



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ

Α' ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

Μοριακή μελέτη σηματοδοτικών μονοπατιών στην
καρκινογένεση

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΙΧΕΛΛΗ ΜΑΡΙΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2021

Στοιχεία Διδακτορική Διατριβής

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 28/04/2017

Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 05/07/2017

Ημερομηνία κατάθεσης της διατριβής: 12/04/21

Μέλη Συμβουλευτικής Επιτροπής

Σαέττα Αγγελική (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια- Επιβλέπουσα)

Πατσούρης Ευστράτιος (Ομότιμος Καθηγητής)

Νόννη Αφροδίτη (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια)

Μέλη 7 μελούς εξεταστικής επιτροπής:

1. Πατσούρης Ευστράτιος, Ομότιμος Καθηγητής
2. Λάζαρης Χ. Ανδρέας, Καθηγητής
3. Σαέττα Αγγελική, Αναπλ. Καθηγήτρια
4. Νόννη Αφροδίτη, Αναπλ. Καθηγήτρια
5. Γακιοπούλου Χαρά, Αναπλ. Καθηγήτρια
6. Αγρογιάννης Γεώργιος, Αναπλ. Καθηγητής
7. Μιχαλόπουλος Νικόλαος, Επικ. Καθηγητής

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Πέτρος Π. Σφηκάκης, Καθηγητής

Βαθμός: 10 Άριστα

«Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα». (Νόμος 5543/1932, άρθρον 202, παράγραφος 2)

ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

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

Περιεχόμενα

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	7
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
1. ΕΙΓΑΓΩΓΗ.....	14
1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	14
1.1.1 ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΗ ΚΑΙ ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ	17
1.2. ΜΑΣΤΟΣ.....	19
1.2.1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΜΑΣΤΟΥ	19
1.3. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ	22
1.3.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ.....	22
1.3.2. ΙΣΤΟΠΟΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ.....	27
1.3.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ.....	32
1.4. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	34
1.5. ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ WNT	36
1.5.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	36
1.5.2. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ WNT	37
1.5.3. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ WNT/Β-ΚΑΤΕΝΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ	39
1.5.4. ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ WNT ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ	60
1.5.5. ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ WNT ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	66
1.5.6. ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ WNT ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ.....	69
1.6. ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ WNT ΣΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ 74	
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	77
2. ΣΚΟΠΟΣ	78
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	79
3.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	79
3.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΦΡΕΣΚΟ ΙΣΤΟ	81
3.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΣΕ RCL2 ΚΑΙ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΟ ΣΕ ΚΥΒΟ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ	82
3.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΦΡΕΣΚΟ ΙΣΤΟ	83
3.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΣΕ RCL2 ΚΑΙ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΟ ΣΕ ΚΥΒΟ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ	85
3.6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ DNA & RNA.....	86

3.7. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (Reverse Transcription-RT).....	86
3.8. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ.....	88
3.8.1. ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ WNT/B-KΑΤΕΝΙΝΗΣ	89
3.9. PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL TIME PCR)	91
3.9.1. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ REAL TIME PCR	95
3.9.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ –ΤΗΞΗΣ (Melt Curve)	96
3.10. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΤΗΣ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL TIME PCR).....	97
3.11. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΟΡΙΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ (FOLD CHANGE).....	98
3.12. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	99
3.13. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΚΑΤΑ SANGER ΓΙΑ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ WNT	103
3.14. ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ REAL TIME PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ mRNA ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>CTNNB1</i>	105
3.15. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΜΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ WESTERN	106
3.15.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΦΡΕΣΚΟ ΙΣΤΟ.....	106
3.15.2. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	107
3.15.3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS-PAGE	107
3.15.4. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΜΑ ΚΑΤΑ WESTERN	108
3.16. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ	111
3.17. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΜΕ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΤΗΞΗΣ ΥΨΗΛΗΣ ΕΥΚΡΙΝΕΙΑΣ (Real Time High Resolution Melting PCR)	112
3.18. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ REAL TIME PCR	116
3.19. ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΚΑΤΑ SANGER.....	117
3.20. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	118
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	119
4.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ WNT	119
4.1.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>WNT2</i> ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	120
4.1.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>WNT3</i> ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	123
4.1.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>WNT5A</i> ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	126

4.1.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>FRIZZLED 4</i> ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	128
4.1.5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>FRIZZLED 6</i> ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	131
4.1.6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>FRIZZLED 7</i> ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	133
4.1.7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>CTNNB1</i> ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	136
4.1.8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>GSK3-β</i> ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	140
4.1.9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>TCF4</i> ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	142
4.1.10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>LEF1</i> ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	145
4.2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ WNT	149
4.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ Β-ΚΑΤΕΝΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ GSK3-B	152
4.3.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΜΑ ΚΑΤΑ WESTERN ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ GSK3-B	152
4.3.2. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ Β-ΚΑΤΕΝΙΝΗΣ.....	153
4.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>APC</i>	159
4.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΡΙ3Κ/ΑΚΤ..	160
4.6. ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ mRNA ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΜΑΣΤΟΥY	162
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	167
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	182
7. ABSTRACT	185
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	188

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή με θέμα «Μοριακή μελέτη σηματοδοτικών μονοπατιών στην καρκινογένεση» εκπονήθηκε στο Α' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών την περίοδο 2017-2021.

Με το πέρας της διδακτορικής μου διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Αγγελική Σαέττα για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη παρούσα διατριβή, καθώς και για το ενδιαφέρον της καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματικού μέρους και τη συγγραφή της εργασίας, καθώς και για τις χρήσιμες και πολύτιμες παρατηρήσεις της που με βοήθησαν για την ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ομότιμο Καθηγητή Ευστράτιο Πατσούρη και μέλος της τριμελούς επιτροπής και τον Διευθυντή του Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής Καθηγητή κ. Ανδρέα Χ. Λάζαρη για την δυνατότητα που μου έδωσαν να πραγματοποιήσω την διδακτορική διατριβή στο συγκεκριμένο εργαστήριο. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Αφροδίτη Νόννη, μέλος της τριμελούς επιτροπής για τη πολύτιμη βοήθεια της κατά τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στα μέλη της ομάδας του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής και ειδικότερα στην Δρ. Ιωάννα Γιαννοπούλου και τους υποψήφιους διδάκτορες Αλέξανδρο Ζούγρο και Ειρήνη Ρούπου και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Χρυσούλα Χατζηγιάννη για την συνεργασία και τις γνώσεις που μοιραστήκαμε.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Ηλένια Χατζηανδρέου για το ενδιαφέρον και τις χρήσιμες παρατηρήσεις της τόσο κατά τη διάρκεια των πειραματικού μέρους και στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Τέλος, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στους γονείς μου, Μιχάλη και Ειρήνη και στον αδερφό μου, Δημήτρη και στους πολύ δικούς μου ανθρώπους για τη τεράστια στήριξη και το κουράγιο που μου δίνουν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου και που είναι πάντα δίπλα μου στις επιλογές μου.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Μιχελλή Μαρία
Πατρώνυμο: Μιχαήλ
Email: mar91mich@gmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- (Απρίλιος 2017- 2021) Υποψήφια διδάκτωρ Ιατρικής Σχολής Αθηνών
- (2014-2016) Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική», Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Βαθμός πτυχίου "Άριστα" οχτώ και εξήντα οχτώ (8,68)
- (2009-2014) Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Βαθμός πτυχίου "Λίαν Καλώς" επτά και είκοσι εκατοστά (7,20)
- (2009) Απολυτήριο Γενικού Λυκείου με βαθμό "Άριστα" δεκαοχτώ και τρία δέκατα (18,3) 2^ο Λύκειο Ηλιούπολης

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

(Ιούλιος 2016-Σήμερα) Βιολόγος στο Μοριακό Τμήμα του Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής Ιατρική Σχολή Αθηνών, ΕΚΠΑ. Διευθυντής: κ. Ανδρέας Χ. Λάζαρης, Καθηγητής.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

- Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής (Απρίλιος 2017-2021). Εργαστηριακός χώρος διεξαγωγής ερευνητικού έργου: Α' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή Αθηνών. Επιβλέπουσα: Σαέττα Αγγελική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια.

- Διπλωματική Πειραματική Εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος: Σεπτέμβριος 2015-Οκτώβριος 2016, Α΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή Αθηνών. Επιβλέπουσα: Σαέττα Αγγελική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια.
- Πτυχιακή Εργασία: Σεπτέμβριος 2013-Σεπτέμβριος 2014, Εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής Ε.ΚΕ.Φ.Ε. «Δημόκριτος». Επιβλέπων: Γιαννουκάκος Δρακούλης, Διευθυντής Ερευνών στο Εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής.
- Πρακτική Άσκηση: 9/07/12-31/08/12, Κυτταρολογικό Τμήμα του Γ.Ν.Αθηνών "Ο Ευαγγελισμός".

ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

- Ξένες γλώσσες: καλή γνώση Αγγλικής Γλώσσας (EDEXCEL London Test of English Level 3, 2006)
- Εξοικείωση με τη χρήση των Microsoft Windows και Microsoft Office (Word/PowerPoint/Internet/Excel)
- Γνώση και χρήση του στατιστικού μαθήματος SPSS (Πιστοποίηση GlobalCert, 2019)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Alexandros Zougros*, **Maria Michelli***, Ilenia Chatziandreou, Afroditi Nonni, Harikleia Gakiopoulou, Nikolaos V. Michalopoulos, Andreas C. Lazaris, Angelica A. Saetta, mRNA coexpression patterns of Wnt pathway components and their clinicopathological associations in breast and colorectal cancer, Submitted, (*ισοδύναμη συμμετοχή)

Michelli M*, Zougros A*, Chatziandreou I, Michalopoulos N, Lazaris A, Wnt pathway component expression in breast and colorectal cancer, Pathology, Research and Practice 2020 Jul; 216 (7):153005. (*ισοδύναμη συμμετοχή)

Karamouzis M, Koustas E, Sarantis P, Theoharis S, Saetta A, Chatziandreou I, Kyriakopoulou G, Giannopoulou I, **Michelli M**, Schizas D, Papavassiliou A, Autophagy related proteins evaluation represents an independent survival factor of colorectal cancer patients, Am J ClinOncol. 2019 Oct; 42(10): 767–776.

Apostolou P, Fostira F, Papamentzelopoulou M, **Michelli M**, Panopoulos C, Fountzilias G, Konstantopoulou I, Voutsinas G, Yannoukakos D, CHEK2 c.1100delC allele is rarely identified in Greek breast cancer cases, *Cancer Genet.* 2015 Apr;208(4):129-3.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Detection of *PIK3CA* mutations in breast cancer: comparison of next-generation sequencing and Sanger sequencing, **M. Michelli**, E. Roupou, I. Chatziandreou, A. Zougros, A. A. Saetta, European Human Genetics Conference June 12-15 2021
2. Mapping of Wnt-Frizzled interactions through mRNA coexpression patterns in breast and colorectal cancer, European Human Genetics Conference, A. Zougros, **M. Michelli**, I. Chatziandreou, N. Michalopoulos, G. Theodoropoulos, A. Lazaris, A. Saetta, European Human Genetics Conference June 6-9 2020
3. EGFR mutation testing in cf-DNA from NSCLC patients using Cobas® EGFR mutation test v2, **M. Michelli**, I. Giannopoulou, I. Chatziandreou, A. Zougros, E. Roupou, A. A. Saetta, European Human Genetics Conference, June 6-9 2020
4. Predictive biomarker analysis of non-small cell lung cancer patients, 31st, European Congress of Pathology, S. Sakellariou, E.A. Karatrasoglou. I. Chatziandreou, I. Giannopoulou, **M. Michelli**, A. Zougros, E. Roupou, K. Stamopoulos, A.C. Lazaris, P. Korkolopoulou, A. Saetta, September 7-11 2019, Nice, France
5. Expression of Wnt signaling pathway in colorectal and breast cancer: Clinicopathological associations, **M. Michelli**, A. Zougros, I. Chatziandreou, N. Michalopoulos, G. Theodoropoulos, E. Patsouris, A. Saetta, European Human Genetics Conference, June 15-18 2019, Gothenburg, Sweden
6. EGFR mutation testing in cf-DNA from NSCLC patients using Cobas® EGFR mutation v2, A. Saetta, I. Giannopoulou, **M. Michelli**, A. Zougros, E. Roupou, I. Chatziandreou, European Human Genetics Conference, June 15-18 2019, Gothenburg, Sweden

7. Deregulation of TRAIL apoptotic pathway mRNA expression in breast tumours, E. Roupou, **M. Michelli**, I. Chatziandreou, NV Michalopoulos, P. Karathanasis, AA Saetta, European Human Genetics Conference, June 15-18 2019, Gothenburg, Sweden
8. Clinicopathological and molecular associations of PDL-1 expression in Non-Small Cell Lung Cancer, Karatrasozlou E. A., Chatziandreou I., Sakellariou S., Giannopoulou I., **Michelli M.**, Zougros A., Roupou E., Stamopoulos K., Kavantzias N., Korkolopoulou P., Saetta A., 5th Symposium on Thoracic and Upper Aerodigestive Malignancies, May 17-18 2019, Athens, Greece
9. Autophagy (A) related proteins evaluation represents an independent survival factor of colorectal cancer (CRC) patients, Karamouzis Michalis, Saetta Angelica, Koustas Evangelos, Chatziandreou Ilenia, Giannopoulou Ioanna, **Michelli Maria**, Giaginis Constantinos, Papavassiliou Athanasios, Theoharis Stamatios, ESMO 20th World Congress on Gastrointestinal Cancer 20–23 June 2018, Barcelona, Spain
10. Evaluation of EGFR mutation testing in cf-DNA from NSCLC patients using Cobas® EGFR mutation test v2, A. Saetta, I. Chatziandreou, I. Giannopoulou, **M. Michelli**, S. Tsikalakis, P. Korkolopoulou, E. Patsouris, 29th European Congress of Pathology, 2-6 September 2017, Amsterdam, the Netherlands
11. Expression analysis of Wnt pathway in colorectal and breast cancer, Saetta A, **Michelli M**, Zougros A, Chatzianderou I, Michalopoulos N, Theodoropoulos G, Patsouris E, AMP Global 2017, 3-5 April 2017, Berlin, Germany
12. EGFR mutation analysis in ct-DNA from NSCLC patients, Saetta A, Chatziadreou I, Giannopoulou I, **Michelli M**, Karamouzis M.V, Tsikalakis S, Patsouris E, Kavantzias N, AMP Global 2017, 3-5 April 2017, Berlin, Germany
13. *CHEK2* c.1100delC allele is rarely identified in Greek breast cancer cases, Apostolou P, Fostira F, Papamentzelopoulou M, **Michelli M**, Konstantopoulou I, Yannoukakos D, Voutsinas G, 6th Familial Cancer Conference, 5-7 June 2014, Madrid, Spain

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Έκφραση του γονιδίου GSK3-β στον καρκίνο παχέος έντερου: συσχέτιση με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, Β. Χαρίτου, Α. Ζούγρος, **Μ. Μιχελή**, Ε. Ρούπου, Η. Χατζηανδρέου, Ι. Παπασιδέρη, Α. Λάζαρης, Α. Σαέττα, 41^ο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνική Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών 9-11 Μαΐου 2019, Κατερίνη
2. Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt στον καρκίνο μαστού, **Μιχελλή Μαρία**, Ζούγρος Αλέξανδρος, Χατζηανδρέου Ηλένια, Ρούπου Ειρήνη, Μιχαλόπουλος Νικόλαος, Καραθανάσης Παναγιώτης, Πατσούρης Ευστράτιος, Σαέττα Αγγελική, 25^ο Ελληνικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας 18-20 Απριλίου 2019, Αθήνα
3. Ανοσοϊστοχημική μελέτη του βιοδείκτη PDL1- στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. συσχέτιση με τους βιοδείκτες EGFR, KRAS, Καρατράσογλου Ε., Σακελλαρίου Σ., Χατζηανδρέου Η., **Μιχελή Μ.**, Γιαννοπούλου Ι., Σταμόπουλος Κ., Καβαντζάς Ν., Λάζαρης Α. 8 , Κορκολοπούλου Π. , Σαέττα Α., 25^ο Ελληνικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας 18-20 Απριλίου 2019, Αθήνα
4. Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt στον καρκίνο μαστού, **Μαρία Μιχελλή**, Αλέξανδρος Ζούγρος, Ηλένια Χατζηανδρέου, Ειρήνη Ρούπου, Νικόλαος Μιχαλόπουλος, Ευστράτιος Πατσούρης, Αγγελική Σαέττα, Πανελλήνιο Συνέδριο Δεικτών Καρκίνου & Στοχευμένης Θεραπείας, 22-24 Νοεμβρίου 2018, Αθήνα
5. Υγρή βιοψία: Μελέτη μεταλλαγών του γονιδίου EGFR σε ασθενείς με ΜΜΚΠ, Ηλένια Χατζηανδρέου, Ιωάννα Γιαννοπούλου, **Μαρία Μιχελλή**, Ευστράτιος Πατσούρης, Αγγελική Α. Σαέττα, Πανελλήνιο Συνέδριο Δεικτών Καρκίνου & Στοχευμένης Θεραπείας, 22-24 Νοεμβρίου 2018, Αθήνα
6. Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου, Αλέξανδρος Ζούγρος, **Μαρία Μιχελλή**, Ηλένια Χατζηανδρέου, Νικόλαος Μιχαλόπουλος, Γεώργιος Θεοδωρόπουλος, Ευστράτιος Πατσούρης, Αγγελική Σαέττα, Πανελλήνιο Συνέδριο Δεικτών Καρκίνου & Στοχευμένης Θεραπείας, 22-24 Νοεμβρίου 2018, Αθήνα
7. Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt στον καρκίνο παχέος εντέρου και μαστού, Ζούγρος Α, **Μιχελλή Μ**, Χατζηανδρέου

Η, Μιχαλόπουλος Ν, Θεοδωρόπουλος Γ, Πατσούρης Ε, Σαέττα Α, 19^ο
Πανελλήνιο Συνέδριο Ογκολογίας, 3-5 Νοεμβρίου 2017, Αθήνα

ΒΡΑΒΕΙΑ

Καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης: Υγρή βιοψία: Μελέτη μεταλλαγών του γονιδίου EGFR σε ασθενείς με ΜΜΚΠ, Ηλένια Χατζηανδρέου, Ιωάννα Γιαννοπούλου, **Μαρία Μιχελλή**, Ευστράτιος Πατσούρης, Αγγελική Α. Σαέττα, Πανελλήνιο Συνέδριο Δεικτών Καρκίνου & Στοχευμένης Θεραπείας, 22-24 Νοεμβρίου 2018, Αθήνα

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΓΑΓΩΓΗ

1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

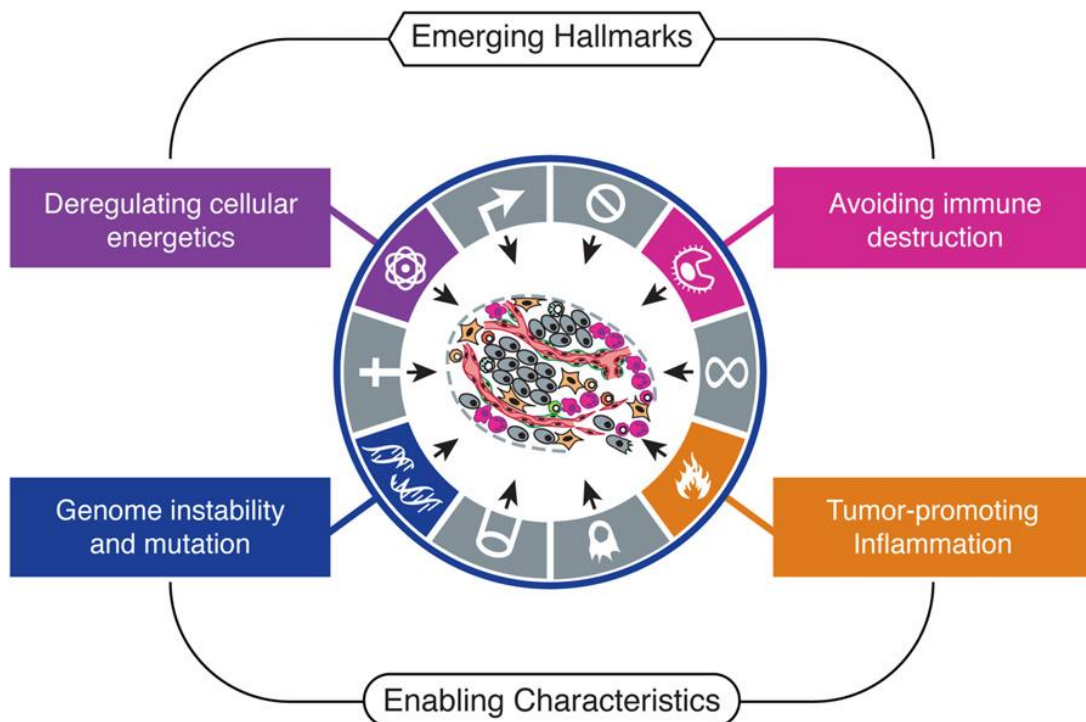
Νεοπλασία ονομάζεται μια νέα αύξηση και ο όρος καλοήθης και κακοήθης αντιστοιχεί στην πορεία του νεοπλάσματος. Το καλοήθες νεόπλασμα παραμένει εντοπισμένο σε μια θέση, ενώ το κακοήθες νεόπλασμα (καρκίνος) αποτελείται κυρίως από καρκινικά κύτταρα τα οποία έχουν την ικανότητα να διηθούν τη βασική μεμβράνη και να δώσουν μεταστάσεις σε απομακρυσμένους ιστούς.

Οι Hanahan και Weinberg το 2000, πρότειναν ένα μοντέλο καρκινογένεσης, το οποίο προϋποθέτει τη συσσώρευση έξι κρίσιμων αλλοιώσεων στο ίδιο κύτταρο, οι οποίες είναι αναγκαίες για να το μετατρέψουν σε καρκινικό. Πιο συγκεκριμένα, απαιτούνται τα παρακάτω:

1. Ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός, ο οποίος επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης σημάτων αύξησης λόγω μεταλλαγής είτε σε συγκεκριμένο γονίδιο, ενεργοποιώντας τον πολλαπλασιασμό του, είτε σε γονίδιο που μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση οδών μεταγωγή σημάτων αύξησης.
2. Η απενεργοποίηση κατασταλτικών μηχανισμών της αύξησης. Τα κατασταλτικά σήματα για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό έχουν ως αποτέλεσμα είτε την έξοδο ενός φυσιολογικού κυττάρου στη φάση G0, είτε την προαγωγή της τελικής διαφοροποίησης ενός κυττάρου, οπότε παύει να διαιρείται. Στον καρκίνο απενεργοποιούνται αυτά τα σήματα με αποτέλεσμα το καρκινικό κύτταρο να πολλαπλασιάζεται ασταμάτητα.
3. Η αποφυγή της απόπτωσης. Υπάρχουν πολλοί τρόποι αποφυγής της απόπτωσης από τα καρκινικά κύτταρα. Ο πιο συχνός είναι η αδρανοποίηση της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το γονίδιο *TP53*, η οποία είναι ο κύριος διαμεσολαβητής της απόπτωσης. Ένας άλλος τρόπος είναι η υπερπαραγωγή παραγόντων αύξησης που μεταβιβάζουν στο κύτταρο σήματα επιβίωσης, τα οποία υπερισχύουν των αποπτωτικών σημάτων.
4. Η αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα. Τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν μια αυτονομία καθώς παρατηρείται πως τα ίδια συνθέτουν αυξητικά σήματα στα οποία είναι δεκτικά, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια μορφή θετικής ανάδρασης δίνοντας μια ανεξαρτησία στο καρκινικό κύτταρο.
5. Η νεοαγγειογένεση. Η δημιουργία νέων αγγείων έχει ως αποτέλεσμα την συνεχόμενη τροφοδοσία του όγκου.

6. Η ικανότητα για διήθηση και μετάσταση. Η πορεία της καρκινογένεσης ολοκληρώνεται με τη διήθηση παρακείμενων ιστών και τη μετάσταση. Για την επιτυχή έκβαση μιας μεταστατικής διαδικασίας απαιτείται η αποκόλληση του καρκινικού κυττάρου από την αρχική θέση και η διήθηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, ώστε το κύτταρο να αποκτήσει πρόσβαση στη λεμφική ή αγγειακή κυκλοφορία, με απώτερο σκοπό την προσκόλληση του σε νέο ιστό. (Hanahan & Weinberg, 2000).

