολογίας και της Βιοτεχνολογίας, γίνεται προσπάθεια διαλεύκανσης της αιτιολογίας και της παθολογίας του καρκίνου του μαστού, καθώς και της κλινικής πορείας της νόσου.

Η καρκινογένεση στον μαστό αφορά μια σειρά μηχανισμών που μετατρέπουν τα φυσιολογικά κύτταρα του μαζικού αδένα σε καρκινικά. Κύριο ρόλο σε αυτούς τους μηχανισμούς παίζουν ορισμένοι γενετικοί και επιγενετικοί παράγοντες, οι οποίοι οδηγούν σε ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση μονοπατιών αγωγής σήματος, επηρεάζοντας τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου. Η καρκινογένεση μαζί με τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό είναι χαρακτηριστικά της κακοήθειας και προκαλούνται εξ αιτίας μεταλλαγών που συμβαίνουν σε πρωτο-ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Η παρούσα διπλωματική εργασία ερευνά την ύπαρξη ή μη, αλληλεπίδρασης μεταξύ της πρωτεΐνης **GATA3** και των **TRAF2** και **RelB** – πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μη κανονικό μονοπάτι σηματοδότησης του μεταγραφικού παράγοντα **NF-κB** – σε 10 περιστατικά ασθενών με καρκίνο του μαστού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΜΑΖΙΚΟΣ ΑΔΕΝΑΣ

1.1 Ανατομία Μαστού

Ο μαστός είναι ανατομικό όργανο, χαρακτηριστικό των θηλαστικών. Πρόκειται για μια ημισφαιρική λιπώδη πτυχή του δέρματος, η οποία αποτελείται από λιπώδη, αδενικό και συνδετικό ιστό. Στο εγκάρσιο επίπεδο, εκτείνεται από τη 2^η έως την 6^η θωρακική πλευρά, ενώ στο οβελιαίο επίπεδο εκτείνεται από το στερνικό χείλος έως τη μέση μασχालιαία γραμμή, σχηματίζοντας μία πυραμοειδή προεκβολή προς την κορυφή της μασχालιαίας κοιλότητας· τη μασχालιαία απόφυση ή ουρά του Spence. (Khan & Sajjad, 2021) Κάθε άνθρωπος, φυσιολογικά, έχει δύο μαστούς που βρίσκονται εκατέρωθεν στο πρόσθιο θωρακικό τοίχωμα, πάνω από τον μείζονα θωρακικό μυ και τον πρόσθιο οδοντωτό μυ. (Μαρκόπουλος, 2007) Οι μαστοί συνήθως είναι συμμετρικοί, με τον αριστερό μαστό να είναι ορισμένες φορές λίγο μεγαλύτερος (Ρούσσο, 2015) και χωρίζονται μεταξύ τους από το μεσομαστικό διάστημα ή αλλιώς μεσομάστιο κόλπο. Συνδέονται με τη θωρακική περιτονία με μία λεπτή στιβάδα χαλαρού, συνδετικού ιστού, επιτρέποντάς τους την κίνηση πάνω στο πρόσθιο τμήμα του θώρακα. (Platzer, et al., 2011) Ο συνδετικός ιστός, μαζί με λιπώδη ιστό, αγγεία και λεμφαγγεία που βρίσκονται ανάμεσα στον μαστό και την εν τω βάθει περιτονία του μείζονος θωρακικού μυός, αποτελούν τον οπισθομαστικό χώρο. (Jesinger, 2014) ; (Pandaya & Moore, 2011)

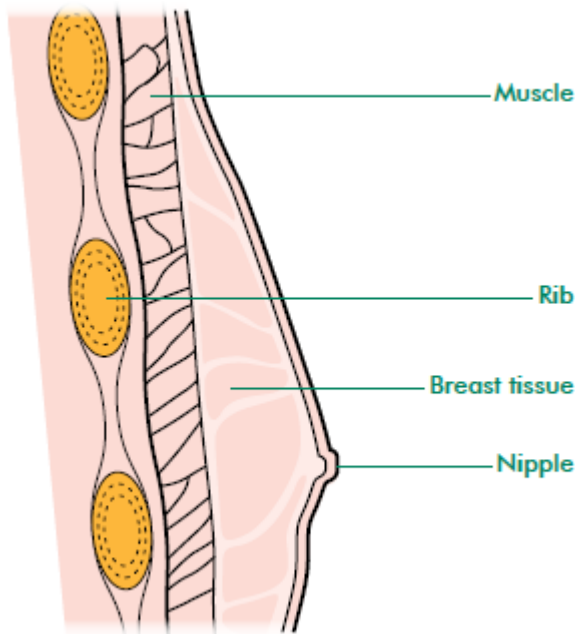
Για να μπορέσει να γίνει η ανατομική του περιγραφή, ο μαστός έχει χωριστεί στην πρόσθια και οπίσθια επιφάνεια και στην περιφέρεια.

Η πρόσθια επιφάνεια του μαστού είναι υπόκυρτη, περιβάλλεται από την υποδόρια περιτονία και το δέρμα και περίπου στο μέσο του, διακρίνονται η θηλή και η θηλαία άλως. Η οπίσθια επιφάνεια του μαστού είναι ελαφρώς υπόκοιλη και βρίσκεται πάνω στην περιτονία του μείζονος θωρακικού μυός. (Χατζημπούγιας, et al., 2007) Η περιφέρεια συνέχεται με το δέρμα γύρω από τον μαστό. Ο μαστός, από άποψη κατασκευής, αποτελείται από το δέρμα, το περιμαστικό λίπος και τον μαζικό αδένα.

Το δέρμα που περιβάλλει τον μαστό είναι λείο και λεπτό με σμηγματογόνους και ιδρωτοποιούς αδένες, σε αντίθεση με τη θηλή που στερείται ιδρωτοποιών αδένων. Είναι στενά συνδεδεμένο με το περιμαστικό λίπος που είναι συνέχεια του υποδόριου λίπους.

Ανάμεσα στο δέρμα και στο περιμαστικό λίπος, πίσω από τη θηλαία άλω, βρίσκεται ο μαζικός αδένας, ο οποίος αποτελεί τη βασική λειτουργική μονάδα του μαστού. (Khan &

Sajjad, 2021) Είναι τροποποιημένος, οσμηγόνος, ιδρωτοποιός αποκρινής αδένας που στερείται κάψας και ελύτρου. Στους άνδρες οι μαζικοί αδένες είναι ανενεργοί, χωρίς πλήρη ανάπτυξη, αποτελούμενοι από πόρους και λιγοστά λοβίδια. (Hansen & Lambert, 2011) Αντίθετα, στις γυναίκες, οι μαζικοί αδένες είναι πλήρως ανεπτυγμένοι, λειτουργικοί και επικουρικοί αδένες της αναπαραγωγής. (Khan & Sajjad, 2021)

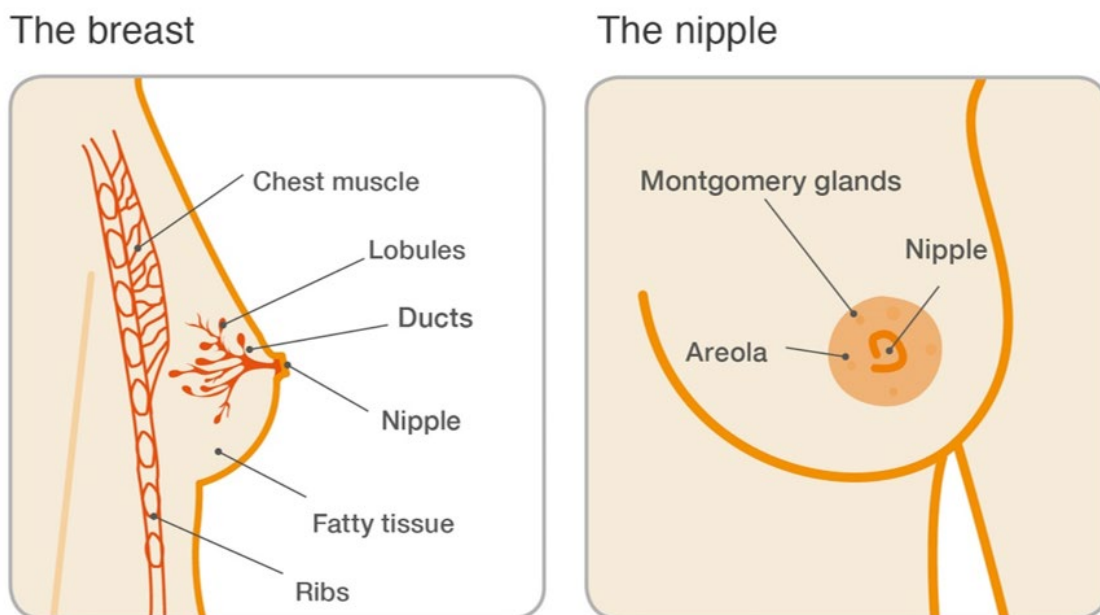


Εικόνα 1: Αντρικός Μαστός. Σχηματική Απεικόνιση της Ανατομίας του. (NHS Harrogate and District. NHS Foundation Trust)

Κάθε μαζικός αδένας σταθεροποιείται με το χόριο του υπερκείμενου δέρματος με ταινίες συνδετικού ιστού, που ονομάζονται ανελκτήρες σύνδεσμοι του Cooper (Jesinger, 2014). Με την πρόσφυσή τους στο χόριο του δέρματος, χωρίζουν τον μαζικό αδένα σε 15-20 λοβούς, που φέρονται ακτινοειδώς από τη θηλή προς την περιφέρεια (Michael & Wojciech, 2015) και ο ρόλος τους είναι η παραγωγή γάλακτος. Σε κάθε λοβό, υπάρχουν λόβια που αποτελούνται από αδενοκυψέλες, από τις οποίες εκπορεύονται οι γαλακτοφόροι πόροι. (Ρούσσο, 2015) Κάθε λοβός έχει τον δικό του γαλακτοφόρο πόρο, ο οποίος οδηγεί κατευθείαν στη θηλή, εκβάλλοντας στην επιφάνειά της.

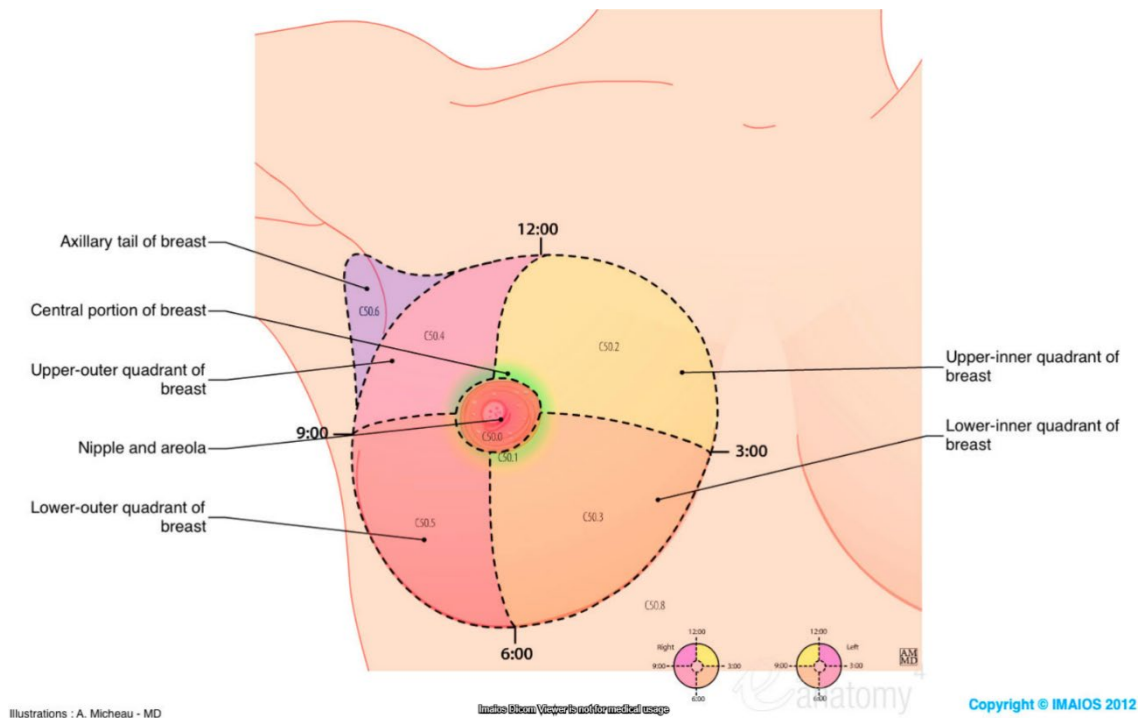
Η θηλή – αν και διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό – κατά μέσο όρο βρίσκεται στο ύψος του 4^{ου} μεσοπλευρίου διαστήματος. Πρόκειται για έπαρμα του δέρματος με κυλινδρικό σχήμα και καστανέρυθρο χρώμα, λόγω της άφθονης μελανίνης. Στην κορυφή της είναι

σχισμοειδής, με 15 έως 20 στόμια, στα οποία διανοίγονται οι γαλακτοφόροι πόροι. (Moore, et al., 2016) Γύρω από τη θηλή, βρίσκεται η θηλαία άλως· μία υποστρόγγυλη και ελαφρά επηρμένη περιοχή καστανέρυθρου χρώματος. Τόσο η θηλή όσο και η θηλαία άλως διαθέτουν ελαστικές και λείες μυϊκές ίνες που φέρονται κυκλωτερώς και ακτινοειδώς προκαλώντας σκλήρυνση κατά την προστριβή ή τον θηλασμό. Κατά την γαλουχία, τα συσσωρευμένα σταγονίδια γάλακτος εκκρίνονται στο στόμα του βρέφους, μετά τη συμπίεση της θηλαίας άλω και των γαλακτοφόρων κόλπων που βρίσκονται κάτω από αυτή. (Moore, et al., 2016) Πάνω στη θηλαία άλω βρίσκονται οι αδένες Montgomery, οι οποίοι είναι σμηγματογόνοι αδένες. Ο ρόλος τους είναι να μεγεθύνονται κατά την εγκυμοσύνη, εκκρίνοντας μια ελαιώδη ουσία που λιπαίνει και προστατεύει τη θηλή και τη θηλαία άλω από τον επερχόμενο θηλασμό.



Εικόνα 2: Γυναικείος Μαστός. Σχηματική Απεικόνιση της Ανατομίας του (Αριστερά) Σχηματική Απεικόνιση της Πρόσθιας Επιφάνειάς του (Δεξιά). (NHS Harrogate and District. NHS Foundation Trust)

Για την καλύτερη περιγραφή του μαστού κατά την κλινική εξέταση, η περιοχή υποδιαιρείται σχηματικά σε τεταρτημόρια. Τα εξωτερικά: Q1 ή UO (ΑΞ, άνω έξω), Q3 ή LO (ΚΞ, κάτω έξω) και τα εσωτερικά: Q2 ή UI (ΑΣ, άνω έσω), Q4 ή LI (ΚΣ, κάτω έσω). Ακόμα, η κεντρική περιοχή, δηλαδή αυτή του οπισθοαγγειακού παρεγχύματος, είναι το Q5 και η μασχαλιαία απόφυση είναι γνωστή ως Q6. (Marchiò, et al., 2017)



Εικόνα 3: Τεταρτημύρια του μαστού. (Micheau, 2012)

Μύες του μαστού

1. Μείζων θωρακικός μυς
 - **Έκφυση:** Κλειδική μοίρα, πρόσθια επιφάνεια στέρνου, 2ος – 6ος πλευρικός χόνδρος, πρόσθιο τοίχωμα θήκης του ορθού κοιλιακού μυός
 - **Κατάφυση:** Ακρολοφία μείζονος βραχιονίου ογκώματος
 - **Κίνηση:** Κάθελξη του ανυψωμένου βραχίονα, προσαγωγή, πρηνισμός

2. Ελάσσων θωρακικός μυς
 - **Έκφυση:** 3^η, 4^η, 5^η πλευρά
 - **Κατάφυση:** Κορακοειδής απόφυση ωμοπλάτης
 - **Κίνηση:** Κατάσπαση ώμου, άνελξη πλευρών

3. Πρόσθιος οδοντωτός μυς
 - **Έκφυση:** Άνω χείλος και έξω επιφάνεια των πλευρών 1-9
 - **Κατάφυση:** Νωτιαίο χείλος ωμοπλάτης
 - **Κίνηση:** Στροφή και έλξη ωμοπλάτης μπροστά και άνω

4. Πλατύς ραχιαίος μυς
 - **Έκφυση:** Ακανθώδεις αποφύσεις Θ6-Θ12 και Ο1-Ο5, 4 κατώτερες πλευρές (Π9-Π12), μέση ιερή ακρολοφία ιερού, έσω τριτημόριο λαγονίου ακρολοφίας
 - **Κατάφυση:** Αύλακα δικέφαλου βραχιονίου μυός
 - **Κίνηση:** Κάθελξη του ανυψωμένου βραχίονα, έλξη προς τα πίσω, άνελξη του κορμού

5. Κορακοβραχιόνιος μυς
 - **Έκφυση:** Κορακοειδής απόφυση ωμοπλάτης
 - **Κατάφυση:** Μέσο πρόσθιας επιφάνειας βραχιονίου
 - **Κίνηση:** Κάμψη του βραχίονα

6. Υποπλάτιος μυς
 - **Έκφυση:** Υποπλάτιος βόθρος ωμοπλάτης, υποπλάτιες γραμμές
 - **Κατάφυση:** Έλασσον βραχιόνιο όγκωμα
 - **Κίνηση:** Έλξη προς τα εμπρός και έσω στροφή του βραχίονα

7. Έξω λοξός κοιλιακός μυς
 - **Έκφυση:** Με οδοντώματα από τις 5 κατώτερες πλευρές
 - **Κατάφυση:** Με την απονεύρωσή του στη λευκή γραμμή, λαγόνιο ακρολοφία και ηβικό οστό
 - **Κίνηση:** Κάμψη του κορμού πλάγια και στροφή προς την αντίθετη πλευρά

(Hansen & Lambert, 2011); (Khan & Sajjad, 2021)

Αγγείωση του μαστού

Αρτηρίες

Το 60% της παροχής αίματος του μαστού προέρχεται από την έσω θωρακική αρτηρία, που είναι γνωστή ως **έσω μαστική αρτηρία**. Είναι η κύρια αρτηρία αιμάτωσης του μαστού και αποτελεί κλάδο της υποκλειδίας αρτηρίας. Από αυτή προκύπτουν οι πρόσθιοι μεσοπλεύριοι κλάδοι και οι πρόσθιοι διατιτρώντες κλάδοι του 2^{ου}, 3^{ου}, 4^{ου} μεσοπλεύριου διαστήματος, τροφοδοτώντας το έσω και κεντρικό τμήμα του μαστού. Το 30% της παροχής αίματος του μαστού προέρχεται από κλάδους της **πλάγιας θωρακικής αρτηρίας**, της **υποπλάτιας αρτηρίας** και θωρακικούς κλάδους της **ακρωμοθωρακικής αρτηρίας** που είναι όλοι

κλάδοι της μασχαλιαίας αρτηρίας και τροφοδοτούν το Q1 του μαστού. Η υπόλοιπη αιμάτωση του μαστού προέρχεται από κλάδους των **μεσοπλεύριων αρτηριών**.

Η παροχή αίματος στο δέρμα του μαστού εξαρτάται από το υποδερμικό πλέγμα, το οποίο βρίσκεται σε επικοινωνία με τα βαθύτερα αγγεία που τροφοδοτούν το μαζικό παρέγχυμα. Η θηλή και η θηλαία άλως αιματώνονται σημαντικά μέσω των κλάδων της έσω μαστικής αρτηρίας και των κλάδων των μεσοπλεύριων αρτηριών. (Platzer, et al., 2011); (Μαζούκα, et al., 2007)

Φλέβες

Η φλεβική παροχέτευση του μαστού χωρίζεται στις επιφανειακές και στις εν τω βάθει φλέβες. Οι επιφανειακές φλέβες σχηματίζουν έναν αναστομωτικό κύκλο γύρω από τη θηλή, που ονομάζεται *circulus venosus* και καταλήγει στην έσω μαστική φλέβα. (Ellis & Mahadevan, 2013) Οι εν τω βάθει φλέβες ακολουθούν την πορεία των αρτηριών προς τη μασχάλη. Αυτές είναι η έσω μαστική φλέβα, η πλάγια θωρακική φλέβα και οι οπίσθιες μεσοπλεύριες φλέβες. (Μαζούκα, et al., 2007)

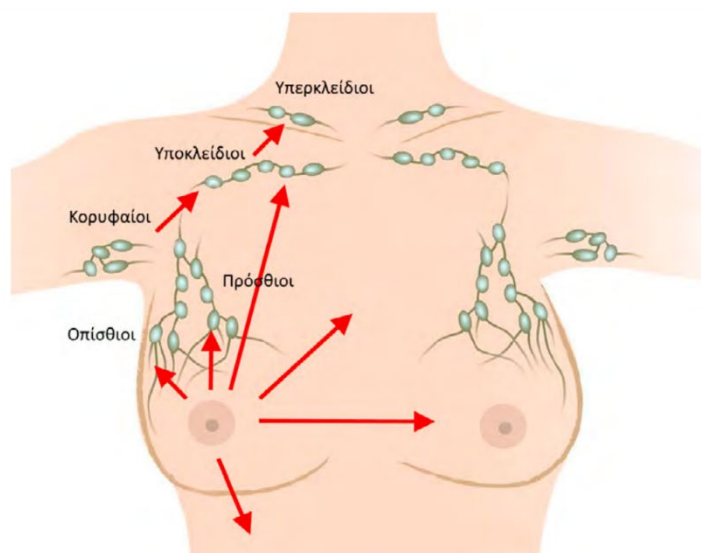
Λεμφαγγεία

Η λέμφος είναι ένα διαυγές, διάφανο μεσοκυττάριο υγρό του λεμφικού συστήματος. Στο 95% αποτελείται από νερό, ενώ περιέχει ακόμα, πρωτεΐνες, γλυκόζη και άλατα με πληθώρα λευκοκυττάρων και ιδιαίτερα λεμφοκυττάρων. Ο μαστός έχει πλούσιο λεμφαγγειακό δίκτυο. Τα λεμφαγγεία του δέρματος και του μαζικού αδένου αποχετεύουν τη λέμφο προς 2 κατευθύνσεις. Το 75% των λεμφαγγείων απάγουν τη λέμφο στα μασχαλιαία λεμφογάγγλια, ενώ το υπόλοιπο 25% που βρίσκονται στην έσω επιφάνεια του μαστού, διοχετεύουν τη λέμφο στα στερνικά λεμφογάγγλια, κατά μήκος των έσω μαστικών αγγείων. Ενδιαφέρον είναι ότι τα λεμφογάγγλια του ενός μαστού αναστομώνονται με αυτά του άλλου και σε αυτήν την αναστόμωση οφείλονται οι μεταστάσεις καρκίνων του μαστού και στο δεύτερο μαστό. Έτσι στη λεμφική παροχέτευση του μαστού διακρίνονται οι παρακάτω λεμφαδένες:

- Οπίσθιοι
- Πρόσθιοι
- Κορυφαίοι
- Υποκλείδιοι
- Υπερκλείδιοι

(Μαζούκα, et al., 2007) ;

(Ellis & Mahadevan, 2013)



Εικόνα 4: Οι λεμφαδένες του μαστού. (Τεντολούρης, 2015)

1.2 Φυσιολογία μαστού

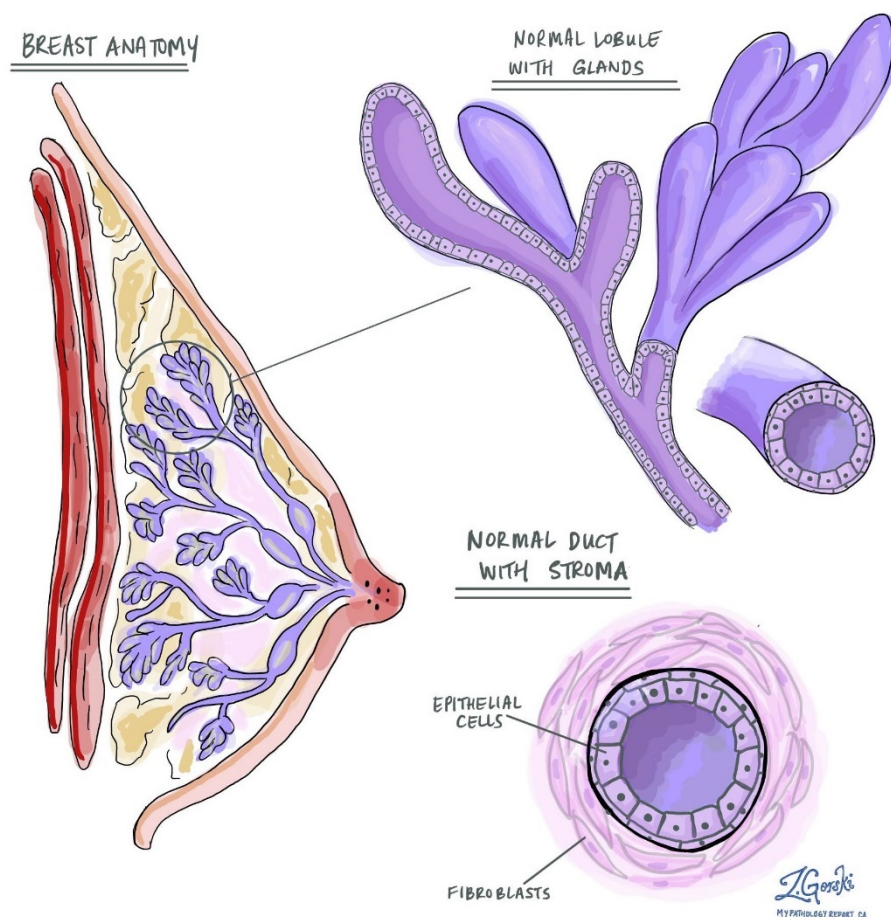
Η ανάπτυξη του μαστού ξεκινάει στην 5^η – 6^η εμβρυϊκή εβδομάδα ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης του εξωδέρματος και μέχρι την έναρξη της ήβης, δεν παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των 2 φύλων. (Ellis & Mahadevan, 2013) Καθώς ο μαστός είναι ορμονοεξαρτώμενο όργανο, η μορφολογία του διαφέρει στα διάφορα στάδια ανάπτυξης των ατόμων. Η διαφοροποίηση ξεκινάει κατά την περίοδο της ήβης, όπου αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων και προγεστερόνης – εκκρινόμενα από τις ωοθήκες – προκαλούν την ανάπτυξη των μαστών στα θήλεα. Η πλήρης ανάπτυξη των μαστών επιτυγχάνεται περίπου στο 20στό έτος της ηλικίας της γυναίκας και μεταβάλλεται στις διάφορες φάσεις του καταμήνιου κύκλου, την κύηση και τη γαλουχία. (Gartner, 2018)

Η λειτουργία του μαστού επηρεάζεται από τον υποθάλαμο, την υπόφυση, τις ωοθήκες, τον πλακούντα, τα επινεφρίδια, τον θυροειδή αδένα και το νευρικό σύστημα. Γι' αυτό, για την ολοκλήρωση των 2 φάσεων ανάπτυξης των μαστών (αυτή της εφηβείας και της κύησης) είναι αναγκαία η δράση των γλυκοκορτικοειδών, της θυροξίνης και της ινσουλίνης, οι οποίες ενισχύονται από τις επιδράσεις των οιστρογόνων και της προγεστερόνης. (Χανιώτης & Χανιώτης, 2009)

Αναλυτικότερα, οι μαστικοί αδένες μιας γυναίκας που δεν βρίσκεται σε περίοδο εγκυμοσύνης ή γαλουχίας είναι αδρανείς, δηλ. βρίσκονται σε μη εκκριτική φάση και γι' αυτό δεν έχουν ανεπτυγμένες αδενοκυψέλες. Κατά την περίοδο της κύησης, αυξημένες ώσεις οιστρογόνων

και προγεστερόνης καθώς και ανθρώπινης σωματομαμμοτροπίνης από τον πλακούντα, ενεργοποιούν τους μαζικούς αδένες και τους καθιστούν γαλουχούντες. Μετά τη γέννηση, μειώνονται τα επίπεδα οιστρογόνων και προγεστερόνης και εκκρίνεται προλακτίνη από τα οξέφιλα κύτταρα της αδενούπόφυσης, ενώ ταυτόχρονα με την παραγωγή προλακτίνης, εκκρίνεται ωκτοκίνη από τον οπίσθιο λοβό της υπόφυσης. (Gartner, 2018) Αργότερα, το αδενικό στοιχείο υποχωρεί, μειώνοντας το μέγεθος των μαστών. Από την ηλικία των 40 ετών περίπου, περιορίζονται οι κυκλικές μεταβολές του μαζικού αδένα και άλλων οιστρογονοεξαρτώμενων ιστών. Λόγω της ανεπάρκειας των οιστρογόνων, οι ιστοί αυτοί αρχίζουν να ατροφούν, γεγονός που συνεχίζεται ακόμα και στη μεταεμμηνοπαυσιακή κατάσταση. (Χανιώτης & Χανιώτης, 2009)

1.3 Ιστολογία μαζικού αδένα

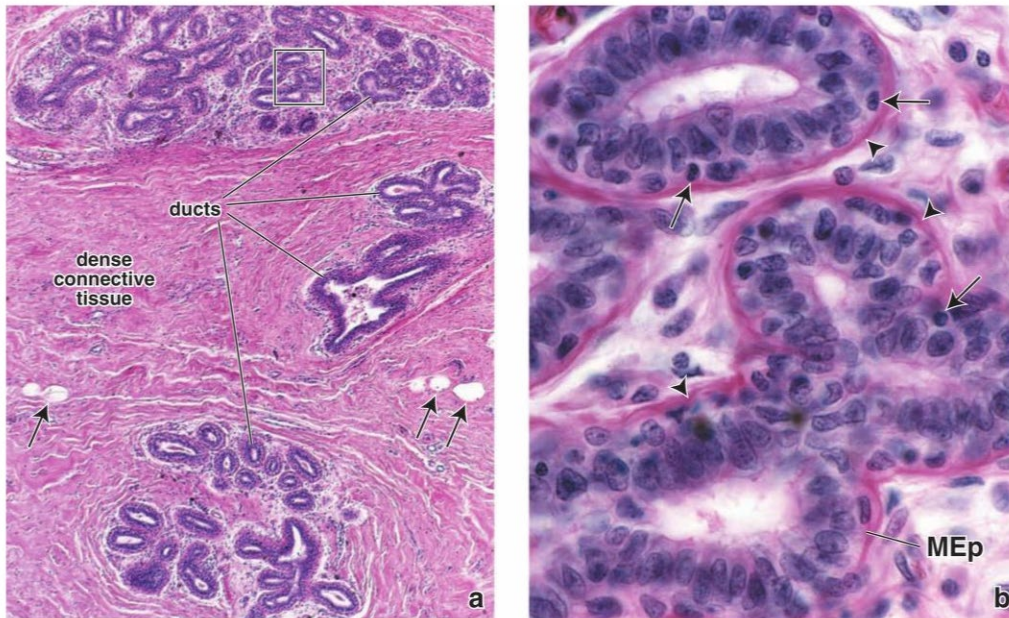


Εικόνα 5: Σχηματική ιστολογική απεικόνιση του μαζικού αδένα. Λόβια και Πόροι. (Wasserman, 2022)

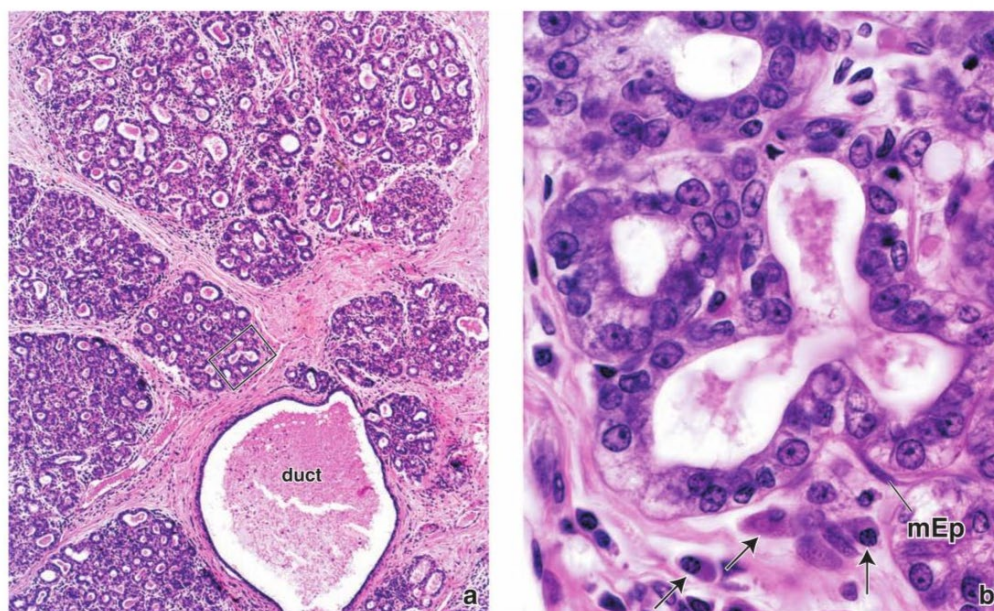
Η ιστολογική δομή των μαζικών αδένων ποικίλλει ανάλογα το φύλο, την ηλικία και τη φυσιολογική κατάσταση. (Mescher, 2015) Όπως έχει αναφερθεί, οι μαζικοί αδένες αναπτύσσονται κατά τον ίδιο τρόπο και παρουσιάζουν την ίδια δομή σε αμφότερα τα φύλα μέχρι την ήβη. Αποτελούνται μόνο από γαλακτοφόρους κόλπους κοντά στη θηλή, όπου αναδύονται από αυτούς, μικροί διακλαδιζόμενοι πόροι. Από αυτό το στάδιο κι έπειτα, ξεκινούν μεταβολές ορμονικών εκκρίσεων στο θήλυ, προκαλώντας περαιτέρω ανάπτυξη και μεταβολές στη δομή των μαζικών αδένων. Ξεκινάει η ανάπτυξη των λοβίων και των τελικών εκφορητικών πόρων, ενώ παράλληλα αυξάνεται ο συνδετικός και ο λιπώδης ιστός μέσα στο στρώμα, με αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθους των μαζικών αδένων. Η πλήρης ανάπτυξη ολοκληρώνεται περίπου κατά το 20στό έτος. (Gartner, 2018)

Οι μαζικοί αδένες περιγράφονται ως σύνθετοι σωληνοκυψελοειδείς αδένες, αποτελούμενοι από 15-20 λοβούς ακτινωτά διατεταγμένους περίξ της θηλής. Ανάμεσά τους, διακρίνεται ο λιπώδης ιστός και το κολλαγόνο. (Gartner, 2018) Κάθε λοβός αποτελείται από 20 – 40 λόβια, καθένα από τα οποία, περιέχει αρκετούς διακλαδιζόμενους πόρους. Τα μορφώματα αυτά, στο σύνολό τους, ονομάζονται λοβιακές μονάδες τελικών πόρων. (Mescher, 2015) Το λόβιο είναι η λειτουργική μονάδα του μαστού και υποστηρίζεται από το ενδολοβιακό εξειδικευμένο στρώμα. Εξωτερικά καλύπτεται από μία στοιβάδα μυοεπιθηλιακών κυττάρων, ενώ η έσω στοιβάδα των κυβοειδών και κυλινδρικών επιθηλιακών κυττάρων επενδύουν τον αυλό. (Kumar, 2007) Κάθε λοβός, επίσης, έχει τον δικό του γαλακτοφόρο πόρο, ο οποίος επενδύεται από μονόστιβο κυβοειδές επιθήλιο που καλύπτεται από πολύ κοντά ευρισκόμενα μυοεπιθηλιακά κύτταρα. (Mescher, 2015) Καθώς διευρύνεται σχηματίζει έναν γαλακτοφόρο κόλπο από πολύστιβο κυβοειδές επιθήλιο και στη συνέχεια στενεύει λίγο πριν φτάσει στη θηλή. Κοντά στην εκβολή του στη θηλή, ο γαλακτοφόρος πόρος επενδύεται από πολύστιβο πλακώδες κερατινοποιημένο επιθήλιο. (Gartner, 2018) Οι πόροι, στο σύνολό τους, εισέρχονται σε χαλαρό αγγειώδη συνδετικό ιστό, ενώ οι λοβοί χωρίζονται από έναν πυκνότερο, αλλά λιγότερο κυτταροβριθή συνδετικό ιστό. (Mescher, 2015)

Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ο μαζικός αδένας αναπτύσσεται και η μορφολογία του ποικίλλει μεταξύ των λοβίων ή ακόμη και ενός μόνο λοβού. Παρατηρείται πολλαπλασιασμός των εκκριτικών αδενοκυψελών, οι οποίες έχουν σφαιρικό σχήμα και αποτελούνται από κυβοειδές επιθήλιο με αστεροειδή μυοεπιθηλιακά κύτταρα μεταξύ των εκκριτικών κυττάρων και της βασικής μεμβράνης. Ο χαλαρός συνδετικός ιστός εντός των λοβίων διηθείται από λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα. (Mescher, 2015)



Εικόνα 6: Φωτογραφία μικροσκοπίου ενός ανενεργού μαστού. *a.* Χρώση A&H. Μεγέθυνση X60. *b.* Χρώση A&H. Μεγέθυνση. (Wojciech, 2016)



Εικόνα 7: Φωτογραφία μικροσκοπίου ενός ενεργού μαζικού αδένος προς το τέλος της κύησης. *a.* Χρώση A&H. Μεγέθυνση X60. *b.* Χρώση A&H. Μεγέθυνση X700. (Wojciech, 2016)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 «ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ»

2.1 Εισαγωγή

Ο καρκίνος είναι μια γενετική ασθένεια των σωματικών κυττάρων, προκαλούμενη από μεταλλάξεις του DNA (Knudson, 2002) και αποτελεί το 2^ο σε συχνότητα ιατρικό αίτιο θανάτου στις ΗΠΑ, μετά τις καρδιοπάθειες. Τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου είναι μια σειρά ιδιοτήτων των καρκινικών κυττάρων, εξ αιτίας των μεταλλάξεων και των επιγενετικών μεταβολών (Kumar, et al., 2018). Ως επιγενετικές μεταβολές ορίζονται οι δυνητικά αναστρέψιμες, κληρονομήσιμες διεργασίες που συμβαίνουν στα κύτταρα, δημιουργώντας διαφορετικό φαινότυπο, χωρίς αλλαγή στον γονότυπο (Laird, 2005). Οι γενετικές μεταβολές είναι συχνά κληρονομήσιμες και τα κύτταρα υπόκεινται στις αρχές της θεωρίας της φυσικής επιλογής του Δαρβίνου, κατά την οποία επιβιώνουν τα πιο ικανά. Οι περισσότερες μεταλλάξεις προκαλούνται είτε από έκθεση σε μεταλλαξιογόνα είτε αυτόματα ως μέρος της γήρανσης. (Kumar, et al., 2018).

Στην ογκολογία, ο καρκίνος αναφέρεται ως κακοήθης όγκος ή κακοήθης νεόπλασμα. Τα νεοπλασμάτα αποτελούνται από κύτταρα που αναπαράγονται ανεπηρέαστα από τη ρύθμιση των φυσιολογικών κυττάρων. Θρέφονται και αιματώνονται από τον ξενιστή και έχουν την τάση να αυξάνονται σε μέγεθος, ανεξάρτητα από το τοπικό τους περιβάλλον (Kumar, et al., 2018).

Χωρίζονται σε 2 κατηγορίες: τα *καλοήθη* και *κακοήθη νεοπλασμάτα*.

Ένας όγκος, ονομάζεται **καλοήθης** όταν, σύμφωνα με τα μικροσκοπικά και μακροσκοπικά του χαρακτηριστικά, έχει καλά διαφοροποιημένα κύτταρα, δεν μεθίσταται και μπορεί να αφαιρεθεί χειρουργικά. Οι ασθενείς συνήθως επιβιώνουν, αλλά μπορεί ο ίδιος, εκτός από τοπική διόγκωση, να προκαλέσει σημαντικού βαθμού νοσηρότητα, ακόμα και θάνατο.

Κακοήθης, ονομάζεται ο όγκος που είναι ικανός να διηθήσει και να καταστρέψει παρακείμενες δομές, να δώσει μεταστάσεις και να οδηγήσει στον θάνατο (Kumar, et al., 2018). Οι κακοήθεις όγκοι με τη σειρά τους, ταξινομούνται σε 3 κατηγορίες:

1. *Σαρκώματα*. Ο όγκος προέρχεται από μεσεγχυματικό ιστό, π.χ. οστά, μύες, νευρικός, συνδετικός ιστός

2. *Καρκινώματα*. Ο όγκος προέρχεται από επιθηλιακό ιστό, π.χ. μαζικός αδένας, βρόγχοι

3. *Αιμοποιητικές και Λεμφοειδείς* κακοήθεις νεοπλασίες. Αποτελούνται από τις λευχαιμίες και τα λεμφώματα. Τα νεοπλασματικά κύτταρα διασπείρονται μέσω του μυελού των οστών, το λεμφικό σύστημα και το περιφερικό αίμα.

Στον μαστό, τα κακοήθη νεοπλάσματα προέρχονται από τα επιθηλιακά κύτταρα της τελικής πορολοβιακής μονάδας (Terminal End Bud, TEB). Όταν ο όγκος εντοπιστεί στον μαζικό αδένα έως και τους μασχαλιαίους λεμφαδένες, ονομάζεται πρωτοπαθής καρκίνος μαστού. Όταν τα καρκινικά κύτταρα εξαπλωθούν σε άλλα όργανα του σώματος, όπως π.χ. πνεύμονες, πλευρές, οστά, ήπαρ, εγκέφαλος, τότε ονομάζεται μεταστατικός καρκίνος μαστού. Το 50% των όγκων εντοπίζεται στο Q1 (ΑΞ τεταρτημόριο) και το 20% στο Q5 (κεντρική περιοχή). Γυναίκες με αμφοτερόπλευρους πρωτοπαθείς όγκους ή διαδοχικές βλάβες στον ίδιο μαστό, απαρτίζουν το 4% του γενικού συνόλου. (Kumar, 2007)

2.2 Καρκινογένεση

Σύμφωνα με τους ερευνητές McCance και Roberts, οποιοδήποτε κύτταρο, μπορεί δυνητικά να πολλαπλασιαστεί ανεξέλεγκτα και να εξελιχθεί σε όγκο (McCance & Roberts, 2006). Παρόλα αυτά, η καρκινογένεση είναι μία διαδικασία πολλών βημάτων, με συσσώρευση κυτταρικών και χημικών σφαλμάτων (Nair & Peate, 2012). Είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων σε γονίδια που ρυθμίζουν την κυτταρική αύξηση και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Αν η αρχική μετάλλαξη που ευθύνεται για την καρκινογένεση, έχει γίνει στα κύτταρα της βλαστικής σειράς (*γαμετικά κύτταρα*), τότε κληρονομείται και είναι παρούσα σε όλα τα κύτταρα του σώματος. Τα άτομα που κληρονομούν τα μεταλλαγμένα γονίδια έχουν αυξημένες πιθανότητες να εμφανίσουν συγκεκριμένους τύπους καρκίνου (π.χ. καρκίνος του μαστού), γι' αυτό πρόκειται για **κληρονομικό καρκίνο**. Η πλειοψηφία των καρκίνων, όμως, είναι **σποραδικοί**, δηλ. η μετάλλαξη έχει γίνει στα *σωματικά κύτταρα*, τα οποία δεν είναι ικανά να τη μεταβιβάσουν στις επόμενες γενιές. Τα κύτταρα αυτά διαιρούνται και οδηγούν στην ανάπτυξη του όγκου. (Nair & Peate, 2012); (Nussbaum, et al., 2011)

2.3 Γενετική Βάση Καρκίνου

Ο καρκίνος αποτελεί γενετικό νόσημα ανεξάρτητα με το αν είναι σποραδικός ή κληρονομικός. Οι μεταλλάξεις που οδηγούν στην καρκινογένεση γίνονται σε 2 κατηγορίες γονιδίων: στα *πρωτο-ογκογονίδια* και στα *ογκοκατασταλτικά γονίδια*.

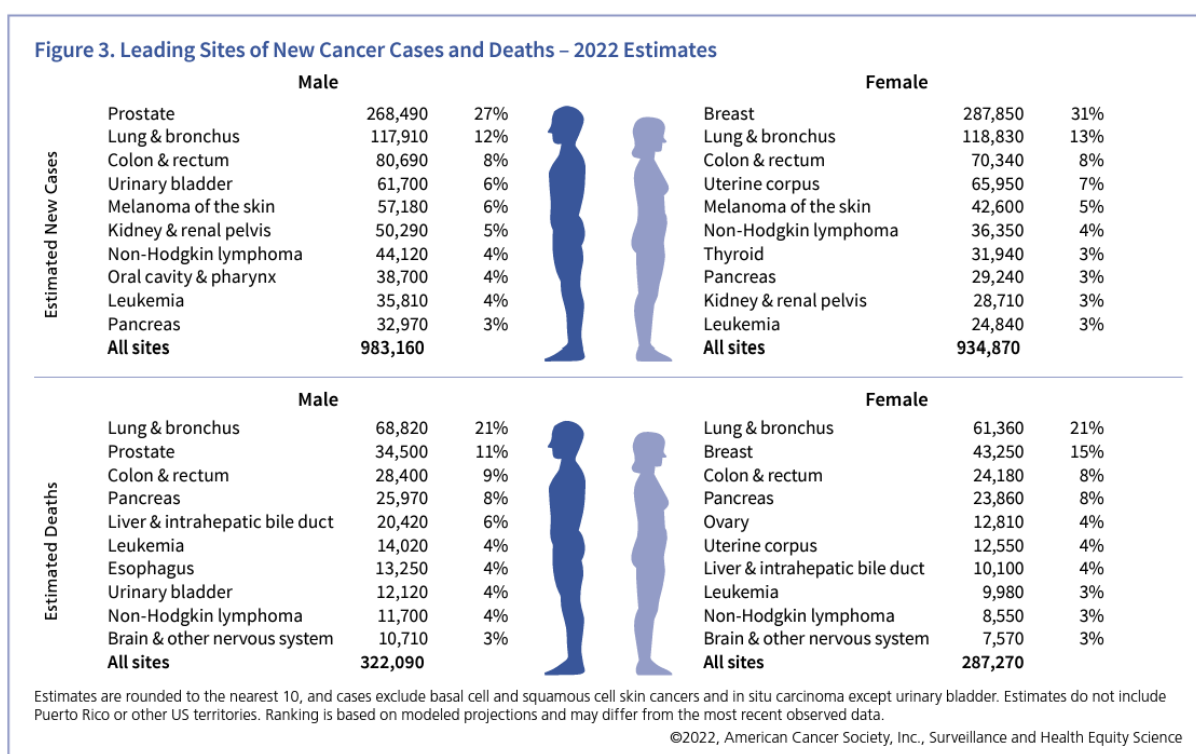
Τα πρωτο-ογκογονίδια είναι φυσιολογικά γονίδια και κωδικοποιούν πρωτεΐνες που επάγουν την αύξηση και την επιβίωση του κυττάρου. Πολλά από αυτά τα γονίδια, έχουν γονιδιακές θέσεις που είναι εύκολο να προσβληθούν από καρκινογόνες ουσίες και να δημιουργηθούν μεταλλάξεις (Nair & Peate, 2012). Μεταλλαγμένη μορφή τους, αποτελούν τα *ογκογονίδια*, τα οποία ευθύνονται για την ανάπτυξη κακοήθων όγκων και έχουν ταυτοποιηθεί σε ποσοστό 15-20%. Κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια, μεταγραφικούς παράγοντες που ελέγχουν την έκφραση άλλων γονιδίων και αναστολείς της ρύθμισης του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Όλα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την καταστολή της απόπτωσης (Nussbaum, et al., 2011).

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια φυσιολογικά, έχουν τη δυνατότητα να επιδιορθώνουν βλάβες του DNA, να επιβραδύνουν ή ακόμη και να σταματούν την κυτταρική διαίρεση, προλαμβάνοντας την ανάπτυξη των όγκων (Nair & Peate, 2012). Χωρίζονται σε 2 κατηγορίες, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια-φρουροί, τα οποία ρυθμίζουν την κυτταρική αύξηση και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια κυτταρικής φροντίδας, τα οποία προστατεύουν την ακεραιότητα του γονιδιώματος. Μεταλλάξεις στην 1^η κατηγορία, οδηγούν σε απώλεια της λειτουργίας τους και ανεξέλεγκτη αριθμητική αύξηση των κυττάρων, ενώ μεταλλάξεις στην 2^η κατηγορία οδηγούν σε απώλεια της λειτουργίας τους και στη συσσώρευση μεταλλάξεων σε ογκογονίδια και γονίδια-φρουρούς.