Δέκα χρόνια αργότερα, από τους Hanahan και Weinberg προστέθηκαν επιπλέον άλλα τέσσερα χαρακτηριστικά για να θεωρηθεί ένα κύτταρο καρκινικό, μεταξύ των οποίων είναι η γενωμική αστάθεια, η επαγωγή της ανοσοδιαφυγής, η δημιουργία φλεγμονής από τον ίδιο τον όγκο και η μεταβολή του μεταβολισμού. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά απεικονίζονται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1. Επιπλέον χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων. Ένας μεγάλος αριθμός ερευνών δείχνει ότι υπάρχουν δύο επιπλέον χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων που συμμετέχουν στην παθογένεια μερικών και ίσως όλων των καρκίνων. Το ένα χαρακτηριστικό αφορά τη δυνατότητα του καρκινικού κυττάρου να τροποποιήσει, ή να επαναπρογραμματίσει τον κυτταρικό μεταβολισμό, ώστε να το κάνει πιο αποτελεσματικό για να υποστηρίξει τη νεοπλασματική εξεργασία. Το δεύτερο χαρακτηριστικό επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να διαφεύγουν τον ανοσολογικό έλεγχο, ιδίως από T και B λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και φυσικά κύτταρα φονείς. Επιπλέον, δύο επιπρόσθετα χαρακτηριστικά είναι η γενωμική αστάθεια και η δημιουργία φλεγμονής από τον ίδιο τον όγκο. Όσον αφορά τη γενωμική αστάθεια, τα καρκινικά κύτταρα έχουν αποκτήσει γενετικές αλλοιώσεις με αποτέλεσμα την εξέλιξη του όγκου. Η φλεγμονή είναι σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανής σε πρώιμα στάδια της νεοπλασματικής εξέλιξης και αποδεδειγμένα ευνοεί την ανάπτυξη της αρχόμενης νεοπλασίας σε καρκίνο. (Hanahan&Weinberg, 2011)

Σήμερα γνωρίζουμε ότι η καρκινογένεση είναι μία μακρόχρονη, πολυσταδιακή διαδικασία, που μπορεί να διαρκέσει δύο, τρεις ή και περισσότερες δεκαετίες. Αρχίζει με την εναρκτήρια μεταλλαγή στο γενετικό υλικό ενός κυττάρου (αρχικό κλωνικό κύτταρο), οι απόγονοι του οποίου συσσωρεύουν και άλλες μεταλλαγές ή υφίστανται επιγενετική αποσιώπηση γονιδίων που κωδικοποιούν συστατικά του μηχανισμού επιδιόρθωσης του κατεστραμμένου DNA. Με τη συσσώρευση των γενετικών αλλοιώσεων επάγεται η ανάπτυξη του πλήρους καρκινικού φαινοτύπου.

1.1.1 ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΗ ΚΑΙ ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ

Η διαβάθμιση (grading) ενός όγκου εμπεριέχει τον καθορισμό του βαθμού διαφοροποίησης του, που βασίζεται σε ιστολογικά και κυτταρολογικά κριτήρια. Το βασικό κριτήριο για τον καθορισμό του βαθμού διαφοροποίησης είναι:

- Η διαφοροποίηση: πόσα παρόμοια είναι τα κύτταρα του νεοπλάσματος όταν αυτά συγκρίνονται με τον τύπο του φυσιολογικού κυττάρου από το οποίο προέρχονται.
- Οι πυρηνικές ατυπίες (υπερχρωμασία, πυρηνική πολυμορφία)
- Αριθμός μιτώσεων ανά 10 καθορισμένα οπτικά πεδία

Έτσι προκύπτουν τρεις βαθμοί διαφοροποίησης Grade 1, 2 και 3. (Riede N., Werner M., 2008)

Η σταδιοποίηση (staging) προσδιορίζει την έκταση της εξάπλωσης του καρκίνου και συμβάλλει στη διάγνωση, στον υπολογισμό της πρόγνωσης για την πορεία της νόσου και στην επιλογή θεραπευτικών προσεγγίσεων. Το ευρύτερα διαδεδομένο σύστημα σταδιοποίησης του όγκου είναι το επικαλούμενο σύστημα TNM, όπου T η αύξηση του όγκου της πρωτοπαθούς εστίας, N οι επιχώριες λεμφαδενικές μεταστάσεις και M οι αιματογενείς απομακρυσμένες μεταστάσεις.

Ανάλογα με τη μέθοδο με την οποία καθορίζεται η επέκταση του όγκου υπάρχει η διάκριση σε κλινική σταδιοποίηση κατά TNM και σε παθολογοανατομική σταδιοποίηση κατά TNM. Όσον αφορά την κλινική σταδιοποίηση κατά TNM, η οποία χαρακτηρίζεται ως cTNM βασίζεται και προκύπτει από κλινικές εξετάσεις πχ. απεικονιστικές μεθόδους, βιοψία, ενδοσκόπηση. Ανάλογα με το βαθμό αξιοπιστίας της χρησιμοποιούμενης διαγνωστικής μεθόδου πχ. ακτινογραφία σε σύγκριση με τη βιοψία) διακρίνονται τρεις βαθμοί διαγνωστικής βεβαιότητας C1 έως C3 (C=

certainty).

Η παθολογοανατομική σταδιοποίηση κατά TNM, η οποία χαρακτηρίζεται ως pTNM απαιτεί εξέταση του πρωτοπαθούς όγκου σε υγιή όρια εκτομής μακροσκοπικά, μπορεί όμως να γίνει αν υπάρχει μόνο μικροσκοπική διήθηση των ορίων. Στον παρακάτω Πίνακα 1 ακολουθεί η σταδιοποίηση του όγκου σύμφωνα με το σύστημα pTNM. (Bocker, Denk, Heitz, 2007).

Πίνακας 1. Σταδιοποίηση σύμφωνα με το σύστημα pTNM.

pT: Πρωτοπαθής όγκος	
pTis	Προδιηθητικό καρκίνωμα (καρκίνωμα in situ)
pT0	Καμία ιστολογική ένδειξη για πρωτοπαθή όγκο
pT1, pT2, pT3, pT4	Ένδειξη για αυξανόμενη έκταση του πρωτοπαθούς όγκου
pTx	Αγνώστου μεγέθους πρωτοπαθούς όγκου
pN: Επιχώριοι λεμφαδένες	
pN0	Καμία ένδειξη για προσβολή επιχώριων λεμφαδένων
pN1, pN2, pN3	Ένδειξη για αυξανόμενη προσβολή επιχώριων λεμφαδένων
pN4	Ένδειξη για αυξανόμενη προσβολή αδένων πέρα από τους επιχώριους
pNx	Η διήθηση λεμφαδένων από τον όγκο δεν είναι δυνατόν να καθορισθεί
pM: Απομακρυσμένες μεταστάσεις	
pM0	Καμία ένδειξη για απομακρυσμένες μεταστάσεις
pM1	Ένδειξη για απομακρυσμένες μεταστάσεις
pMx	Η παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων δεν μπορεί να καθορισθεί

Υπάρχουν 7 στάδια στον καρκίνο μαστού:

- Στάδιο 0: (καρκίνωμα in situ).Ο όγκος εντοπίζεται στο σημείο προέλευσής του και δεν έχει αρχίσει να διηθεί τους γύρω ιστούς ή να διασπείρεται. (Tis, N0, M0)
- Στάδιο I: ο όγκος είναι μεγέθους 2 cm ή μικρότερος και δεν υπάρχει ένδειξη διασποράς.(T1, N0, M0)

- Στάδιο ΙΑ: ο όγκος είναι 2-5 cm χωρίς διασπορά στους λεμφαδένες. (T0-2, N1, M0)
- Στάδιο ΙΒ: όγκος 2-5 cm με θετικούς λεμφαδένες ή όγκος >5 cm χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις. (T2,3,N0,M0)
- Στάδιο ΙΙΑ: όγκος >5 cm και διακρίνεται προσβολή των σύστοιχων μασχαλιαίων λεμφαδένων που συμφύονται μεταξύ τους ή με άλλους ιστούς T0-3,N1-2,M0)
- Στάδιο ΙΙΒ: προσβεβλημένοι θωρακικοί λεμφαδένες και όγκος που επεκτείνεται στο θωρακικό τοίχωμα ή προσβάλλει και εξελκώνει το δέρμα. T4,N0-4,M0
- Στάδιο ΙV: διασπορά στους λεμφαδένες, αλλά και απομακρυσμένες μεταστάσεις ή προσβολή του δέρματος και του θωρακικού τοιχώματος πέρα από την περιοχή του μαστού. (οποιαδήποτε T, οποιαδήποτε N, M1)

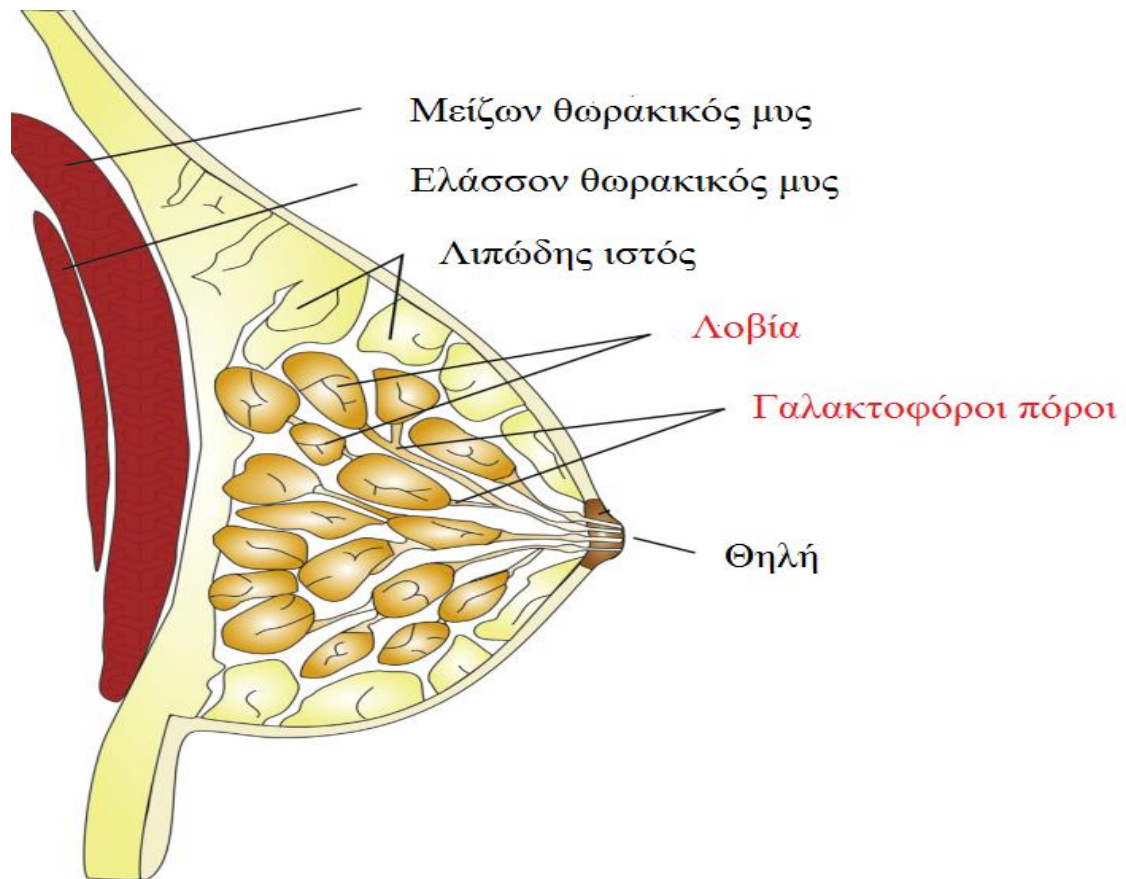
1.2. ΜΑΣΤΟΣ

1.2.1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΜΑΣΤΟΥ

Ο μαστός είναι ένας εκκριτικός αδένας του οποίου η δομή αντανακλά την ειδική λειτουργία του, δηλαδή την παραγωγή γάλακτος. Η δομή του γυναικείου μαστού είναι πολύπλοκη συμπεριλαμβανομένου του λίπους και του συνδετικού ιστού, καθώς και τους λοβούς, τα λοβία, τους αγωγούς και τους λεμφαδένες. Ο μαστός ιστολογικά αποτελείται από τρεις κύριες δομές: το δέρμα, το υποδόριο λίπος και τον μαστικό αδένα, ο οποίος με τη σειρά του αποτελείται από το παρέγχυμα και το στρώμα.

Ο μαστικός αδένας (μαζικός αδένας) χωρίζεται σε 15-20 ακανόνιστα τμήματα, τους λοβούς (lobes), οι οποίοι χωρίζονται μεταξύ τους από έναν πυκνό συνδετικό ιστό και από το λίπος. Ο λοβός αποτελεί έναν αδένα με το δικό του γαλακτοφόρο πόρο. Ο συνδετικός ιστός μέσα στο λοβό αποτελείται από ινοβλάστες μέσα σε ένα υπόστρωμα από κολλαγόνο με ιστιοκύτταρα και περιστασιακά με λεμφοκύτταρα. Καθένας από τους λοβούς αποτελείται από 20-40 εκκριτικά λοβία (lobules), όπου το κάθε ένα περιλαμβάνει μια περιοχή που παράγει το γάλα και μια περιοχή που μεταφέρει το γάλα και ονομάζεται γαλακτικός πόρος (lactiferous duct). Τα λοβία καλύπτονται εσωτερικά από μια στιβάδα κυβοειδών και κυλινδρικών κυττάρων και

εξωτερικά από μια στιβάδα μυοεπιθηλιακών κυττάρων. Το στρώμα ανάμεσα στα λοβία είναι υποκυτταρικό και συντίθεται από ινολιπόδη ιστό. Κάθε λοβίο διαχωρίζεται σε 10-100 αδενοκυψέλες, οι οποίες αφορίζονται από τη βασική μεμβράνη. Τα λοβία υπόκεινται σε δομικές αλλαγές κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου, μετά την επίδραση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης. Κατά το τέλος του έμμηνου κύκλου και με την πτώση των επιπέδων της προγεστερόνης, τα λοβία επανέρχονται στην αρχική τους κατάσταση. Οι γαλακτοφόροι πόροι εκβάλλουν ανεξάρτητα στη θηλή, η οποία εμφανίζει 15 έως 20 στόμια, το καθένα έχει διάμετρο 0,5 εκ. Οι πόροι λίγο πριν την έκβαση τους διευρύνονται δημιουργώντας του γαλακτοφόρους κόλπους. Στην Εικόνα 2 απεικονίζεται ο μαστός με τα επιμέρους τμήματα που τον αποτελούν.

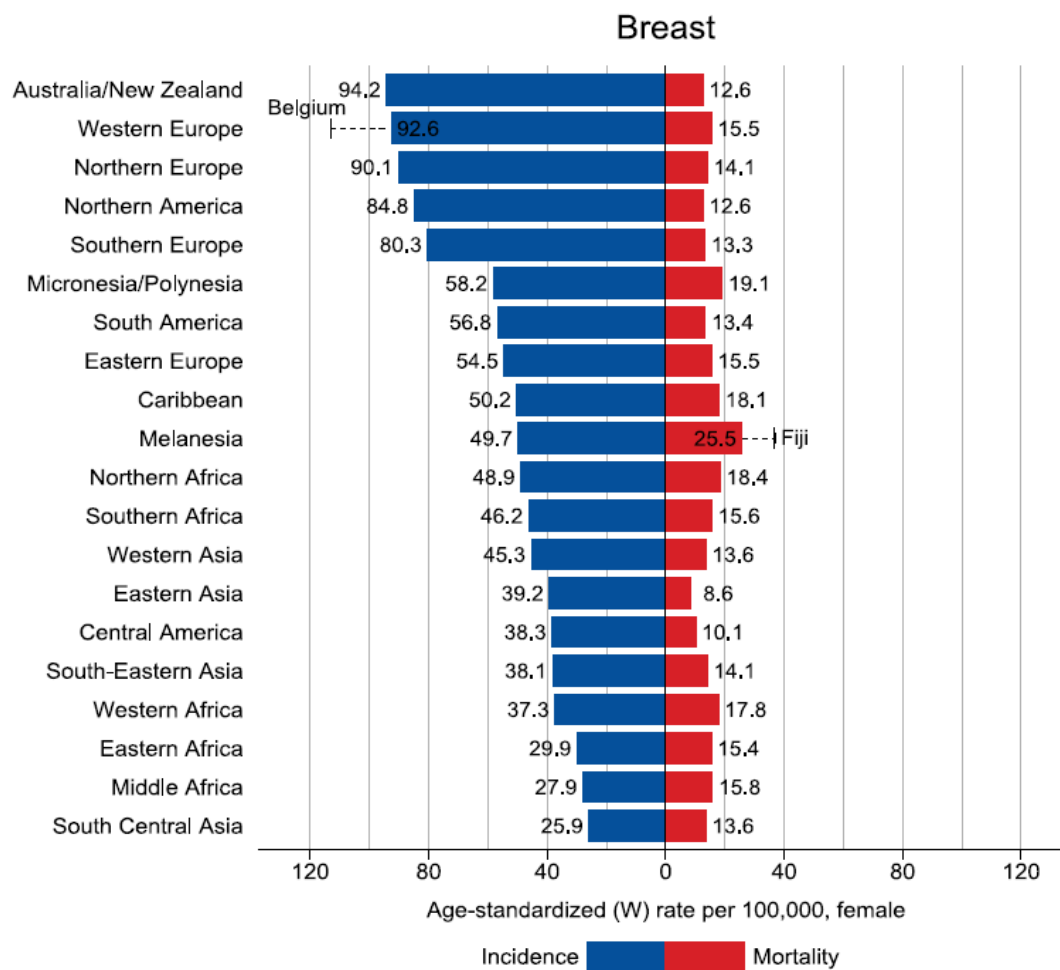


Εικόνα 2. Ανατομία του μαστού. Ο μαστός περιλαμβάνει 15-25 γαλακτοφόρους πόρους, οι οποίοι ξεκινούν από την θηλή, διακλαδίζονται σε μικρότερους πόρους και καταλήγουν στους λοβούς. Το λοβίο αναπτύσσεται από τα άκρα των εξωλοβιακών πόρων, από τα οποία σχηματίζονται οι αδενοκυψέλες παρόμοιας δομής με τους σιελογόνους αδένες και την εξωκρινή μείρα του παγκρέατος. Καθώς οι γαλακτοφόροι πόροι πλησιάζουν στη θηλή ανοίγουν για να σχηματίσουν γαλακτοφόρους κόλπους, πριν να στενέψουν ξανά για να εκβάλλουν στη λήκυθο της θηλής. (Feng et al, 2018)

1.3. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ

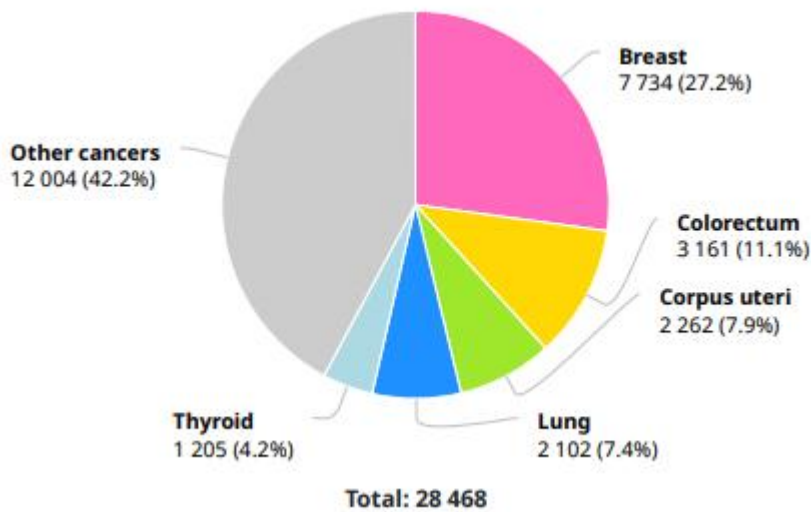
1.3.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Ο καρκίνος του μαστού, αποτελεί μείζον πρόβλημα υγείας για τις γυναίκες όλου του κόσμου. Σύμφωνα με στατιστικά δεδομένα που καταγράφηκαν το 2018, ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο συχνός τύπος καρκίνου στις γυναίκες με ποσοστό 11,6% (2.088.849 εκατομμύρια περιστατικά) των συνολικών περιπτώσεων καρκίνου, ενώ ευθύνεται για το 15.4% (626.679 περιπτώσεις) των θανάτων στις αναπτυγμένες χώρες (Bray et al., 2018). Στην Εικόνα 3 παρατηρούνται αναλυτικά ποσοστά διάγνωσης καρκίνου, αλλά και θανάτου σε διάφορες χώρες. Χαρακτηριστικά είναι τα υψηλά ποσοστά καρκίνου του μαστού στη Δυτική και Νότια Ευρώπη, Αυστραλία και Βόρεια Αμερική, ενώ μειωμένα ποσοστά αναφέρονται στη Ανατολική Αφρική αλλά και στην Νότια Ασία σύμφωνα με την παρακάτω γραφική παράσταση.



Εικόνα 3. Ταξινόμηση περιοχών της Γης με βάση τα ποσοστά διάγνωσης και θνησιμότητας από καρκίνο μαστού σύμφωνα με στατιστικές μελέτες του 2018. (Bray et al., 2018).

Στην Εικόνα 4 καταγράφονται οι πιο συχνοί καρκίνοι που παρατηρούνται σε γυναίκες στον Ελληνικό πληθυσμό, σύμφωνα με τις τελευταίες στατιστικές αναλύσεις που παρουσιάζονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Ο καρκίνος μαστού αποτελεί το πιο συχνό τύπο καρκίνο στις Ελληνίδες γυναίκες σε ποσοστό 27,2%.



Εικόνα 4. Τα περιστατικά καρκίνων σε γυναίκες στον Ελληνικό πληθυσμό. (The Global Cancer Observatory, 2018)

Οι επιστήμονες έχουν αναγνωρίσει αρκετούς παράγοντες, οι οποίοι έχουν συσχετιστεί με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου μαστού τόσο στις γυναίκες, όσο και στους άντρες. Οι κυριότεροι παράγοντες είναι:

Ηλικία: Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού αυξάνεται στις μεγαλύτερες ηλικίες. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί στο Ηνωμένο Βασίλειο ότι τέσσερις στις πέντε όλων των περιπτώσεων καρκίνου μαστού αφορούν γυναίκες ηλικίας άνω των 50 ετών (Cancer Research UK, 2011). Τα στοιχεία αποδεικνύουν πως ο καρκίνος του μαστού μπορεί να προκύψει σε οποιαδήποτε ηλικία μετά την εφηβεία. Ωστόσο, τα ποσοστά εμφάνισής του αυξάνονται όσο ανεβαίνουμε τις ηλικιακές κλίμακες (Anderson et al., 2004).

Φύλο: Οι γυναίκες έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να νοσήσουν από καρκίνο μαστού σε αντίθεση με τους άνδρες (Golshan et al., 2007). Η αναλογία γυναικών προς τους άνδρες που διαγιγνώσκονται με καρκίνο μαστού είναι 100:1 (Giorgano et al., 2002). Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι οι γυναίκες έχουν περισσότερα μαστικά κύτταρα, επομένως εκτίθενται σε υψηλότερα επίπεδα οιστρογόνων, τα οποία μπορούν να προωθήσουν την εμφάνιση του καρκίνου μαστού.

Ηλικία εμμηναρχής – εμμηνόπαυσης: Η νεότερη ηλικία εμμηναρχής (<12 ετών) αυξάνει ελαφρά τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου μαστού, κυρίως επειδή η γυναίκα εκτίθεται πιο νωρίς στα οιστρογόνα (Kvale & Heuch, 1988). Αντίθετα η νεαρή ηλικία εμμηνόπαυσης θεωρείται προστατευτική ανεξάρτητα από το αν είναι φυσική ή χειρουργική.