2.4 Επιδημιολογία

Τις δύο τελευταίες δεκαετίες η συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του μαστού, παγκοσμίως, αυξάνεται ~0.5% κάθε χρόνο. (American Cancer Society, Inc., 2022) Ακολουθώντας ένα αντιστρόφως ανάλογο μοτίβο, η θνησιμότητα της νόσου στις Δυτικές χώρες δείχνει να μειώνεται. Αυτό οφείλεται στην αυξημένη πρόληψη, έγκαιρη διάγνωση και αποτελεσματικότερη θεραπεία. Καρκίνο του μαστού μπορεί να εμφανίσουν και άντρες και γυναίκες με ικανοποιητική διαφορά στα ποσοστά εμφάνισης. Για τους άντρες, η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε κάποιο στάδιο της ζωής τους ανέρχεται σε

~0,1% παγκοσμίως, ενώ στις γυναίκες, η συχνότητα εμφάνισης είναι ~13%. (Giordano, 2018) Πρακτικά, αναλύοντας τα ποσοστά, οι γυναίκες έχουν >100 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού από ό,τι οι άντρες, αφού 1 στις 8 γυναίκες, θα διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού σε κάποιο στάδιο της ζωής της. (Kumar, 2007) ; (American Cancer Society, Inc., 2019) Τα στατιστικά δεδομένα για το 2022 στις ΗΠΑ, δείχνουν 287.850 νέες διαγνώσεις καρκίνου του μαστού στις γυναίκες και 2.710 διαγνώσεις στους άντρες. (Εικόνα 8) Στην Ελλάδα το 2020, διαγνώστηκαν 7.772 άτομα με καρκίνο του μαστού, σε ποσοστό 12% από τις, συνολικά, 64.530 νέες περιπτώσεις καρκίνου και στα δύο φύλα. (Εικόνα 9)

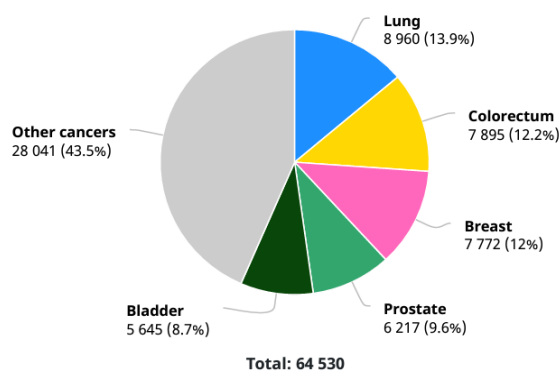


Εικόνα 8: Νέες περιπτώσεις και θάνατοι από καρκίνο στις ΗΠΑ για το 2022 – Στατιστικά και για τα 2 φύλα (American Cancer Society, Inc., Surveillance Research, 2022)

Greece

Source: Globocan 2020

Number of new cases in 2020, both sexes, all ages



Εικόνα 9: Στατιστικά όλων των νέων περιπτώσεων καρκίνου στην Ελλάδα, για τα 2 φύλα, όλων των ηλικιών (The Global Cancer Observatory, 2021)

2.5 Παράγοντες Κινδύνου

Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα της αιτιολογίας που προκαλεί καρκίνο του μαστού, υπάρχουν, όμως, ορισμένοι παράγοντες κινδύνου που έχουν συνδυαστεί με την εμφάνιση της συγκεκριμένης νεοπλασίας. Οι παράγοντες που μπορεί να αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου μπορεί να είναι βιολογικοί, γενετικοί, ορμονικοί ή περιβαλλοντικοί. Μερικοί από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου που έχουν αναγνωριστεί στον καρκίνο του μαστού, συνοψίζονται παρακάτω:

Φύλο: Είναι ο πιο καθοριστικός παράγοντας όσον αφορά τη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Η επίπτωση στους άνδρες είναι 1% σε σύγκριση με τις γυναίκες. Δηλ. οι άνδρες έχουν 100 φορές λιγότερες πιθανότητες να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού.

Ηλικία: Το 75% των γυναικών με καρκίνο του μαστού είναι >50 ετών, ενώ μόλις το 5% των περιπτώσεων είναι <40 ετών.

Οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού: Άτομα με συγγενείς α' βαθμού που έχουν προσβληθεί από καρκίνο του μαστού σε μικρή ηλικία, διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο. Άτομα, επίσης, που έχουν κληρονομήσει υψηλής διεισδυτικότητας γαμετικές μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια, έχουν δια βίου κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε ποσοστό >90%

Γενετικοί παράγοντες: Γαμετικές μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1, BRCA2, TP53 και PTEN σχετίζονται με τον οικογενή καρκίνο του μαστού. Σωματικές μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 και BRCA2 είναι σπάνιες στους σποραδικούς καρκίνους του μαστού. Αντίθετα, σωματικές μεταλλάξεις στο TP53 είναι συνήθεις κυρίως στους τριπλά αρνητικούς και στους HER2+ όγκους, ενώ μεταλλάξεις που ενεργοποιούν την PI3K-AKT σηματοδότηση παρατηρούνται συχνά σε σποραδικούς ER+ και HER2+ καρκίνους μαστού.

Ιστορικό αναπαραγωγικής κατάστασης: Η πρώιμη εμμηναρχή, η μη τεκνοποίηση, η απουσία θηλασμού ή η πρώτη τεκνοποίηση σε μεγάλη ηλικία είναι παράγοντες που, πιθανόν, εκθέτουν τα επιθηλιακά κύτταρα σε διέγερση, η οποία προκαλείται από τα οιστρογόνα.

Ορμονική επίδραση: Οι ορμόνες επιδρούν στην ανάπτυξη του όγκου, από τις πρόδρομες αλλοιώσεις, μέχρι και την κακοήγη εξαλλαγή και τη μετάσταση. Οι υποδοχείς οιστρογόνων (ERα) ρυθμίζουν πολλά ορμονοεξαρτώμενα γονίδια, ενώ τα ίδια τα οιστρογόνα διεγείρουν την παραγωγή των TGF-α, PDGF, FGF κ.ά. οι οποίοι μέσω παρακρινών και αυτοκρινών μηχανισμών προάγουν την ανάπτυξη του όγκου.

Ιοντίζουσα ακτινοβολία: Έκθεση σε ακτινοβολία, κυρίως, στην περιοχή του θώρακα, κατά τις περιόδους ανάπτυξης των μαζικών αδένων, αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού.

Γεωγραφικοί παράγοντες: Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού είναι σημαντικά υψηλότερος στην Αμερική και την Ευρώπη, παρά στην Ασία και την Αφρική. Ειδικά για τις γυναίκες των ευρωπαϊκών χωρών, παρατηρείται υψηλότερη επίπτωση των ER+ καρκίνων του μαστού.

Άλλοι παράγοντες: Η μετεμμηνοπαυσιακή ορμονική θεραπεία υποκατάστασης, η πυκνότητα των μαστών κατά τη μαστογραφία, η κατανάλωση αλκοόλ και η παχυσαρκία είναι μερικοί ακόμα παράγοντες που σχετίζονται με την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Η παχυσαρκία σχετίζεται μόνο με αυξημένο κίνδυνο ER+ όγκων, πιθανώς, επειδή ο μαστός εκτίθεται σε οιστρογόνα που παράγει ο λιπώδης ιστός.

(Kumar, 2007)

Παράγοντας	Άντρες	Γυναίκες
Κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού (%)		
Γενικός Πληθυσμός	<1	10
Φέρουν μετάλλαξη BRCA1	1	65
Φέρουν μετάλλαξη BRCA2	7	45
Μέση Ηλικία Διάγνωσης (έτη)	67	62
Πιο πιθανές σωματικές μεταλλάξεις	Μεταλλάξεις σε γονίδια επιδιόρθωσης DNA	Διαγραφή του χρωμοσώματος 16q και μεταλλάξεις στα γονίδια PIK3CA και TP53

Πίνακας 1: Διαφορές μεταξύ του Καρκίνου του Μαστού στους Άνδρες και στις Γυναίκες (Giordano, 2018)

2.6 Μοριακή Ταξινόμηση Καρκίνου Μαστού

Ο καρκίνος του μαστού απαρτίζεται από ετερογένεια. Η διάγνωση και εξέλιξη της νόσου διαφέρει από ασθενή σε ασθενή, καθώς ο κάθε κακοήθης όγκος έχει διαφορετική μορφολογία, πρόγνωση και ανταπόκριση στη θεραπεία. Ύστερα από μελέτες έκφρασης πολλών γονιδίων (Gene expression), σε μοριακό επίπεδο, ο καρκίνος του μαστού ταξινομείται σε 5 κύριους υποτύπους:

1. Αυλικού τύπου A (Luminal A). Πρόκειται για όγκους που εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα τους ορμονικούς υποδοχείς οιστρογόνων ή/και προγεστερόνης, ενώ εκφράζουν σε χαμηλό βαθμό το γονίδιο HER-2 και τα γονίδια πολλαπλασιασμού Ki-67. Εμφανίζονται στο 40% των καρκινωμάτων μαστού και έχουν καλή πρόγνωση.
2. Αυλικού τύπου B+C (Luminal B+C). Πρόκειται για όγκους που εκφράζουν τους ορμονικούς υποδοχείς οιστρογόνων ή/και προγεστερόνης, όχι όμως στα ίδια υψηλά επίπεδα με τους Luminal A. Αν και εκφράζουν σε υψηλό βαθμό τα Ki-67, δεν υπάρχει συγκεκριμένο επίπεδο έκφρασης του HER-2, που άλλοτε η έκφρασή του είναι υψηλή και άλλοτε χαμηλή. Συγκριτικά με τους Luminal A, οι Luminal B όγκοι έχουν δυσμενέστερη πρόγνωση και απαντώνται στο 20% των καρκινωμάτων μαστού.
3. HER-2 Enriched. Πρόκειται για όγκους που εκφράζουν σε υψηλό βαθμό το HER-2 και τα Ki-67, και καθόλου τους ορμονικούς υποδοχείς οιστρογόνων και

προγεστερόνης. Το 10–15% των καρκίνων του μαστού είναι HER2- Enriched και η πρόγνωση τους είναι κακή.

4. Τριπλοί αρνητικοί όγκοι (Triple negative ή Basal like). Πρόκειται για όγκους που δεν εκφράζουν τους ορμονικούς υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης, ούτε το γονίδιο HER-2. Αντίθετα, εκφράζουν σε υψηλό βαθμό τις Ki-67, τον υποδοχέα EGFR και τις κυτταροκερατίνες CK5, CK14, CK17. Αντιστοιχούν στο 5-10% των περιστατικών καρκίνου μαστού και στο 80% των καρκίνων με γενετική μετάλλαξη στο γονίδιο BRCA1. Τριπλά αρνητικοί όγκοι έχουν συσχετιστεί με μειωμένη πιθανότητα οστικής μετάστασης, αλλά μεγαλύτερη πιθανότητα εγκεφαλικής και σπλαχνικής μετάστασης.
5. Normal breast-like όγκοι. Πρόκειται για όγκους που δεν είναι καλά χαρακτηρισμένοι. Θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν TN γιατί δεν εκφράζουν τους υποδοχείς ER, PR, HER-2, όμως δεν εκφράζουν επίσης τον υποδοχέα EGFR και την κυτταροκερατίνη CK5. Ανήκουν στο 5-10% των καρκινωμάτων μαστού και έχουν μέτρια πρόγνωση.

Από το 2007, έχει αναγνωριστεί ένας νέος υπότυπος, οι Claudin-low όγκοι, στους οποίους ανήκουν τα διηθητικά πορογενή καρκινώματα μαστού, αυξημένου βαθμού κακοήθειας. Μοιάζουν με τους TN, όμως η διαφορά τους είναι ότι υπερεκφράζουν 40 γονίδια που έχουν σχέση με την ανοσολογική απόκριση. (Perou C. M., 2000); (Eroles P, 2012); (Luck A. A., 2008); (Provenzano, et al., 2018); (Sørli, et al., 2001)

2.7 Ιστοπαθολογική Ταξινόμηση

Η επιβεβαίωση ενός κακοήθους νεοπλασματος θα γίνει από παθολογοανατόμο, ο οποίος θα είναι σε θέση να διακρίνει τον παθολογικό ιστό από τον φυσιολογικό. Τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν από τα φυσιολογικά, αλλά και μεταξύ τους, ως προς το μέγεθος, το σχήμα και τη διάταξή τους. Ο όγκος δηλαδή απαρτίζεται από ετερογενή κύτταρα που δεν έχουν πολλές ομοιότητες με το αρχικό στάδιο διαφοροποίησής τους.

Τα κακοήθη νεοπλασματα του μαστού προέρχονται από το επιθήλιο των πόρων και των λόβων και το 95% αυτών είναι αδenoκαρκινώματα. Ταξινομούνται μορφολογικά ανάλογα με το αν έχουν διηθήσει τη βασική μεμβράνη. Αν το καρκίνωμα δεν έχει διηθήσει τη βασική μεμβράνη (ούτε το στρώμα και τα λεμφαγγεία) ονομάζεται *μη – διηθητικό (in situ)*

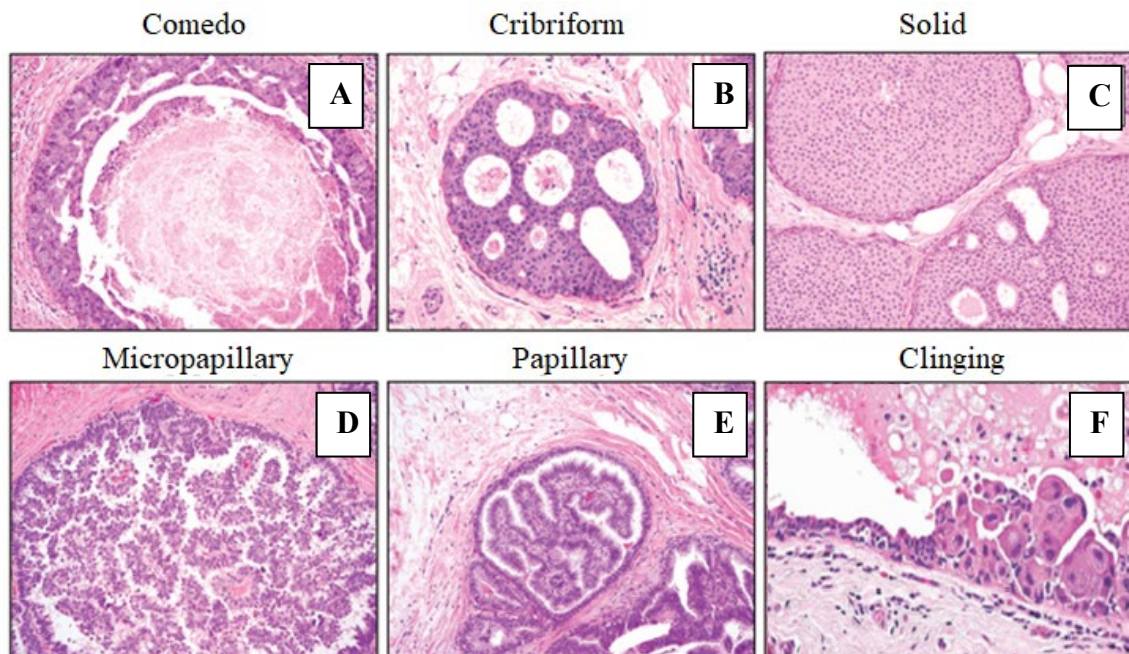
καρκίνωμα, ενώ αν έχει γίνει διήθηση, ονομάζεται *διηθητικό καρκίνωμα*. Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι κύριοι τύποι καρκινώματος είναι:

I. In situ καρκίνωμα

Υπάρχουν 2 τύποι in situ καρκινώματος στον καρκίνο του μαστού, το πορογενές και το λοβιακό. Οι όροι *πορογενές* και *λοβιακό* δεν αντιστοιχούν στην προέλευση του καρκινώματος, αφού και τα 2 in situ καρκινώματα προέρχονται από κύτταρα της τελικής πορολοβιακής μονάδας. Αντίθετα, οι όροι αυτοί περιγράφουν την ιστολογική μορφή των νεοπλασματικών κυττάρων.

1. Πορογενές in situ καρκίνωμα (Ductal Carcinoma In Situ, DCIS): προέρχεται από κύτταρα της τελικής πορολοβιακής μονάδας, προσβάλλει το λόβιο και του προσδίδει πορώδη εμφάνιση. Η ιστολογική του εικόνα ποικίλλει και περιλαμβάνει 6 τύπους:

- A. Φαγεσωρικός (Comedo)
- B. Ηθμοειδής (Cribriform)
- C. Συμπαγής (Solid)
- D. Μικροθηλώδης (Micropapillary)
- E. Θηλώδης (Papillary)
- F. Τοιχωματικός (Clinging)

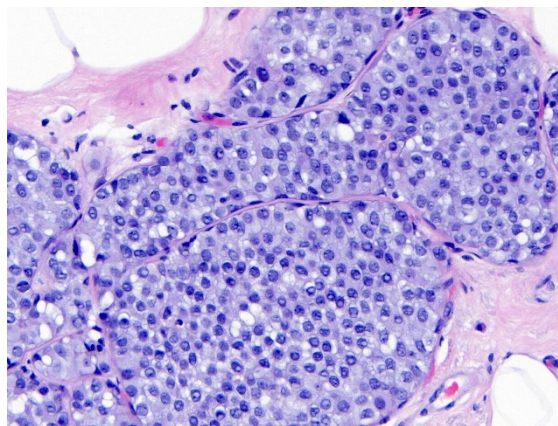


Εικόνα 10: Εικόνα κατόπιν επεξεργασίας A&H (Allred, 2010); (Hoda, 2016)

Κυμαίνεται από χαμηλού βαθμού πυρηνικής κακοήθειας, δηλ. η μορφολογία του πυρήνα μπορεί να είναι μονότονη, χωρίς ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, έως και μέχρι υψηλού βαθμού κακοήθειας, δηλ. με πλειόμορφη μορφολογία πυρήνα. Παρατηρούνται συχνές αποτιτανώσεις, ως αποτέλεσμα αποθέσεων αλάτων ασβεστίου στα νεκρωτικά κύτταρα ή στο υλικό έκκρισης. Έχει άριστη πρόγνωση, >97% μακρόχρονη επιβίωση, όμως αν δεν αντιμετωπιστεί θεραπευτικά, το 1/3 των περιπτώσεων DCIS μπορεί να εξελιχθεί σε διηθητικό πορογενές καρκίνωμα, συνήθως στον ίδιο μαστό και τεταρτημόριο με πριν. (Kumar, 2007)

2. Λοβιακό *in situ* καρκίνωμα (Lobular Carcinoma In Situ, LCIS): προέρχεται από κύτταρα της τελικής πορολοβιακής μονάδας και συνήθως διατείνει τα λόβια που προσβάλλει. Η ιστολογική του εικόνα είναι μορφολογικά ομοιογενής, με ομοιόμορφα κύτταρα, στρογγυλούς πυρήνες που αναπτύσσονται μέσα σε λόβια σε ομάδες χαλαρής συνοχής.

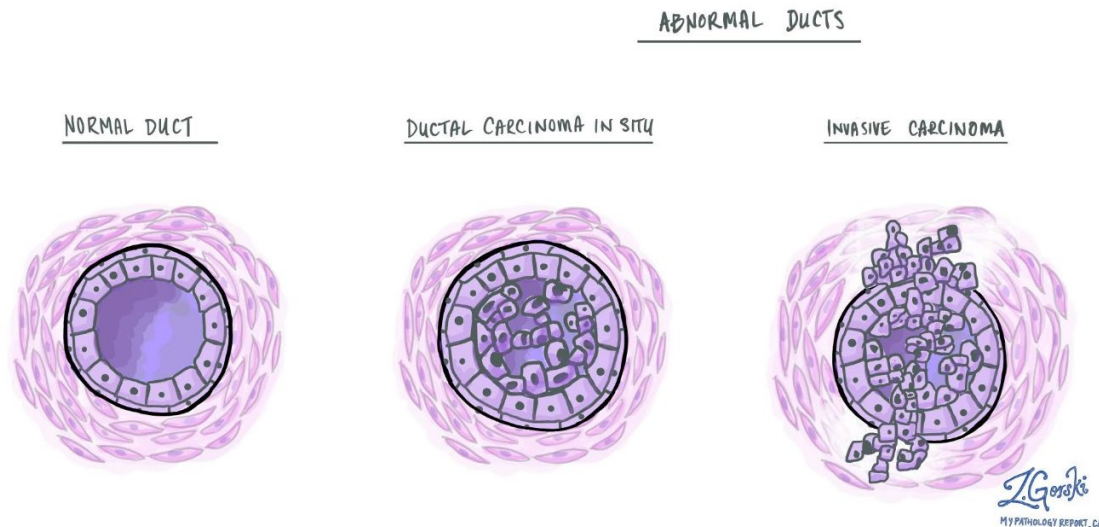
Σχεδόν πάντα είναι τυχαίο εύρημα και το 1/3 των γυναικών με LCIS θα αναπτύξουν διηθητικό καρκίνωμα. Αντίθετα με το DCIS, δεν είναι απαραίτητο ότι το διηθητικό καρκίνωμα θα αναπτυχθεί στον ίδιο μαστό (~67% πιθανότητα), κάνοντας έτσι «το LCIS έναν δείκτη αυξημένου κινδύνου ανάπτυξης καρκινώματος και στους δύο μαστούς και έναν άμεσο πρόδρομο μερικών άλλων τύπων καρκίνου» (Kumar, 2007)



Εικόνα 11: Λοβιακό In Situ Καρκίνωμα. Μορφολογία Κυττάρων. A&H (Vickery & Biernacka, 2022)

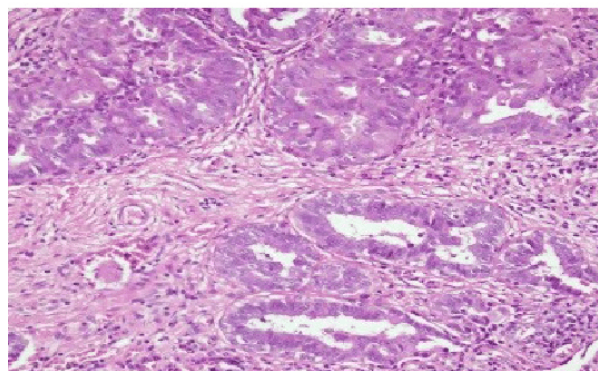
II. Διηθητικό καρκίνωμα

1. **Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (Invasive Ductal Carcinoma, IDC):** ο όρος αυτός χρησιμοποιείται συνήθως για τα καρκινώματα (70-80%) που δεν ταξινομούνται σε κάποιον από τους ακόλουθους ειδικούς τύπους. Αυτός ο τύπος του καρκίνου συνήθως σχετίζεται με DCIS.



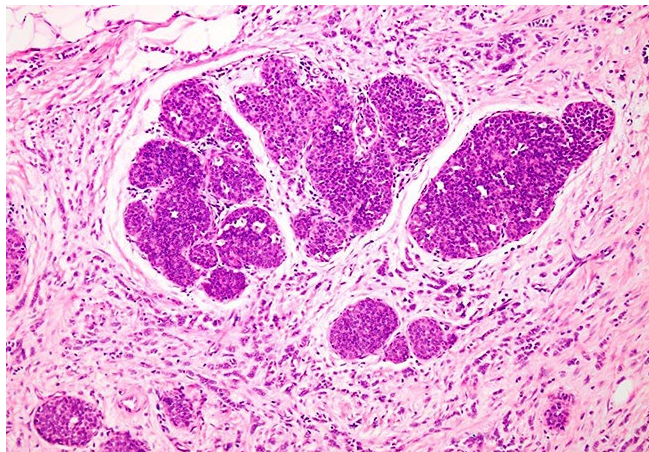
Εικόνα 12: Normal Duct → Ductal Carcinoma In Situ → Invasive Carcinoma. (Wasserman, 2022)

«Η μικροσκοπική εμφάνιση ποικίλλει και κυμαίνεται από όγκους με καλά ανεπτυγμένους σωληνώδεις σχηματισμούς και πυρήνες χαμηλού βαθμού κακοήθειας έως όγκους που αποτελούνται από εκτεταμένες συμπαγείς αθροίσεις αναπλαστικών κυττάρων». Τα περισσότερα πορογενή διηθητικά καρκινώματα προκαλούν δεσμοπλαστική αντίδραση, η οποία αντικαθιστά τον φυσιολογικό λιπώδη ιστό του μαστού, οδηγώντας τελικά στον σχηματισμό μιας σκληρής, ψηλαφητής, ακανόνιστης μάζας.



Εικόνα 13: Myiasis as a rare complication of invasive ductal carcinoma. A&H (Muhammad Khurram Zia, 2019)

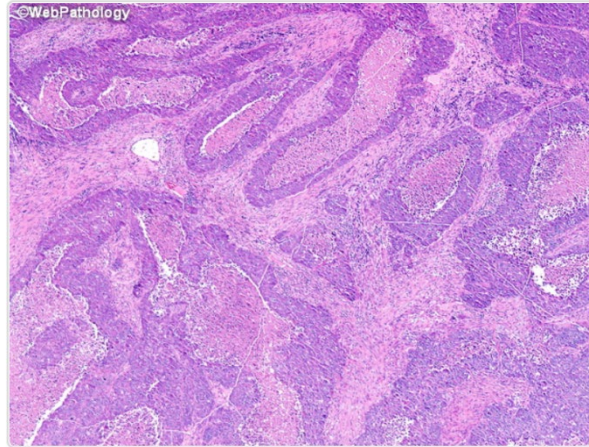
2. **Διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα (Invasive Lobular Carcinoma, ILC):** αποτελείται από κύτταρα μορφολογικώς όμοια με τα κύτταρα του LCIS, τα οποία διηθούν το στρώμα, ενώ στα 2/3 των περιπτώσεων υπάρχει παρακείμενο LCIS. Οι όγκοι αυτό αποτελούν το 10-15% των όγκων του μαστού. Το στρώμα διηθείται από μεμονωμένα νεοπλασματικά κύτταρα, τα οποία διατάσσονται σε μονή σειρά το ένα πίσω από το άλλο. Οι περισσότεροι όγκοι εμφανίζονται ως ψηλαφητές μάζες ή ως πυκνώσεις στη μαστογραφία. Παρόλα αυτά, υπάρχει μια σημαντική υποομάδα όγκων, η οποία διηθεί χωρίς να δημιουργεί δεσμοπλαστική αντίδραση. Αυτοί οι όγκοι μπορεί να είναι κλινικώς κρυφοί και δύσκολο να ανιχνευθούν μαστογραφικώς. Ο τρόπος μετάστασης των λοβιακών καρκινωμάτων σε σχέση με άλλους τύπους καρκίνου του μαστού είναι μοναδικός. Αυτό συμβαίνει γιατί συνήθως, διασπείρονται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, στις ορογόνιες επιφάνειες, στη γαστρεντερική οδό, στις ωθήκες, στη μήτρα και στον μυελό των οστών. Σχεδόν, όλα τα λοβιακά καρκινώματα είναι **ER+/PR+**, ενώ **HER-2+** είναι σπάνια.



Εικόνα 14: Διηθητικό Λοβιακό Καρκίνωμα. A&H. (WebPathology, 2022)

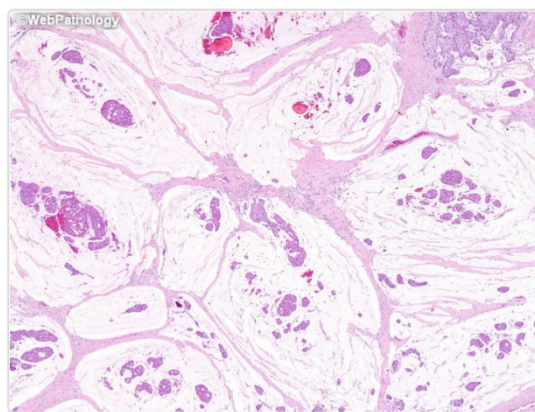
3. **Καρκινώματα με μυελοειδή χαρακτηριστικά (Medullary Carcinoma, MC):** πρόκειται για ειδικό τύπο TNC, αποτελώντας το 5% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού. Το 13% των καρκίνων που φέρουν μετάλλαξη BRCA1 είναι μυελοειδή καρκινώματα. Στη μαστογραφία είναι δύσκολο να διακριθούν από τους καλοήθεις όγκους, γιατί αναπτύσσονται σαν στρογγυλή μάζα. Είναι αποτελούμενα από συμπαγείς, εκτεταμένες αθροίσεις μεγάλων αναπλαστικών κυττάρων και συνοδεύονται από ικανού βαθμού λεμφοκυτταρικό διήθημα. Αποτελείται από περιφερικά T-κύτταρα (με πολλά ενεργοποιημένα κυτταροτοξικά

λεμφοκύτταρα) και πλασματοκύτταρα που παράγουν IgA. Η παρουσία των λεμφοκυττάρων συνεπάγει ευνοϊκή πρόγνωση, γιατί παρατηρείται καλύτερη απόκριση στη χημειοθεραπεία.



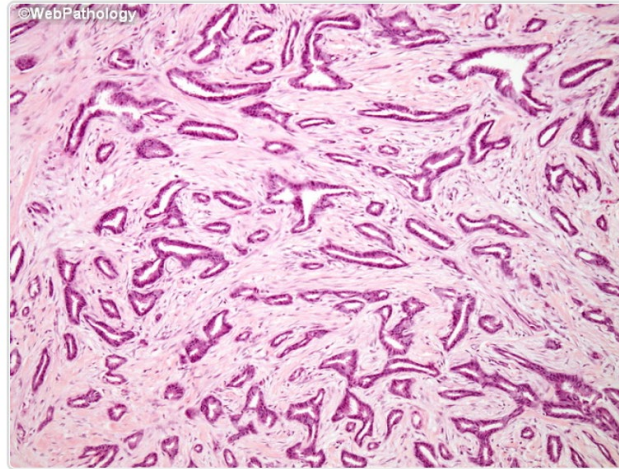
Εικόνα 15: Μυελοειδές Καρκίνωμα. A&H (WebPathology, 2022)

4. **Κολλοειδές (ή βλενώδες) καρκίνωμα (Colloid – Mucinous Carcinoma, CC):** πρόκειται για **ER+** και **HER-2** – όγκο, συνήθως μαλακό και ζελατινώδη. Αυτό οφείλεται στην παραγωγή άφθονης ποσότητας εξωκυττάριας βλέννης που παράγουν τα νεοπλασματικά κύτταρα και δημιουργούν μια απωθητικών ορίων περιγεγραμμένη μάζα. (Kumar, 2007) Αποτελεί το 2% των όγκων του μαστού, οι οποίοι κατατάσσονται σε αυτή την κατηγορία όταν εμφανίζουν στρωματική βλέννη σε >90% του όγκου.



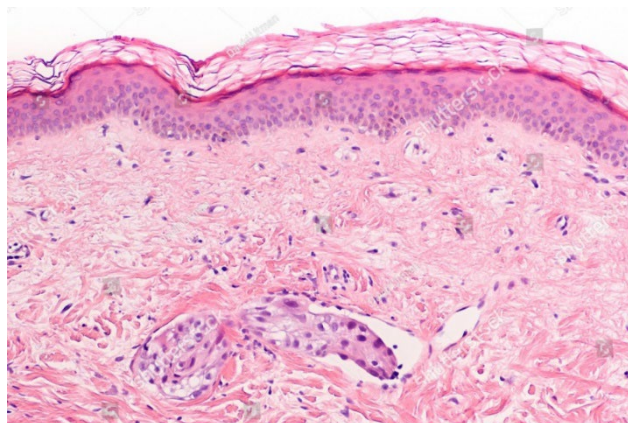
Εικόνα 16: Βλενώδες Καρκίνωμα. A&H (WebPathology, 2022)

5. **Σωληνώδες καρκίνωμα (Tubular Carcinoma, TC):** πρόκειται για ακόμα έναν τύπο **ER+** και **HER-2-** όγκου, που ανακαλύπτεται σχεδόν πάντα στη μαστογραφία ως μία ακανόνιστου σχήματος μάζα. Τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν χαμηλού βαθμού κακοήθειας πυρήνες και σχηματίζουν σωληνάρια καλά σχηματισμένα. Η πρόγνωση είναι εξαιρετική και οι λεμφαδενικές μεταστάσεις σπάνιες.



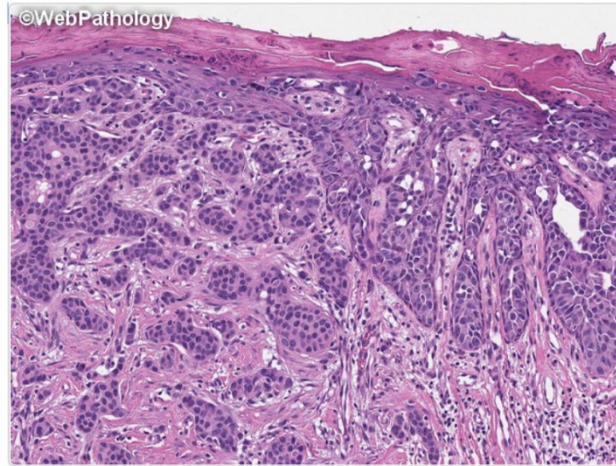
Εικόνα 17: Σωληνώδες Καρκίνωμα. A&H (WebPathology, 2022)

6. **Φλεγμονώδες καρκίνωμα (Inflammatory Carcinoma, IC):** δεν έχει κάποια συγκεκριμένη μορφολογία, κυρίως καθορίζεται σύμφωνα με την κλινική εικόνα. Είναι χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα και διάχυτα διηθητικό νεόπλασμα, που αποφράσσει τα λεμφαγγεία του χορίου και δημιουργεί κλινική εικόνα «φλεγμονής», χωρίς, όμως, να υπάρχει φλεγμονή στην πραγματικότητα. Πολλοί όγκοι μεθίστανται σε απομακρυσμένες θέσεις, ενώ ο μαστός που έχει προσβληθεί από το συγκεκριμένο νεόπλασμα, εμφανίζεται ως οίδηματώδης και ερυθρηματώδης, χωρίς ψηλαφητή μάζα.



Εικόνα 18: Φλεγμονώδες Καρκίνωμα. A&H (WebPathology, 2022)

7. *Νόσος Paget της θηλής (Paget Disease, PD)*: πρόκειται για τον σχηματισμό ενός εφελκιδιοποιημένου εξιδρώματος στην επιδερμίδα της θηλής και της θηλαίας άλω. Είναι αποτέλεσμα επέκτασης, συνήθως, του DCIS στους γαλακτοφόρους πόρους και εν συνεχεία στον ιστό του δέρματος της θηλής. Παρατηρούνται ευμεγέθη αραιοχρωματικά κύτταρα και αναπτύσσονται είτε μεμονωμένα είτε σε ομάδες, πρώτα στις βαθύτερες στοιβάδες κι έπειτα στις επιπολής στοιβάδες της επιδερμίδας. (Kumar, 2007) ; (Μαρκόπουλος, 2007)



Εικόνα 19: *Νόσος Paget της θηλής. A&H (WebPathology, 2022)*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 «ΟΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ GATA3 ΚΑΙ NF-κB»

Οι μεταγραφικοί παράγοντες (Transcription Factors, TFs) είναι πρωτεΐνες και παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων. Αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA που έχουν ρυθμιστικό ρόλο, προσδένονται σε αυτές, ρυθμίζοντας τη μεταγραφή του εκάστοτε γονιδίου.

3.1 Η οικογένεια GATA

Η πρωτεΐνη GATA3 ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων GATA. Κάθε μέλος της οικογένειας αυτής, διατηρείται εξελικτικά, μεταξύ των ζώων, των φυτών και των μυκήτων. (Tremblay, et al., 2018) Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη GATA3 του ανθρώπου ταυτίζεται σε ποσοστό 97% με αυτή του ποντικού. (Chou, et al., 2009) Έρευνες στη γενετική

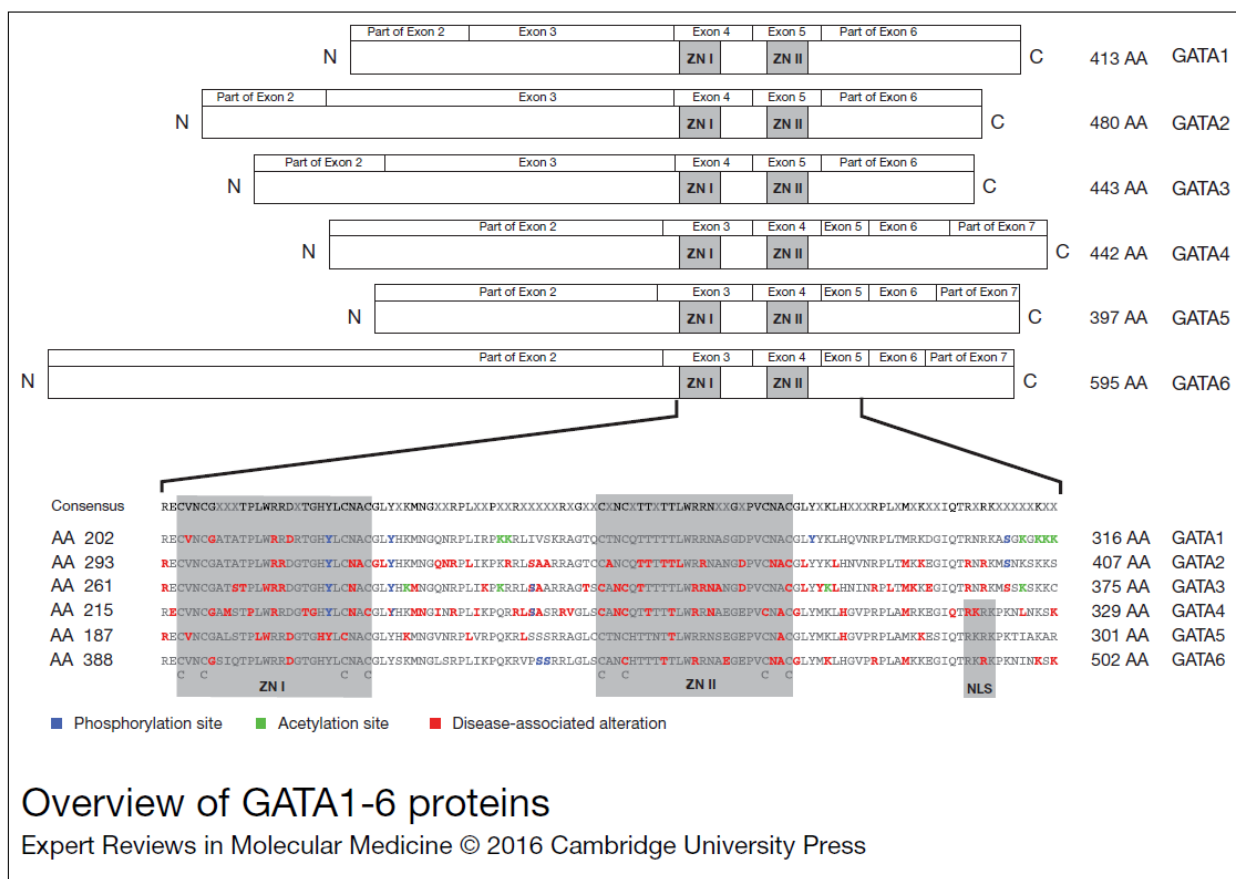
και τη βιοχημεία ποντικών αποκαλύπτουν πόσο σημαντικοί είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA στην κυτταρική διαφοροποίηση, στην ομοιόσταση και τη μορφογένεση των ιστών. (Tremblay, et al., 2018)

Κατά την εμβρυϊκή ηλικία, η λειτουργία τους σχετίζεται κυρίως με τον σχηματισμό διαφόρων ιστών, όπως του εγκεφάλου, του ήπατος και του δέρματος καθώς και με τον σχηματισμό του αιμοποιητικού, του καρδιαγγειακού και του ουροποιητικού συστήματος. Οι πρωτεΐνες αυτές, όμως, είναι εξίσου σημαντικές για τη μετέπειτα ανάπτυξη και επιβίωση του οργανισμού. Πειράματα σε έμβρυα ποντικών δείχνουν ότι η απώλεια γονιδίων GATA συνεπάγεται στην πλειοψηφία τους με θάνατο των εμβρύων. (Lentjes, et al., 2016)

Στον άνθρωπο, αιτιολογικές μεταλλάξεις των γονιδίων που τους εκφράζουν μπορούν να προκαλέσουν διαταραχές στην ανάπτυξή του. Τέτοιες διαταραχές είναι η αναιμία, ο υπερπαραθυρεοειδισμός (HDR syndrome), η κώφωση, η στειρότητα, η νεφρική και η καρδιακή ανεπάρκεια. (Tremblay, et al., 2018)

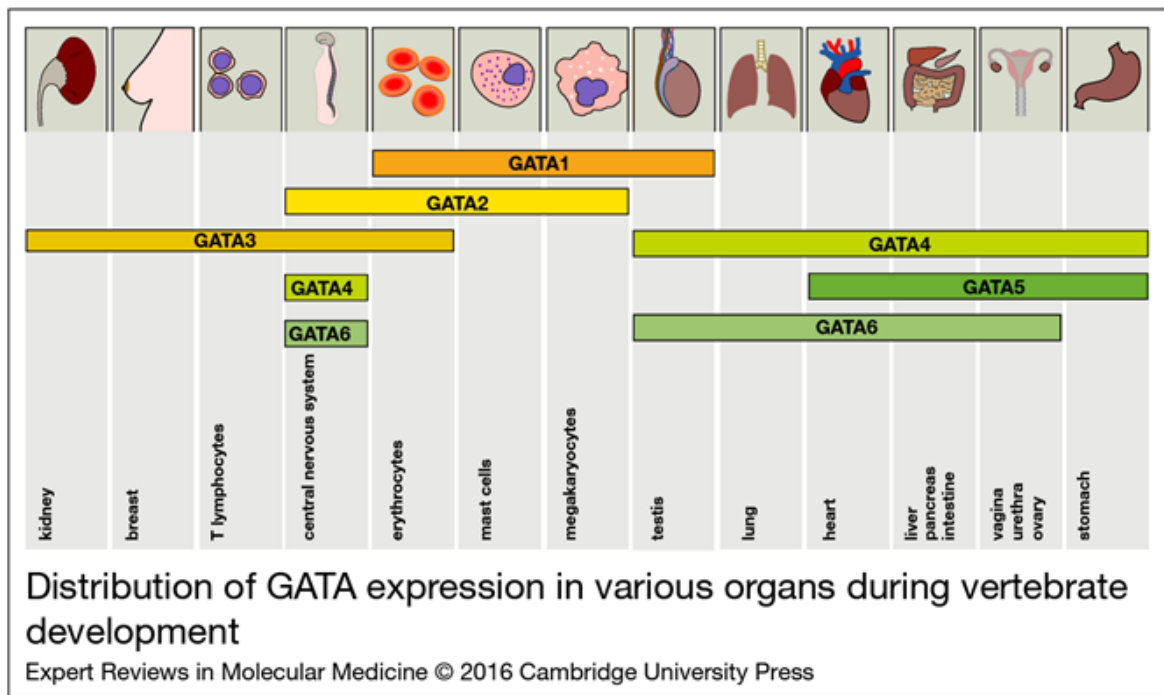
Στα θηλαστικά, υπάρχουν 6 μεταγραφικοί παράγοντες GATA, οι οποίοι είναι κύριοι ρυθμιστές ορισμένων γονιδίων. Οι πρωτεΐνες αυτές, αναγνωρίζουν και προσδέονται στην αλληλουχία DNA $5'-(A/T)GATA(A/G)-3'$, μέσω δομικών μοτίβων δακτύλων ψευδαργύρου (Zinc Finger DNA Binding Domains). (Song & Yan, 2020) Η πρόσδεση γίνεται απευθείας ή μετά από ομο- ή ετερο-διμερισμό. Κάθε μεταγραφικός παράγοντας GATA αποτελείται από 2 δάκτυλα ψευδαργύρου (ZNI και ZNII), τα οποία εντοπίζονται στο αμινο-τελικό άκρο (NF) και στο καρβοξυ-τελικό άκρο (CF) της πρωτεΐνης, αντίστοιχα. Ο ZNII συνδέεται με το DNA, με αλληλουχία Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cys, ενώ ο ZNI σταθεροποιεί τη σύνδεση ZNII-DNA και παράλληλα αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες δακτυλίου ψευδαργύρου (π.χ. FOG). (Nesbit , et al., 2004)

Οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA 1–6 καθορίζουν την κυτταρική διαφοροποίηση, συμμετέχοντας σε γονιδιακά ρυθμιστικά δίκτυα. Για να δράσουν στα γόνιδια-στόχους, ενεργοποιούνται μέσω ορισμένων άλλων στοιχείων που προσδέονται στους υποκινητές τους. Έπειτα, είτε ενεργοποιούν γονίδια που σχετίζονται με συγκεκριμένα μορφολογικά στοιχεία του κάθε κυτταρικού τύπου, είτε καταστέλλουν γονίδια που η έκφρασή τους οδηγεί σε εναλλακτικά μονοπάτια διαφοροποίησης και άρα άλλου κυτταρικού τύπου.



Εικόνα 20: Οι πρωτεΐνες GATA1-6. Οι δομικές περιοχές τους και η αλληλουχία των αμινοξέων. (Lentjes, et al., 2016)

Εκφράζονται ιστοειδικά και ταξινομούνται σε 2 υπο-οικογένειες με βάση τα μονοπάτια έκφρασής τους. Η 1^η υπο-οικογένεια αποτελείται από τους αιμοποιητικούς παράγοντες και περιλαμβάνει τους GATA1, GATA2 και GATA3, που εκφράζονται κυρίως στα αιμοποιητικά κύτταρα, ενώ η 2^η υπο-οικογένεια αποτελείται από τους μη-αιμοποιητικούς παράγοντες και περιλαμβάνει τους GATA4, GATA5, GATA6, που καθορίζουν ιστούς που προέρχονται από το ενδόδερμα και το μεσόδερμα. (Kouros-Mehr, et al., 2008) Ο GATA3 αν και εκφράζεται σε αιμοποιητικά κύτταρα (π.χ. Τ λεμφοκύτταρα), εκφράζεται επίσης και σε μεσεγχυματικούς ιστούς (π.χ. μαζικός αδένας, δέρμα, νεφροί, ΚΝΣ) Γι' αυτό, παρόλο τον διαχωρισμό, η έκφρασή τους εκτείνεται πέρα από αυτούς τους ιστούς, εκτελώντας βασικές λειτουργίες σε ένα ευρύ φάσμα αναπτυσσόμενων συστημάτων. (Tremblay, et al., 2018)



Εικόνα 21: Η έκφραση των γονιδίων GATA στους διάφορους ιστούς. (Lentjes, et al., 2016)

3.1.2 GATA3

Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA3 είναι μία πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο GATA3, το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 10, στη θέση 14 (10p14), έχει συνολικό μήκος 20.510 βάσεις και αποτελείται από 8 εξώνια (exons). Από τις διαδικασίες της μεταγραφής και της μετάφρασης, προκύπτει ένα πρωτεϊνικό μόριο με 2 ισομορφές. Η ισομορφή α που έχει μήκος 443 αμινοξέα και μοριακό βάρος 47,9 kDa και η ισομορφή β που έχει μήκος 444 αμινοξέα και μοριακό βάρος 48 kDa. (Miettinen, et al., 2014) Η δομή του μορίου αυτού περιλαμβάνει 4 επικράτειες, σημαντικές για τη λειτουργία του ως μεταγραφικός παράγοντας. Στο αμινοτελικό άκρο εντοπίζονται οι επικράτειες trans ενεργοποίησης (Trans Activation Domains, TADs), οι TAI (αμινοξέα 31-59) και TAIΙ (αμινοξέα 132-214), οι οποίες είναι απαραίτητες για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου στόχου. Αν παρατηρηθεί απώλεια μιας επικράτειας TA, η έκφραση του γονιδίου στόχου μπορεί να μειωθεί από 5 έως και 10 φορές, ενώ αν παρατηρηθεί απώλεια και στις 2 επικράτειες TAI και TAIΙ, τα επίπεδα της έκφρασης μειώνονται μέχρι και 100 φορές. (Takaku, et al., 2016) Προχωρώντας νοητά προς το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, λίγο μετά την TAIΙ βρίσκεται ο δακτύλιος ψευδαργύρου ZNI και έπειτα οι βασικές περιοχές I και II. Ανάμεσα στις 2 βασικές περιοχές βρίσκεται ο δακτύλιος ψευδαργύρου ZNII. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο ρόλος του ZNII είναι η πρόσδεση στο DNA, ενώ ο κύριος ρόλος του ZNI είναι

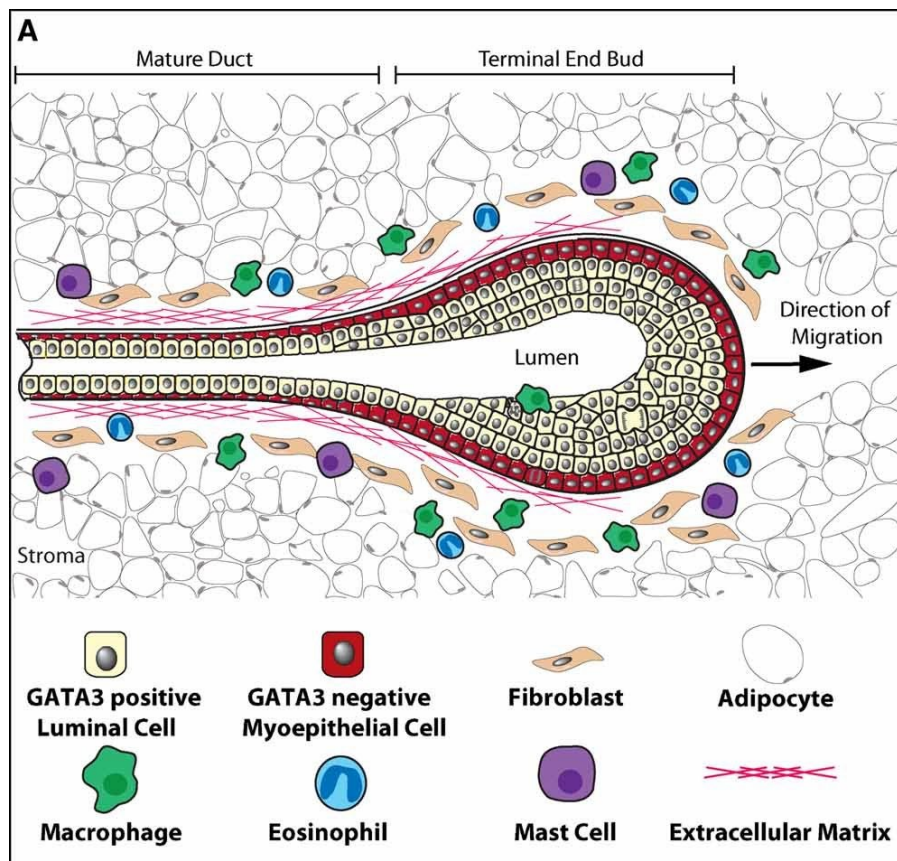
η σταθεροποίηση αυτής της σύνδεσης. Η ικανότητα ενεργοποίησης των TAs επικρατειών, δείχνει να εξαρτάται από τις επικράτειες ZNI και ZNII, αφού μειώνεται σε ικανοποιητικό βαθμό, έπειτα από έλλειψη έστω και μίας περιοχής. Από την άλλη, η απώλεια της επικράτειας ZNI, τουλάχιστον, *in vitro*, δεν δείχνει να επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA, σε αντίθεση με απώλεια στην επικράτεια ZNII που οδηγεί σε ανικανότητα πρόσδεσης. Παράλληλα, μεταλλάξεις στη βασική περιοχή I οδηγούν σε επικρατή αρνητική ή υπομορφική λειτουργία και από μεταλλάξεις στη βασική περιοχή II προκύπτει ομο- ή ετεροδιμερισμός του GATA3 και μείωση πρόσδεσης του DNA. (Takaku, et al., 2016) ; (Chou, et al., 2009)