Ηλικία εγκυμοσύνης: Έρευνες έχουν δείξει ότι όσο πιο νέα είναι η γυναίκα στην πρώτη ολοκληρωμένη εγκυμοσύνη της, τόσο λιγότερος είναι ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού, καθώς και οι επιπλέον εγκυμοσύνες συμβάλλουν στη μείωση του κινδύνου. Συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί ότι στις γυναίκες που έχουν μια πρώτη ολοκληρωμένη εγκυμοσύνη πριν την ηλικία των 20 ετών, ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού είναι περίπου ο μισός, σε αντίθεση με τις γυναίκες όπου η πρώτη εγκυμοσύνη τους είναι σε ηλικία μεγαλύτερη των 30 ετών και διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να νοσήσουν από καρκίνο μαστού (Chie et al., 2000).

Οικογενειακό ιστορικό: Το μεγαλύτερο μέρος του καρκίνου του μαστού καταλαμβάνουν οι σποραδικές περιπτώσεις, ενώ το 10%-30% του συνόλου καταλαμβάνουν ο κληρονομικός και ο οικογενής καρκίνος μαστού. Ο κληρονομικός καρκίνος του μαστού είναι αποτέλεσμα γαμετικών μεταλλαγών σε ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα οποία συνήθως κληρονομούνται στους απογόνους κατά τον αυτοσωμικό επικρατή τρόπο. Το οικογενειακό ιστορικό είναι πλέον ένας από τους πιο καθιερωμένους παράγοντες κινδύνου του καρκίνου του μαστού με τα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* να ευθύνονται για ένα μεγάλο ποσοστό του κληρονομικού καρκίνου του μαστού. Πιο συγκεκριμένα, σε γυναίκες που φέρουν μεταλλαγή στο γονίδιο *BRCA1* ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου μαστού είναι περίπου 80% μέχρι την ηλικία των 80 χρόνων, ενώ η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου ωοθηκών είναι περίπου 40%. Αντίστοιχα, ο δια βίου κίνδυνος για τις γυναίκες που φέρουν μεταλλαγές στο γονίδιο *BRCA2* είναι περίπου 60% και 20%. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η υψηλή συσχέτιση γαμετικών μεταλλαγών στο γονίδιο *BRCA2* με την εμφάνιση ανδρικού καρκίνου μαστού, με το ποσοστό του δια βίου κινδύνου να φτάνει το 6%. Άτομα που φέρουν μεταλλαγές στο γονίδιο *BRCA2* έχουν επίσης αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου προστάτη και παγκρέατος. Με την εξέλιξη των μεθόδων αλληλούχισης έχουν ανακαλυφθεί κι άλλα γονίδια, των οποίων οι γαμετικές μεταλλαγές σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου μαστού.

Ακτινοβολία: Η έκθεση στην ιονίζουσα ακτινοβολία θεωρείται η μεγαλύτερη και η πιο εδραιωμένη περιβαλλοντική αιτία πρόκλησης οποιοδήποτε τύπου καρκίνου στις

γυναίκες και στους άνδρες, μεταξύ των οποίων και του καρκίνου μαστού. Η ιονίζουσα ακτινοβολία μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού μέσα από μια σειρά διαφορετικών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της άμεσης μεταλλαξιγένεσης και της γονιδιωματικής αστάθειας (Collins et al., 2003), και των αλλαγών στο μικροπεριβάλλον των κυττάρων του μαστού που μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή της διακυτταρικής επικοινωνίας μεταξύ των μαστικών κυττάρων (Wright et al., 2005).

Θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης: Η χρήση της ορμονικής υποκατάστασης έχει ελαττωθεί εξαιτίας της συσχέτισης στα τέλη της δεκαετίας του 1970 με τον καρκίνο του ενδομητρίου. Έχει αποδειχθεί ότι η ορμονική υποκατάσταση έχει συσχετιστεί με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού, όταν αυτή εφαρμόζεται 5 έτη και περισσότερο. Μάλιστα ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού εκτιμάται στο ποσοστό 30-50% (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer Breast cancer and hormone replacement therapy, 1997).

Αντισυλληπτικά: Δεν υπάρχει κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου μαστού από τη στιγμή που η χρήση των αντισυλληπτικών έχει διακοπεί για 10 ή και περισσότερα χρόνια (Kubba, 2003).

Το κάπνισμα: Δεν έχει καμία επίδραση στον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (Palmer et al., 1991).

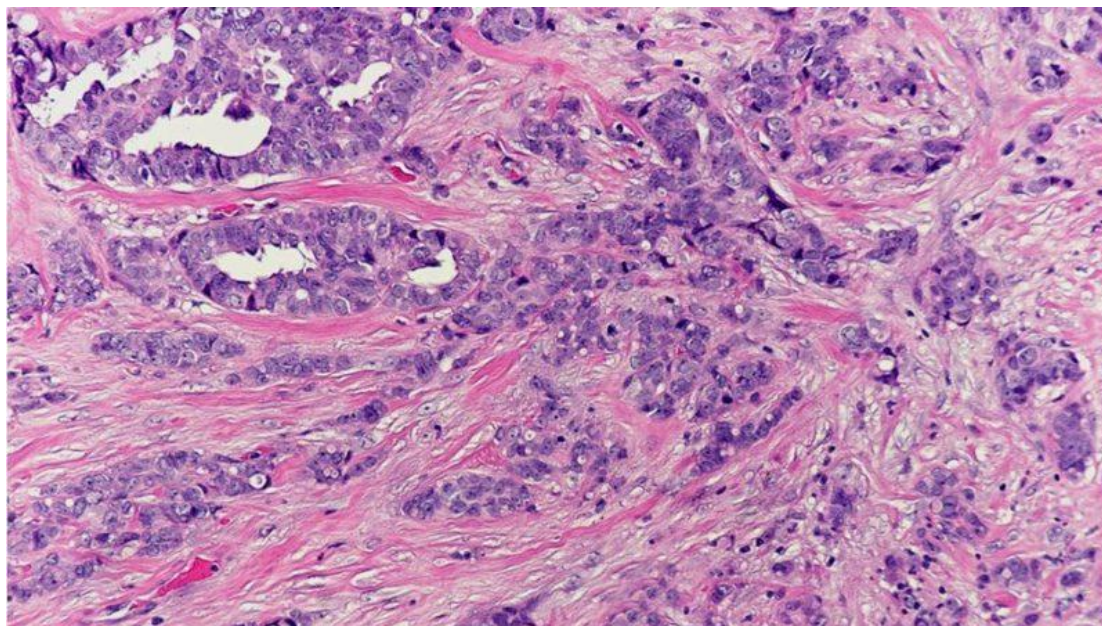
Αλκοόλ: Η κατανάλωση αλκοόλ έχει αναφερθεί συχνά ως ένας παράγοντας εμφάνισης καρκίνου μαστού. Ο κίνδυνος που σχετίζεται με το επίπεδο κατανάλωσης αλκοόλ ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των ερευνών (Schatzkin & Longnecker, 1994). Στο σύνολό τους, οι μελέτες δείχνουν ότι η κατανάλωση αλκοόλ σε ένα επίπεδο του ενός έως δύο ποτά την ημέρα αυξάνει τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού (σχετικός κίνδυνος περίπου 1.2-1.4).

Παχυσαρκία: Διεθνείς συγκρίσεις δείχνουν μια ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στη μέση πρόσληψη λίπους ανά χώρα και στα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του μαστού (Hunter & Willett, 1994). Η απόκτηση βάρους στην ενήλικη ζωή πριν την εμμηνόπαυση μειώνει ελαφρά τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου μαστού. Ωστόσο το υπερβολικό βάρος μετά την εμμηνόπαυση αυξάνει τον κίνδυνο καρκίνου μαστού. Αυτό συμβαίνει επειδή ο λιπώδης ιστός είναι η κύρια πηγή των οιστρογόνων μετά την εμμηνόπαυση, οπότε όσο περισσότερο είναι το σωματικό λίπος, τόσο υψηλότερο είναι το επίπεδο των οιστρογόνων, το οποίο με τη σειρά του, μπορεί να αυξήσει κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού

1.3.2. ΙΣΤΟΠΟΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

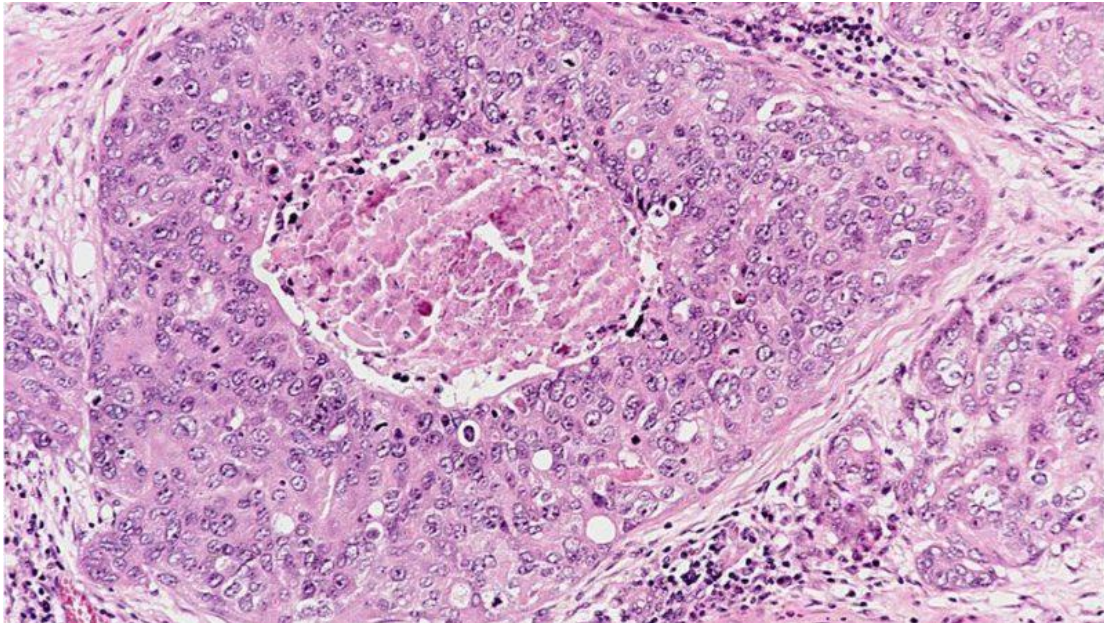
Οι κακοήθεις νεοπλασίες του μαστού κατατάσσονται σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας σε διάφορους ιστολογικούς τύπους ανάλογα με την ιστοπαθολογική τους εικόνα, το βαθμό διαφοροποίησης, τη σταδιοποίηση της νόσου κατά το TNM σύστημα και τέλος, με την έκφραση ορισμένων υποδοχέων και πρωτεϊνών. Οι συχνότεροι ιστολογικοί τύποι είναι το πορογενές και το λοβιακό καρκίνωμα του μαστού (Lakhani et al., 2012), ακολουθούν οι λιγότεροι συχνοί ιστολογικοί τύποι, όπως το μυελοειδές καρκίνωμα, το θηλώδες καρκίνωμα και το μικτό καρκίνωμα μαστού.

Το πορογενές καρκίνωμα μαστού διακρίνεται στο διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (Invasive Ductal Carcinoma) και στο μη διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (Non Invasive Ductal Carcinoma-DCIS (Ductal Carcinoma In Situ)). Το διηθητικό καρκίνωμα χαρακτηρίζεται από τη διήθηση των παρακείμενων ιστών και τη τάση για μετάσταση σε απομακρυσμένες περιοχές. Το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μαστού ταξινομείται σε πολλούς ιστολογικούς υποτύπους σύμφωνα με ένα ευρύ φάσμα κριτηρίων, συμπεριλαμβανομένου του τύπου των κυττάρων, τη θέση έκκρισης, τη μορφολογία και το ανοσοϊστοχημικό προφίλ. Επιπλέον, είναι ο πιο συχνός τύπος καρκίνου μαστού και ευθύνεται για το 22% όλων των καρκίνων των γυναικών, ενώ είναι μια ετερογενής ομάδα όγκων (Winchester et al., 1998). Η πρόγνωση της νόσου θεωρείται καλή εάν εντοπιστεί σε πρώιμο στάδιο. Είναι αξιοσημείωτο ότι έχει παρατηρηθεί υψηλότερη συχνότητα του διηθητικού πορογενούς καρκινώματος στον αριστερό μαστό με μια αναλογία σε σύγκριση με τον δεξιό μαστό 1,7 προς 1 (Diseases of the Breast, 1984). Στην Εικόνα 5 απεικονίζεται το διηθητικό πορογενές διηθητικό καρκίνωμα μαστού όπως παρατηρείται στο μικροσκόπιο.

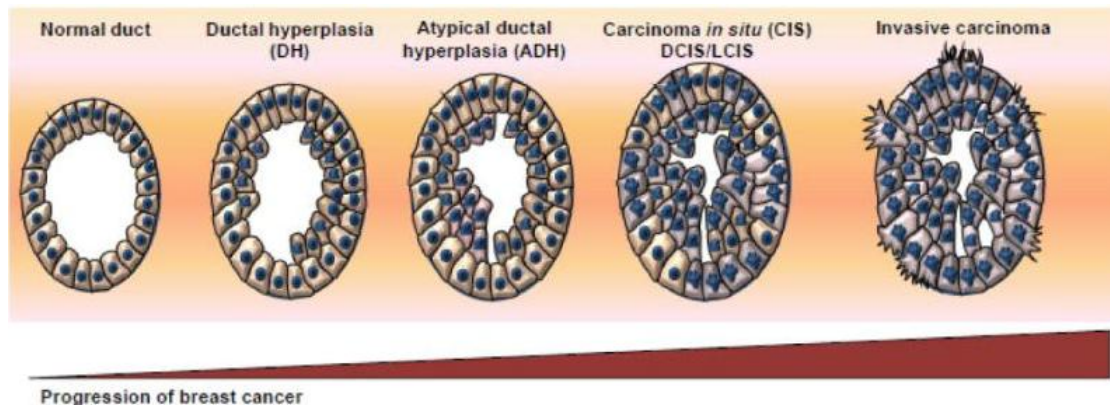


Εικόνα 5. Παράδειγμα διηθητικού πορογενούς καρκινώματος μαστού με βαθμό διαφοροποίησης 2 (Grade 2).

Στο μη διηθητικό πορογενές καρκίνωμα τα καρκινικά κύτταρα παραμένουν εντός των γαλακτοφόρων πόρων, δεν μεγαλώνουν και δεν διηθούν γειτονικούς ιστούς ούτε εξαπλώνονται σε απομακρυσμένα όργανα. Οι μη διηθητικοί καρκίνοι συχνά αποκαλούνται καρκινώματα *in situ*, δηλαδή στο «ίδιο μέρος». Στην Εικόνα 6 απεικονίζεται το διηθητικό πορογενές μη διηθητικό καρκίνωμα μαστού όπως παρατηρείται στο μικροσκόπιο, ενώ στην Εικόνα 7 απεικονίζονται τα στάδια εξέλιξης του όγκου σε έναν πόρο του μαστού.

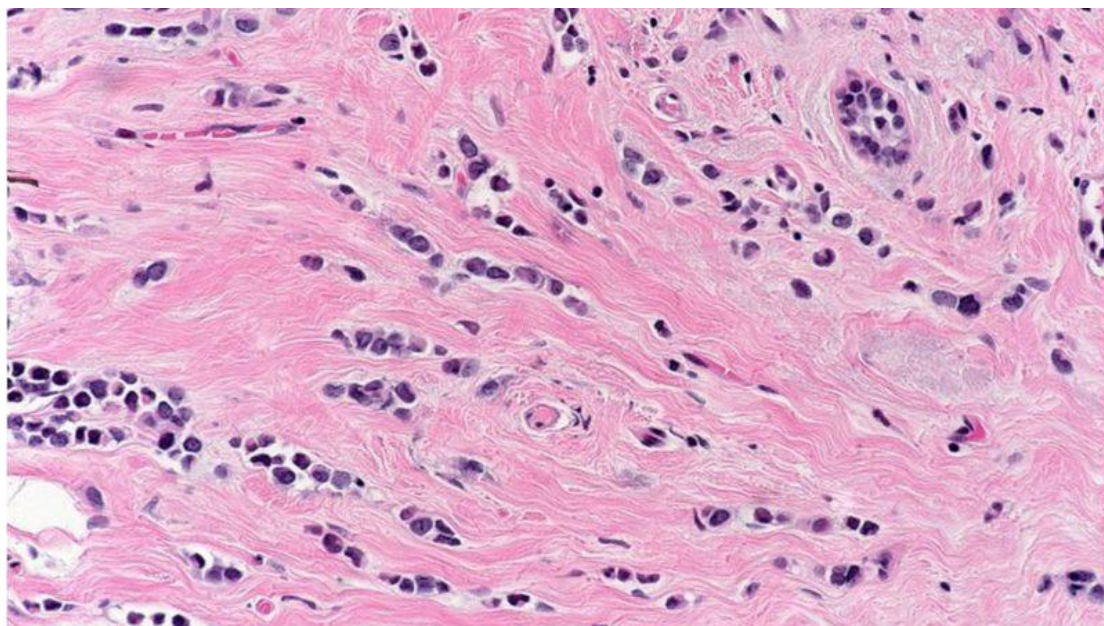


Εικόνα 6. Παράδειγμα μη διηθητικού πορογενούς καρκινώματος μαστού.

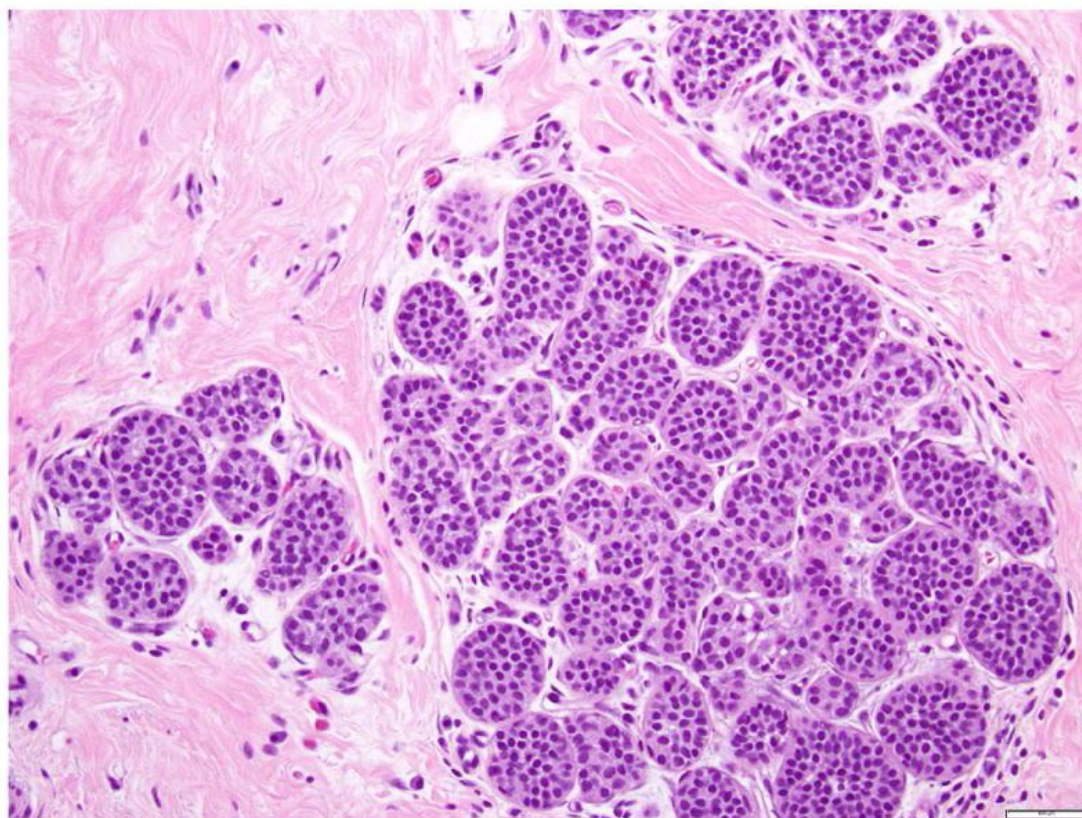


Εικόνα 7. Ο καρκίνος μαστού πιστεύεται ότι αναπτύσσεται μέσα από μια σειρά καλά ορισμένων σταδίων. Αρχικά, τα κύτταρα του πόρου είναι φυσιολογικά, στη συνέχεια παρατηρείται μια υπερπλασία κάποιων κυττάρων, τα οποία αργότερα γίνονται άτυπα και πιο μετά με τη συσσώρευση μεταλλαγών γίνονται καρκινικά. Όταν τα καρκινικά κύτταρα παραμένουν εντοπισμένα στον πόρο και δεν διηθούν τη βασική μεμβράνη και τους περιβάλλοντες ιστούς και δεν εξαπλώνονται σε απομακρυσμένα όργανα τότε το καρκίνωμα ονομάζεται μη διηθητικό πορογενές. Όμως, όταν τα καρκινικά κύτταρα διηθήσουν τη βασική μεμβράνη και εισέλθουν στην αιματική κυκλοφορία, τότε το καρκίνωμα ονομάζεται διηθητικό πορογενές. (Mukhopadhyay et al., 2011).

Το λοβιακό καρκίνωμα μαστού διακρίνεται και αυτό με τη σειρά του σε διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα (Invasive Lobular Carcinoma) και σε μη διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα (Non Invasive Lobular Carcinoma- LCIS (Lobular Carcinoma In Situ)). Το διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα συνιστά το 5 έως 15% των διηθητικών καρκινωμάτων (Rakha et al., 2008) και συχνά είναι πολυεστιακό και αμφοτερόπλευρο. Τα καρκινικά κύτταρα σε αυτή την περίπτωση διασπύουν το τοίχωμα των λοβίων, διηθούν τους παρακείμενους ιστούς και μεθίστανται σε απομακρυσμένες θέσεις (Εικόνα 8). Τα τελευταία είκοσι χρόνια έχει παρατηρηθεί η εμφάνιση του συγκεκριμένου ιστολογικού τύπου καρκίνου μαστού σε γυναίκες ηλικίας άνω των 50 ετών, οι οποίες έκαναν χρήση της θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης (Verkooyen et al., 2003). Η μέση ηλικία των γυναικών με διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα είναι 1 με 3 χρόνια μεγαλύτερη από τη μέση ηλικία των γυναικών με διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (Berg et al., 2003). Το μη διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα δε θεωρείται κακοήθεια του μαστού και συνίσταται σε ακανόνιστη αύξηση των κυττάρων που καλύπτουν το εσωτερικό τοίχωμα των λοβίων των γαλακτοπαραγωγών αδένων του μαστού, τα οποία όμως δεν διηθούν το τοίχωμά τους (Εικόνα 9). Ωστόσο σχετίζεται με τον αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου μαστού συνήθως πολλά χρόνια αργότερα. Υπάρχουν δύο ανοσοϊστοχημικοί δείκτες που διακρίνουν το διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα μαστού, η έλλειψη έκφρασης της E-καδχερίνης, β-κατενίνης και η θετική έκφραση της κερατίνης. Επιπρόσθετα, η έκφραση του δείκτη CK8-18, ο οποίος εκφράζεται περιπτυρηνικά ενώ βάφει το περιφερικά το κυτταρόπλασμα των κυττάρων των πόρων. Αντιθέτως, στο μη διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μαστού εκφράζονται σταθερά η E-καδχερίνη, η β-κατενίνη ενώ η κερατίνη μπορεί να εκφράζεται ελάχιστα ή και καθόλου.



Εικόνα 8. Παράδειγμα διηθητικού λοβιακού καρκινώματος μαστού με χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης 1 (Grade 1).



Εικόνα 9. Παράδειγμα μη διηθητικού λοβιακού καρκινώματος μαστού.

Το μυελοειδές καρκίνωμα μαστού είναι ένας σπάνιος, ειδικός υπότυπος καρκίνου μαστού, ο οποίος παρουσιάζεται από μια καλά καθορισμένη μάζα όγκου με αναπλαστική μορφολογία. Ωστόσο έχει καλύτερη πρόγνωση από το διηθητικό καρκίνωμα μαστού. Εμφανίζεται κυρίως στις γυναίκες με ηλικία περίπου στα 50 έτη, ενώ είναι περισσότερος κοινός ιστολογικός τύπος στις γυναίκες οι οποίες φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRCA1* (Armes & Venter, 2002). Το ποσοστό εμφάνισης του μυελοειδούς καρκινώματος είναι 5-7% (Roosen, 2009).