Εικόνα 22: Η δομή της πρωτεΐνης GATA3. (Chou, et al., 2009)

3.1.3 Έκφραση του GATA3 στον μαζικό αδένα

Σύμφωνα με την ιστολογία του μαστού που αναλύθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, το λόβιο, αποτελεί τη λειτουργική μονάδα του μαζικού αδένου. Καλύπτεται από μία διπλή στοιβάδα επιθηλιακών κυττάρων· εξωτερικά από μυοεπιθηλιακά κύτταρα και εσωτερικά από τα αυλικά κύτταρα. (Kumar, 2007) Αν και οι δύο αυτές στοιβάδες προέρχονται από έναν κοινό προγονικό κυτταρικό πληθυσμό, έχουν διαφοροποιηθεί. Έτσι, η εξωτερική μυεπιθηλιακή στοιβάδα που είναι ER- δεν εκφράζει την πρωτεΐνη GATA3, ενώ τα επιθηλιακά κύτταρα της εσωτερικής στοιβάδας του αυλού, που είναι ER+ εκφράζουν την πρωτεΐνη. Σε αυτό το σημείο, να επισημανθεί ότι το γονίδιο GATA3, μαζί με άλλα γονίδια που ελέγχουν κυτταρικές λειτουργίες, αποτελεί στόχο του γενωμικού και μη-γενωμικού μονοπατιού σηματοδότησης του ERα (Estrogen Receptor α). (Pavithran & Kumavath, 2021) Εν συνεχεία, η πρωτεΐνη εκφράζεται και στα προγονικά λιποκύτταρα του μαστού, ενώ στην πορεία καταστέλλεται για να μην δράσει αρνητικά στη διαφοροποίησή τους. Αντίθετα, φαίνεται να είναι απαραίτητος παράγοντας στην ανάπτυξη των TEBs κατά την ήβη και στη διαφοροποίηση των αυλικών κυττάρων, ενώ στην ενήλικη ζωή, η έκφρασή του διατηρεί τη διαφοροποίησή τους. (Kouros-Mehr, et al., 2006)



Εικόνα 23: Τα κύτταρα του πόρου του μαστού και η εντόπιση της έκφρασης GATA3. (Kouros-Mehr, et al., 2008)

Σε διάφορα πειράματα, έπειτα από knock-out του GATA3 γονιδίου, υπήρχαν ποντίκια που δεν επιβίωσαν μετά την 11^η εβδομάδα, δείχνοντας τη σημαντικότητα του μεταγραφικού παράγοντα στην κυτταρική διαφοροποίηση, την ανάπτυξη και την εξέλιξη ενός οργανισμού. Παράλληλα, έρευνες με ανάλυση μικροσυστοιχιών (Microarray Analysis), παρουσιάζουν τον GATA3 ως τον πιο υψηλά εκφραζόμενο μεταγραφικό παράγοντα κατά την ανάπτυξη του μαστικού αδένου σε ποντίκια στο στάδιο της ήβης και της ενήλικης ζωής.

3.2 Η οικογένεια Rel/NF-κB

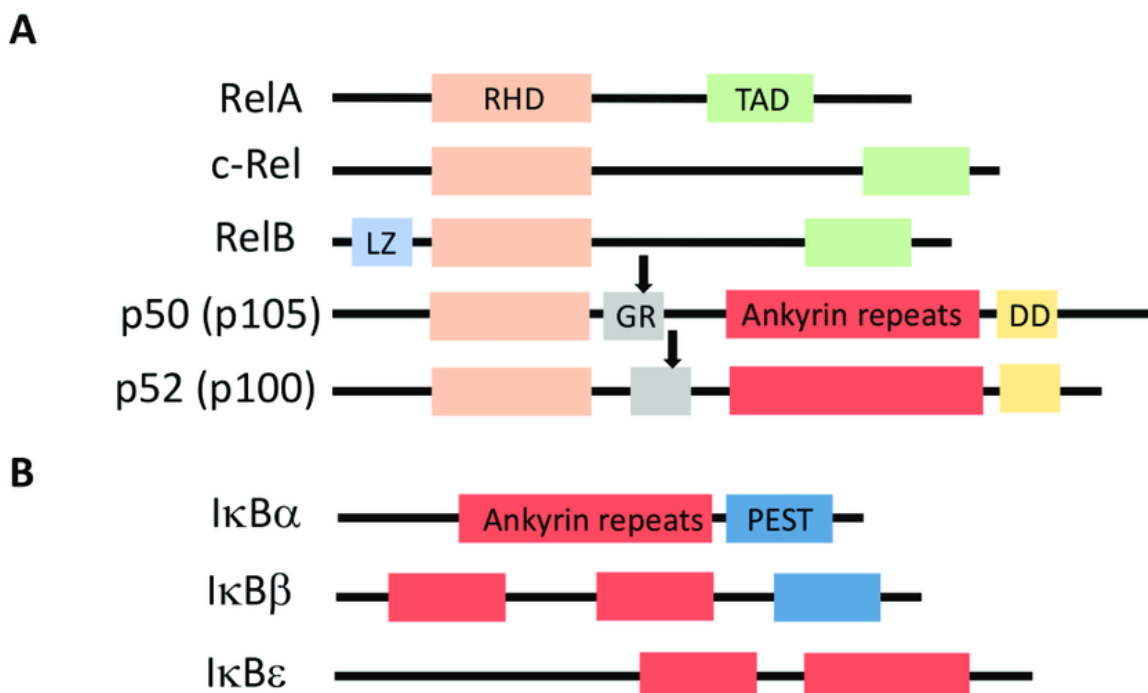
Στα θηλαστικά, η ευρύτερη οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων Rel/NF-κB, αποτελείται από 5 μέλη που διακρίνονται σε 2 υπο-οικογένειες. Στην υπο-οικογένεια Rel ανήκουν οι πρωτεΐνες RelA (ή p65), RelB και cRel, ενώ στην υπο-οικογένεια NF-κB, ανήκουν οι

πρωτεΐνες NF-κB1 (ή p105/p50) και NF-κB2 (ή p100/p52). (Luo, et al., 2005) Οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης, ρυθμίζοντας τις κυτταρικές αποκρίσεις σε κατάσταση στρες καθώς και τη γένεση ανοσίας (επίκτητης και έμφυτης).

Κοινό χαρακτηριστικό και των 5 μεταγραφικών παραγόντων είναι ότι όλοι φέρουν μία συντηρημένη περιοχή 300 αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο τους (NF)· την αυτοτελή δομική περιοχή Rel (Rel Homology Domain, RHD), που περιέχει ένα πυρηνικό σήμα εντοπισμού (Nuclear Localization Sequence, NLS) και έχει σαν στόχο την πρόσδεση στο DNA των γονιδίων, τον διμερισμό και την αλληλεπίδραση με μέλη της οικογένειας IκB.

Τα μέλη της υπο-οικογένειας Rel συντίθενται ως ώριμα προϊόντα, έχοντας στο καρβοξυτελικό τους άκρο (CF) επικράτειες ρύθμισης της μεταγραφής (Transactivation Domains, TADs). Οι TADs είναι πολύ χαρακτηριστικό γνώρισμα των πρωτεϊνών Rel και απαραίτητο στοιχείο για την επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων.

Τα μέλη της υπο-οικογένειας NF-κB, ο NF-κB1 και ο NF-κB2, αρχικά συντίθενται ως πρόδρομα μόρια, τα p105 και p100 αντίστοιχα. Αυτά, δεν έχουν TADs στο CF τους, σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες Rel, αλλά διαθέτουν μία περιοχή επαναλήψεων αγκυρίνης (Ankyrin Repeats, ANK) οι οποίες προσδίδουν ανασταλτική ικανότητα. Παράλληλα, βοηθούν στην αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών, γι' αυτό και συνδέονται στην RHD περιοχή, επικαλύπτουν το NLS, παρεμποδίζοντας έτσι τη μεταφορά των πρωτεϊνών στον πυρήνα. Επομένως, τα πρόδρομα p105 και p100 εντοπίζονται αποκλειστικά και μόνο στο κυτταρόπλασμα. Ο συνδυασμός του μοτίβου ANK και της παρεμπόδισης των ώριμων μορίων NF-κB να μεταβούν στο κυτταρόπλασμα, θα μπορούσε να χαρακτηρίσει τα πρόδρομα αυτά μόρια ως κινάσες IκB (Zinatizadeh, et al., 2020). Στη συνέχεια, όταν ενεργοποιηθεί ο NF-κB ακολουθεί πρωτεόλυση των πρόδρομων μορίων, δηλ. γίνεται μεταμεταφραστική τροποποίηση, με τη διαδικασία της ουβικουιτίνωσης και προκύπτουν τα ώριμα μόρια p50 και p52. Όπως και τα πρόδρομα, έτσι και τα ώριμα μόρια, διαθέτουν RHDs για να μπορούν να συνδεθούν με το DNA. Εφόσον, όμως, τα p105 και p100 δεν διαθέτουν TADs, το ίδιο θα ισχύει και για τα p50 και p52. Επομένως δεν μπορούν να επάγουν τη μεταγραφή, παρά μόνο αν συνδεθούν με κάποιο άλλο μέλος της οικογένειας που φέρει TADs (p65, RelB, cRel) ή σχηματίσουν ομοδιμερή, με αποτέλεσμα την καταστολή των γονιδίων-στόχων ή επάγουν τη μεταγραφή άλλων πρωτεϊνών που διαθέτουν TADs. (Hayden & Gosh, 2008)



Εικόνα 24: Σχηματική απεικόνιση της μορφολογίας και των δομικών στοιχείων της οικογένειας Rel/NF-κB και της IκB (Courtois & Fauvarque, 2018)

3.2.2 Μονοπάτια Μεταγωγής Σήματος

Τα ετεροδιμερή του NF-κB είναι ισχυρά συνδεδεμένα με τους IκB αναστολείς, ώστε να παραμένουν ανενεργά στο κυτταρόπλασμα. Με αυτόν τον τρόπο, επικαλύπτονται οι αλληλουχίες της πυρηνικής τους εντόπισης μέχρι να λάβουν εξωκυττάρια ή ενδοκυττάρια ερεθίσματα, ώστε να ξεκινήσει η ενεργοποίησή τους. Η ενεργοποίηση προϋποθέτει ένα σύμπλοκο αναγνώρισης σήματος (Signalsome) υψηλού μοριακού βάρους, το οποίο αποτελείται από κινάσες σερίνης/θρεονίνης, τις IKKα, IKKβ και IKKγ/NEMO. Ανάλογα με την αντίδραση στα ερεθίσματα ακολουθείται ένα από τα παρακάτω μονοπάτια ενεργοποίησης, τα οποία εξαρτώνται από τις IKK κινάσες.

1. Κανονικό μονοπάτι (Canonical Pathway)

Το κανονικό μονοπάτι ρυθμίζει την κυτταρική επιβίωση και αποτρέπει ανάλογα τις συνθήκες, τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Συμμετέχει σε αυτό, κυρίως το ετεροδιμερές σύμπλοκο p65 – p50 ή το p50 – c-Rel, το οποίο είναι δεσμευμένο στο

κυτταρόπλασμα από την IκBa, χωρίς την παρουσία σήματος. Η σηματοδότηση προέρχεται κυρίως από προφλεγμονώδη ερεθίσματα, όπως κυτοκίνες (π.χ. TNF-α, IL-1) ή/και TLRs (Toll-like Receptors). Με την ανταπόκριση σε κάποιο ερέθισμα, ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης το σύμπλοκο IKKα, IKKβ και IKKγ/NEMO, το οποίο φωσφορυλιώνει την IκBa, η οποία εν συνεχεία ουβικουιλιώνεται και αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα, απελευθερώνοντας το ετεροδιμερές. Τώρα, ο NF-κB μπορεί να μετατοπιστεί στον πυρήνα του κυττάρου και να συνδεθεί με τα γονίδια-στόχους, επάγοντας ή καταστέλλοντας τη μεταγραφή τους.

2. Μη κανονικό ή Εναλλακτικό μονοπάτι (Non-canonical or Alternative Pathway)

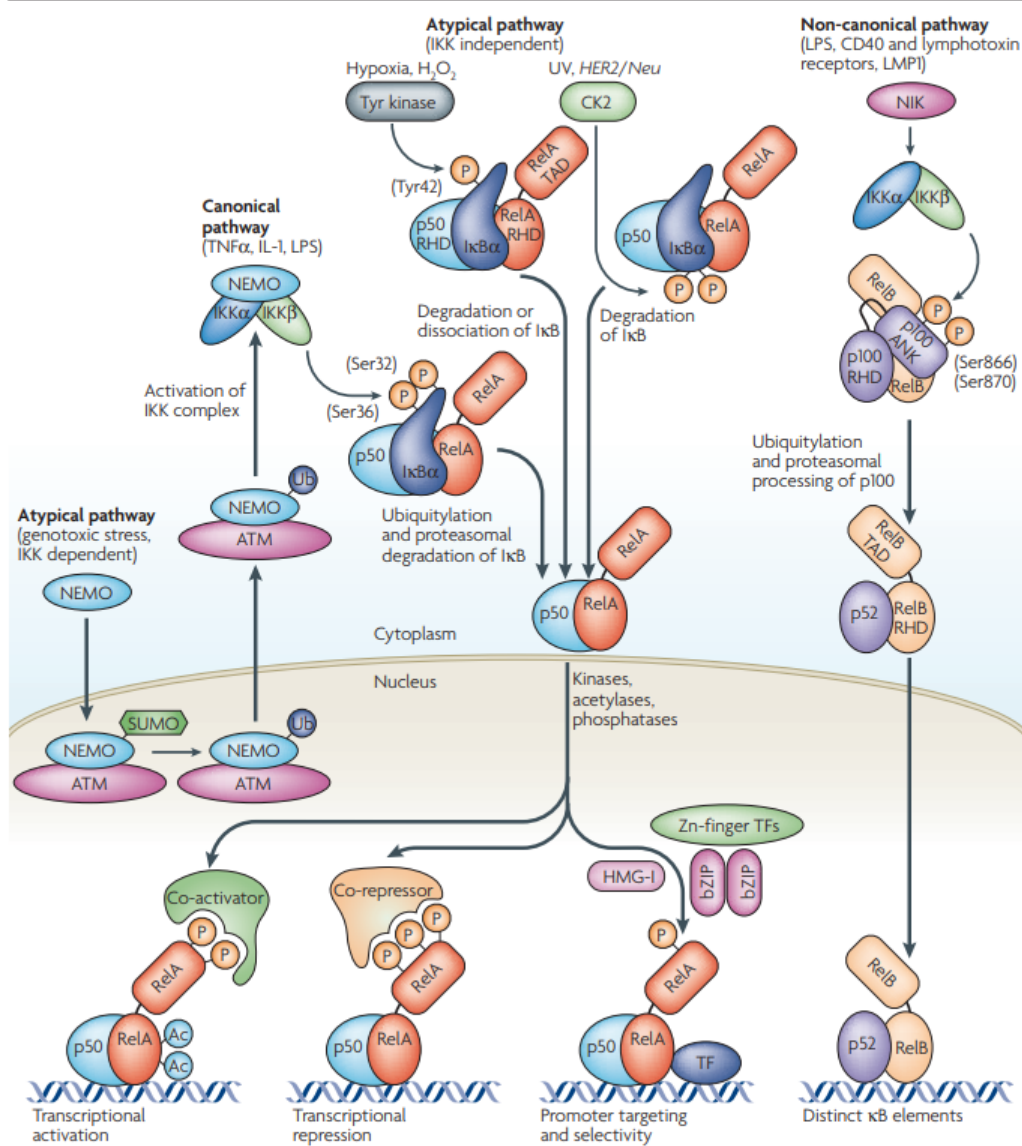
Το εναλλακτικό μονοπάτι ρυθμίζει τον κυτταρικό θάνατο και την κυτταρική επιβίωση, καθώς ευθύνεται για την επιβίωση των ανώριμων B λεμφοκυττάρων και τον σχηματισμό λεμφοειδών ιστών. Συμμετέχει σε αυτό, αποκλειστικά, το ετεροδιμερές p52 – RelB, το οποίο αρχικά βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα στην πρόδρομη μορφή p100 – RelB. Η σηματοδότηση προέρχεται από ερεθίσματα όπως του υποδοχέα λεμφοτοξίνης β (LTβR), του CD40 ή του BR3. Ανταποκρινόμενη σε κάποιο ερέθισμα, η κινάση NIK (NF-κB Inducing Kinase) αφού έχει αποδεσμευτεί από το σύμπλοκο TRAF2/TRAF3, ενεργοποιεί ομοδιμερή της υπομονάδας IKKα, φωσφορυλιώνοντάς τα. Με την ενεργοποίηση της IKKα, ακολουθεί πρωτεόλυση του πρόδρομου p100 μέσω φωσφορυλίωσης του CF του και παραγωγή του ώριμου p52. Το σύμπλοκο p52 – RelB που δημιουργείται μεταφέρεται στον πυρήνα για να επάγει ή να καταστείλει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του. (Espinosa , et al., 2011)

3. Άτυπο μονοπάτι (Atypical Pathway)

Σε αυτό το μονοπάτι συμμετέχει το ετεροδιμερές σύμπλοκο p50 – p65, το οποίο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα στην πρόδρομη μορφή p105 – p65. Η σηματοδότηση προέρχεται από πολλαπλά ερεθίσματα και δεν είναι απαραίτητο να εξαρτάται από το σύμπλοκο IKK. Αν το άτυπο μονοπάτι είναι εξαρτώμενο του IKK, η σηματοδότηση οφείλεται κυρίως στο γενοτοξικό στρες ή σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα και δεν διαφέρει πολύ από την κανονική πορεία σηματοδότησης. Ο NEMO εντοπίζεται στον πυρήνα κι έπειτα από ουβικουιλιώση μέσω της ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) επανεντοπίζονται μαζί στο κυτταρόπλασμα κι ενεργοποιείται η IKKβ. Ακολουθεί αποικοδόμηση της IκBa, απελευθερώνοντας το σύμπλοκο p50 – p65 στον πυρήνα. Στην περίπτωση όμως, που το άτυπο μονοπάτι είναι

ανεξάρτητο της IKK, τότε η σηματοδότηση οφείλεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV), υποξία, επαναοξυγόνωση, διέγερση με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), κυτταρική θεραπεία με νευρικό αυξητικό παράγοντα (Nerve Growth Factor, NGF) ή έκφραση του HER2/Neu ογκογονιδίου στα καρκινικά κύτταρα μαστού. Τα μονοπάτια ενεργοποίησης που έχουν περιγραφεί, περιλαμβάνουν εξαρτώμενα μονοπάτια καζεΐνης/κινάσης-II (CK2) και τυροσίνης/κινάσης. Με την ανταπόκριση στη σηματοδότηση, φωσφορυλιώνεται η IκΒα, με αποτέλεσμα την αποδόμησή της και την απελευθέρωση του συμπλόκου NF-κΒ. Αυτά τα άτυπα μονοπάτια που είναι ανεξάρτητα του IKK έχουν τη δυνατότητα να επάγουν διαφορετικά τροποποιημένες μορφές NF-κΒ με διακριτές λειτουργίες.

Box 1 | Pathways leading to the activation of NF-κΒ



Εικόνα 25: Τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος του NF-κΒ. (Perkins, 2007)

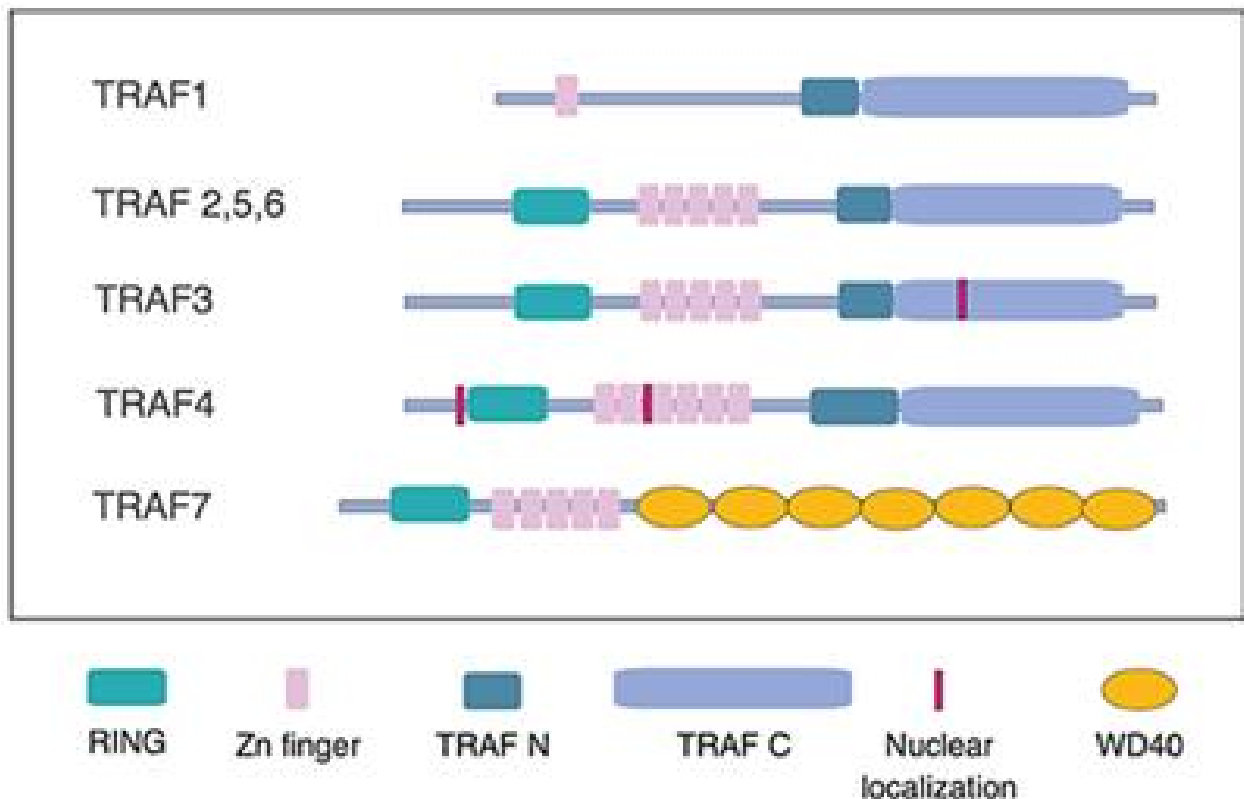
3.2.3 Ο NF-κB στον καρκίνο

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σε πολλούς τύπους καρκίνου – συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού – παρατηρείται συστηματική ενεργοποίηση του NF-κB. Γενικά, στο μικροπεριβάλλον του όγκου, παρατηρείται φλεγμονώδης φαινότυπος. Όσο ο όγκος αυξάνεται σε μέγεθος, ο περιβάλλον ιστός χάνει τη διάταξή του, με αποτέλεσμα διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος να σπεύδουν να «επιδιορθώσουν» τη βλάβη. Αυτά τα κύτταρα είναι πλούσια σε κυτταροκίνες, αυξητικούς και αγγειογενετικούς παράγοντες, οι οποίοι σε πολύ μικρό ποσοστό εναντιώνονται στα νεοπλασματικά κύτταρα. Κατά κύριο λόγο, ευνοούν τον πολλαπλασιασμό τους και άρα την επιβίωσή τους. Η αλληλεπίδραση αυτή των καρκινικών κυττάρων με τους αντιφλεγμονώδεις παράγοντες, πυροδοτούν έναν καταρράκτη μεταγωγής σήματος, ενεργοποιώντας διάφορα μόρια, συμπεριλαμβανομένου του NF-κB. Τα γονίδια-στόχοι του NF-κB είναι κυρίως γονίδια που παράγουν πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν σε πολλές λειτουργίες των κυττάρων, όπως στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη φλεγμονή, την απόπτωση, την αγγειογένεση και τη μετάσταση. (Aggarwal & Sung, 2011) (Baldwin, 2001) (Perkins, 2012) Επομένως, η ενεργοποίηση του NF-κB δεν έχει ανασταλτικό ρόλο, αλλά βοηθά στην ανάπτυξη του όγκου. (Hoesel & Schmid, 2013); (Karin, 2006); (Bassères & Baldwin, 2006) Αυτό επιτυγχάνεται με πολλούς τρόπους.