Το διηθητικό θηλώδες καρκίνωμα μαστού είναι ένας σπάνιος υπότυπος καρκίνου μαστού με καλύτερη πρόγνωση από το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μαστού. Εμφανίζεται κυρίως στις μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και αποτελεί το 1-2% των διηθητικών καρκίνων μαστού (Rosai, 2011).

1.3.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του καρκίνου μαστού δεν μπορούν απόλυτα να αποτυπώσουν την ετερογένεια του όγκου, γι' αυτό ακολούθησε περαιτέρω ταξινόμηση του καρκίνου μαστού ανάλογα με το μοριακό πρότυπο. Επομένως, ο καρκίνος μαστού ταξινομείται με βάση του μοριακού προφίλ σε τουλάχιστον τέσσερις κατηγορίες, οι οποίες παρατίθενται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Βασικοί μοριακοί υπότυποι καρκίνου μαστού.

Μοριακοί Υπότυποι	Υποδοχείς που εκφράζουν	Επιπρόσθετοι δείκτες
Αυλικού τύπου Α (Luminal A)	ER ⁺ και/ή PR ⁺ , HER2 ⁻ , χαμηλή έκφραση Ki-67	
Αυλικού τύπου Β (Luminal B)	ER ⁺ και/ή PR ⁺ , HER2 ⁻ /ή HER2 ⁺ με υψηλή έκφραση Ki-67	
Όγκοι που υπερεκφράζουν τον HER2 (HER2 Enriched)	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺	CK5/6+/- EGFR +/-
Τριπλά Αρνητικός (Triple negative)	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	CK5/6+ EGFR+

Αυλικού τύπου A (Luminal A): Οι όγκοι αυτοί εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς οιστρογόνων (ER) και/ή προγεστερικούς υποδοχείς (PR), ενώ δεν εκφράζουν τον παράγοντα πολλαπλασιασμού Ki-67 και δεν φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53*. Επίσης, θεωρείται η λιγότερο επιθετική μορφή ER+ καρκίνου του μαστού με καλύτερη πρόγνωση.

Αυλικού τύπου B (Luminal B): Οι όγκοι αυτοί εκφράζουν υποδοχείς οιστρογόνων και/ή υποδοχείς προγεστερόνης με υπερέκφραση του υποδοχέα HER2 ή απουσία έκφρασης του υποδοχέα HER2 αλλά με υψηλή έκφραση του Ki-67. Συνήθως, οι όγκοι Αυλικού τύπου B εξελίσσονται πιο γρήγορα από τους όγκους Αυλικού τύπου A και έχουν τη χειρότερη πρόγνωση. Αν ο όγκος είναι ER+ και PR+ , οι θεραπείες που αναστέλλουν τις ορμόνες, όπως η ταμοξιφένη ή οι αναστολείς της αρωματάσης μπορούν να σταματήσουν την ανάπτυξη του όγκου.

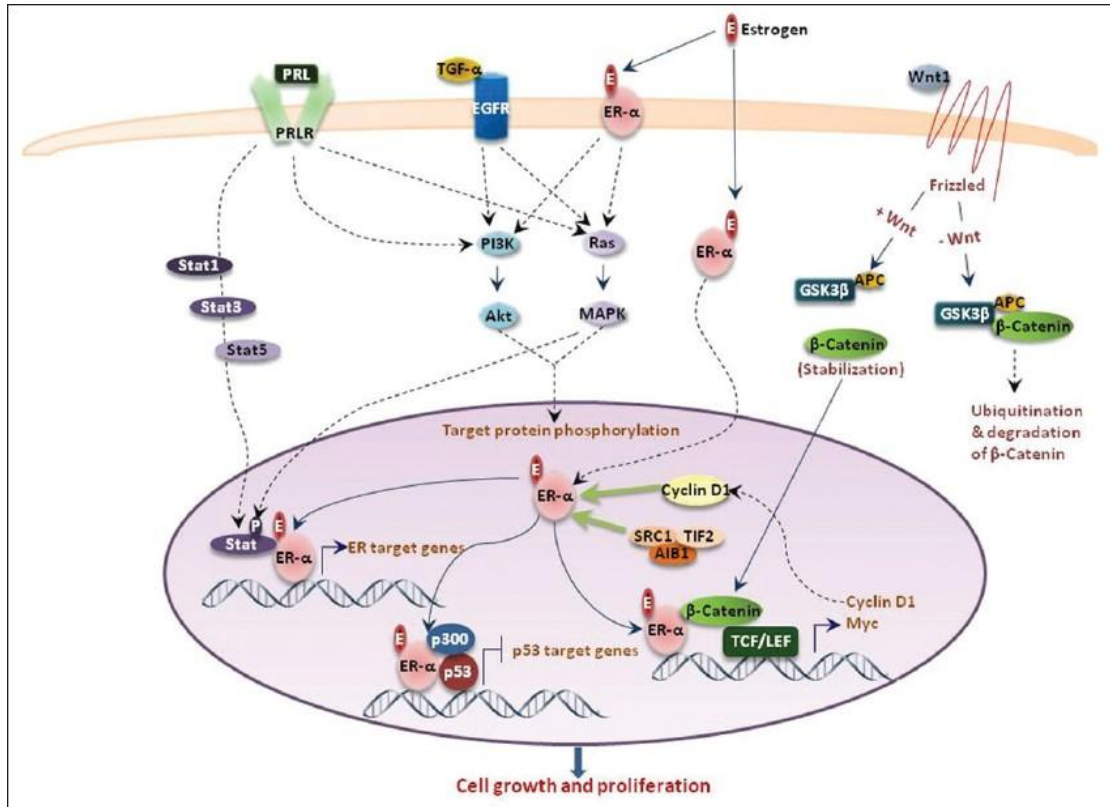
HER2 enriched: Όγκοι που υπερεκφράζουν τον HER2: Ο υποδοχέας HER2 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη και μέλος της οικογένειας των επιδερμικών αυξητικών παραγόντων με δράση κινάσης τυροσίνης που περιλαμβάνει τους υποδοχείς EGFR/HER1, HER3 και HER4. Η πρόσδεση των κατάλληλων αυξητικών παραγόντων στους υποδοχείς αυτού προκαλεί τον ομοδιμερισμό ή ετεροδιμερισμό τους, τη φωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης της ενδοκυττάριας περιοχής με αποτέλεσμα τη μεταγωγή του σήματος στον πυρήνα. Ο υποδοχέας HER2 είναι το μόνο μέλος της οικογένειας HER, το οποίο στερείται γνωστού προσδέτη. Η υπερέκφραση του υποδοχέα HER2 έχει παρατηρηθεί στο 20% των περιπτώσεων καρκίνου μαστού, ενώ το 50% αυτών των όγκων δεν εκφράζουν τους ορμονικούς υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης (Gusterson et al., 1992). Παρόλο τον επιθετικό φαινότυπο αυτών των όγκων, υπάρχει στοχευμένη θεραπεία των HER2 θετικών καρκίνων μαστού με παράγοντες που στοχεύουν τον υποδοχέα HER2 όπως μονοκλωνικό αντίσωμα trastuzumab (Herceptin) και αναστολείς τυροσινικής κινάσης.

Τριπλά αρνητικός καρκίνος μαστού: Ο τριπλά αρνητικός καρκίνος μαστού αποτελεί μια υπο-ομάδα των καρκίνων μαστού που δεν εκφράζουν τους οιστρογονικούς υποδοχείς (ER), τους προγεστερονικούς υποδοχείς (PR) και τον υποδοχέα HER2. Αυτή η ετερογενής ομάδα όγκων έχει σημαντική επικάλυψη με βασικούς τύπους (basal-like) όγκους (Foulkes et al., 2010), καθώς και με τον κληρονομικό καρκίνο μαστού με μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRCA1* (Musolino et al., 2007). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι BRCA1-καρκίνοι μοιράζονται κλινικοπαθολογοανατομικά

χαρακτηριστικά με τους τριπλά αρνητικούς καρκίνους μαστού (Li et al., 2008), καθώς και ότι οι ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού εμφανίζουν γονιδιακή ενίσχυση και υπερέκφραση του EGFR σε ποσοστό 30-52% (Reis-Filho & Tutt, 2008). Τέλος ο συγκεκριμένος υπότυπος καρκίνου μαστού είναι ορμονοάντοχος όγκος καθώς δεν αποτελεί στόχο της ορμονοθεραπείας.

1.4. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Η δημιουργία και ανάπτυξη καρκίνου οδηγείται από γενετικές και επιγενετικές μεταβολές που επιτρέπουν στα κύτταρα να ξεφύγουν από μηχανισμούς που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη μετανάστευση τους. Πολλές από αυτές τις μεταβολές αντιστοιχούν σε μονοπάτια σηματοδότησης που διέπουν τον πολλαπλασιασμό, τον κυτταρικό θάνατο, τη διαφοροποίηση και την κυτταρική κινητικότητα. Επομένως, μεταλλαγές σε πρωτο-ογκογονίδια μπορούν να προκαλέσουν υπερδραστηριότητα των οδών σηματοδότησης, ενώ η απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων εξαλείφει τη δράση αρνητικών ρυθμιστών της σηματοδότησης. Μερικά από τα πιο σημαντικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του μαστικού αδένα αλλά και στον καρκίνο μαστού είναι η σηματοδότηση των υποδοχέων οιστρογόνων (ER), του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (HER2) και το σηματοδοτικό μονοπάτι WNT. Στην Εικόνα 10 αναπαριστάται η λειτουργία των οιστρογόνων σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετάται το σηματοδοτικό μονοπάτι WNT.



Εικόνα 10. Οι λειτουργίες των οιστρογόνων σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια. Η πρόσδεση του οιστρογόνου (E, estrogen), στο οιστρογονικό υποδοχέα (ER- α , Estrogen Receptor) οδηγεί τη μεταφορά του συμπλόκου προσδέτη-υποδοχέα στον πυρήνα του κυττάρου ενεργοποιώντας τη δράση μεταγραφικών παραγόντων με αποτέλεσμα την έκφραση ανεξάρτητων γονιδίων. Στο μονοπάτι Wnt που θα αναλυθεί περαιτέρω όταν ο προσδέτης Wnt συνδεθεί στον υποδοχέα Frizzled, η β -κατενίνη εισέρχεται στον πυρήνα, συνδέεται με μεταγραφικούς παράγοντες προκαλώντας την έκφραση γονιδίων- στόχων του μονοπατιού. Η δράση της β -κατενίνη στον πυρήνα ρυθμίζεται από τον οιστρογονικό υποδοχέα. Επιπρόσθετα, με την πρόσδεση του οιστρογόνου στη μεμβράνη του κυττάρου ενεργοποιεί καθοδικά και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως PI3K και Ras-MAPK (Mohibi et al., 2011).

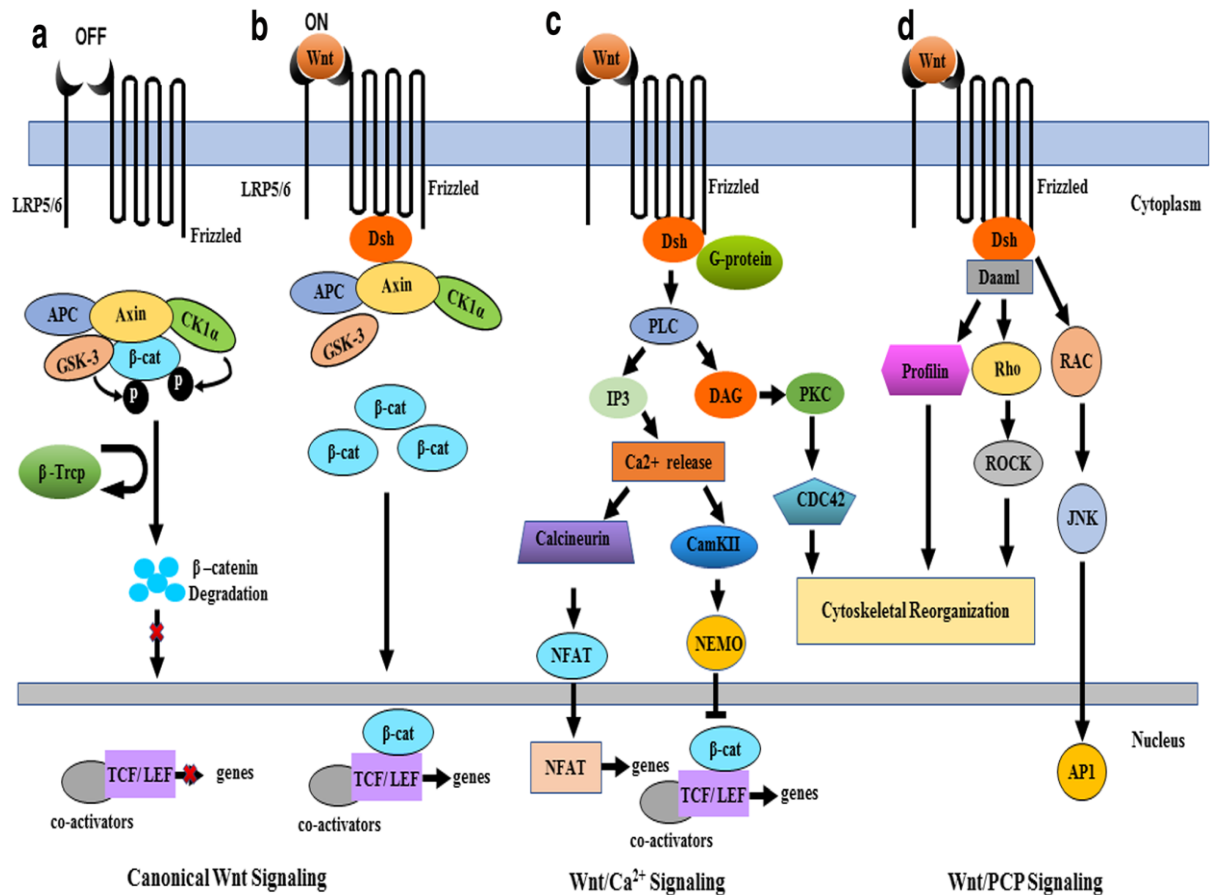
1.5. ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ WNT

1.5.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Το μονοπάτι Wnt ανακαλύφθηκε το 1982 με την ταυτοποίηση του γονιδίου Int-1 (Integration-1), το οποίο σχηματίζει όγκους στο μαστό των ποντικών όταν ενεργοποιείται από την ενσωμάτωση του ιού MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) (Nusse & Varmus, 1982). Το γονίδιο Int-1 θεωρείται ογκογονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί μια εκκριτική πρωτεΐνη, πλούσια σε κυστεΐνες. Αργότερα, δείχθηκε ότι το γονίδιο Wingless (Wg) στη *Drosophila*, το οποίο ελέγχει την πολικότητα τμημάτων κατά το στάδιο της προνύμφης, (Nusslein-Volhard & Wieschaus, 1980) και ονομάστηκε έτσι από τον μεταλλαγμένο φαινότυπο του (χωρίς φτερά), θεωρείται ομόλογο με το γονίδιο Int-1 (Rijsewijk et al., 1987) και έτσι μετονομάστηκε σε Wnt-1. Στη συνέχεια ακολούθησαν περαιτέρω έρευνες στις οποίες η πρωτεΐνη Armadillo (Arm), η οποία είναι συστατικό του Wg μονοπατιού βρέθηκε ότι είναι ομόλογη με τις πρωτεΐνες β κατενίνη και πλακοσφαιρίνη (McCrae et al., 1991, Peifer et al., 1992) και συνδέει το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt με την E-καδχερίνη που συμμετέχει στην κυτταρική προσκόλληση. Επιπλέον, μια ακόμη μελέτη έδειξε ότι μικροένεση του mRNA του γονιδίου Wnt-1 από ποντίκι σε πρώιμα έμβρυα βατράχων προκαλεί διπλασιασμό του άξονα σώματος τους δίνοντας τη δυνατότητα μελέτης του μονοπατιού Wnt στα σπονδυλωτά (McMahon & Moon, 1989). Οι μελέτες που ακολούθησαν τις επόμενες δεκαετίες έφεραν στο φως πολυάριθμα συστατικά του συγκεκριμένου σηματοδοτικού μονοπατιού, καθώς η απορρύθμιση αυτών έχει συσχετιστεί με αρκετές νόσους, όπως ο καρκίνος. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι το μονοπάτι αυτό σήμερα αποτελεί στόχο θεραπευτικών προσεγγίσεων με πολλά φαρμακευτικά μόρια να βρίσκονται ήδη στο στάδιο των κλινικών μελετών.

1.5.2. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ WNT

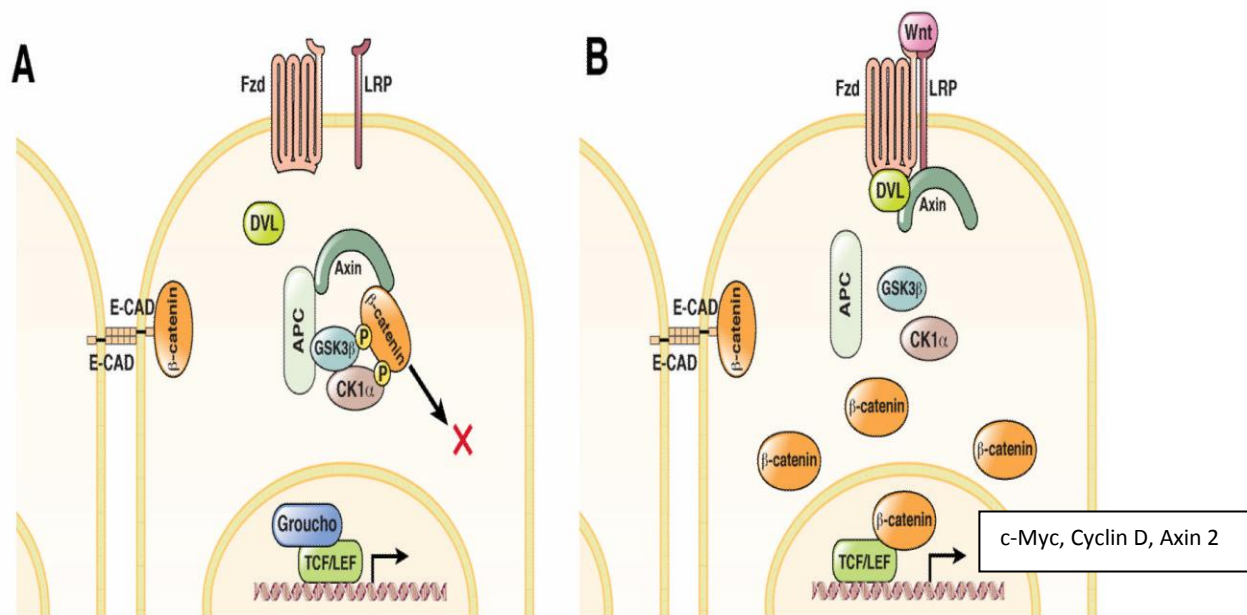
Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt ρυθμίζει μια ποικιλία θεμελιωδών κυτταρικών διαδικασιών στην εμβρυογένεση και στην ομοιόσταση των ενήλικων ιστών συμπεριλαμβάνοντας τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση, τη μορφολογία, τον σχηματισμό του άξονα και την ανάπτυξη των οργάνων (Wodarz & Nusse, 1998, Amerongen & Nusse, 2009). Το πολύπλοκο αυτό σηματοδοτικό μονοπάτι μεταφέρει σήματα από το εξωτερικό περιβάλλον με τη βοήθεια διαμεμβρανικών υποδοχέων και συν-υποδοχέων με στόχο την αλλαγή έκφρασης γονιδίων, ρυθμίζοντας έτσι τη λειτουργία των κυττάρων. Στους ενήλικους οργανισμούς η απορρύθμιση του μονοπατιού αυτού μπορεί να προκαλέσει νεοπλασία και την εξέλιξη του όγκου σε κακοήγη. Είναι αξιοσημείωτο ότι το μονοπάτι Wnt είναι εξαιρετικά συντηρημένο, γεγονός που δηλώνει ότι είναι παρόμοιο σε πολλά είδη από τους πιο απλούστερους οργανισμούς όπως τα μετάζωα (σπόγγιοι) μέχρι και τους πιο πολύπλοκους όπως ο άνθρωπος (Nusse et al., 1997). Υπάρχουν δύο ευδιάκριτα Wnt μονοπάτια για τη μεταγωγή σημάτων, το κανονικό (εξαρτώμενο από τη β-κατενίνη) και το μη κανονικό (ανεξάρτητο από τη β-κατενίνη) μονοπάτι. Το κανονικό Wnt μονοπάτι ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο, την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό (Niehrs & Acebron, 2012). Το μη κανονικό μονοπάτι περιλαμβάνει δύο οδούς: α) την οδό PCP (Planar Cell Polarity), η οποία ρυθμίζει την κυτταρική κινητικότητα και την κυτταρική πολικότητα (Ridley et al., 2003) και β) την οδό Wnt/Ca²⁺, η οποία περιέχει το ενδοκυτταρικό ασβέστιο και προάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NFAT (πυρηνικός παράγοντας των ενεργοποιημένων T κυττάρων) (Dejmeck et al., 2006). Στην Εικόνα 11 απεικονίζονται το κανονικό σηματοδοτικό και το μη σηματοδοτικό μονοπάτι.



Εικόνα 11. Επιγραμματικά σχεδιαγράμματα των μονοπατιών WNT. α) Με την απουσία του προσδέτη της γλυκοπορωτεΐνης Wnt, το σύμπλοκο APC, Axin, GSK3-β και CK1 προκαλεί την αποικοδόμηση της κυτταροπλασματικής β-κατενίνης μέσω της φωσφορύλιωσης της από τις κινάσες GSK3-β και CK1. β) Με την παρουσία του προσδέτη Wnt το σύμπλοκο αποικοδόμησης της β-κατενίνης αδρανοποιείται όταν προσλαμβάνεται από το σύμπλοκο του υποδοχέα Frizzled-συνυποδοχέα LRP5/6 με τον προσδέτη Wnt. Το αποτέλεσμα είναι η συσσώρευση β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα και η μετατόπιση της στον πυρήνα, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή γονιδίων- στόχων του μονοπατιού. γ) Η οδός Wnt/Ca²⁺ ενεργοποιείται κατά την πρόσδεση του Wnt στον υποδοχέα Frizzled και η πρωτεΐνη Dsh προσελκύεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μέσω G-πρωτεϊνών. Αυτή η σηματοδότηση λειτουργεί για να ρυθμίσει την ενεργοποίηση καθοδικών μορίων όπως των κινασών PLC, CAMKII, PKC προκαλώντας την ενεργοποίηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Ο τελικός σκοπός του μονοπατιού είναι η ενεργοποίηση του μεταγραφικό παράγοντα NFAT, ο οποίος ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων που ελέγχουν την κυτταρική μετανάστευση και την κυτταρική μοίρα. δ) Η οδός Wnt/PCP ενεργοποιείται κατά την πρόσδεση μορίων Wnts στους υποδοχείς Frizzleds και στον συνυποδοχέα οδηγώντας σε πρόσληψη της πρωτεΐνης Dsh στην κυτταροπλασματική μεμβράνη σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο με την πρωτεΐνη DAAM1. Η τελευταία ενεργοποιεί την Rho, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την κινάση ROCK για τη ρύθμιση του κυτταροσκελετού. (Harb et al., 2019).