Πρώτον, ο NF-κB ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την έκφραση ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, όπως είναι η κυκλίνη D1 (ελέγχει τη μετάβαση G1 → S). Με αυτόν τον τρόπο, δίνει συνεχώς σήμα για διπλασιασμό του γενετικού υλικού και αύξηση των κυττάρων. (Guttridge, et al., 1999) Παράλληλα, με την ενεργοποίησή του, αναστέλλεται η διαδικασία της απόπτωσης, είτε γιατί ενεργοποιούνται αντι-αποπτωτικά γονίδια, είτε γιατί η έκφραση των γονιδίων που προάγουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο είναι μειωμένη. (Gyrd-Hansen & Meier, 2010) Είναι γνωστό ότι ένας όγκος θρέφεται με οξυγόνο και θρεπτικές ουσίες για να αυξήσει το μέγεθός του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η περιοχή γύρω από τον όγκο να είναι αγγειοβριθής. Καθώς ενεργοποιείται ο NF-κB, δίνει ένασμα στην έκφραση διαφόρων πρωτεϊνών που εμπλέκονται θετικά στην αγγειογένεση, όπως οι IL-8, TNF α , VEGF κ.ά.

3.3 Η οικογένεια TRAF

Η οικογένεια πρωτεϊνών TRAF (TNF Receptor Associated Factors) αποτελείται από 7 μέλη, τις πρωτεΐνες TRAF1–TRAF7. Είναι παράγοντες που σχετίζονται με τον TNFR υποδοχέα και αντιπροσωπεύουν μια οικογένεια πρωτεϊνών κυτταροπλασματικής σηματοδότησης, με κύρια λειτουργία, τη ρύθμιση και δέσμευση της σηματοδότησης των υποδοχέων που ενεργοποιούν ή αναστέλλουν, το κανονικό και εναλλακτικό μονοπάτι μεταγωγής σήματος του NF-κB. Οι πρωτεΐνες αυτές, προσδένονται στους TNFR υποδοχείς, για να βοηθήσουν στη διαδικασία μεταγωγής σήματος προς το σύμπλοκο IKK κινασών. (Inoue , et al., 2000) Γενικά, η μεταγωγή του εξωκυττάριου σήματος προς το εσωτερικό του κυττάρου είναι μια διαδικασία που δεν μπορούν να κάνουν οι TNFR υποδοχείς από μόνοι τους. Οι πρωτεΐνες TRAF επίσης συνδέονται με τους υποδοχείς IL-1R, TLRs, RLRs, NLRs και με υποδοχείς για τις IL-17, IL-2, IFN και TGF-β. Ο βιολογικός ρόλος των πρωτεϊνών TRAF είναι η ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης και της λειτουργίας των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Επιπλέον, είναι θεμελιώδεις ρυθμιστές της οξείας και χρόνιας φλεγμονής. (Siegmund, et al., 2022)



Εικόνα 26: Σχηματική απεικόνιση της δομής των TRAF πρωτεϊνών (Bishop, et al., 2019)

Αναφορικά με τη δομή τους, οι πρωτεΐνες TRAF είναι δομικά ομόλογες. Στο CF τους, όλες οι TRAFs –εκτός από την TRAF7– φέρουν μία χαρακτηριστική, συντηρημένη αλληλουχία 180 αμινοξέων, την επικράτεια TRAF (TRAF Domain), η οποία αποτελείται από δύο υπο-περιοχές, την TRAF-N ή επικράτεια εσπειραμένης έλικας (Coiled – Coil Domain) και την επικράτεια TRAF-C που επιτρέπει στα μόρια TRAF να σχηματίσουν ομο- ή ετερο-διμερισμό και να αναγνωρίσουν τα κυτταροπλασματικά άκρα των σχετικών υποδοχέων. Στο NF τους, μεσολαβεί στη σηματοδότηση και στη στρατολόγηση των ενζύμων, μια εύκαμπτη α-ελικοειδής δομή από μοτίβα ZN και RING Fingers. Εκτός από την TRAF1, οι υπόλοιπες πρωτεΐνες TRAF, φέρουν στο NF τους μία επικράτεια RING δακτύλου [(Really Interesting New Gene, RING) Finger]. Ο τομέας RING αντιπροσωπεύει το 2^ο δομικά ομόλογο στοιχείο που μοιράζονται οι περισσότερες πρωτεΐνες TRAF μεταξύ τους και ο κύριος ρόλος του είναι να δίνει στα TRAFs τη δυνατότητα να δρουν ως λιγάσες ουβικουϊτίνης E3. Ανάμεσα στη RING Domain και στην Coil Domain, βρίσκονται δάκτυλοι ψευδαργύρου (ZN, Zinc Fingers), ο αριθμός των οποίων ποικίλλει ανά πρωτεΐνη TRAF. Πιο συγκεκριμένα, η TRAF1 και η TRAF7 έχουν από 1 ZN στο αμινοτελικό άκρο τους, οι TRAF2, TRAF3, TRAF5 και TRAF6 έχουν από 5 ZNs, ενώ η TRAF4 έχει 7 ZNs. Όλες οι πρωτεΐνες της οικογένειας TRAF εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα. Εξάιρεση αποτελεί η TRAF4 που διαθέτει 2 σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και εντοπίζεται στον πυρήνα. (So, 2021) (Park, 2018)

3.3.2 TRAF2

Η TRAF2 είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 56 kDa που εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα, είναι «Ubiquitously expressed». Οι διάφορες υπο-περιοχές της ευθύνονται για την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες. Μέσω της TRAF-N και της TRAF-C, η TRAF2 συνδέεται με τους υποδοχείς TNFR1-, TNFR2- RANK- (Receptor Activator of NF-κB), OX40- και CD40 και εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της σηματοδότησής τους. Επίσης ρυθμίζει φλεγμονώδεις αποκρίσεις που προκαλούνται από τα NLRs, RIG-I και άλλους υποδοχείς κυτοκινών, όπως IL-6R και IL-17R. Παράλληλα, οι TRAF-N και TRAF-C, μεσολαβούν στη δέσμευση της TRAF1 και της ίδιας της TRAF2, ώστε να προκύψει η δημιουργία ομοδιμερούς. Η επικράτεια RING έχει δράση λιγάσης ουβικουϊτίνης στην κανονική οδό ενεργοποίησης του NF-κB, καθώς ενεργοποιεί την IKKβ και απελευθερώνει τον NF-κB στον πυρήνα. Αυτές οι διεργασίες πυροδοτούν την έκφραση φλεγμονωδών γονιδίων και προάγουν την κυτταρική επιβίωση. (Takeuchi & Goeddel, 1996) (Lalani, et al., 2018)

Πρέπει να αναφερθεί ότι, η παρατεταμένη διέγερση του TNFR2, μπορεί να οδηγήσει στην απενεργοποίηση του TRAF2, με αρνητικό αποτέλεσμα στη ρύθμιση της μη κανονικής σηματοδότησης NF-κB. Τότε, η TRAF1 σταθεροποιεί το TRAF2 προκειμένου να αποτρέψει αυτό το φαινόμενο. Όμως, η έλλειψη του TRAF2 καταργεί τη σηματοδότηση TNF-α, οδηγεί σε χρόνια φλεγμονή, προκαλώντας απορρύθμιση της οδού NF-κB. Πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ότι η ανεπάρκεια σε TRAF2 είναι θανατηφόρα λόγω υπερ-φλεγμονής που προκαλείται από τον TNF-α . (Gissler, et al., 2022)

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Εν συνεχεία αυτών των δεδομένων, ο σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής/πτυχιακής εργασίας είναι η διερεύνηση πιθανής συσχέτισης της πρωτεΐνης GATA3 με το TRAF2 και το RelB, συστατικά που παίρνουν μέρος στο μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Για να επιτευχθεί αυτό, ακολούθησε η τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης (Immunoprecipitation, IP) στις κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού BT474 και η τεχνική της ανοσοϊστοχημείας σε ER+ τομές καρκίνου μαστού.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ιστορικό υλικού

Για τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης, χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές BT474 (ER+, PR+, HER2+) και ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης TRAF2.

Για τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας, χρησιμοποιήθηκαν καρκινικοί ιστοί εγκλεισμένοι σε κύβους παραφίνης από 10 ασθενείς. Από τους κύβους, πάρθηκαν ιστολογικές τομές 4μm και μελετήθηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών GATA3, TRAF2 και RelB, με ειδικά αντισώματα έναντι αυτών των πρωτεϊνών. Οι κύβοι παραφίνης προέρχονται από τα αρχεία του εργαστηρίου Ογκολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών και η μελέτη έγινε σεβόμενη τις οδηγίες περί προσωπικών δεδομένων.

Ανοσοκατακρήμνιση

Αρχή Μεθόδου

Πρόκειται για μια ποιοτική τεχνική που στηρίζεται στη σύνδεση αντιγόνου – αντισώματος. Τα πρωτεϊνικά αντιγόνα, αφού αντιδράσουν με εξειδικευμένο αντίσωμα, δεσμεύονται σε σφαιρίδια και δημιουργούν ένα σύμπλοκο, το οποίο και κατακρημνίζεται. Για την επεξεργασία των δεδομένων ακολουθεί ηλεκτροφορητική ανάλυση, αφού προηγουμένως έχει απομονωθεί το αντιγόνο.

Αντιγόνο

Το αντιγόνο είναι ένα μόριο που μπορεί να αναγνωριστεί από τα T και B λεμφοκύτταρα και να προκαλέσει ανοσολογική απόκριση στον ξενιστή, δηλαδή την παραγωγή αντισωμάτων

ειδικών για τους επιτόπους του αντιγόνου. Κάθε αντιγόνο έχει πολλούς αντιγονικούς καθοριστές (επιτόπους), που αναγνωρίζονται από διαφορετικά αντισώματα.

Αντίσωμα

Το αντίσωμα είναι μια τετραμερής πολυπεπτιδική αλυσίδα που αποτελείται από 2 βαριές και 2 ελαφριές επιμέρους αλυσίδες. Ο συνδυασμός των βαρέων με των ελαφριών αλυσίδων, καθορίζει την ειδικότητα του αντισώματος, δηλαδή την ικανότητα του αντισώματος να συνδέεται με ακρίβεια σε έναν αντιγονικό επίτοπο. Παράγονται από τα Β λεμφοκύτταρα όταν ένα αντιγόνο προσβάλλει τον οργανισμό. Τόσο στην ανοσοκατακρήμνιση όσο και στην ανοσοϊστοχημεία χρησιμοποιούνται αντισώματα που ανήκουν στις ανοσοσφαιρίνες IgG και είναι είτε μονοκλωνικά είτε πολυκλωνικά.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα προέρχονται από έναν κλώνο Β λεμφοκυττάρων που αναγνωρίζει έναν συγκεκριμένο αντιγονικό επίτοπο. Παράγονται σε έναν οργανισμό κι έχουν ίδια δομή και ειδικότητα. Τα πολυκλωνικά αντισώματα προέρχονται από πολλούς και διαφορετικούς κλώνους Β λεμφοκυττάρων, συνεπώς αναγνωρίζουν διαφορετικούς αντιγονικούς επιτόπους. Παράγονται σε πολλούς οργανισμούς, έχουν μεγαλύτερη συγγένεια από τα μονοκλωνικά, αλλά έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν ψευδώς θετικό αποτέλεσμα.

Προετοιμασία διαλυμάτων:

PBS 1x

Διάλυμα λύσης: (1%NP-40, 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,5, 0,5 mM EDTA, αναστολείς πρωτεΐνάσης, NaF, Na3VO4)

Dynabeads G (αριθμός κατηγορίας: 10003D, Invitrogen)

50μl FSB/DTT 1x

Πρωτόκολλο Co-IP

1. Ξύθουμε τα κύτταρα από τη βάση του τρυβλίου με παγωμένο PBS 1x και φυγοκεντρούμε.
2. Το ίζημα εναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης NP-40 και αφήνεται σε πάγο για 30 λεπτά

3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 15 λεπτά
4. Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε νέο erpendorf και απορρίπτουμε το ίζημα. Το υπερκείμενο είναι περίπου 1500μg
5. Προσθήκη κατάλληλης συγκέντρωσης αντισώματος και επώαση O/N στους 4°C
6. Προσθήκη 20μl μαγνητικών σφαιριδίων σε κάθε erpendorf αφού πλυθεί 3 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης. Ακολουθεί επώαση για 3 ώρες στους 4°C
7. Αφαίρεση μη δεσμευμένων πρωτεϊνών και τοποθέτησή τους σε άλλο erpendorf
8. Πλύση μαγνητικών σφαιριδίων 3 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης
9. Αφαιρείται όλο το υπολειπόμενο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης και επαναιωρούνται τα σφαιρίδια σε 50μl FSB/DTT 1x
10. Βράζουμε στους 95°C για 5min
11. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ανοσοαποτύπωση Western Blot και οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων μέσω της μεθόδου χημειοφωταύγειας.

Ανοσοϊστοχημεία

Με τον όρο Ανοσοϊστοχημεία περιγράφεται ένας συνδυασμός τεχνικών ιστοπαθολογίας, ανοσολογίας και χημείας, που έχει σαν στόχο τον ακριβή εντοπισμό πρωτεϊνών βάσει της αντίδρασης αντιγόνου – αντισώματος, τόσο σε ιστικό, όσο και σε κυτταρικό επίπεδο.

Χρησιμοποιείται ευρέως στη ρουτίνα ενός παθολογοανατομικού εργαστηρίου ως συμπληρωματική εξέταση, για την εντόπιση προγνωστικών και προβλεπτικών δεικτών, με αποτέλεσμα την επιλογή κατάλληλης θεραπείας για τον ασθενή, όπως και στη διάγνωση δύσκολων περιστατικών, αδιαφοροποίητων νεοπλασμάτων και μεταστατικών όγκων. Σημαντική είναι η συμβολή της στην έρευνα, αφού έδωσε τη δυνατότητα να παρατηρηθεί η έκφραση μιας πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια ανάπτυξης ενός οργανισμού και ο εντοπισμός διαφόρων πρωτεϊνών σε διάφορες περιοχές του ιστού. Η μέθοδος είναι ημιποσοτική και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον άνθρωπο ή σε πειραματόζωα, ακόμα και σε νεκρωτικά δείγματα. Έχει, επίσης, μεγάλη ειδικότητα, ευαισθησία, επαναληψιμότητα και είναι σχετικά γρήγορη μέθοδος.

Αρχή Μεθόδου

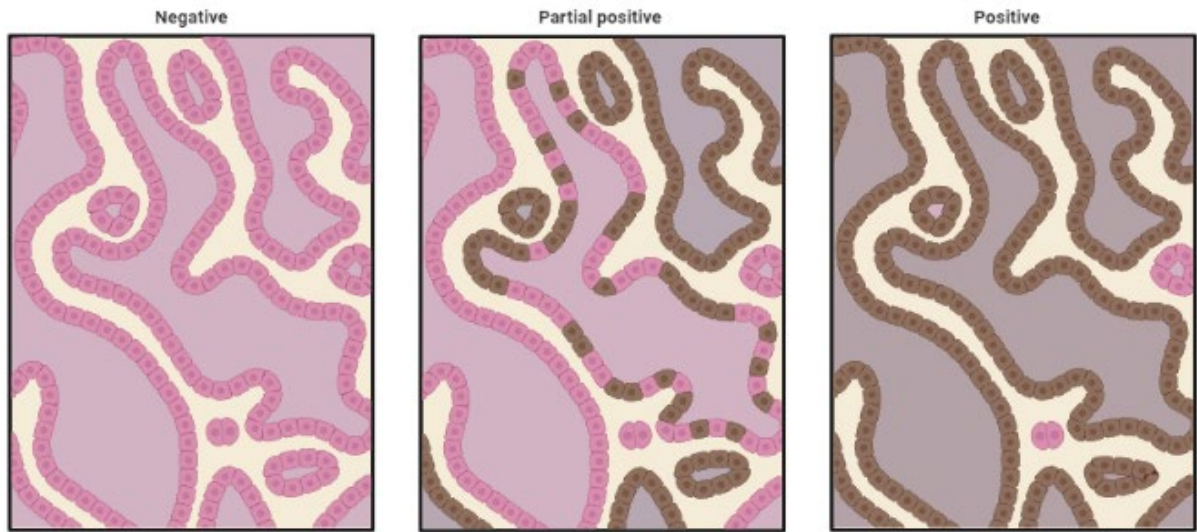
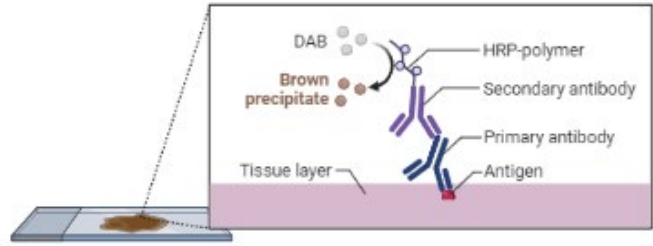
Η αρχή μεθόδου της ανοσοϊστοχημείας βασίζεται στην ιδιότητα ενός σεσημασμένου αντισώματος να εντοπίζει και να κατευθύνεται προς το ειδικό αντιγόνο, προκαλώντας χημική αντίδραση, με αποτέλεσμα την ορατή σύζευξη αντιγόνου – αντισώματος, σε οπτικό, ηλεκτρονικό ή φθορίζον μικροσκόπιο, χωρίς την αλλοίωση των ιστών και των κυττάρων.

Έμμεση Μέθοδος

Στην έμμεση μέθοδο, παρασκευάζεται σημασμένο αντίσωμα έναντι του πρωτογενούς αντισώματος, που αναγνωρίζει το αντιγόνο. Αμέσως μετά την αντίδραση του πρωτογενούς αντισώματος με το αντιγόνο, το παρασκεύασμα ξεπλένεται για να απομακρυνθεί το πρωτογενές αντίσωμα που δεν δεσμεύθηκε. Στη συνέχεια, προστίθεται το σημασμένο δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει το πρωτογενές και αντιδρά με το αρχικό σύμπλεγμα αντιγόνου – αντισώματος, σχηματίζοντας δευτερογενές σύμπλεγμα, ορατό με μικροσκόπιο. Το δευτερογενές αντίσωμα μπορεί να είναι σημασμένο με φθορίζουσα ουσία ή ένζυμο (HRP ή AP) ή άλλες ενώσεις (π.χ. βιοτίνη). Το πρωτογενές αντίσωμα θα πρέπει να παραχθεί σε ένα είδος (π.χ. ποντικό) και το δευτερογενές σε ένα άλλο είδος (π.χ. κουνέλι), ώστε η αλληλουχία των αμινοξέων να είναι διαφορετική για το 2^ο είδος, άρα να το αναγνωρίσει ως ξένο –αντιγόνο– και να αρχίσει η παραγωγή αντισωμάτων εναντίον του.

Το δείγμα του ιστού που πρόκειται να βαφτεί με ανοσοϊστοχημική χρώση, έχει περάσει από τα στάδια επεξεργασίας: μονιμοποίηση, αφυδάτωση, διαύγαση, σκλήρωμα, παραγωγή ιστολογικών τομών και τοποθέτησή τους σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Η ουδέτερη φορμόλη που χρησιμοποιείται ως το κύριο μονιμοποιητικό στην Παθολογική Ανατομική, διατηρεί τη μορφολογία των ιστών που εξετάζονται, αλλά μειώνει την αντιγονικότητά τους. Αυτό γίνεται, γιατί δημιουργούνται χημικοί δεσμοί μεταξύ των αμινοξέων των πρωτεϊνών, κατά τη μονιμοποίηση, με αποτέλεσμα τη μεταβολή της τριτοταγούς διαμόρφωσης του πρωτεϊνικού μορίου και την απόκρυψη των αντιγονικών επιτόπων. Σχεδόν το 85% των αντιγόνων απαιτούν ανάκτηση είτε με χρήση ενζύμων (τρυψίνη, πεψίνη, πρωτεϊνάση K) για πέψη των ιστών, είτε με θέρμανση – βρασμό των ιστικών τομών.

Immunohistochemistry: Stain Positivity



By: Theakou M. P.

Created in **BioRender.com** **bio**

Εικόνα 27: Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής της ανοσοϊστοχημείας

Πειραματική Διαδικασία

Λήψη ιστολογικών τομών

Οι κύβοι παραφίνης μικροτομήθηκαν σε πάχος 4 μ m, στη συνέχεια οι τομές τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο 40°C και τέλος σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

Προετοιμασία διαλυμάτων

Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος TBS 1x: 12,5mLTBS 40x σε 487,5mL dH₂O

Παρασκευή διαλύματος DIVA 1x: 20mL DIVA σε 180mL dH₂O

Παρασκευή χρωμογόνου DAB: 40 μ L DAB Solution B (Concentrated) σε 1mL DAB Solution A (Buffered H₂O₂ Ready-to-use)

Αραιώση Αντισωμάτων 1:80 7,5μL Ab + 600μL diluent

Πρωτόκολλο IHC

Το πρωτόκολλο που περιγράφεται, αφορά έμμεση μέθοδο 2 σταδίων σύμφωνα με το kit Immunologic: BrightVision Ultimate plus, two component detection system Goat Anti-Mouse/Rabbit IgG HRP plus DAB (Ready-to-Use).

Αποπαραφίνωση

1. Οι τομές μπαίνουν σε κλίβανο τους 60°C για 30 λεπτά

2. Εμβαπτίζονται σε:

Ευλόλη → 5 λεπτά

Ευλόλη → 5 λεπτά

Ενυδάτωση

3. Εμβαπτίζονται σε:

Αλκοόλη 100% → 1 λεπτό

Αλκοόλη 96% → 1 λεπτό

Αλκοόλη 80% → 1 λεπτό

Αλκοόλη 70% → 1 λεπτό

4. Ξεπλένουμε με dH₂O 1-2 φορές

5. Τοποθετούμε τις τομές σε TBS 1x → 5 λεπτά

Antigen Retrieval

6. Μεταφέρουμε τις τομές σε πλαστικό μπανάκι με DIVA 1x (200mL) στον φούρνο μικροκυμάτων, medium high → 2 λεπτά, medium → 7 λεπτά

7. Βγάζουμε το μπανάκι από τον φούρνο μικροκυμάτων και αφήνουμε να κρυώσουν οι τομές για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

8. Αδειάζουμε λίγο από το DIVA και προσθέτουμε dH₂O. Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για άλλα 10 λεπτά.

9. Ξεπλένουμε με dH₂O

10. Ξεπλένουμε με TBS → 5 λεπτά

11. Ξεπλένουμε με TBS → 5 λεπτά

Δέσμευση 1^ο αντισώματος

12. Προσθέτουμε Primary antibody → 30 λεπτά *

*GATA3 → 60 λεπτά, TRAF2, RelB → O/N

13. Ξεπλένουμε με TBS → 5 λεπτά

14. Ξεπλένουμε με TBS → 5 λεπτά

Σύστημα ανίχνευσης, βήμα 1: Blocking μη ειδικών αντιγονικών επιτόπων

15. Προσθέτουμε Post blocking → 15 λεπτά

16. Ξεπλένουμε με TBS → 5 λεπτά

17. Ξεπλένουμε με TBS → 5 λεπτά

Σύστημα ανίχνευσης, βήμα 2

18. Polymer HRP → 30 λεπτά

19. Ξεπλένουμε με TBS → 5 λεπτά

20. Ξεπλένουμε με TBS → 5 λεπτά

Χρωμογόνο υπόστρωμα

21. Προσθέτουμε πάνω σε κάθε πλακάκι DAB, παρακολουθώντας πότε θα χρωματιστεί το πρώτο πλακάκι

22. Ξεπλένουμε με dH₂O → 2 λεπτά

23. Ξεπλένουμε με dH₂O → 2 λεπτά

Αντίχρωση

24. Τοποθετούμε σε διηθημένη αιματοξυλίνη → 2 λεπτά

25. Ξεπλένουμε με νερό βρύσης 3 φορές

Αφυδάτωση

26. Εμβάπτιση των τομών σε:

Αλκοόλη 70% → 1 λεπτό

Αλκοόλη 80% → 1 λεπτό

Αλκοόλη 96% → 1 λεπτό

Αλκοόλη 100% → 1 λεπτό

Αλκοόλη 100% → 1 λεπτό

Ευλόλη → 5 λεπτά

Ευλόλη → 5 λεπτά

Κάλυψη τομών

27. Μία σταγόνα κόλλα σε κάθε καλυπτρίδα και καλύπτουμε το πλακάκι με την τομή μας

Παρατήρηση στο μικροσκόπιο

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων Ανοσοϊστοχημείας

Πραγματοποιήθηκε μικροσκόπηση των πλακιδίων σε οπτικό μικροσκόπιο και ανοσοϊστοχημική εκτίμηση της έκφρασης των αντισωμάτων GATA3, TRAF2, RelB. Η βαθμολογική κλίμακα κυμαίνεται:

1: Απουσία έκφρασης

2: Ήπια έκφραση

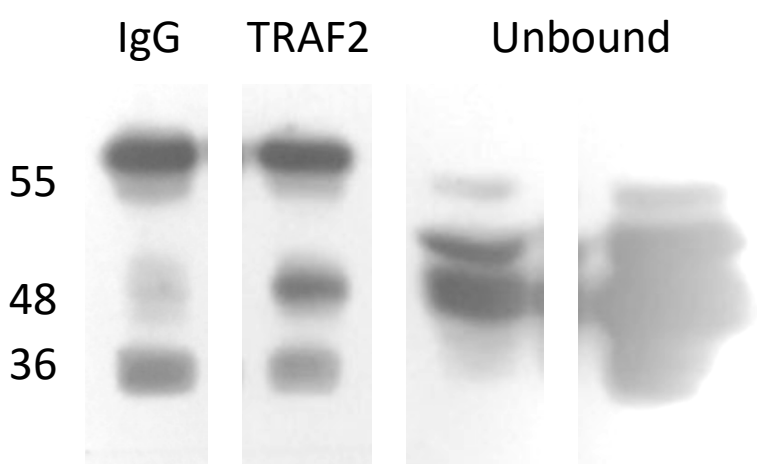
3: Μέτρια έκφραση

4: Έντονη έκφραση

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν θετικά και αρνητικά controls

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ανοσοκατακρήμνιση του TRAF2 σε συνδυασμό με ανάλυση προηγούμενων δεδομένων φασματοφωτομετρίας μάζας, δείχνουν μία πιθανή φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης GATA3 και TRAF2. Το γεγονός ότι μέσω των πειραμάτων αυτών, βρέθηκε πιθανή συσχέτιση μεταξύ τους, δεν μπορεί να αποκλείσει το ενδεχόμενο μιας μεγαλύτερης αλληλεπίδρασης μεταξύ κι άλλων πρωτεϊνών.