1.5.3. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ WNT/Β-ΚΑΤΕΝΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ

Το κανονικό σηματοδοτικό Wnt μονοπάτι είναι απαραίτητο σε πολλές κυτταρικές διεργασίες καθώς ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική διαφοροποίηση. Σε πολυάριθμες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έχουν αναγνωριστεί αρκετά συστατικά του. Παρ' όλα αυτά η λειτουργία πολλών από αυτών δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Το κανονικό μονοπάτι περιλαμβάνει ένα σημαντικό συστατικό-τελεστή, τη β-κατενίνη, μια πρωτεΐνη η οποία παραμένει σε χαμηλή συγκέντρωση στο κυτταρόπλασμα εξαιτίας της παρουσίας του συμπλόκου αποικοδόμησης/καταστροφής της. Σε αυτή την οδό η β-κατενίνη εισέρχεται στον πυρήνα προάγοντας τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων του μονοπατιού. Στην παρακάτω Εικόνα 12 απεικονίζεται το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη σε δύο διαφορετικές περιπτώσεις, απουσία ή παρουσία του προσδέτη Wnt.



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση του κανονικού Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού. Α) Όταν οι προσδέτες Wnt απουσιάζουν τα κυτταροπλασματικά επίπεδα της β-κατενίνης διατηρούνται σε μειωμένα επίπεδα εξαιτίας της δέσμευσης της από το σύμπλοκο αποικοδόμησης. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται κυρίως από τις πρωτεΐνες Axin και APC (Adenomatosis Polyposis Coli) και από τις κινάσες CK1 (Casein Kinase 1) και GSKE-β (Glycogen Synthase Kinase 3β), οι οποίες κινάσες φωσφορυλιώνουν τη β-κατενίνη σε συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα με αποτέλεσμα την ουβικιτινίωση της από την E3 λιγάσης ουβικουΐτινης β-TrCP (*β-transducin repeats containing protein*). Στη συνέχεια, η β-κατενίνη οδηγείται στο πρωτεάσωμα για την αποικοδόμηση της. Υπό αυτές τις συνθήκες οι μεταγραφικοί παράγοντες LEF (Lymphoid Enhancer Factor) και TCF (T-cell Factor) συνδέονται με την πρωτεΐνη συνκαταστολέα Groucho εμποδίζοντας τη μεταγραφή γονιδίων στόχων. Επιπλέον, απουσία των προσδετών Wnts, η β-κατενίνη συνδέεται με την E-καδχερίνη (E-CAD) για τον σχηματισμό των συνδέσμων προσκόλλησης μορίων (adherens junctions). Β) Αντιστρόφως, όταν οι προσδέτες Wnts είναι παρόντες προσδέονται στους υποδοχείς Frizzleds (Fzds), ο οποίος διαπερνά τη μεμβράνη επτά φορές και στον συνυποδοχέα LRP5 ή 6, έτσι οι υποδοχείς ετεροδιμερίζονται με αποτέλεσμα τη μετατόπιση στη μεμβράνη των Axin και DVL, την αποδιοργάνωση του συμπλόκου αποικοδόμησης και τη συσσώρευση της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα. Ένα υποσύνολο της β-κατενίνης οδηγείται στον πυρήνα, όπου εκτοπίζει τον συν-καταστολέα Groucho και σχηματίζει ένα σύμπλοκο με τους μεταγραφικούς παράγοντες TCF/LEF και με τη βοήθεια συνδιεγερτικών πρωτεϊνών ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων. Ορισμένα γονίδια-στόχοι του κανονικού Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού είναι: το ογκογονίδιο c-Myc, η μεταλλοπρωτεϊνάση MMP7, η CyclinD, το c-jun, η Axin2. (Bryan D. White, 2012)

Το κανονικό σηματοδοτικό Wnt μονοπάτι ξεκινάει με τους προσδέτες Wnts, οι οποίοι είναι γλυκοπρωτεΐνες και δεσμεύονται όταν είναι παρόντες στους διαμεμβρανικούς υποδοχείς Frizzleds. Ο υποδοχέας Frizzled (Fzd) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που διαπερνά επτά φορές τη διπλοστιβάδα της μεμβράνης.

Όταν απουσιάζουν οι προσδέτες Wnts τότε οι υποδοχείς Frizzleds και ο συνυποδοχέας τους LRP5 ή 6 παραμένουν ελεύθεροι και το σύμπλοκο καταστροφής της β-κατενίνης (destruction complex), το οποίο αποτελείται από τις πρωτεΐνες Axin, APC (Adenomatosis Polyposis Coli), τις κινάσες GSK-3β (Glycogen Synthase Kinase 3β) και CK1 (Casein Kinase 1) διατηρεί μειωμένα τα επίπεδα της κυτταροπλασματικής β-κατενίνης.

Οι κινάσες CK1 και GSK3-β φωσφορυλιώνουν τη β κατενίνη σε συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης. Αρχικά, η β-κατενίνη απαιτεί την πρωταρχική φωσφορυλίωση από την κινάση CK1 στη θέση σερίνη 45 (Ser45) για να ακολουθήσει η φωσφορυλίωση από την κινάση GSK3-β στις θέσεις θρεονίνη 41 (Thr41), σερίνη 35 (Ser35) και σερίνη 33 (Ser33) (MacDonald et al., 2009, Niehrs, 2012). Το αποτέλεσμα από τις φωσφορυλιώσεις είναι η αναγνώριση της β-κατενίνης από την E₃ λιγάση ουβικουιτίνης, b-TRCP (b-Tranducin Repeat Contain Protein), η οποία προσθέτει μόρια ουβικιτίνης με αποτέλεσμα την οδήγηση της β-κατενίνης στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Η φωσφορυλίωση από τις κινάσες CK1 και GSK3-β πραγματοποιείται στο αμινοτελικό άκρο της β-κατενίνης και θεωρείται περιοχή ιδιαίτερα ευάλωτη σε μεταλλαγές.

Όταν ο προσδέτης Wnt είναι παρών, συνδέεται στον υποδοχέα Frizzled ο οποίος αλληλεπιδρά σχηματίζοντας ετεροδιμερές σύμπλοκο με ένα συνυποδοχέα LRP 5 ή 6 (LDL Related Peptide) και ο οποίος διαπερνά μόνο μια φορά την κυτταρική μεμβράνη. Τα μοριακά γεγονότα που λαμβάνουν χώρα αμέσως μετά από την ενεργοποίηση των υποδοχέων αφορούν τη φωσφορυλίωση του συνυποδοχέα LRP5/6 από τις κινάσες CK1 και GSK3-β και την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Disheveled (Dvl για τη Drosophila και Dvl για τα σπονδυλωτά). Η πρωτεΐνη Dvl/Dsh ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση από τις κινάσες CK1 και GSK3-β (Sakanaka et al., 1999; Amit et al., 2002). Η λειτουργία της Dvl/Dsh είναι η απενεργοποίηση του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου αποικοδόμησης της β-κατενίνης. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητός, όμως το συνολικό αποτέλεσμα είναι ότι η β-κατενίνη δεν αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα, αντιθέτως σταθεροποιείται και εισέρχεται στον πυρήνα όπου προσδένεται στους μεταγραφικούς παράγοντες TCF

(T-cell Factor) και LEF (Lymphoid Enhancer Factor), ενεργοποιώντας τη μεταγραφή γονιδίων στόχων του μονοπατιού Wnt. Τα πιο σημαντικά γονίδια-στόχοι του μονοπατιού αυτού είναι το ογκογονίδιο c-Myc, η μεταλλοπρωτεΐνάση MMP7, CyclinD, c-jun, Axin2.

Αν θα είναι παρόντες ή απόντες οι προσδέτες Wnts εξαρτάται από την παρουσία ή απουσία των ανασταλτικών παραγόντων. Η σηματοδότηση του μονοπατιού Wnt μπορεί να ανασταλεί μέσω της αλληλεπίδρασης ενός προσδέτη Wnt με μια πρωτεΐνη της οικογένειας SFRPs (Secreted Frizzled Related Proteins) ή με μια πρωτεΐνη της οικογένειας WIF (Wnt-Inhibitory Factor-1), καθώς και με τη πρόσδεση των ανταγωνιστών Kremen και Dickkopf, οι οποίοι κυρίως αναστέλλουν την αλληλεπίδραση του υποδοχέα Fzd με τον συνυποδοχέα του LRP.

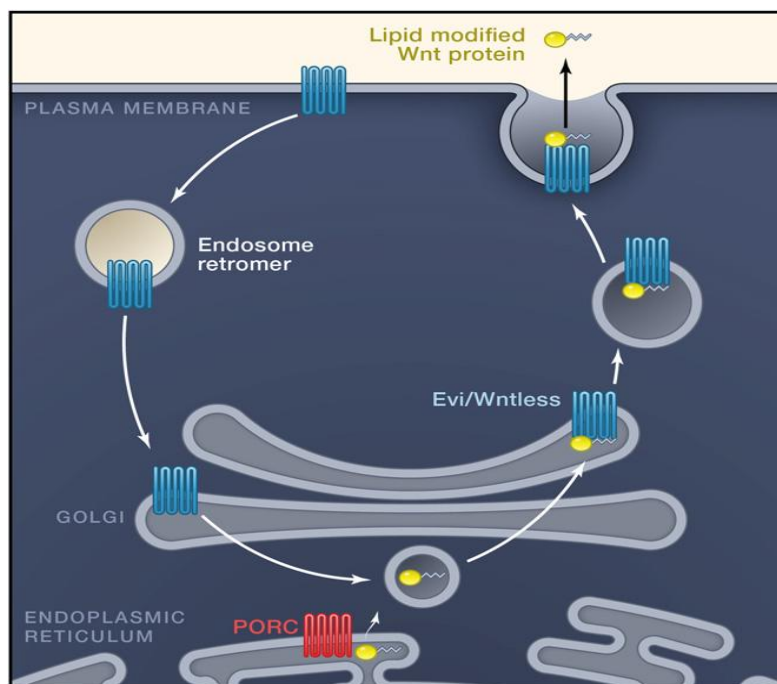
ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ WNT

ΠΡΟΣΔΕΤΕΣ WNTs

Στον άνθρωπο έχουν αναγνωρισθεί 19 μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Wnts (Wnt1, 2A, 2B, 3, 3A, 4, 5A, 5B, 6, 7A, 7B, 8A, 8B, 9A, 9B, 10A, 10B, 11, 16) καθώς και οι θέσεις των γονιδίων στο γονιδίωμα του ανθρώπου που τις κωδικοποιούν. Ορισμένα από τα γονίδια που κωδικοποιούν τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες εντοπίζονται πολύ κοντά στο ανθρώπινο γονιδίωμα, για παράδειγμα τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες Wnt6 και Wnt10a, βρίσκονται αρκετά κοντά και εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 2. Οι προσδέτες Wnt είναι υδρόφοβες γλυκοπρωτεΐνες, με μοριακό βάρος από 39kDa (Wnt7a) έως 46kDa (Wnt 10a). Όσον αφορά τη δομή τους, όλες οι πρωτεΐνες Wnts περιέχουν 23 ή 24 συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης με παρόμοια απόσταση υποδηλώνοντας ότι η αναδίπλωση των πρωτεϊνών αυτών εξαρτάται από τον σχηματισμό πολλαπλών ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών. Η λειτουργία των πρωτεϊνών Wnts είναι η μεταγωγή των σημάτων με τη δέσμευση τους στους υποδοχείς Frizzleds και σε έναν από τους συνυποδοχείς LRP5 ή 6.

Οι πρωτεΐνες Wnts μεταφέρονται στην κυτταρική επιφάνεια από το κύτταρο που παράγονται με τη βοήθεια της συντηρημένης μεμβρανικής πρωτεΐνης Wntless (Wls)/Evi/Sprinter/GPR177, η οποία αποτελεί μεταγραφικό στόχο του κανονικού σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt. Η πρωτεΐνη Wls εντοπίζεται στο εκκριτικό

μονοπάτι, περιλαμβάνοντας το Golgi, το ενδόσωμα και τις μεμβράνες του πλάσματος (Banziger et al., 2006). Η λειτουργία της πρωτεΐνης Wls είναι η μεταφορά παλμιτοϋλιωμένων Wnts από το ενδοπλασματικό δίκτυο στην πλασματική μεμβράνη και είναι απαραίτητη για την εξωκυττάρωση των συνδετών Wnt από τα κύτταρα που τις παράγουν. Η διαδικασία έκκρισης της πρωτεΐνης Wnt αναπαριστάται στην Εικόνα 13.



Εικόνα 13. Ο μηχανισμός έκκρισης του προσδέτη Wnt. Η πρωτεΐνη Wnt υφίσταται λιπιδιακή τροποποίηση στο ενδοπλασματικό δίκτυο με τη βοήθεια του ενζύμου PORC και στη συνέχεια η πρωτεΐνη Wntless τη μεταφέρει στην πλασματική μεμβράνη και όπου εκκρίνεται. (Clevers & Nusse, 2012)

Η δέσμευση των πρωτεϊνών Wnts στους υποδοχείς Frizzleds εμποδίζεται από την ύπαρξη διαφόρων εκκρινόμενων πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων των μελών Frizzled-related πρωτεϊνών και των ανταγωνιστών WIF-1 και Dickkopf. Οι εκκρινόμενες Frizzled-related πρωτεΐνες (sFRPs) περιέχουν μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες, η οποία παρουσιάζει ομοιότητες με την περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα Frizzled αλλά στερούνται τις περιοχές που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη (Moon et al., 1997). Επομένως οι πρωτεΐνες sFRPs και οι υποδοχείς Frizzleds ανταγωνίζονται για τη σύνδεση με τις πρωτεΐνες Wnt. Ο ανασταλτικός παράγοντας WIF-1 (Wnt-Inhibitory-1) δεσμεύεται με την πρωτεΐνη Wnt αποτρέποντας την πρόσδεση της στον υποδοχέα (Hsieh et al., 1999). Ο ανταγωνιστής Dickkopf (Dkk), ο

οποίος περιλαμβάνει τέσσερα μέλη Dkk 1 έως 4 δεν αναστέλλει άμεσα τον προσδέτη Wnt, αλλά αλληλεπιδρά με τον συνυποδοχέα LRP5/6 και εμποδίζει το σχηματισμό του συμπλόκου Wnt-Frizzled-LRP5/6 (Nusse, 2001). Επιπλέον σε αυτή την κατηγορία ανήκουν και οι πρωτεΐνες R-spondins, οι οποίες είναι ανταγωνιστές του Wnt/β-κατενίνης μονοπατιού και συνδέονται τόσο στους υποδοχείς Frizzleds, όσο και στους συνυποδοχείς LRP5/6 (Name et al., 2006).

ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ FRIZZLEDS ΚΑΙ ΟΙ ΣΥΝΥΠΟΔΟΧΕΙΣ LRP5 ΚΑΙ 6

Δύο διακριτές οικογένειες υποδοχέων είναι πολύ σημαντικές για το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης, ο υποδοχέας Frizzled και οι συνυποδοχείς LRP5 και 6. Ο υποδοχέας Frizzled είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που διαπερνά επτά φορές την κυτταρική μεμβράνη και ανήκει στην οικογένεια των GPCRs υποδοχέων (G Protein-Coupled Receptors). Ο υποδοχέας Fzd έχει υψηλή συγγένεια με τον προσδέτη Wnt, καθώς περιέχει στο εξωκυττάριο τμήμα του μια περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα κυστεΐνης [Cys-RichDomain (CRD)] και η οποία είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του με την πρωτεΐνη Wnt. Η σχέση μεταξύ του προσδέτη και του υποδοχέα Fzd είχε μελετηθεί καλύτερα στη *Drosophila*, όπου ο προσδέτης Wg συνδέεται με υψηλή συγγένεια με τους υποδοχείς DFZD1 και DFZD2 (Logan & Nusse, 2004). Στον άνθρωπο έχουν αναγνωρισθεί 10 μέλη της οικογένειας του υποδοχέα Fzd (Fzd 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10).

Ο υποδοχέας Fzd για να κατευθύνει τη σηματοδότηση καθοδικά χρειάζεται και έναν συνυποδοχέα. Ο συνυποδοχέας που χρησιμοποιεί είναι ανάλογος του υποδοχέα των LDL σωματιδίων χοληστερίνης και ονομάζεται LRP (LDL Related Peptide) και ο οποίος διαπερνά μόνο μια φορά την κυτταρική μεμβράνη. Αυτός ο συνυποδοχέας είναι μια πρωτεΐνη της κυτταρικής επιφάνειας όπου συνδέεται με τον υποδοχέα Fzd και τον προσδέτη Wnt όταν ο τελευταίος είναι παρών, ενισχύοντας τη μεταγωγή του σήματος μέσα στο κύτταρο. Μεταξύ των δύο συνυποδοχέων LPRs, ο LRP6 έχει μελετηθεί πιο πολύ και είναι απαραίτητος στην εμβρυογένεση, ενώ ο LRP5 είναι σημαντικός για την ομοιόσταση των οστών των ενηλίκων (Wolski H et al., 2015). Οι συνυποδοχείς LRP5/6 έχουν στο εξωκυττάριο τμήμα τους θέσεις δέσμησης των πρωτεϊνών Wnts, ενώ η ενδοκυτταρική περιοχή αποτελείται από πέντε επαναλαμβανόμενα αμινοξικά κατάλοιπα Pro-Pro-Pro-Ser/Thr-Pro (PPSP), η φωσφορυλίωση των οποίων είναι σημαντική για τη μεταγωγή του σήματος (Tamaï et al., 2004). Ο κύριος μηχανισμός ενεργοποίησης του συνυποδοχέα LRP5/6 είναι με τη

φωσφορυλίωση της ενδοκυτταρικής περιοχής (ICD, Intracellular Domain), αρχικά από την κινάση GSK3-β και στη συνέχεια από την κινάση CK1 σε κατάλοιπα σερίνης (Davidson et al., 2005).

Στον Πίνακα 3 καταγράφονται οι πιθανοί συνδυασμοί μεταξύ των προσδετών Wnts και των υποδοχέων Frizzleds, οι οποίοι βασίζονται είτε σε πειράματα άμεσης σύνδεσης αυτών των δύο πρωτεϊνών όπως η ανοσοκατακρήμιση ή με άλλα πειράματα, όπως η φασματομετρία μάζας.

Πίνακας 3. Η αλληλεπίδραση Wnts-Fzds. (Dijksterhuis et al., 2013)

WNT	1	2	2	3	3	4	5	5	6	7	7	8	8	9	9	10	10	11	16	
		A	B		A		A	B		A	B	A	B	A	B	A	B			
FZD1	X	X	-	O	X	-	X	O	-	O	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FZD2	-	O	-	O	O	-	X	-	O	O	O	-	O	-	-	-	-	-	-	-
FZD3	-	X	-	-	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FZD4	-	X	X	-	O	-	O	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FZD5	-	O	-	-	X	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	O	-	-	-
FZD6	-	-	-	-	X	X	X	O	-	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FZD7	-	-	-	X	X	-	O	-	-	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FZD8	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	O	-	-	-	-	-
FZD9	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FZD10	-	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Με το γράμμα (X) καταγράφονται οι συνδυασμοί που προκύπτουν μετά από ανοσοκατακρήμιση, η οποία θεωρείται για τη συγκεκριμένη μελέτη πολύ πιο αξιόπιστη από τα υπόλοιπα πειράματα. Με κύκλο (O) καταγράφονται οι συνδυασμοί που προκύπτουν από άλλα πειράματα όπως φασματομετρία μάζας και με συνεντοπισμό φθοριοχρωμάτων

Στον Πίνακα 3 συνοψίζονται οι πιθανοί συνδυασμοί μεταξύ των προσδετών Wnts και των υποδοχέων Frizzleds. Με το γράμμα (X) καταγράφονται οι συνδυασμοί που προκύπτουν μετά από ανοσοκατακρήμιση, η οποία θεωρείται για τη συγκεκριμένη μελέτη πολύ πιο αξιόπιστη από τα υπόλοιπα πειράματα. Με κύκλο (O) καταγράφονται οι συνδυασμοί που προκύπτουν από άλλα πειράματα όπως φασματομετρία μάζας και με συνεντοπισμό φθοριοχρωμάτων.

Από πρόσφατες μελέτες έχουν προκύψει και άλλοι συνδυασμοί προσδετών και υποδοχέων, που δεν αναγράφονται στον παραπάνω πίνακα, όπως η σύνδεση του προσδέτη Wnt 2 με τον υποδοχέα Frizzled 7 (Hourieh Kalhor et al., 2018). Επομένως, αυτό αποδεικνύει την πολυπλοκότητα που χαρακτηρίζει τη σύνδεση Wnt/Frizzled.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4) καταγράφονται οι υποδοχείς Frizzleds και οι προσδέτες WNTs και το μονοπάτι Wnt στο οποίο συμμετέχουν (κανονικό και μη κανονικό). Παρατηρείται ότι πολλά μόρια Wnt και Frizzled συμμετέχουν και στις δύο μεγάλες κατηγορίες μονοπατιών Wnt.

Πίνακας 4. Οι προσδέτες Wnts, οι υποδοχείς Fzds και το μονοπάτι Wnt στο οποίο παρατηρούνται (Ueno et al., 2013, Siar et al., 2012).

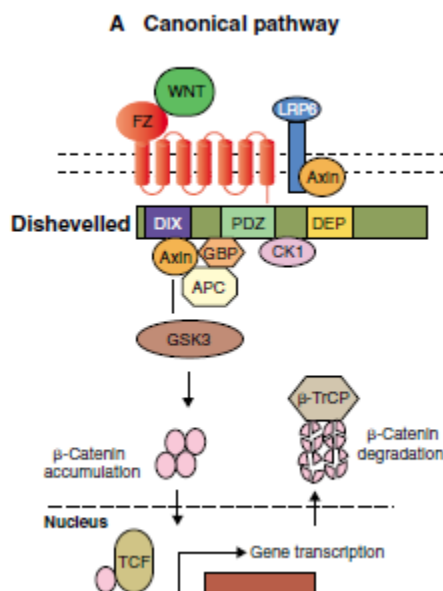
ΠΡΟΣΔΕΤΗΣ	ΜΟΝΟΠΑΤΙ WNT	ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ	ΜΟΝΟΠΑΤΙ WNT
WNT1	ΚΑΝΟΝΙΚΟ	FZD1	ΚΑΝΟΝΙΚΟ
WNT2	ΚΑΝΟΝΙΚΟ	FZD2	ΚΑΝΟΝΙΚΟ / ΜΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟ
WNT2B	ΚΑΝΟΝΙΚΟ	FZD3	ΚΑΝΟΝΙΚΟ / ΜΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟ
WNT3	ΚΑΝΟΝΙΚΟ	FZD4	ΚΑΝΟΝΙΚΟ
WNT4	ΜΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟ	FZD5	ΚΑΝΟΝΙΚΟ
WNT5A	ΜΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟ	FZD6	ΜΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟ
WNT5B	ΜΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟ	FZD7	ΚΑΝΟΝΙΚΟ / ΜΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟ
WNT6	ΜΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟ	FZD8	ΚΑΝΟΝΙΚΟ
WNT7A	ΜΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟ	FZD9	ΜΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟ (ERK)
WNT7B	ΜΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟ	FZD10	ΚΑΝΟΝΙΚΟ / ΜΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟ
WNT8A	ΚΑΝΟΝΙΚΟ		
WNT8B	ΚΑΝΟΝΙΚΟ		
WNT10A	ΚΑΝΟΝΙΚΟ		
WNT10B	ΚΑΝΟΝΙΚΟ		
WNT11	ΜΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟ		

ΠΡΩΤΕΪΝΗ DISHEVELLED

Τα πρώτα αλληλόμορφα του γονιδίου Dishevelled (Dsh για τη *Drosophila* και Dvl για τα θηλαστικά) ταυτοποιήθηκαν σε μεταλλαγμένους φαινοτύπους της *Drosophila*, όπου χαρακτηρίστηκαν από αλλαγές στην πολικότητα των τριχών (Fahmy & Fahmy, 1959). Αργότερα σε πειράματα που έγιναν σε έμβρυα *Drosophila* βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη Dvl συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι Winless/Wnt (Klingensmith et al., 1994). Το γονίδιο Dishevelled κωδικοποιεί μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη με πολλές βιολογικές διεργασίες, όπως η κυτταρική πολικότητα και αποτελεί ένα βασικό συστατικό τόσο του κανονικού Wnt μονοπατιού, όσο και του μη κανονικού μονοπατιού (PCP και Wnt/Ca²⁺). Στον άνθρωπο έχουν περιγραφεί τρία ομόλογα του γονιδίου Dishevelled, Dvl1, Dvl2 και Dvl3 (Bui et al., 1997).

Η πρωτεΐνη Dvl/Dsh έχει μήκος 500-600 αμινοξικά κατάλοιπα και αποτελείται από τρεις συντηρημένες περιοχές, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 14. Στο αμινοτελικό άκρο της υπάρχει η περιοχή DIX (Dishevelled/Axin), η οποία έχει δομή α-έλικας και στο κέντρο της πρωτεΐνης υπάρχει η PDZ (PSD-95, DLG, ZO1) περιοχή με δομή 6 β-στροφών που τυλίγουν δύο α-έλικες σχηματίζοντας μια υδρόφοβη σχισμή για την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες. Τέλος, υπάρχει μια τρίτη περιοχή μεταξύ της περιοχής PDZ και του καρβοξυτελικού άκρου, η DEP (Dishevelled, EGL-10, Pleckstrin) που αποτελείται από τρεις α-έλικες. Έχει βρεθεί ότι η περιοχή DEP

της Dvl συμμετέχει στην υποδοχή του σήματος από τη πρόσδεση Wnt-FZD και στη μετατόπιση της Dvl στην κυτταρική μεμβράνη (Boutros et al., 2000).

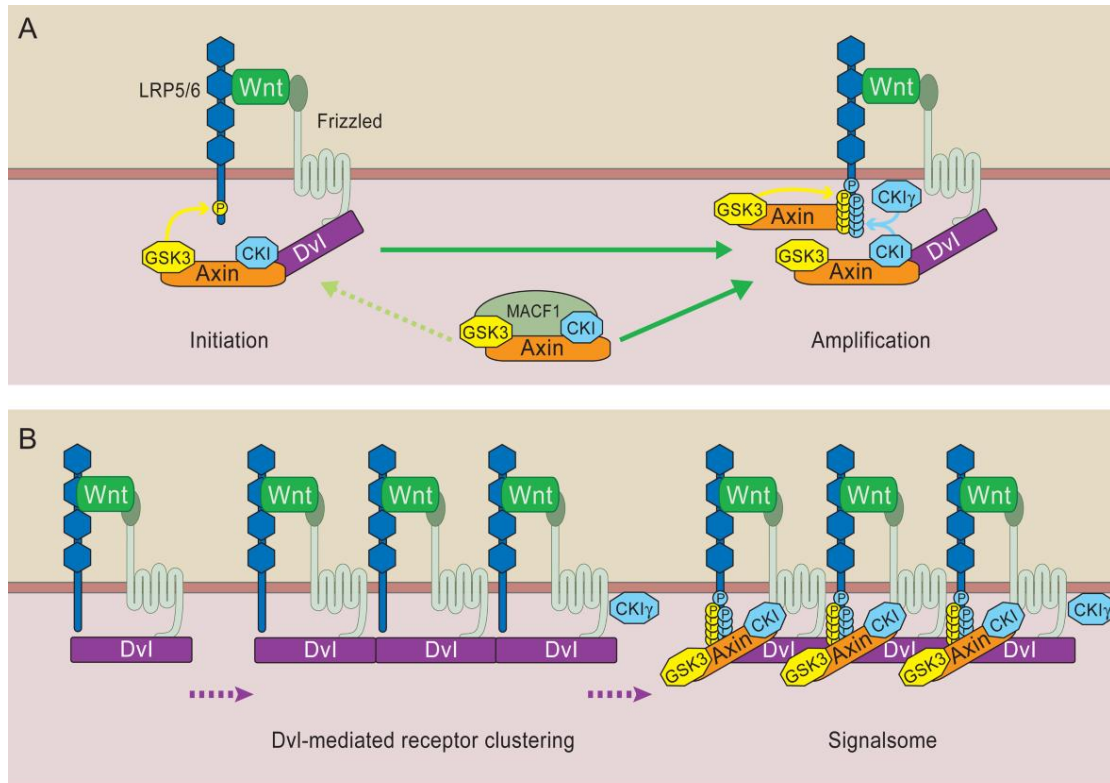


Εικόνα 14. Η δομή της πρωτεΐνης Dishevelled και η συμμετοχή της στο κανονικό Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι. (Wallingford & Habas, 2005)

Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Dvl γίνεται με φωσφορυλίωση από το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt, όμως παραμένει ασαφής μέχρι και σήμερα η διαδικασία ενεργοποίησης της (Li et al., 1999, Rothbacher et al., 2000). Ο μηχανισμός που έχει προταθεί για την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Dvl είναι η χαμηλή συγγένεια-πρόσδεση του υποδοχέα Fzd με την περιοχή PDZ της Dvl (Wong et al., 2003) και στη συνέχεια ακολουθεί η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Dvl από πολλές κινάσες, μερικές από τις οποίες είναι η CK1 (Casein kinase), η CK2 και η PAR1 (Ossipova et al., 2005).

Όσον αφορά τη συμμετοχή της πρωτεΐνης Dvl στο κανονικό σηματοδοτικό μονοπάτι έχουν προταθεί αρκετοί μηχανισμοί. Ο πρώτος μηχανισμός, ο οποίος απεικονίζεται στην Εικόνα 15A προτείνει ότι η πρωτεΐνη Dvl συνδέεται μέσω των περιοχών της PDZ και DEP με την καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα Fzd (Wong et al., 2003) με αποτέλεσμα τη δέσμευση του συμπλόκου Axin και GSK3-β στον υποδοχέα και κατ' επέκταση τη φωσφορυλίωση του συνυποδοχέα LRP5/6 στην περιοχή PPPSP (Zeng et al., 2008). Η δέσμευση της Axin διαταράσσει το σύμπλοκο αποικοδόμησης της β-κατενίνης με αποτέλεσμα η τελευταία να συσσωρεύεται στον πυρήνα. Οι πρωτεΐνες Dvl και Axin, συνδέονται μεταξύ τους μέσω της περιοχής

DIX όπου διαθέτουν. Η συγκεκριμένη υπόθεση έχει προέλθει από την παρατήρηση ότι οι δύο πρωτεΐνες Dvl και Axin συν-εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα (Fagotto et al., 1999; Smalley et al., 1999). Η σύνδεση μεταξύ των Fzd-Dvl είναι αδύναμη, ενώ η σύνδεση μεταξύ της Axin-Dvl θεωρείται ισχυρή. Στη συνέχεια η μερική φωσφορυλίωση του συνυποδοχέα LRP5/6 προκαλεί πιο αποτελεσματική δέσμευση της Axin με αποτέλεσμα την περισσότερη φωσφορυλίωση της περιοχής PPPSP. Ο δεύτερος μηχανισμός αφορά τον ολιγομερισμό πρωτεϊνών Dvl λόγω της DIX περιοχής τους, ο οποίος οδηγεί στον σχηματισμό συσσωματωμάτων τριμερών συμπλόκων Wnt-LRP-Fzd με αποτέλεσμα την δέσμευση της Axin στη μεμβράνη και τη φωσφορυλίωση του συνυποδοχέα LRP από τις κινάσες GSK3-β και CK1. Αυτά τα συσσωματώματα ονομάζονται signalosomes και η παρατήρηση αυτών προήλθε μέσω των τεχνικών της κλασματοποίησης και ανοσοχρώσης (Bilic et al., 2007). Στην Εικόνα 10B απεικονίζεται ο σχηματισμός των signalosomes. Ένας τρίτος μηχανισμός που έχει προταθεί είναι η δέσμευση της κινάσης CK1 από την πρωτεΐνη Dvl αναστέλλοντας έτσι το σύμπλοκο καταστροφής και έμμεσα την φωσφορυλίωση της β-κατενίνης από την κινάση GSK3-β (Amit et al., 2002). Ένας τελευταίος προτεινόμενος μηχανισμός είναι ότι η πρωτεΐνη Dvl προσλαμβάνει μια πρωτεΐνη, την GBP (GSK3-β Binding Protein) η οποία δεσμεύεται στην κινάση GSK3-β εμποδίζοντας τη δράση της, δηλαδή αποτρέπει την κινάση GSK3-β να φωσφορυλιώσει τα υποστρώματα της μεταξύ των οποίων είναι και η β-κατενίνη.



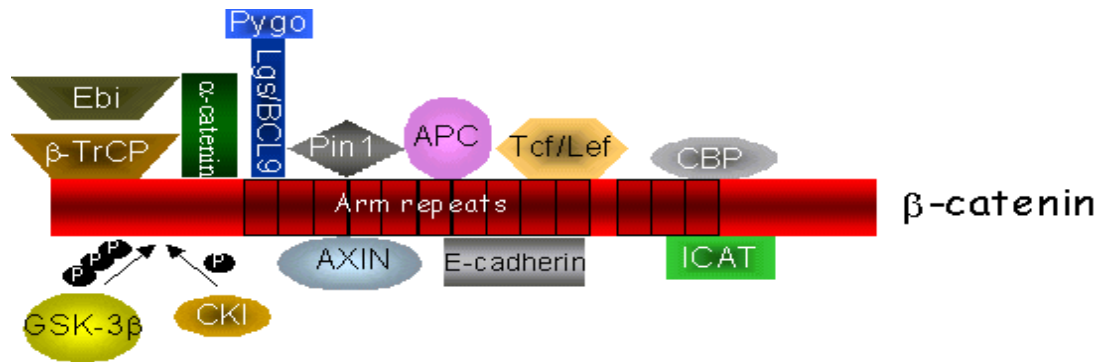
Εικόνα 15. Ο σχηματισμός συμπλόκου LPR5/6 και Fzd-Dvl στη μεμβράνη και ο σχηματισμός του σιγναλωσώματος (signalsome). Α) Με την προσδέτη του Wnt στον υποδοχέα Frizzled σχηματίζεται ένα σύμπλοκο στη μεμβράνη, το οποίο αποτελείται από τον συνυποδοχέα LRP 5/6 και Fzd-Dvl. Η πρωτεΐνη Dvl με τη σειρά της δεσμεύει την Axin-GSK3-β με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση του LPR στα μοτίβα PPPSP. Ο μερικός φωσφορυλιωμένος συνυποδοχέας LPR είναι σε θέση να προσλαμβάνει και πιο αποτελεσματικά να δεσμεύει την Axin-GSK3- και να προωθεί περισσότερο τη φωσφορυλίωση της PPPSP περιοχής Β) Ο σχηματισμός του signalsome μέσω του πολυμερισμού της Dvl και τη συνάθροιση των υποδοχέων. Ο ολιγομερισμός της Dvl προκαλεί τα άθροισμα του συμπλόκου Wnt-LPR-Fzd με αποτέλεσμα την δέσμευση της Axin και τη φωσφορυλίωση του συνυποδοχέα από τις κινάσες CK1 και GSK3-β.(MacDonald et al., 2010)

B-KATENININH

Η β-κατενίνη είναι μια πρωτεΐνη η οποία αλληλεπιδρά με το κυτταροπλασματικό τμήμα της E-καδχερίνης και με την α-κατενίνη, και στη συνέχεια το σύμπλοκο που σχηματίζεται αγκυροβολείται στον κυτταροσκελετό της ακτίνης (Kemler & Ozawa, 1989). Αυτή η αλληλεπίδραση είναι απαραίτητη για το σχηματισμό συναπτικών ζωνών μεταξύ των κυττάρων και την κυτταρική προσκόλληση.

Η β-κατενίνη κωδικοποιείται από το γονίδιο *CTNNB1* και η πρωτοταγής δομή της περιλαμβάνει μια αμινοτελική περιοχή περίπου 130 αμινοξικών καταλοίπων, μια κεντρική περιοχή με 12 ατελείς επαναλήψεις 42 αμινοξικών καταλοίπων γνωστά ως armrepeats, και τέλος μια καρβοξυτελική περιοχή 110 αμινοξικών καταλοίπων. Το αμινοτελικό άκρο της β-κατενίνης είναι σημαντικό για τη ρύθμιση της σταθερότητας της, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο λειτουργεί ως περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης (Willert & Nusse, 1998).

Όσον αφορά τη συμμετοχή της β-κατενίνης με το μονοπάτι Wnt, αρχικά σε περίπτωση απουσίας του εξωτερικού ερεθίσματος, η κυτταροπλασματική β-κατενίνη που δε συμμετέχει στις συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων στοχεύεται για πρωτεόλυση από το σύμπλοκο αποικοδόμησης (APC, GSK3-β, CK1, Axin) και οδηγείται στο πρωτεάσωμα. Η αλληλεπίδραση της β-κατενίνης με την λιγάση E3 b-TRCP έχει ως αποτέλεσμα την προσθήκη μορίων ουβικιτίνης από τη συγκεκριμένη λιγάση και έτσι η β-κατενίνη αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα. Η θέση δέσμευσης της β-TrCP στη β-κατενίνη είναι ένα μικρό τμήμα πεπτιδίου που περιλαμβάνει δύο συντηρημένες σερίνες, τη Ser 33 και τη Ser37, οι οποίες όταν φωσφορυλιωθούν αλληλεπιδρούν με τη β έλικα της λιγάσης β-TrCP (Wu et al. 2003). Όταν το ερέθισμα από τον προσδέτη Wnt είναι παρών, τότε απενεργοποιείται η καταστροφή της β-κατενίνης, η οποία σταθεροποιείται και συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια εισέρχεται στον πυρήνα, όπου συνδέεται με τους μεταγραφικούς παράγοντες TCF/LEF για τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι β-κατενίνη περιέχει την αλληλουχία NLS (Nuclear Localization Signal), με τη βοήθεια της οποίας εισέρχεται μέσω του πυρηνικού πόρου μέσα στον πυρήνα (Henderson & Fagotto, 2002). Στην Εικόνα 16 απεικονίζεται η δομή της β-κατενίνης και οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά.



Εικόνα 16. Η β κατενίνη και οι περιοχές πρόσδεσης άλλων πρωτεϊνών. Υπάρχουν δύο συστήματα για την ουβικιτιλίωση της β-κατενίνης, το ένα αφορά την πρωτεΐνη Ebi, η οποία δεν απαιτεί η β-κατενίνη να είναι φωσφορυλιωμένη και το άλλο αφορά τη λιγάση β-TrCP, όπου η β-κατενίνη φωσφορυλιώνεται από τις κινάσες CK1 και GSK3-β. Παρ' όλα αυτά και τα δυο συστήματα απαιτούν τη παρουσία της πρωτεΐνης APC (Adenomatosis Polyposis Coli). Η α-κατενίνη συνδέεται στην αμινοτελική περιοχή της β-κατενίνης και η E-καδχερίνη στην περιοχή των arm επαναλήψεων (armrepeats). Επιπλέον, στην περιοχή αυτή προσδέονται οι πρωτεΐνες APC, Axin, PIN1 και οι μεταγραφικοί παράγοντες TCF και LEF. Στην *Drosophila*, οι πρωτεΐνες Legless (Lgs) και Pygopus (Pygo) συνδέονται στις περιοχές arm και δρουν ως μεταγραφικοί συνενεργοποιητές. Η αντίστοιχη πρωτεΐνη Lg στον άνθρωπο είναι η BCL-9, η οποία συνδέεται στις arm επαναλήψεις της β-κατενίνης και λειτουργεί ως ένα συνδετικό μόριο μεταξύ της β-κατενίνης με τον TCF μέσα στον πυρήνα. Η ισομεράση Pin1 (Peptidyl-prolylcis-transisomerase 1) συνδέει ένα φωσφορυλιωμένο Ser-προλίνη (Pro) μοτίβο δίπλα στην θέση πρόσδεσης της APC στη β-κατενίνη και αναστέλλει την αλληλεπίδραση μεταξύ APC και β-κατενίνης, συνεπώς ενεργεί ως θετικός ρυθμιστής της σηματοδότηση Wnt. Η πρωτεΐνη CBP (CREB binding protein) συνδέεται σε μια συγκεκριμένη περιοχή της β-κατενίνης και διεγείρει τη μεταγραφή των γονιδίων του Wnt μονοπατιού. Τέλος, ο αναστολέας ICAT δεσμεύεται στο καρβοξυτελικό άκρο της β-κατενίνης και αναστέλλει την αλληλεπίδραση της με τον μεταγραφικό παράγοντα TCF.(Thorstensen, 2003)

ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΤΗΣ Β-ΚΑΤΕΝΙΝΗΣ

Η β-κατενίνη δεν αποτελεί καθοδικό συστατικό μόνο του κανονικού μονοπατιού Wnt, αλλά συμμετέχει και σε άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια μπορούν να δράσουν είτε τροποποιώντας τη β-κατενίνη, είτε αλλάζοντας τη λειτουργία ενός άλλου συστατικού που βρίσκεται ανοδικά της β-κατενίνης. Για παράδειγμα, πολλές κινάσες εκτός της GSK3-β μπορούν να φωσφορυλιώσουν τη β-κατενίνη. Σε αυτές τις κινάσες ανήκουν οι υποδοχείς EGFR και FGFR που έχουν ενεργότητα κινάσης τυροσίνης. Πολλές μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ μελών των υποδοχέων EGFR, και συγκεκριμένα του υποδοχέα HER2, και της β-κατενίνης (Hoschuetzky et al., 1994). Όπως είναι γνωστό στο 30% των περιπτώσεων καρκίνου μαστού, ο υποδοχέας HER2 υπερεκφράζεται, όπως επίσης και άλλοι υποδοχείς της οικογένειας EGFR και προσδέτες (Arteaga et al., 2002). Επομένως, η αυξημένη ενεργότητα αυτών των υποδοχέων μπορεί να οδηγήσει στη σταθεροποίηση της β-κατενίνης και τη μετατόπιση της στον πυρήνα. Επιπρόσθετα, η επικοινωνία μεταξύ του μονοπατιού Wnt και του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K σχετίζεται με τον καρκίνο μαστού. Οι γαμετικές μεταλλαγές στο γονίδιο PTEN, το οποίο θεωρείται ογκοκατασταλτικό γονίδιο, σχετίζονται με το σύνδρομο Cowden's, ένα οικογενές σύνδρομο με την εμφάνιση όγκων στο θυρεοειδή αδένα, στο μαστού αλλά και στο ενδομήτριο. Η απώλεια του γονιδίου PTEN οδηγεί στη συσσώρευση της β-κατενίνης και την μετατόπιση της στον πυρήνα (Persad et al., 2002).

Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι η αποικοδόμηση της β-κατενίνης μπορεί να επιτευχθεί από το γονίδιο TP53, το οποίο φέρει μεταλλαγές στο 20-40% των περιπτώσεων καρκίνου μαστού (Borresen, 2003). Η πρωτεΐνη p53 στοχεύει την αποικοδόμηση της β-κατενίνης, κρατώντας μειωμένα τα επίπεδα της στο κυτταρόπλασμα (Sadot et al., 2001).

ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ Β-ΚΑΤΕΝΙΝΗΣ

Το σύμπλοκο αποικοδόμησης της β-κατενίνης όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 12 είναι ένα πολύ-πρωτεϊνικό συγκρότημα με βασικά στοιχεία τις κινάσες σερίνης/θρεονίνης GSK3-β (Glycogen Synthase Kinase 3) και CK1 (Casein Kinase 1), τις πρωτεΐνες Axin και APC (Adenomatous Polyposis Coli). Επίσης, η φωσφατάση PP2A σχετίζεται με το σύμπλοκο αποικοδόμησης και αποτελεί έναν αρνητικό ρυθμιστή του κανονικού μονοπατιού (Li et al., 2001a).

Αρχικά, η κινάση CK1 φωσφορυλιώνει τη β-κατενίνη στη θέση Ser45. Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ισομορφών CK1 (CK1a,d και e) οι οποίες μπορούν να δεσμευτούν στην Axin, να φωσφορυλιώσουν τον συνυποδοχέα LRP και την πρωτεΐνη Dvl (Price et al., 2006) και επίσης να φωσφορυλιώσουν τη β-κατενίνη στη Ser45. Στη συνέχεια η κινάση GSK3-β φωσφορυλιώνει τη β-κατενίνη στα αμινοξικά κατάλοιπα της αλληλουχίας S/T-X-X-X-pS/pT και συγκεκριμένα τη σερίνη στη θέση 45 και τη θρεονίνη στη θέση 41 με αποτέλεσμα την διαδοχική φωσφορυλίωση των Ser 37 και Ser 33 και την δέσμευση της λιγάσης β-TrCP.

Δύο ομόλογα γονίδια GSK3-α και GSK3-β έχουν ταυτοποιηθεί και οι δύο αυτές ισομορφές είναι περισσότερο από 95% ταυτόσημες στην περιοχή με ενεργότητα κινάσης. Συνεπώς, η κινάση GSK3-α μπορεί να υποκαταστήσει πολλές αλλά όχι όλες τις λειτουργίες της κινάσης GSK3-β στο μονοπάτι Wnt. Η πρώτη απόδειξη της σχέσης μεταξύ της ενδογενούς GSK3-β και του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνης παρατηρήθηκε στον *Xenopus*, στον οποίο η κινάση GSK3-β λειτουργούσε ως αρνητικός ρυθμιστής στο σχηματισμό του ραχιαίου άξονα (Dominguez et al., 1995) και στη συνέχεια η β-κατενίνη αναγνωρίστηκε ως υπόστρωμα της κινάσης GSK3-β (Yost et al., 1996). Η κινάση GSK3-β πέρα το γεγονός ότι φωσφορυλιώνει τη β-κατενίνη στο N τελικό άκρο οδηγώντας την για αποικοδόμηση, φωσφορυλιώνει και τις πρωτεΐνες Axin και APC αυξάνοντας την σταθερότητα τους και την πρόσδεση τους στη β-κατενίνη. Εκτός από το ρόλο της κινάσης GSK3-β στο σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη, έχει κι άλλους ρυθμιστικούς ρόλους σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένου τη βιοσύνθεσης του γλυκογόνου, τη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων, τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και της φλεγμονής (Frame & Cohen, 2001). Επιπρόσθετα είναι σημαντικός ο ρόλος της στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-AKT-mTOR. Οι κινάσες AKT και PIK3 του παραπάνω σηματοδοτικού μονοπατιού φωσφορυλιώνουν την κινάση GSK3-β στο N-αμινοτελικό άκρο και συγκεκριμένα στις θέσεις Ser9/Ser21, με αποτέλεσμα την

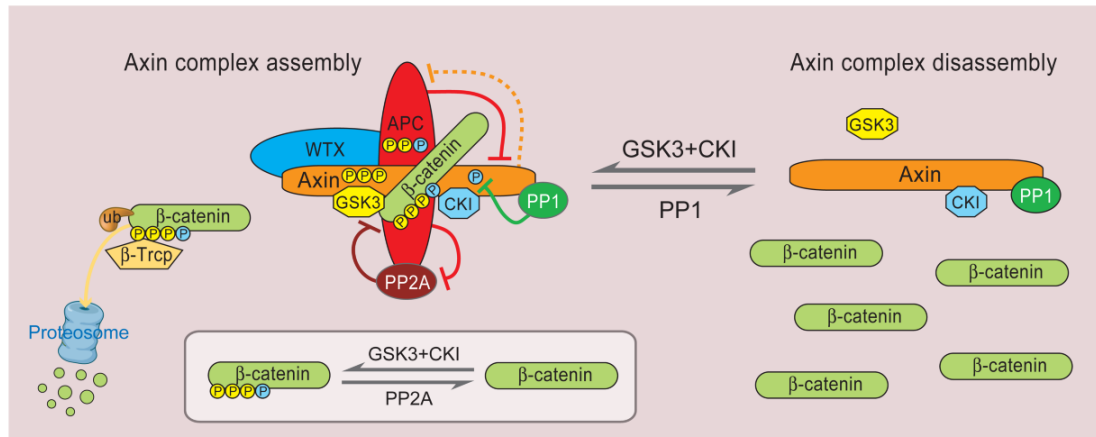
αναστολή της δραστηριότητας της. Η κινάση GSK3-β έχει αποδειχθεί ότι φωσφορυλιώνει αρκετές πρωτεΐνες οι οποίες δρουν είτε ανοδικά είτε καθοδικά του μονοπατιού PI3K / AKT / mTOR, συμπεριλαμβανομένων των ίδιων των AKT, RICTOR, TSC1 και 2, PTEN και IRS1 και 2, με τη δυνατότητα εφαρμογής ανατροφοδότησης εντός του μονοπατιού (Miguel et al., 2017) .