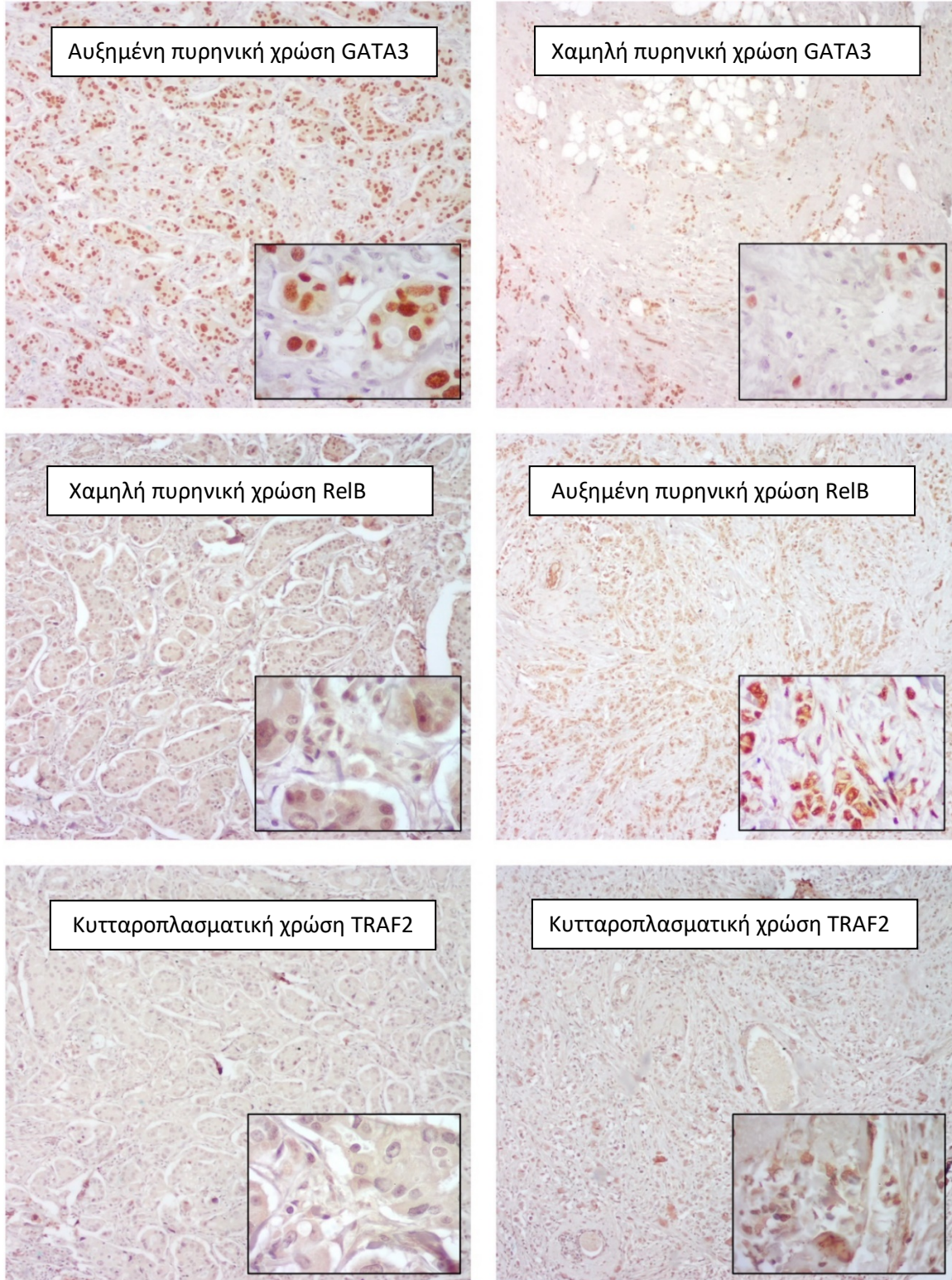
Εικόνα 28: Αποτελέσματα Co-IP

Η πρωτεΐνη GATA3 έχει μοριακό βάρος 48kDa και φαίνεται η εμφάνισή της στις στήλες. Η εμφάνιση αυτή δείχνει ότι πράγματι, υπάρχει σύμπλοκο TRAF2-GATA3 στις κυτταρικές σειρές BT474 που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη.

Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας έδειξαν μία αρνητική συσχέτιση μεταξύ της πρωτεΐνης GATA3 και της πρωτεΐνης RelB. Δηλαδή, σύμφωνα με τα περιστατικά που βάφτηκαν με ανοσοϊστοχημική χρώση, όσα έδειξαν υψηλή έκφραση για GATA3, είχαν χαμηλή έκφραση RelB και το αντίστροφο. Όσο αφορά τις τομές εξετάστηκαν ως προς την έκφρασή τους σε TRAF2, παρατηρήθηκε μια γενικά χαμηλή έκφραση, που όμως μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το αντίσωμα δεν ήταν ready-to-use και είχε χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα.

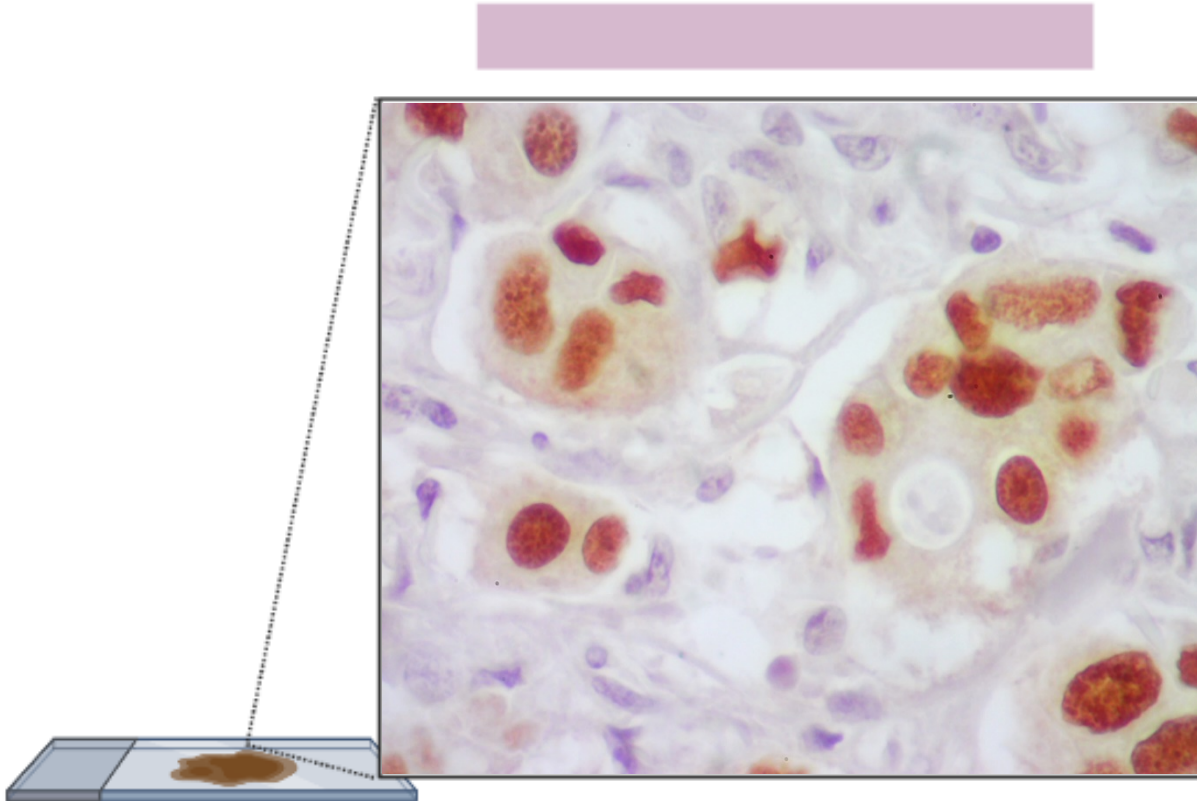
Απεικόνιση αποτελεσμάτων

Σύγκριση αποτελεσμάτων ανοσοϊστοχημείας μεταξύ 2 πλακιδίων για GATA3, TRAF2, RelB



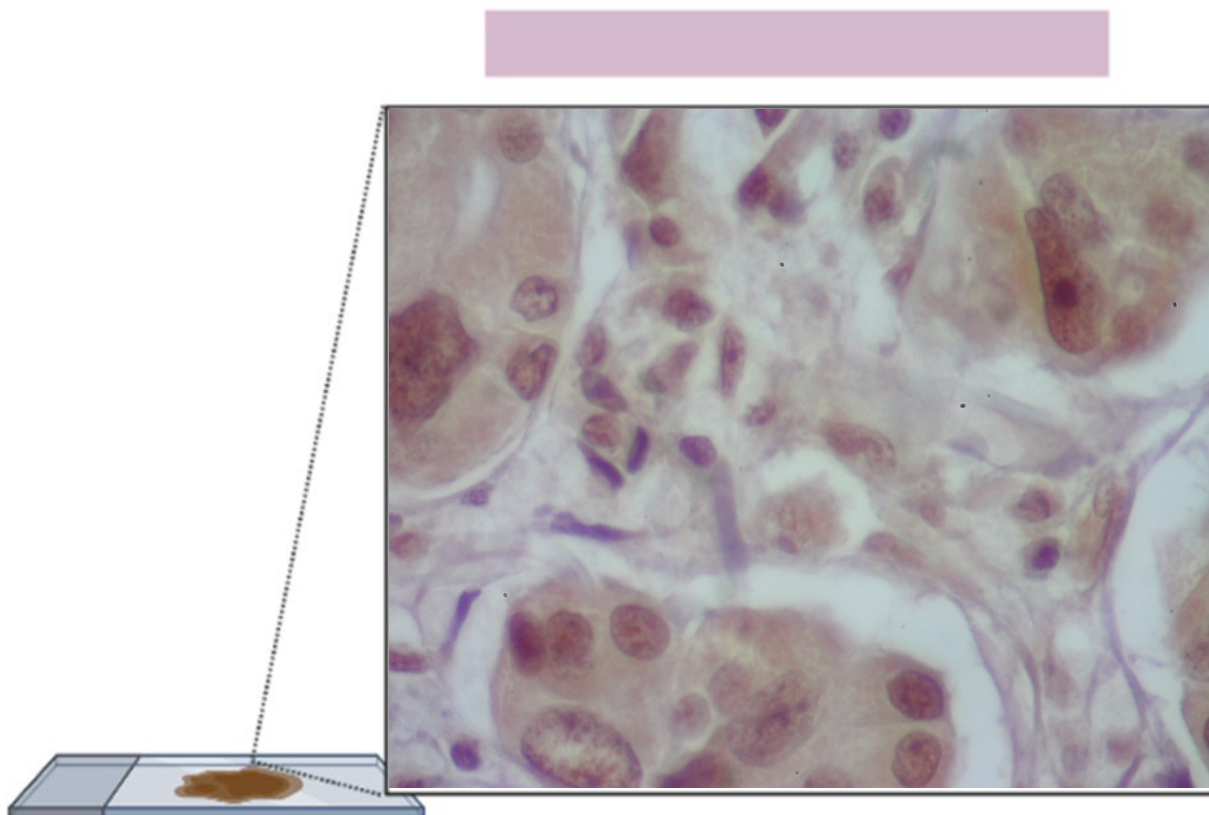
Εικόνα 29: Αποτελέσματα IHC

Immunohistochemistry: Stain Positivity



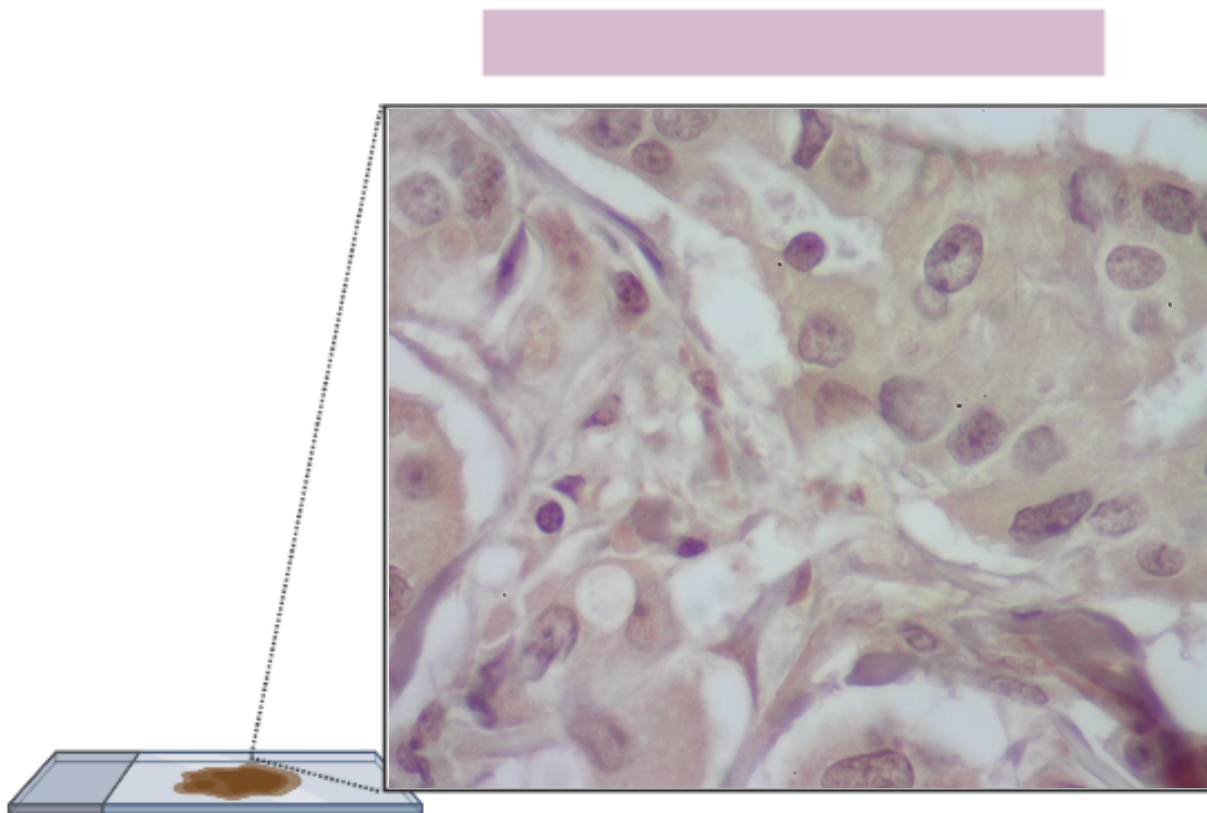
Εικόνα 30: Ανοσοϊστοχημική χρώση. Μεγέθυνση X400. Αυξημένη έκφραση GATA3. Πλακίδιο 1

Immunohistochemistry: Stain Positivity



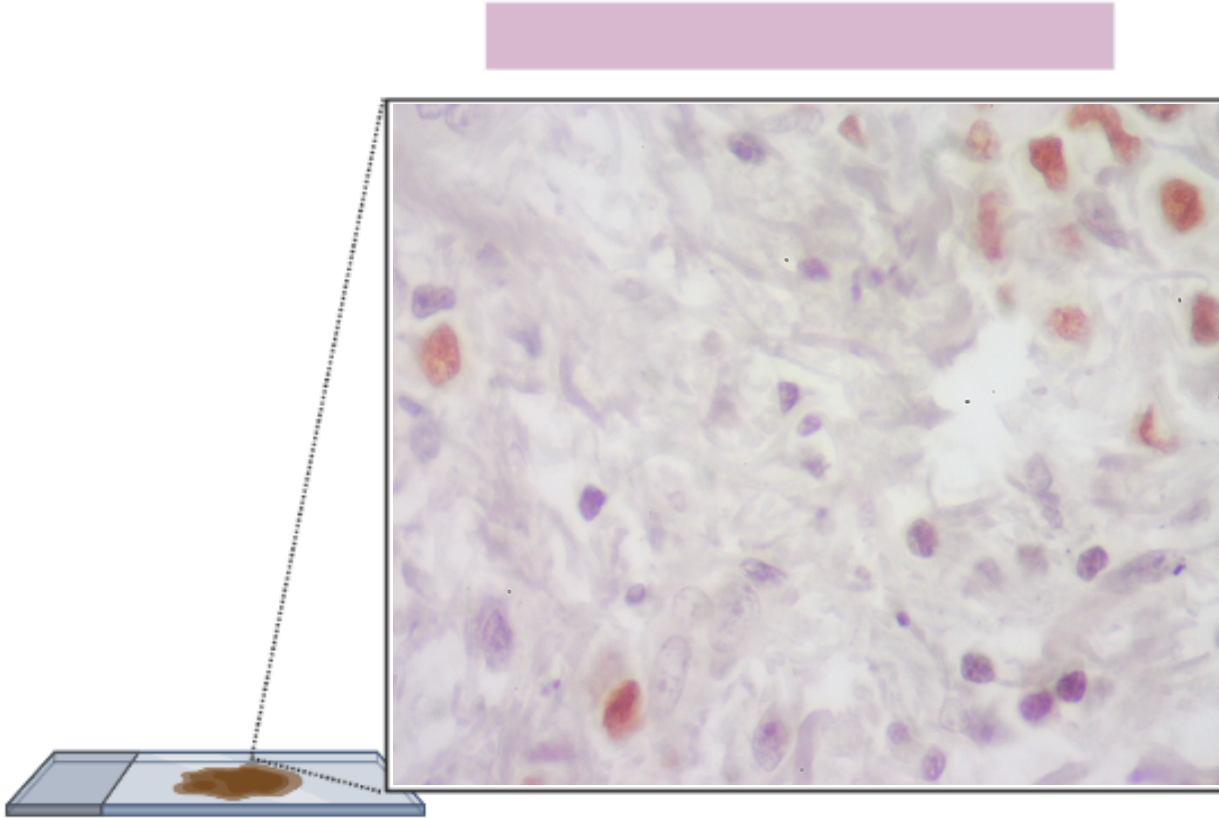
Εικόνα 31: Ανοσοϊστοχημική χρώση. Μεγέθυνση X400. Μειωμένη έκφραση RelB. Πλακίδιο 1

Immunohistochemistry: Stain Positivity



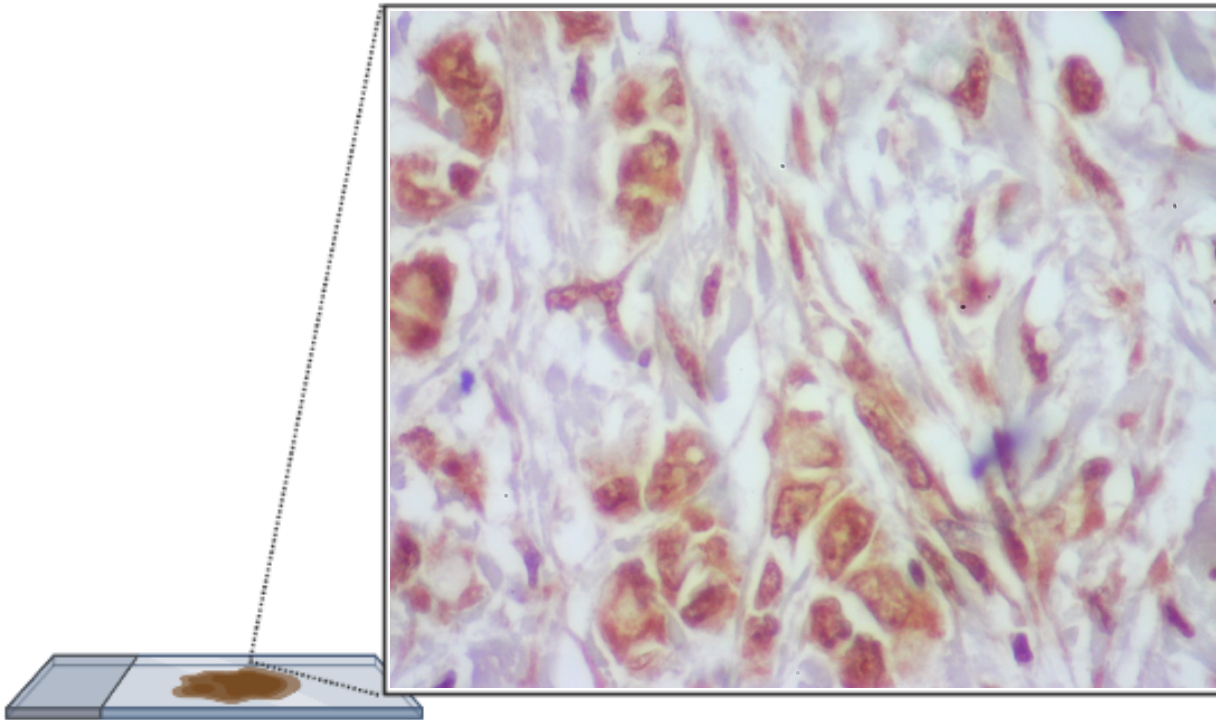
Εικόνα 32: Ανοσοϊστοχημική χρώση. Μεγέθυνση X400. Έκφραση TRAF2. Πλακίδιο 1

Immunohistochemistry: Stain Positivity



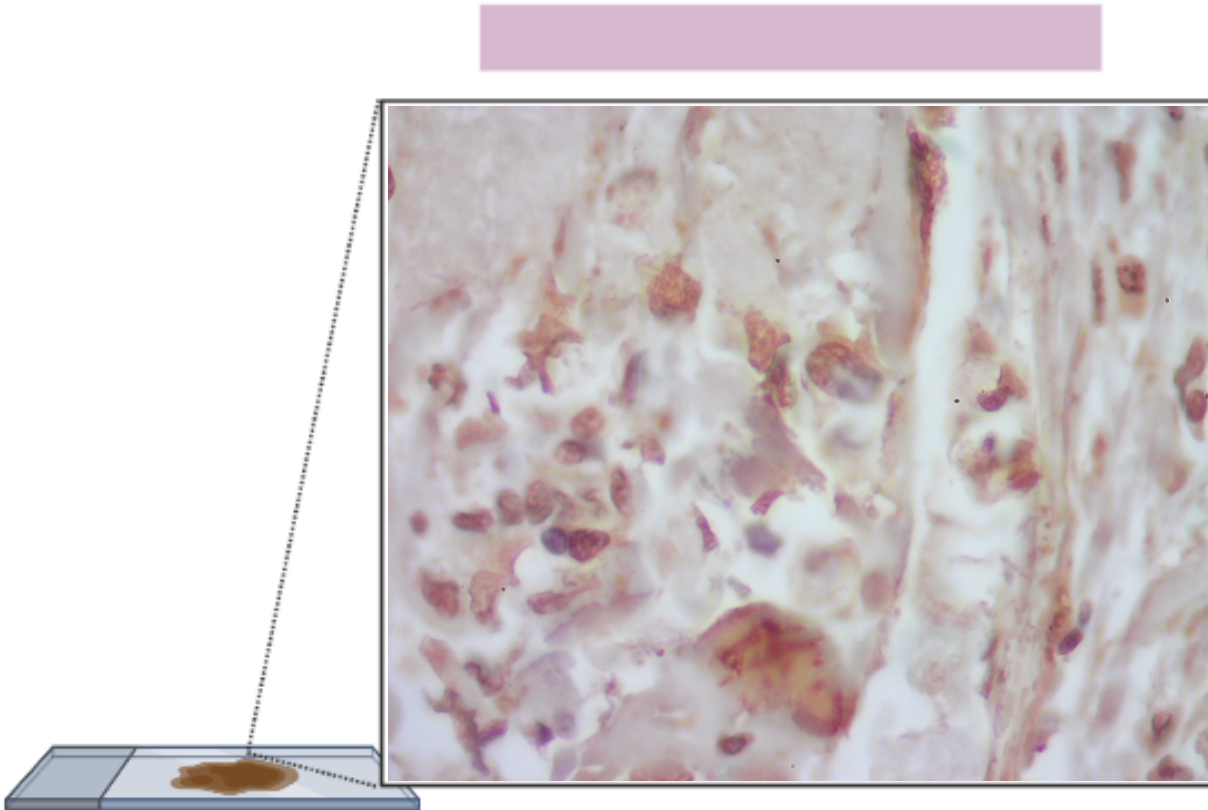
Εικόνα 33: Ανοσοϊστοχημική χρώση. Μεγέθυνση X400. Μειωμένη έκφραση GATA3. Πλακίδιο 2