Η πρωτεΐνη Axin εμπλέκεται στον σχηματισμό του πολυ-πρωτεϊνικού συμπλόκου αποικοδόμησης της β-κατενίνης και υπάρχουν δύο ισομορφές, η Axin1/Axin και η Axin2/Axil/Conductin. Η πρωτεΐνη Axin 2 είναι γονίδιο-στόχος του μονοπατιού Wnt και λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού. Πολλά συστατικά όπως οι πρωτεΐνες APC, GSK3-β, PP2A και Dvl αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Axin, καθώς περιέχει περιοχές δέσμευσης αυτών. Επιπρόσθετα, έχει δείχθει ότι η Axin1 και η Axin 2 αλληλεπιδρούν άμεσα με τη β-κατενίνη δίπλα από τη θέση δέσμευσης της κινάσης GSK3-β. Αυτή η αλληλεπίδραση συμβάλλει στη φωσφορυλίωση της β-κατενίνης από τις κινάσες CK1 και GSK3-β. Επιπλέον, υπάρχει μια ακόμη περιοχή στη πρωτεΐνη Axin, η περιοχή DIX, η οποία δεσμεύει την πρωτεΐνη Dvl (Kishida et al., 1999) και τον συνυποδοχέα LRP5 (Mao et al., 2001b) και επίσης είναι απαραίτητη για τον ολιγομερισμό της Axin. Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρωτεΐνη Axin συμμετέχει τουλάχιστον σε άλλα δύο σηματοδοτικά μονοπάτια, στο SARK/Jun μονοπάτι και στο TGF-β σηματοδοτικό μονοπάτι.

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο APC (Adenomatous Polyposis Coli) εντοπίζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 5 στη θέση 22.2 και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί έχει μοριακό βάρος 310kDa με μήκος 1000 αμινοξικά κατάλοιπα και με μικρά πεπτιδικά μοτίβα για να προσδέεται στην β-κατενίνη. Συγκεκριμένα αποτελείται από τρεις επαναλήψεις 15 αμινοξικών καταλοίπων και επτά επαναλήψεις 20 αμινοξικών καταλοίπων. Ο ρόλος της πρωτεΐνης APC είναι η δέσμευση της β-κατενίνης στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Η πρωτεΐνη APC περιέχει επιπλέον, μια περιοχή που φωσφορυλιώνεται από την κινάση GSK-3β με αποτέλεσμα να αυξάνεται το αρνητικό φορτίο της και να ενισχύεται η αλληλεπίδραση με την θετικά φορτισμένη περιοχή της β-κατενίνης (Oving & Clevers, 2002). Η περιοχή της πρωτεΐνης APC που αλληλεπιδρά με την Axin αποτελείται από 20 αμινοξικά κατάλοιπα Ser-Ala-Met-Pro (SAMP).

Τέλος, η φωσφατάση PP2A αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες Axin και APC στο σύμπλοκο Axin-GSK3-β-β-κατενίνη και μειώνει τη φωσφορυλίωση της πρώτης έχοντας ως αποτέλεσμα τη μετάδοση του σήματος (Ikeda et al., 1998). Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι η φωσφατάση PP2A εκτός ότι είναι θετικός ρυθμιστής του μονοπατιού Wnt, ασκεί και αρνητική δράση στο συγκεκριμένο μονοπάτι, καθώς ενεργοποιεί την κινάση GSK3-β, οδηγώντας στην καταστροφή της β-κατενίνης (Li et al., 2001a). Επομένως, ο ρόλος της φωσφατάσης PP2A είναι αρκετά περίπλοκος.

Όπως αναφέρθηκε και στην περιγραφή του σηματοδοτικού μονοπατιού, σε περίπτωση απουσία τους σήματος το πολυ-πρωτεϊνικό σύμπλοκο αποικοδόμησης της β-κατενίνης δεσμεύει και φωσφορυλιώνει τη β-κατενίνη, όπου στη συνέχεια αυτή ουβικιτιλιώνεται από τη λιγάση β-TrCP και έπειτα αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα. Όταν όμως, ο προσδέτης Wnt είναι παρών, η πρωτεΐνη Axin συνδέεται με τον φωσφορυλιωμένο υποδοχέα LRP και το σύμπλοκο καταστρέφεται με αποτέλεσμα η β-κατενίνη να σταθεροποιείται στο κυτταρόπλασμα. Ένας επιπλέον μηχανισμός έχει προταθεί όταν υπάρχει ο προσδέτης Wnt, η β-κατενίνη φωσφορυλιώνεται κανονικά από τις κινάσες GSK3-β και CK1 αλλά δεν είναι δυνατή η ουβικιτυνιλίωση από τη λιγάση β-TrCP. Έτσι το σύμπλοκο αποικοδόμησης είναι κορεσμένο από τη φωσφορυλιωμένη β-κατενίνη με αποτέλεσμα τη συσσώρευση της νεοσυντιθέμενης β-κατενίνης και έπειτα τη μετατόπιση της στον πυρήνα του κυττάρου. Στην Εικόνα 17 απεικονίζεται το σύμπλοκο αποικοδόμησης της β-κατενίνης.

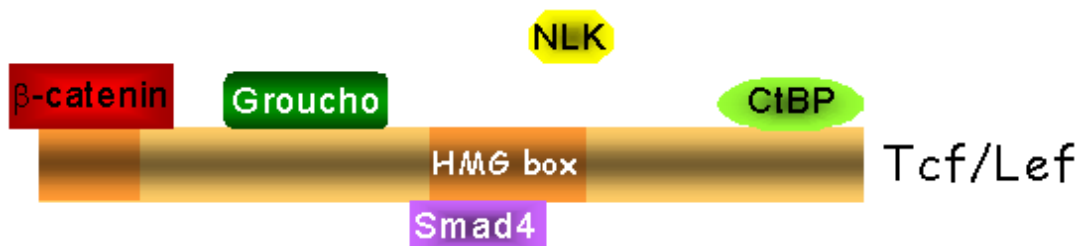


Εικόνα 17. Το σύμπλοκο αποικοδόμησης της β-κατενίνης. Τα βασικά συστατικά του συμπλόκου είναι οι πρωτεΐνες Axin, APC, οι κινάσες CK1 και GSK3-β και κύριος στόχος τους είναι η φωσφορυλίωση της β-κατενίνης για την αποικοδόμηση της στο πρωτεάσωμα. Οι κινάσες CK1 και GSK3-β εκτός από τη φωσφορυλίωση της β-κατενίνης, φωσφορυλιώνουν και τις πρωτεΐνες Axin και APC με σκοπό να σταθεροποιηθεί ακόμη περισσότερο το σύμπλοκο. Η αποφωσφορυλίωση πραγματοποιείται από τη φωσφατάση PP2A. Η πρωτεΐνη APC εμποδίζει την φωσφατάση PP2A να αποφωσφορυλιώσει τη β-κατενίνη. Τέλος, η φωσφατάση PP1 αποφωσφορυλιώνει την Axin και συμβάλλει στην αποδιοργάνωση του συμπλόκου. (MacDonald et al., 2010)

ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ TCF/LEF

Η β-κατενίνη όταν δεν αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα, συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου σχηματίζει σύμπλοκο με τους μεταγραφικούς παράγοντες TCF (T-cell Factor) και LEF (Lymphoid Enhancer Factor). Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες ανήκουν στην κατηγορία HMG-box (High Mobility Group) μεταγραφικών παραγόντων και συνδέονται άμεσα με το DNA εξαιτίας της συγκεκριμένης περιοχής. Ο μεταγραφικός παράγοντα TCF συνδέεται με μια αλληλουχία του DNA που ονομάζεται Wnt αποκριτικό στοιχείο (Wnt Responsive Element, WRE), προκαλώντας μια κάμψη στο DNA, η οποία μπορεί να αλλάξει τη δομή της χρωματίνης. Έχουν βρεθεί τέσσερα ομόλογα των μεταγραφικών παραγόντων TCF/LEF: LEF1, TCF1, TCF3 και TCF4 και όλα αναγνωρίζουν την ίδια αλληλουχία DNA, ωστόσο εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης ανάλογα με τον ιστό. Με την παρουσία του σήματος οι μεταγραφικοί παράγοντες σχηματίζουν σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες β-κατενίνη, BCL-9, Pygo και CBP (CREB-binding protein) επάγοντας τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του σηματοδοτικού

μονοπατιού. Με την απουσία του σήματος οι προσδέτες Wnts, οι μεταγραφικοί παράγοντες TCF/LEF καταστέλλουν τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων μέσω της πρόσδεσης με συν-κατασταλικούς παράγοντες Groucho και CtBP (C-terminal binding protein). Στην Εικόνα 18 απεικονίζονται οι μεταγραφικοί παράγοντες TCF/LEF με τους παράγοντες που ενεργοποιούν και καταστέλλουν την μεταγραφή γονιδίων.



Εικόνα 18. Οι μεταγραφικοί παράγοντες TCF/LEF και οι περιοχές πρόσδεσης των πρωτεϊνών. Όταν η β-κατενίνη εισέρχεται στον πυρήνα σχηματίζει ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο με τη αμινοτελική περιοχή των μεταγραφικών παραγόντων TCF/LEF. Το ετεροδιμερές σύμπλοκο συνδέεται μέσω του TCF σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA που ονομάζεται WRE. Έχουν βρεθεί τουλάχιστον δύο συνκαταστολείς οι οποίοι δεσμεύονται και αναστέλλουν τη δράση των μεταγραφικών παραγόντων TCF/LEF, απουσία της β-κατενίνης στον πυρήνα. Ένας από αυτούς είναι η πρωτεΐνη Groucho, η οποία αλληλεπιδρά με την αποακετυλάση ιστονών με αποτέλεσμα η δομή της χρωματίνης να είναι κλειστή και να εμποδίζεται η μεταγραφή των γονιδίων. Υπάρχουν τρία ομόλογα γονίδια στον άνθρωπο, τα οποία κωδικοποιούν την πρωτεΐνη Groucho, Transducin-Like Enhancer of split 1-3 (TLE 1-3). Ο δεύτερος συν-καταστολέας είναι η πρωτεΐνη CtBP, η οποία συνδέεται και καταστέλλει τους μεταγραφικούς παράγοντες TCF3 και TCF4. Τέλος, υπάρχει μια κινάση, η NLK (nemo-like kinase), η οποία φωσφορυλιώνει τους μεταγραφικούς παράγοντες TCFs με αποτέλεσμα να μειώνεται η ικανότητα των TCFs να προσδέονται στη WRE αλληλουχία του DNA, απομακρύνοντας έτσι το σύμπλοκο της β-κατενίνης με τους TCF/LEF από την περιοχή του υποκινητή των γονιδίων στόχων.(Thorstensen, 2003)

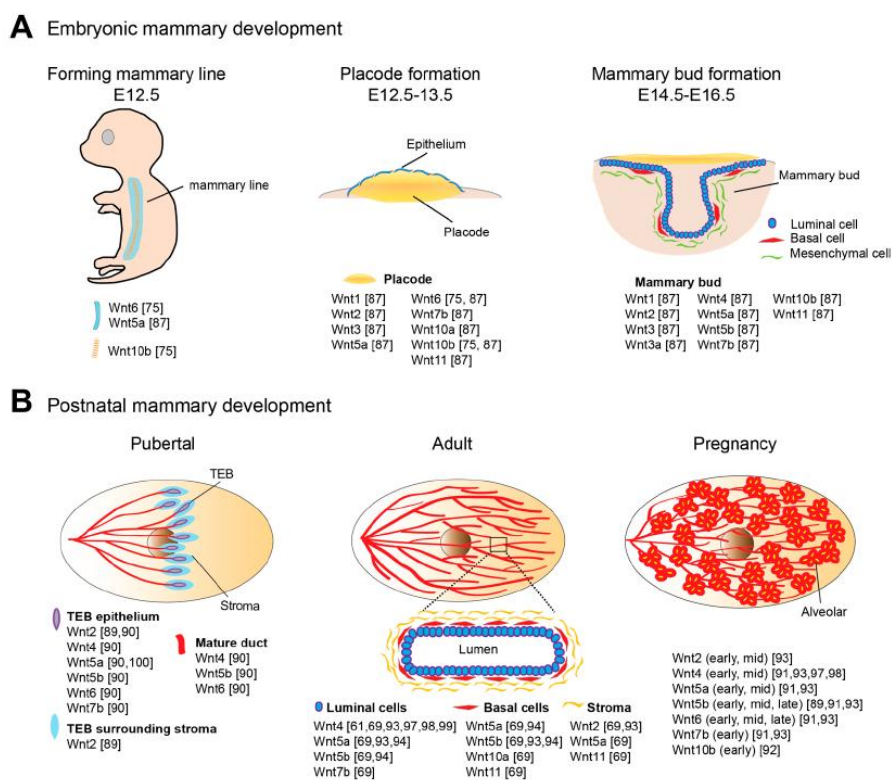
ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ-ΣΤΟΧΟΙ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ WNT

Μέχρι στιγμής έχουν περιγραφεί πάνω από πενήντα γονίδια τα οποία μεταγράφονται από το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης. Αυτά τα γονίδια συμμετέχουν σε πολύ πολυάριθμες σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση, ενώ υπάρχουν και γονίδια τα οποία συμβάλλουν στην ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt. Η πλειονότητα αυτών των γονιδίων περιέχουν θέσεις πρόσδεσης Tcf/Lef στον υποκινητή τους, ωστόσο έχουν αναφερθεί και άλλοι μηχανισμοί ενεργοποίησης. Περιληπτικά, αναφέρονται ορισμένα γονίδια-στόχοι του μονοπατιού αυτού όπως το ογκογονίδιο-Myc, η μεταλλοπρωτεΐνάση MMP7, CyclinD, c-jun, Axin2, VEGF, Oct4, Snail, Twist, EGFR, WISP-1 κ.α.

ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ WNT ΣΤΟΝ ΜΑΣΤΟ

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt παίζει σημαντικό ρόλο τόσο κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης όσο και στην μεταγεννητική ανάπτυξη και την ομοιόσταση των ενήλικων ιστών. Έχει παρατηρηθεί ότι το μονοπάτι Wnt εμπλέκεται στη ρύθμιση ιστών που υφίστανται συνεχή αυτοανανέωση των κυττάρων όπως το δέρμα, το γαστρεντερικό σωλήνα και το μυελό των οστών. Επιπλέον, συμμετέχει σημαντικά στην ανάπτυξη του μαστικού αδένου, καθώς και στη διαφοροποίηση του στη διάρκεια της εγκυμοσύνης σε ποντίκια. Έχει αποδειχθεί ότι επιδρά μέσω διαφόρων αλληλεπιδράσεων σε άλλα συστήματα, όπως αυτό της αναπαραγωγικής οδού (Smalley & Dale, 2001). Το κανονικό σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt είναι σημαντικό για την έναρξη της ανάπτυξης του μαστικού αδένου. Πιο αναλυτικά, σε ποντίκια έχουν καταγραφεί συγκεκριμένοι προσδέτες Wnts, οι οποίοι εκφράζονται στα αρχικά στάδια της εγκυμοσύνης ποντικών (Wnt 4, Wnt 5B, 6, 7B) και άλλοι όπως οι προσδέτες Wnt 2, Wnt 5A και Wnt7B οι οποίοι υποεκφράζονται στην εγκυμοσύνη αλλά υπερεκφράζονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των μαστικών αδένων. Έχει παρατηρηθεί ότι το μη κανονικό σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt συμμετέχει στην αρνητική ρύθμιση της ανάπτυξης του επιθηλίου στο μαστό. Για παράδειγμα η απώλεια του προσδέτη WNT5A (αποτελεί προσδέτη μόνο του μη κανονικού μονοπατιού) κατά τη διάρκεια της μορφογένεσης, αυξάνει την κυτταροπλασματική και πυρηνική β-κατενίνη και επιταχύνει την ανάπτυξη του πόρου στον μαστικό αδένου.

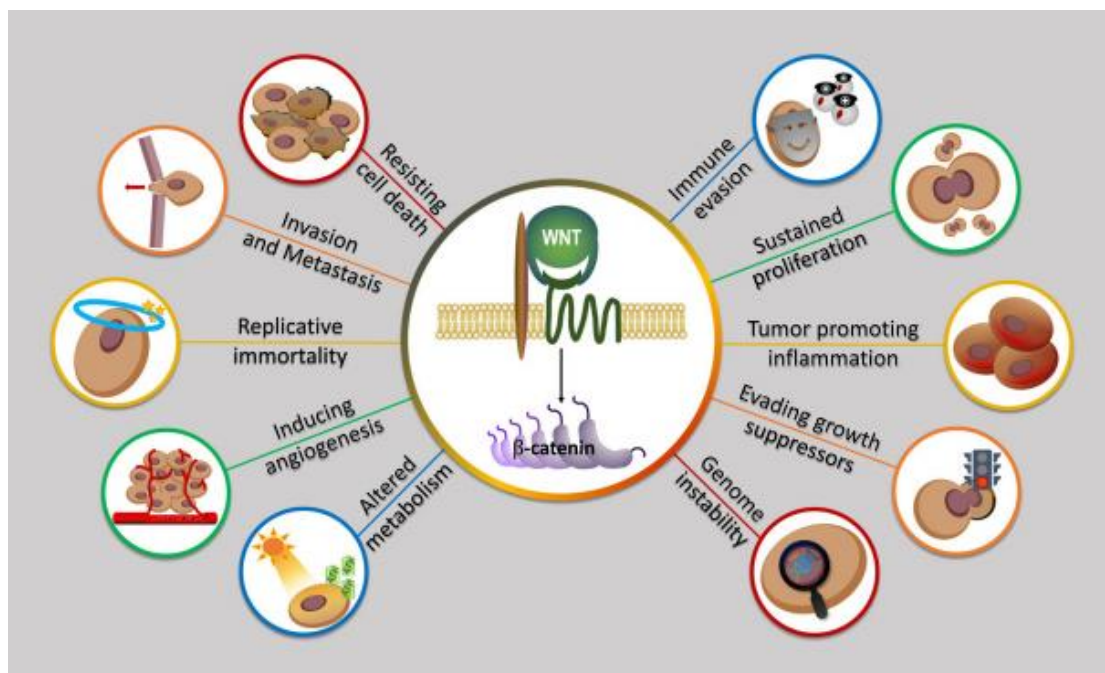
(Roarty et al., 2007). Επιπρόσθετα, ο προσδέτης WNT5A είναι ένας ουσιαστικός μεσολαβητής του αυξητικού παράγοντα TGFβ, υποδηλώνοντας ότι τα χαμηλά επίπεδα του μονοπατιού της β-κατενίνης διατηρούνται κατά τη διάρκεια της μορφογένεσης του εφηβικού πόρου μέσω του ανταγωνισμού TGFβ και WNT5A. Στην παρακάτω Εικόνα 19 απεικονίζονται τα διάφορα στάδια της ανάπτυξης του μαστού με τη συμβολή του μονοπατιού Wnt. Αν και το μονοπάτι Wnt έχει μελετηθεί για τη συμμετοχή του στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση του σε ποντίκια, δεν έχει αποσαφηνιστεί ο ρόλος του στον ανθρώπινο μαστικό αδένα.



Εικόνα 19. Η έκφραση των προσδετών Wnts στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του μαστικού αδένα σε ποντίκια **A)** κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και **B)** κατά τη διάρκεια της εφηβείας, της ενήλικης ζωής και της εγκυμοσύνης (Yu et al., 2016)

1.5.4. ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ WNT ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

Δεδομένου του σημαντικού ρόλου του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt σε πολλές λειτουργίες στον οργανισμό, αναμένεται ότι η απορρύθμιση του μονοπατιού να συνδέεται με έναν μεγάλο αριθμό ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων νευρολογικών ασθενειών, φλεγμονών, διαταραχών του ενδοκρινικού συστήματος και του μεταβολισμού των οστών. Όμως, πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη συσχέτιση του μονοπατιού Wnt με την ανάπτυξη καρκίνου. Η απορρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt έχει ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση ενός μεγάλου αριθμού κακοηθειών, μερικές από τις οποίες είναι ο καρκίνος παχέος εντέρου, ηπατοκυτταρικά καρκινώματα, μελανώματα, καρκίνος μαστού και καρκίνος των ωοθηκών. Έχουν αναφερθεί αρκετές μεταλλάξεις στα γονίδια που ρυθμίζουν το συγκεκριμένο μονοπάτι. Παρόλα αυτά, δεν έχουν περιγραφεί μεταλλάξεις σε ορισμένα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες του συμπλόκου αποικοδόμησης της β-κατενίνης, αλλά έχει παρατηρηθεί αλλαγή στην έκφραση ορισμένων συστατικών του συμπλόκου. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την κινάση GSK3-β δεν έχουν παρατηρηθεί και αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η συγκεκριμένη κινάση έχει κεντρικό ρόλο σε πολλούς οδούς και οποιαδήποτε μεταλλαγή είναι ασύμβατη με τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Στην Εικόνα 20 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων σύμφωνα με τους Hanahan και Weinberg τα οποία προκύπτουν από την απορρύθμιση του μονοπατιού Wnt (Zhong et al., 2020).



Εικόνα 20. Οι πολλαπλοί ρόλοι του μονοπατιού Wnt στην παθογένεια του καρκίνου σύμφωνα με χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων που καταγράφονται από τους Hanahan και Weinberg (Zhong et al., 2020).

Στο μονοπάτι Wnt, όπως και σε πολλά ογκογόνα σηματοδοτικά μονοπάτια, υπάρχουν συστατικά με θετική και αρνητική δράση (ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια). Επομένως, μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν ως αποτέλεσμα την απενεργοποίησή τους και την έναρξη της καρκινογένεσης, αντίθετα, μεταλλάξεις σε πρωτογονίδια οδηγούν στην ενεργοποίησή τους με στόχο την ογκογένεση. Ανάμεσα στα ογκοκατασταλτικά γονίδια του μονοπατιού Wnt, το γονίδιο *APC* είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο στους διάφορους τύπους καρκίνου. Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα, κύριος ρόλος του γονιδίου αυτού είναι η δέσμευση της β-κατενίνης στο σύμπλοκο αποικοδόμησης της. Παρόλα αυτά, έχουν ανακαλυφθεί πολλοί ρόλοι του συγκεκριμένου γονιδίου εκτός του μονοπατιού Wnt, όπως στη μετανάστευση των κυττάρων, στη λειτουργία του κυτταροσκελετού και στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων (Fodde, 2003). Η απώλεια λειτουργίας και των δύο αλληλομόρφων του γονιδίου *APC*, η οποία ονομάζεται απώλεια ετεροζυγωτίας είναι απαραίτητη για την έναρξη της καρκινογένεσης και είναι συνδεδεμένη με την αλλαγή της σταθερότητας της β-κατενίνης. Οι μεταλλάξεις που έχουν ανιχνευθεί συνολικά στο γονίδιο *APC* δεν επηρεάζουν μόνο τις περιοχές δέσμευσης της β-κατενίνης, αλλά και τις θέσεις δέσμευσης άλλων συστατικών του πρωτεϊνικού συμπλόκου και συγκεκριμένα της πρωτεΐνης Axin. Στην πλειοψηφία

τους σε ποσοστό 95% οι μεταλλάξεις αυτές είναι μη νοηματικές (nonsense mutations) ή πλαισιοτροπικές (frameshift mutations) και οδηγούν σε αδυναμία ολοκλήρωσης της σύνθεσης της πρωτεΐνης APC, άρα και σε μη φυσιολογική λειτουργία της. Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί πολλές επιγενετικές αλλαγές στο γονίδιο APC, όπως είναι η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου με αποτέλεσμα την καταστολή της λειτουργίας του (Tserga et al., 2011, Dan Zhou et al., 2016). Γαμετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο APC προκαλούν το σύνδρομο Οικογενούς Αδενωματώδους Πολυποδίασης (FAP, Familial Adenomatous Polyposis). Τα άτομα με γαμετικές μεταλλάξεις στα κωδικόνια 78 έως 167 και από 1581 έως 2843 εμφανίζουν σύνδρομο FAP καθώς αναπτύσσουν εκατοντάδες πολύποδες στο παχύ έντερο σε νεαρή ηλικία που τελικά εξελίσσονται σε καρκίνο. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το γονίδιο APC φέρει μεταλλάξεις σε ένα συντριπτικό ποσοστό, περίπου 80% των σποραδικών καρκίνων παχέος εντέρου.