Immunohistochemistry: Stain Positivity



Εικόνα 34: Ανοσοϊστοχημική χρώση. Μεγέθυνση X400. Αυξημένη έκφραση RelB. Πλακίδιο 2

Immunohistochemistry: Stain Positivity



Εικόνα 35: Ανοσοϊστοχημική χρώση. Μεγέθυνση X400. Έκφραση TRAF2. Πλακίδιο 2

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το σύστημα NF-κB γενικά επηρεάζει μια ποικιλία διαδικασιών που σχετίζονται με τον καρκίνο και έτσι δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι το TRAF2 μέσω του ρόλου του στη σηματοδότηση NF-κB, όχι μόνο συμβάλλει στην κακοήγη μετατροπή του λεμφώματος, αλλά και στην ανάπτυξη συμπαγών καρκίνων, όπως είναι ο καρκίνος του μαστού. Για παράδειγμα, σε καρκίνος του μαστού υπάρχουν άφθονες ενδείξεις ότι η σηματοδότηση NF-κB προάγει την εξέλιξη του όγκου, τη μετάσταση και αντίσταση στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία (Park, 2018). Ίσως το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι ο ρόλος της σύνδεσης TRAF2 – NF-κB στον μετασχηματισμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού από το ογκογονίδιο του καρκίνου του μαστού IκB κινάση ε (IKKε). Η έκφραση IKKε ρυθμίζεται προς τα πάνω σε >30% των καρκίνων του μαστού. Το IKKε διεγείρει την ουβικουϊτινυλίωση των συμπλοκών TRAF2-cIAP1 και TRAF2-cIAP2 με φωσφορυλίωση της σερίνης 11 στο TRAF2. Αυτό, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NF-κB, επιδρώντας στα κύτταρα π.χ. με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, πριν την *in vitro* και *in vivo* ογκογένεση. (Shen, et al., 2012)

Η δραστηριότητα του TRAF2 στο καρκίνωμα του μαστού είναι επίσης εμφανής μέσα από πειράματα που έγιναν σε κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού MDA-MB-231, στις οποίες πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση του TRAF2. Έπειτα διαμολύνθηκαν ποντικοί με ένεση στο μαστικό λίπος και παρατηρήθηκε ενισχυμένη ανάπτυξη όγκου. Διαμόλυνση ποντικών ενδοκνημιαία έδειξε επίσης αυξημένους σκελετικούς όγκους. (Peramuhendige, et al., 2018)

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, για τον καρκίνο του μαστού, ο άξονας RANK/RANKL ρυθμίζει την έναρξη, εξέλιξη και μετάσταση της νόσου. (Papanastasiou, et al., 2012) Όταν οι πρωτεΐνες TRAF2, TRAF5 και TRAF6 προσδεθούν στον παράγοντα RANK, ενεργοποιείται η σηματοδοτική πορεία του NF-κB, κι έπειτα από φωσφορυλίωση των IKKs, ο NF-κB μετατοπίζεται στον πυρήνα. Αρνητικός ρυθμιστής αυτής της ενεργοποίησης είναι μια μεταλλαγμένη ισομορφή του RANK, ο RANK-c, που εκφράζεται σε μικρό ποσοστό καρκινωμάτων μαστού, τόσο ER+, όσο και ER- καρκινωμάτων. Η παρουσία του σε ER- κυτταροκαλλιέργειες φαίνεται να εμποδίζει την ενεργοποίηση του NF-κB, με αποτέλεσμα να εξασθενίσουν ιδιότητες των κυττάρων όπως η μετανάστευση, ο σχηματισμός αποικιών, η προσκόλληση καρκινικών κυττάρων κ.ά. Δηλαδή, με την απενεργοποίηση του NF-κB, μάλλον, εξασθένησε η επιθετικότητα των όγκων, γεγονός που μοιάζει να βασίζεται στην πρωτεΐνη TRAF2. Όπως επιβεβαίωσαν οι (Sirinian C. Papanastasiou AD, et al., 2018), ένα

μεταλλαγμένο RANK-c, αδυνατεί να αλληλεπιδράσει με τον TRAF2, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να αναστείλει την ενεργοποίηση του NF-κB και κατά συνέπεια, ούτε τις επιθετικές ιδιότητες των κυττάρων. Ωστόσο, ο RANK-c, δεδομένου ότι οι ER+ και οι ER- όγκοι έχουν διαφορετική μοριακή παθολογία, μπορεί να επιδρά διαφορετικά στα αντίστοιχα καρκινικά κύτταρα. Η υψηλή έκφραση του GATA3 στους ER+ όγκους συνοδεύεται γενικά με καλή πρόγνωση, σε αντίθεση με όγκους που δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη και έχουν δυσμενέστερη πρόγνωση. (Jiang, et al., 2014). Ανάλυση νεότερων δεδομένων φασματομετρίας μάζας, υποδεικνύουν την ύπαρξη μιας φυσικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του TRAF2 και του GATA3, χωρίς φυσικά να αποκλείεται η πιθανότητα ύπαρξης ενός μεγαλύτερου πρωτεϊνικού συμπλόκου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο καρκίνος, γενικά και ο καρκίνος του μαστού, ειδικότερα, είναι μία ασθένεια πολύπλοκη, με πληθώρα πρωτεϊνών και γονιδίων να παίρνουν μέρος στις διαδικασίες της καρκινογένεσης, ανάπτυξης και μετάστασης του όγκου. Φυσιολογικά στον μαστό έχει πολύ σημαντικό ρόλο η πρωτεΐνη GATA3, η οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία εκφράζεται όχι μόνο στα φυσιολογικά κύτταρα, αλλά και στη νεοπλασία. Συγκεκριμένα, λόγω της αλληλεπίδρασης με τον ERα υποδοχέα οιστρογόνων, εκφράζεται κυρίως σε ER+ καρκινώματα μαστού. Η υψηλή του έκφραση σε αυτούς τους όγκους συνοδεύεται γενικά με καλή πρόγνωση, σε αντίθεση με όγκους που δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη GATA3 και έχουν δυσμενέστερη πρόγνωση. Αυτό έχει προκύψει σύμφωνα με μελέτες και στατιστικά δεδομένα, χωρίς να αποτελεί κανόνα στην εξέλιξη της νεοπλασίας. Από την άλλη, όπως αναφέρθηκε, η παρουσία του NF-κB, δείχνει μία όχι τόσο καλή πρόγνωση σε καρκίνους μαστού. Έχει μεγάλο ενδιαφέρον, αν υπάρχει ή όχι αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες και με τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας, φάνηκε, να υπάρχει μια φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ του TRAF2 και του GATA3. Η αλληλεπίδραση αυτή χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, καθώς δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα αν η αλληλεπίδραση αφορά αυτά τα δύο μόρια ή συμμετέχει ένα μεγαλύτερο πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Παράλληλα, η ανοσοϊστοχημική χρώση που έγινε, έδειξε μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ του GATA3 και του RelB, γεγονός που φάνηκε από την έκφρασή τους στις τομές των ασθενών. Σε ασθενή με αυξημένη ανοσοϊστοχημική χρώση με GATA3, υπήρξε μειωμένη ανοσοϊστοχημική χρώση με RelB και το αντίστροφο. Είναι επιτακτική ανάγκη να γίνουν περαιτέρω μελέτες με περισσότερα δείγματα, ώστε να οδηγήσουν σε μία καλύτερη κατανόηση της σχέσης της πρωτεΐνης GATA3 με τα μονοπάτια σηματοδότησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Τα δεδομένα αυτά θα μπορέσουν να αξιοποιηθούν αποτελεσματικότερα στην πρόγνωση και κλινική εξέλιξη του καρκίνου του μαστού, καθώς και στην εφαρμογή της κατάλληλης θεραπείας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aggarwal, B. & Sung, B., 2011. NF-kappaB in cancer: a matter of life and death. *Cancer Discov.*
- Allred, C., 2010. Ductal Carcinoma In Situ: Terminology, Classification, and Natural History.
- American Cancer Society, Inc., Surveillance Research, 2022. s.l.: s.n.
- American Cancer Society, Inc., 2019. Breast Cancer Facts & Figures 2019-2020.
- American Cancer Society, Inc., 2022. Cancer Facts & Figures 2022.
- Anon., n.d. *Macmillan Cancer Support*. [Online].
- Baldwin, A., 2001. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-κB. *J Clin Invest.*
- Bassères, D. & Baldwin, A., 2006. Nuclear factor-kappa B and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene.*
- Bishop, G. A., Abdul-Sater, A. A. & Watts, T. H., 2019. Editorial: TRAF Proteins in Health and Disease. *Frontiers in Immunology.*
- Chou, J., Provot, S. & Werb, Z., 2009. GATA3 in development and cancer differentiation: Cells GATA have it!. *Journal of Cellular Physiology*.
- Courtois, G. & Fauvarque, M., 2018. The many roles of ubiquitin in Nf-kB Signaling. *Biomedicines.*
- Ellis, H. & Mahadevan, V., 2013. Anatomy and Physiology of the Breast. *Surgery.*
- Eroles P, e. a., 2012. Molecular Biology in Breast Cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, October, pp. 698-707.
- Espinosa, L., Bigas, A. & Mulero, M., 2011. Alternative nuclear functions for NFkappaB family members.. *Am J Cancer Res.*
- Gartner, L. P., 2018. *Ιστολογία 4η Έκδοση*. s.l.:Παρισιάνου Α.Ε.
- Giordano, S. H., 2018. Breast Cancer in Men. *The New England Journal of Medicine*, 14 June, pp. 2311-2320.
- Giordano, S. H., 2018. Breast Cancer in Men. *The New England Journal of Medicine.*
- Gissler, M. C., Stachon, P., Wolf, D. & Marchini, T., 2022. The Role of Tumor Necrosis Factor Associated Factors (TRAFs) in Vascular Inflammation and Atherosclerosis. *frontiers in Cardiovascular Medicine.*
- Guttridge, D. et al., 1999. Nf-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol.*
- Gyrd-Hansen, M. & Meier, P., 2010. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kB, inflammation and cancer. *Nature Reviews Cancer.*

- Hansen, J. T. & Lambert, D. R., 2011. *Ανατομία I Βασική Κλινική Ανατομία*. s.l.:Π.Χ. Πασχαλίδης.
- Hayden , M. & Gosh, S., 2008. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*.
- Hoda, S. A., 2016. Ductal Carcinoma In Situ.
- Hoesel, B. & Schmid, L., 2013. The complexity of NF-kB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*.
- Inoue , J.-I.et al., 2000. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: Adapter proteins that mediate cytokine signaling.. *Experimental Cell Research* .
- Jesinger, R. A., 2014. Breast Anatomy for the interventionalist. *Tech Vasc Interv Radiol*, Mar.
- Jiang, Y. et al., 2014. GATA3 mutations define a unique subtype of luminal-like breast cancer with improved survival. *Cancer*.
- Karin, M., 2006. NF-κB in cancer development and progression. *Nature*.
- Khan , Y. & Sajjad, H., 2021. *Anatomy, Thorax, Mammary Gland*. s.l.:StatPearls.
- Knudson, A. G., 2002. Cancer genetics. *American Journal of Medical Genetics*, 7 June, 111(1), pp. 96-102.
- Kouros-Mehr, H. et al., 2008. GATA3 links tumor differentiation and dissemination in a luminal breast cancer model. *Cancer Cell*.
- Kouros-Mehr, H., Slorach, E., Sternlicht, M. & Werb, Z., 2006. GATA3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. *Cell*.
- Kumar, A. A., 2007. *Robbins Βασική Παθολογική Ανατομική*. s.l.:Παρισιάνου Α.Ε..
- Kumar, V., Abbas, A. K. & Aster, J. C., 2018. *Robbins Basic Pathology*. 10th edition ed. s.l.:s.n.
- Laird, P. W., 2005. Departments of Surgery and of Biochemistry and Molecular Biology.
- Lalani, A. et al., 2018. TRAF molecules in inflammation and inflammatory diseases. *Curr Pharmacol Rep*.
- Lentjes, M. H. et al., 2016. The emerging role of GATA transcription factors in development and disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*.
- Luck A. A., e. a., 2008. The influence of basal phenotype on the metastatic pattern of breast cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, pp. 40-45.
- Luo, J.-L., Kamat, H. & Karin, M., 2005. IKK/NF-κB signaling: balancing life and death - a new approach to cancer therapy. *The journal of Clinical Investigation*.
- Marchiò, C., Geyer, F. C. & Reis-Filho, J. S., 2017. Pathology and Epidemiology of Cancer. *Springer International*.
- McCance, K. & Roberts, L., 2006. Biology of Cancer. In: *Pathophysiology: The Biologic Basis for Disease, in Adults and Children*. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings.

- Mescher, A. L., 2015. *Janqueira's Βασική Ιστολογία*. s.l.:Π.Χ. Πασχαλίδης.
- Michael , R. & Wojciech, P., 2015. *Histology: A text and Atlas: With correlated cell and molecular biology*. s.l.:s.n.
- Micheau, A., 2012. *IMAIOS*. [Online].
- Miettinen, M. et al., 2014. GATA3 - A multipsecific but potentially useful marker in surgical pathology - A systematic analysis of 2500 epithelial and non-epithelial tumors. *Am J Surg Pathol* .
- Moore, K. L., Dalley, A. F. & Agur, A. M., 2016. *Κλινική Ανατομία*. s.l.:Π.Χ. Πασχαλίδης.
- Muhammad Khurram Zia, S. I. A. , H. A. W. ,. O. S. ,. e. a., 2019. *Case Report: Myiasis as a rare complication of invasive ductal carcinoma*. [Online].
- Nair, M. & Peate, I., 2012. *Παθοφυσιολογία. Βασικές Αρχές Εφαρμοσμένης Παθολογικής Φυσιολογίας*. s.l.:Π.Χ. Πασχαλίδης.
- Nesbit , M. et al., 2004. Characterization of GATA3 mutations in the hypoparathyroidism, deafness, and renal dysplasia (HDR) syndrome.. *mBiol Chem*.
- NHS Harrogate and District. NHS Foundation Trust, n.d. *NHS Harrogate and District. NHS Foundation Trust*. [Online].
- Nussbaum, R., McInnes, R. & Willard, H., 2011. *Thompson & Thomson Ιατρική Γενετική*. s.l.:Broken Hill Publishers Ltd.
- Pandaya, S. & Moore, R., 2011. Breast development and anatomy. *Clin Obstet Gynecol.*, Mar, pp. 91-95.
- Papanastasiou, A., Sirinian, C. & Kalofonos, H. P., 2012. Identification of novel human receptor activator of nuclear factor-κB isoforms generated through alternative splicing: implications in breast cancer cell survival and migration. *Breast Cancer Research. Springer*.
- Park, H., 2018. Structure of TRAF family: current understanding of receptor recognition. *Front Immunol*.
- Pavithran, H. & Kumavath, R., 2021. Emerging role of pioneer transcription factors in targeted Era positive breast cancer. *Explore Target Antitumor Ther.*
- Peramuhendige, P. et al., 2018. TRAF2 in osteotropic breast cancer cells enhances skeletal tumour growth and promotes osteolysis. *Sci Rep*.
- Perkins, N., 2012. The diverse and complex roles of NF-κB subunits in cancer.. *Nature Rev Cancer*.
- Perkins, N. D., 2007. Integrating cell-signalling pathways with NF-κB and IKK function. *Molecular Cell Biology*.
- Perou C. M., e. a., 2000. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*, pp. 747-752.
- Platzer, W. et al., 2011. *Εγχειρίδιο Περιγραφικής Ανατομικής, 3η Βελτιωμένη Ελληνική Έκδοση*. s.l.:s.n.

Provenzano, E., Ulaner, G. A. & Chin, S.-F., 2018. Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clin. Elsevier*.

Shen, R. et al., 2012. IκB kinase ε phosphorylates TRAF2 to promote mammary epithelial cell transformation. *Mol Cell Biol*.

Siegmund, D., Wagner, J. & Wajant, H., 2022. TNF Receptor Associated Factor 2 (TRAF2) Signaling in Cancer. *Cancers*.

Sirinian C. Papanastasiou AD, et al., 2018. RANK-c attenuates aggressive properties of ER-negative breast cancer by inhibiting NF-κB activation and EGFR signaling. *Oncogene*.

Song, Z.-P. & Yan, B., 2020. Potential roles of GATA binding protein 5 in cardiovascular diseases. *Rev. Cardiovasc. Med.*

Sørli, T. et al., 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS*.

So, T., 2021. The immunological significance of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs).. *Int Immunol.*

Takaku, M. et al., 2016. GATA3-dependent cellular reprogramming requires activation-domain dependent recruitment of a chromatin remodeler. *Genome Biology*.

Takeuchi, M. & Goeddel, D., 1996. Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *J Biol Chem*.

The Global Cancer Observatory, 2021. [Online].

Tremblay, M., Sanchez-Ferras, O. & Bouchard, M., 2018. GATA transcription factors in development and disease. *Development*.

Vickery, J. & Biernacka, A., 2022. [Online].

Wasserman, J., 2022. *MyPathologyReport.ca*. [Online].

WebPathology, 2022. *WebPathology*. [Online].

Wojciech, P., 2016. *Histology. A text and Atlas. with Correlated Cell and Molecular Biology*. s.l.:s.n.

Zinatizadeh, M. et al., 2020. The Nuclear Factor Kappa B signaling in cancer development and immune diseases. *Science Direct*.

Λογοθέτη, Σ., Βλαχόπουλος, Σ., Μήκας, Δ. & Ζουμπουρλής, Β., 2005. Καρκινικά Γονίδια και τα Μονοπάτια που Ελέγχουν. *Ογκολογική Ενημέρωση*.

Μαζούκα, Λ., Μανδρέκας, Α. & Μπαρμπούνης, Β., 2007. *Σύγχρονη Μαστολογία*. Αθήνα: Π.Χ. Πασχαλίδης.

Μαρκόπουλος, Ι., 2007. *Εγχειρίδιο: Καλοήθειας και Κακοήθεις Παθήσεις του Μαστού*. Αθήνα: Π.Χ. Πασχαλίδης.

Ρούσσος, Δ., 2015. *Μαιευτική και Γυναικολογία*. s.l.:A. Τζιόλα & Υιοί Α.Ε..

Τεντολούρης, Ν., 2015. Κεφάλαιο 5. Μαστοί και Μασχάλες. In: *Λήψη ιστορικού και κλινική εξέταση στην παθολογία*. s.l.:s.n.

Χανιώτης, Φ. & Χανιώτης, Δ., 2009. *Φυσιολογία*. s.l.:Λίτσας Ιατρικές Εκδόσεις.

Χατζημπούγιας, Ι., Χατζημπούγιας, Δ. & Χριστοδουλάκης, Ν., 2007. *Στοιχεία ανατομικής ανθρώπου*. Αθήνα: GM Design.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Αντρικός Μαστός. Σχηματική Απεικόνιση της Ανατομίας του. (NHS Harrogate and District. NHS Foundation Trust).....	3
Εικόνα 2: Γυναικείος Μαστός. Σχηματική Απεικόνιση της Ανατομίας του (Αριστερά) Σχηματική Απεικόνιση της Πρόσθιας Επιφάνειάς του (Δεξιά). (NHS Harrogate and District. NHS Foundation Trust).....	4
Εικόνα 3: Τεταρτημόρια του μαστού. (Micheau, 2012).....	5
Εικόνα 4: Οι λεμφαδένες του μαστού. (Τεντολούρης, 2015).....	8
Εικόνα 5: Σχηματική ιστολογική απεικόνιση του μαζικού αδένου. Λόβια και Πόροι. (Wasserman, 2022).....	9
Εικόνα 6: Φωτογραφία μικροσκοπίου ενός ανενεργού μαστού. a. Χρώση A&H. Μεγέθυνση X60. b. Χρώση A&H. Μεγέθυνση. (Wojciech, 2016).....	11
Εικόνα 7: Φωτογραφία μικροσκοπίου ενός ενεργού μαζικού αδένου προς το τέλος της κύησης. a. Χρώση A&H. Μεγέθυνση X60. b. Χρώση A&H. Μεγέθυνση X700. (Wojciech, 2016).....	11
Εικόνα 8: Νέες περιπτώσεις και θάνατοι από καρκίνο στις ΗΠΑ για το 2022 – Στατιστικά και για τα 2 φύλα (American Cancer Society, Inc., Surveillance Research, 2022).....	15
Εικόνα 9: Στατιστικά όλων των νέων περιπτώσεων καρκίνου στην Ελλάδα, για τα 2 φύλα, όλων των ηλικιών (The Global Cancer Observatory, 2021).....	16
Εικόνα 10: Εικόνα κατόπιν επεξεργασίας A&H (Allred, 2010); (Hoda, 2016).....	20
Εικόνα 11: Λοβιακό In Situ Καρκίνωμα. Μορφολογία Κυττάρων. A&H (Vickery & Biernacka, 2022).....	21
Εικόνα 12: Normal Duct → Ductal Carcinoma In Situ → Invasive Carcinoma. (Wasserman, 2022).....	22
Εικόνα 13: Myiasis as a rare complication of invasive ductal carcinoma. A&H (Muhammad Khurram Zia, 2019).....	22
Εικόνα 14: Διθητικό Λοβιακό Καρκίνωμα. A&H. (WebPathology, 2022).....	23
Εικόνα 15: Μυελοειδές Καρκίνωμα. A&H (WebPathology, 2022).....	24
Εικόνα 16: Βλενωδές Καρκίνωμα. A&H (WebPathology, 2022).....	24
Εικόνα 17: Σωληνώδες Καρκίνωμα. A&H (WebPathology, 2022).....	25
Εικόνα 18: Φλεγμονώδες Καρκίνωμα. A&H (WebPathology, 2022).....	25
Εικόνα 19: Νόσος Paget της θηλής. A&H (WebPathology, 2022).....	26
Εικόνα 20: Οι πρωτεΐνες GATA1-6. Οι δομικές περιοχές τους και η αλληλουχία των αμινοξέων. (Lentjes, et al., 2016).....	28
Εικόνα 21: Η έκφραση των γονιδίων GATA στους διάφορους ιστούς. (Lentjes, et al., 2016).....	29

Εικόνα 22: Η δομή της πρωτεΐνης GATA3. (Chou, et al., 2009).....	30
Εικόνα 23: Τα κύτταρα του πόρου του μαστού και η εντόπιση της έκφρασης GATA3. (Kouros-Mehr, et al., 2008).....	31
Εικόνα 24: Σχηματική απεικόνιση της μορφολογίας και των δομικών στοιχείων της οικογένειας Rel/NF-κB και της IκB (Courtois & Fauvarque, 2018).....	33
Εικόνα 25: Τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος του NF-κB. (Perkins, 2007).....	35
Εικόνα 26: Σχηματική απεικόνιση της δομής των TRAF πρωτεϊνών (Bishop, et al., 2019)	37
Εικόνα 27: Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής της ανοσοϊστοχημείας	45
Εικόνα 28: Αποτελέσματα Co-IP	49
Εικόνα 29: Αποτελέσματα IHC	50
Εικόνα 30: Ανοσοϊστοχημική χρώση. Μεγέθυνση X400. Αυξημένη έκφραση GATA3. Πλακίδιο 1	51
Εικόνα 31: Ανοσοϊστοχημική χρώση. Μεγέθυνση X400. Μειωμένη έκφραση RelB. Πλακίδιο 1	52
Εικόνα 32: Ανοσοϊστοχημική χρώση. Μεγέθυνση X400. Έκφραση TRAF2. Πλακίδιο 1 .	53
Εικόνα 33: Ανοσοϊστοχημική χρώση. Μεγέθυνση X400. Μειωμένη έκφραση GATA3. Πλακίδιο 2	54
Εικόνα 34: Ανοσοϊστοχημική χρώση. Μεγέθυνση X400. Αυξημένη έκφραση RelB. Πλακίδιο 2	55
Εικόνα 35: Ανοσοϊστοχημική χρώση. Μεγέθυνση X400. Έκφραση TRAF2. Πλακίδιο 2 .	56

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Διαφορές μεταξύ του Καρκίνου του Μαστού στους Άνδρες και στις Γυναίκες (Giordano, 2018).....	18
---	----