Στο γονίδιο *CTNNB1*, το οποίο κωδικοποιεί τη β-κατενίνη έχουν καταγραφεί μεταλλάξεις που επηρεάζουν την αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, οι μεταλλάξεις αυτές συμβαίνουν στο εξώνιο 3 και επηρεάζουν τα κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης, όπου είναι θέσεις φωσφορυλίωσης από τις κινάσες CK1 (Ser 45) και GSK3-β (Ser 33,37 και Thr 41), επομένως η β-κατενίνη δεν φωσφορυλιώνεται και δεν αλληλεπιδρά με τη λιγάση b-TrCP. Έχει αναφερθεί ότι όταν παρατηρούνται μεταλλάξεις στο γονίδιο *CTNNB1* δεν ανιχνεύονται μεταλλάξεις στο γονίδιο APC, στους κακοήθεις όγκους παχέος εντέρου. Αντίθετα, όταν ανιχνεύονται μεταλλάξεις στο γονίδιο APC, η συχνότητα μεταλλαγών στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη β-κατενίνη είναι μειωμένη (Sparks et al., 1998). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι σε περιπτώσεις όγκων του εντέρου με μικροδορυφορική αστάθεια, ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη β-κατενίνη με υψηλότερη συχνότητα, ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο APC ήταν σπάνιες (Mirabelli & Primdahl et al., 1999). Αυτή η διαφορά εμφάνισης μεταλλαγών στα δύο γονίδια δεν βρέθηκε σε κακοήθεις όγκους του ενδομητρίου (Mirabelli & Primdahl et al., 1999). Σε πολλές μελέτες για το ηπατοβλάστωμα, έχουν ανιχνευθεί σε υψηλή συχνότητα μεταλλάξεις για το γονίδιο της β-κατενίνης, ενώ καμία μεταλλαγή δεν ανιχνεύθηκε στο γονίδιο APC (Koch et al., 1999, Jeng et al., 2000, Wei et al., 2000). Ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος σχετίζεται με συχνές μεταλλάξεις στα γονίδια του μονοπατιού Wnt. Το ποσοστό μεταλλαγών στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη β-κατενίνη είναι 20% και πιθανό να είναι ακόμα υψηλότερο σε περιπτώσεις ηπατοκυτταρικού καρκίνου που σχετίζονται με ιό της

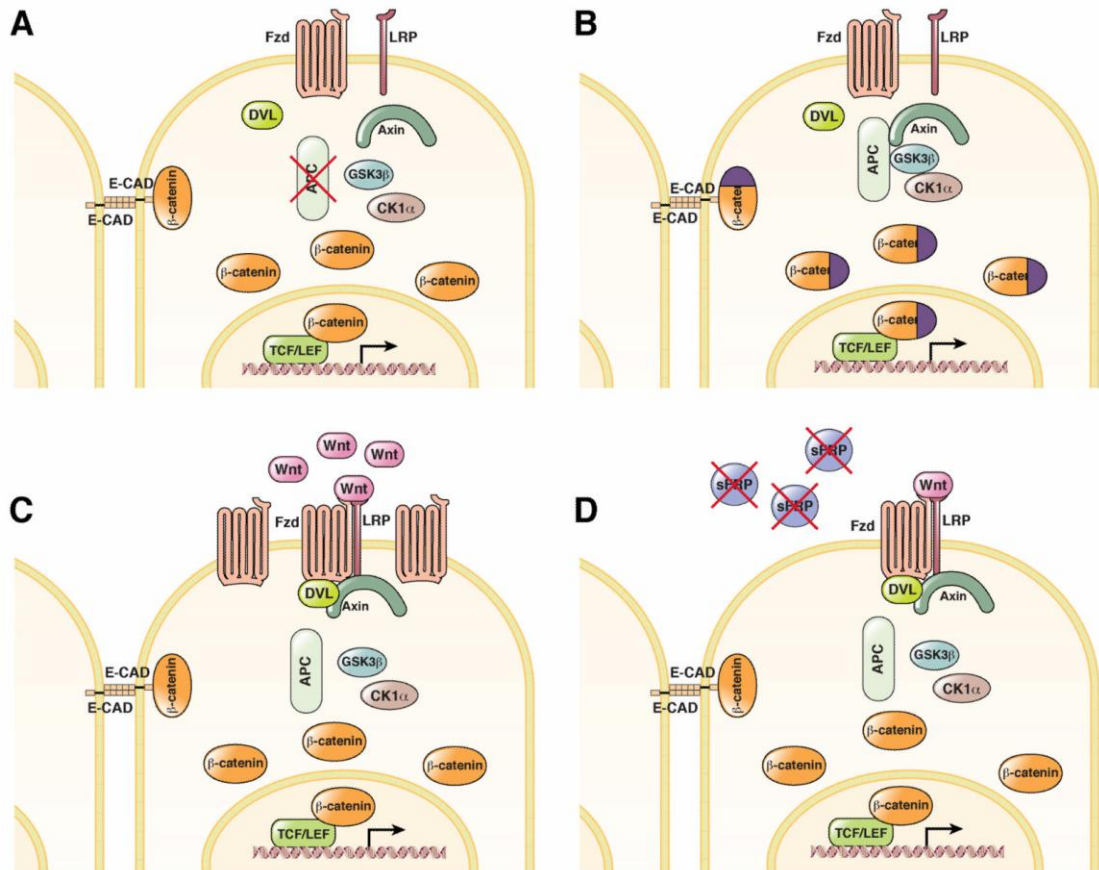
ηπατίτιδας C (Van Nhieu et al. 1999). Στον καρκίνο ωοθηκών, σε περιπτώσεις χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *CTNNB1* και η παρουσία β-κατενίνης στον πυρήνα σχετίζεται με ευνοϊκή πρόγνωση (Wright et al., 1999). Μετά τις μεταλλάξεις στα γονίδια *CTNNB1* και *APC*, οι οποίες απορρυθμίζουν το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης και οδηγούν στην εμφάνιση καρκινογένεσης, ακολουθούν οι μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Axin1. Το γονίδιο αυτό θεωρείται ογκοκατασταλτικό και οι μεταλλάξεις σε αυτό, οι οποίες είναι συνήθως παρανοηματικές (missense) και μεταλλάξεις που οδηγούν σε κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης (truncation), έχουν βρεθεί σε σποραδικούς καρκίνους παχέος εντέρου και σε ηπατοκυτταρικούς καρκίνους, καθώς και σε οικογενή σύνδρομο καρκίνου (Salahshor & Woodgett, 2005, Marvin et al., 2011). Οι μεταλλάξεις αυτές προκαλούνται στις περιοχές δέσμευσης της β-κατενίνης. Επίσης, στο ομόλογο γονίδιο *AXIN2* το οποίο θεωρείται ογκοκατασταλτικό γονίδιο έχουν παρατηρηθεί μεταλλάξεις. Έχει ενδιαφέρον το γεγονός ότι στο εξώνιο 7 του γονιδίου *AXIN2*, το οποίο περιλαμβάνει τέσσερις μονο-νουκλεοτιδικές επαναλήψεις έχουν βρεθεί μεταλλάξεις σε όγκους παχέος εντέρου με μικροδορυφορική αστάθεια (Thorstensen et al., 2005).

Όπως αναφέρθηκε στην αρχή της ενότητας αυτής, δεν έχουν παρατηρηθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη κινάση GSK3-β, καθώς η κινάση αυτή είναι ζωτικής σημασίας για τη βιωσιμότητα των κυττάρων, εντούτοις έχει βρεθεί μια in-frame splice διαγραφή στην περιοχή ενεργότητας της GSK3-β σε ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία (Abrahamsson et al., 2009). Έχει παρατηρηθεί ότι ο ρόλος της κινάσης GSK3-β σε ορισμένους τύπους καρκίνου είναι διττός, δηλαδή στον καρκίνο μαστού και στους καρκίνους του δέρματος (με εξαίρεση το μελάνωμα) η κινάση δρα ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο, μειώνοντας τον νεοπλασματικό μετασχηματισμό των κυττάρων και την ανάπτυξη του όγκου. Αντίθετα σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως ο καρκίνος παχέος εντέρου, ωοθηκών και παγκρέατος, η κινάση GSK3-β λειτουργεί ως ογκογονίδιο, καθώς προάγει την καρκινογένεση, την ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση (Jia Luo, 2009).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη φωσφατάση PP2A έχει θεωρηθεί ογκογονίδιο και ογκοκατασταλτικό γονίδιο ανάλογα με γενετική βλάβη. Ως ογκογονίδιο θεωρείται γιατί αναστέλλει τη δράση της πρωτεΐνης Axin, ενώ σε πολλές μελέτες τόσο καρκινικών κυτταρικών σειρών παχέος εντέρου όσο και σε κακοήθεις όγκους παχέος εντέρου, η έκφραση συγκεκριμένων υπομονάδων της PP2A, οδηγεί στην καταστροφή της β-κατενίνης (Seeling et al., 1999, Wang et al., 1998).

Από τους μεταγραφικούς παράγοντες του κανονικού μονοπατιού TCF και LEF, στον ομόλογο μεταγραφικό παράγοντα TCF4 έχουν ανιχνευθεί μεταλλάξεις. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα TCF4 περιέχει 9 μόνο-νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αδενίνης στο εξώνιο 17 με αποτέλεσμα αυτές οι επαναλήψεις είναι να επιρρεπείς για μεταλλάξεις σε καρκίνους παχέος εντέρου και στομάχου με μικροδορυφορική αστάθεια (Thorstensen et al., 2005). Οι μεταλλάξεις στο εξώνιο 17 επηρεάζουν τις περιοχές δέσμευσης του αναστολέα του TCF4, CtBP, με αποτέλεσμα την ιδιοστατική ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων του μονοπατιού Wnt. Επίσης, είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι όγκοι που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια *APC*, *CTNNB1* και *AXIN*, φέρουν και μεταλλαγή στον γονίδιο που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα TCF4.

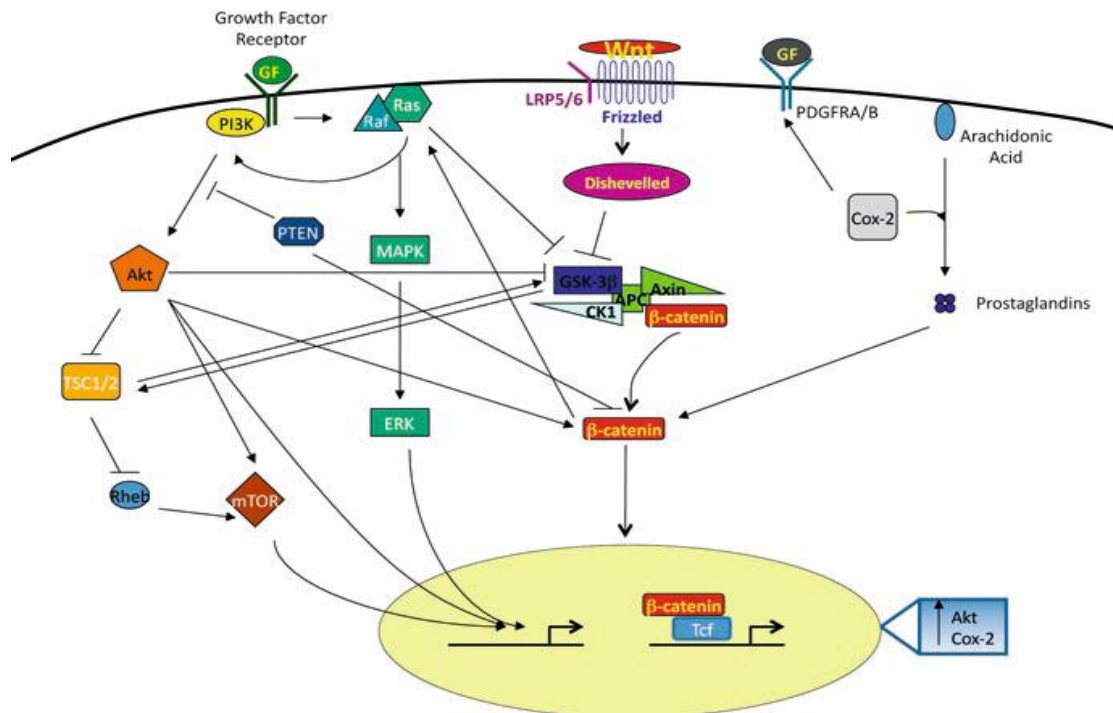
Οι προσδέτες Wnts, οι υποδοχείς Frizzleds και τα υπόλοιπα συστατικά του μονοπατιού Wnt συχνά υπερ ή υπο-εκφράζονται σε διάφορους τύπους καρκίνου και αυτές οι αλλαγές στο προφίλ έκφρασης συχνά συσχετίζονται με επιγενετική ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση των υποκινητών των γονιδίων. Στη Εικόνα 20 απεικονίζονται τέσσερις γενικοί μηχανισμοί, οι οποίοι μπορούν να οδηγήσουν σε απορρύθμιση του Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού και την επαγωγή της καρκινογένεσης.



Εικόνα 20. Κοινός μηχανισμός με τους οποίους το Wnt/β-κατενίνη μονοπάτι είναι απορρυθμισμένο στον καρκίνο. Α) Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *APC* εμποδίζουν τον σχηματισμό του συμπλόκου αποικοδόμησης της β-κατενίνης και εκείνη συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια μετατοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου με αποτέλεσμα την έκφραση γονιδίων-στόχων του μονοπατιού. Β) Μεταλλάξεις στο γονίδιο *CTNNB1*, συνήθως στο εξόνιο 3 το οποίο κωδικοποιεί την αμινοτελική περιοχή της β-κατενίνης αποφεύγοντας έτσι την ουβικιτινίωση της και την αποικοδόμηση της στο πρωτεάσωμα. Γ) Η υπερέκφραση των υποδοχέων Frizzleds ή των προσδετών Wnts μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη ενεργοποίηση του μονοπατιού. Δ) Η μειωμένη έκφραση των αναστολέων του μονοπατιού όπως των sFRPs (secreted Frizzled-Related Proteins) μπορούν να προκαλέσουν αύξηση της πρόσδεσης των προσδετών Wnts, άρα και αυξημένη ενεργότητα του μονοπατιού. (Bryan D. White, 2012).

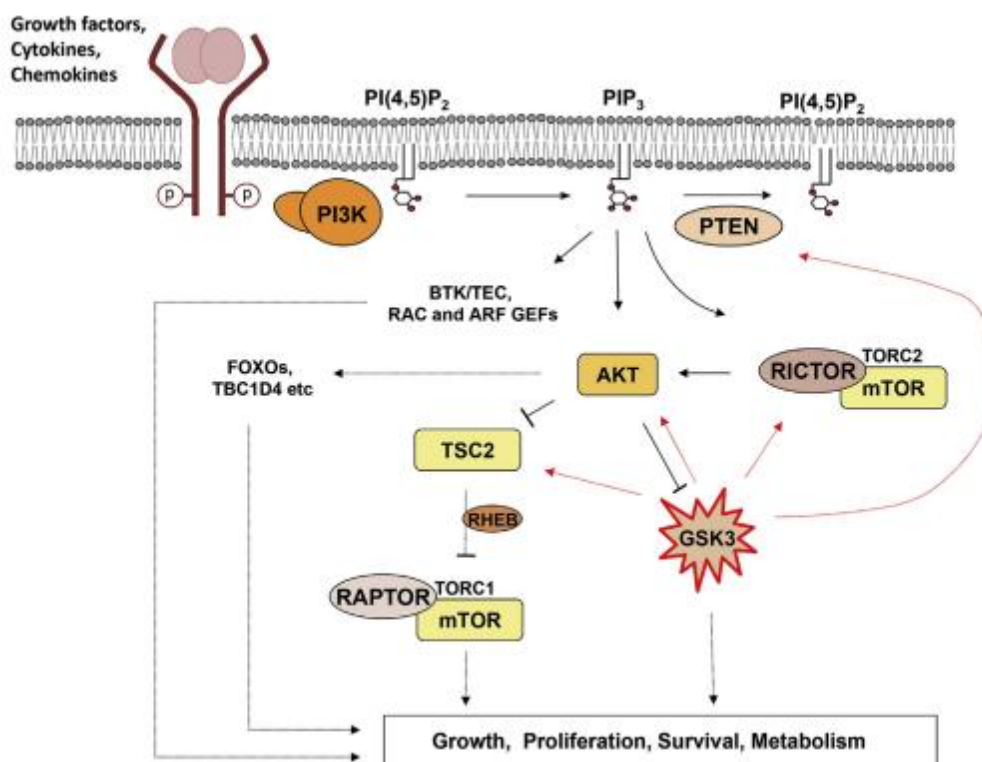
1.5.5. ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ WNT ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Σε πολλές μελέτες έχει παρατηρηθεί η ικανότητα του μονοπατιού Wnt να ενεργοποιεί άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια σε διάφορους τύπους καρκίνου. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί η επικοινωνία του μονοπατιού Wnt με σηματοδοτικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος που συνδέονται με την ανάπτυξη του κυττάρου (growth factor signaling pathways), συμπεριλαμβανομένου τα μονοπάτια HGF, EGF, TGFβ, VEGF και Insulin/IGF και με σηματοδοτικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος που συνδέονται με την ανάπτυξη (Developmental Pathways), στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα μονοπάτια Notch και Hedgehog αλλά και με άλλα μονοπάτια όπως PI3K/Akt, mTOR και RAS/MAPK. (Michael Tompson et al., Targeting the Wnt Pathway in Cancer). Η επικοινωνία μερικών σηματοδοτικών μονοπατιού αναπαριστάται στην Εικόνα 21.



Εικόνα 21. Η επικοινωνία μεταξύ των μονοπατιών PI3K/AKT και RAS/MAPK με το μονοπάτι Wnt. Με την σύνδεση του αυξητικού παράγοντα PI3K στον υποδοχέα ενεργοποιείται η πρωτεΐνη Akt, η οποία ενεργοποιεί είτε άμεσα είτε έμμεσα τη β-κατενίνη μέσω της απενεργοποίησης της κινάσης GSK-3β ή ενεργοποιώντας την μετατόπιση της β-κατενίνης στον πυρήνα. Επιπλέον, το μονοπάτι Wnt ενεργοποιεί το μονοπάτι mTOR, απενεργοποιώντας τη GSK-3β. Η πρωτεΐνη PTEN η οποία εμποδίζει την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Akt δρα ανασταλτικά στην μετατόπιση της β-κατενίνης στον πυρήνα. Όσον αφορά το μονοπάτι Ras/MAPK, η πρωτεΐνη Ras μπορεί να ενεργοποιήσει έμμεσα τη β-κατενίνη με την απενεργοποίηση της κινάσης GSK-3β. Το μονοπάτι Wnt μπορεί να ρυθμίσει την σταθερότητα της πρωτεΐνης Ras μειώνοντας την ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση. Τέλος, η πρωτεΐνη Cox2 το οποίο μετατραπεί το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλανδίνες, οι οποίες αυξάνουν τη συσσώρευση της β-κατενίνης στον πυρήνα.

Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-AKT-mTOR ελέγχει την ανάπτυξη και των πολλαπλασιασμό των κυττάρων, καθώς αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν υποδοχείς οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων, ενεργοποιώντας στη συνέχεια την πρωτεΐνη PI3K, τη σύνθεση του λιπιδικού προϊόντος PIP3 και καθοδικά του μονοπατιού τις κινάσες AKT και mTOR (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Η κινάση AKT φωσφορυλιώνει και αναστέλλει την δράση της κινάσης GSK3-β η οποία αποτελεί σημαντικό συστατικό του συμπλόκου αποικοδόμησης της β-κατενίνης στο σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt. Επιπρόσθετα η κινάση AKT αναστέλλει και τη δράση και άλλων πρωτεϊνών όπως τις πρωτεΐνες TSC2, TBC1D4 την οικογένεια των πρωτεϊνών FOXOs. Όταν η κινάση GSK3-β είναι ενεργοποιημένη φωσφορυλιώνει άμεσα σημαντικά συστατικά σηματοδοτικών μονοπατιών συμπεριλαμβανόμενων τις πρωτεΐνες TSC2, RICTOR, PTEN, καθώς και την ίδια την κινάση AKT με πιθανές επιδράσεις ανατροφοδότησης στη σηματοδότηση (Hermida et al., 2017).

1.5.6. ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ WNT ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ

Η ανακάλυψη του γονιδίου Wnt1 ως ογκογονίδιο στο μαστό προέκυψε από τη δημιουργία όγκων στο μαστό ποντικών μετά το μόλυνση με τον ιό MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus). Η ενσωμάτωση του MMTV ιού στο γονιδίωμα του ποντικού έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου που είναι σήμερα γνωστό με την ονομασία WNT1. Από τη συγκεκριμένη μελέτη παρατηρήθηκε ότι η άμεση συνέπεια της έκφρασης του γονιδίου WNT1 στον αδένα του μαστού των ποντικών είναι η υπερπλασία και όχι το καρκίνωμα. Αυτή η ένδειξη προήλθε από διαγονιδιακά ποντίκια με φαινότυπο MMTV-Wnt1, τα οποία είχαν εκτεταμένη λοβιακή υπερπλασία και στη συνέχεια αυτή η υπερπλασία εξελίχθηκε σε καρκίνωμα μετά από μια μακρά λανθάνουσα περίοδο. Επομένως, παρά τη μακρά περίοδο, το γονίδιο WNT1 έχει ογκογόνο δράση. Στον άνθρωπο δεν έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις γλυκοπρωτεΐνες Wnts, εντούτοις η υπερέκφραση τους έχει παρατηρηθεί σε πολλούς τύπος καρκίνου.

Η απορρύθμιση του κανονικού μονοπατιού Wnt/β-κατενίνης έχει παρατηρηθεί και στον καρκίνο μαστού. Γενικά, όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα έχουν παρατηρηθεί μεταλλάξεις σε πολλά συστατικά του Wnt μονοπατιού σε διάφορους τύπους κακοηθειών, έτσι θα ήταν αναμενόμενο να έχουν παρατηρηθεί σε μεγάλο ποσοστό και στον καρκίνο μαστού. Παρόλα αυτά, προς μεγάλη έκπληξη, μέχρι και σήμερα δεν έχουν αναφερθεί αρκετές μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια στον καρκίνο μαστού. Αρχικά, γνωρίζοντας ότι σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως καρκίνος παχέος εντέρου, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β-κατενίνη συχνά φέρει μεταλλάξεις στο εξόνιο 3, εντούτοις μεταλλάξεις στη β-κατενίνη έχουν ανιχνευθεί στο 45% των περιπτώσεων ινωμάτωσης μαστού και καθόλου σε κακοήθεις όγκους. Συγκεκριμένα, σε μια μελέτη η οποία περιλάμβανε 54 δείγματα ασθενών με διηθητικό καρκίνο μαστού (34 πορογενή καρκινώματα και 20 λοβιακά καρκινώματα) δεν ανιχνεύθηκε καμία μεταλλαγή, αλλά το 13% των δειγμάτων εμφάνιζε υψηλά επίπεδα β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα (Jonsson et al., 2000). Επίσης, σε προγενέστερη μελέτη σε 27 μεταπλαστικά καρκινώματα μαστού καταγράφηκαν σε 7 δείγματα μεταλλάξεις στην περιοχή του γονιδίου που κωδικοποιεί το αμινοτελικό άκρο της β-κατενίνης (Hayes et al., 2008).

Η πρώτη μελέτη που απέδειξε τα αυξημένα επίπεδα της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα ήταν το 2000 όταν με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας παρατηρήθηκε συσσώρευση της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα στο 60% των περιστατικών καρκίνου μαστού (Lin et al., 2000). Στο ίδιο πείραμα παρατηρήθηκαν τα αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης CyclinD1, που μεταγράφεται από το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης και τα οποία σχετίζονται με κακή πρόγνωση των ασθενών. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η εντόπιση της β-κατενίνης στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα δεν παρατηρείται στον φυσιολογικό μαστό. Επομένως, η ανίχνευση της β-κατενίνης στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα δηλώνει ενεργό σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt.

Παρά το γεγονός ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β-κατενίνη δεν φέρει καμία μεταλλαγή που να εξηγεί τη συσσώρευση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στον πυρήνα ή και στο κυτταρόπλασμα και όχι στη μεμβράνη των καρκινωμάτων μαστού, θα ήταν αναμενόμενο να πιστεύεται ότι τα υπόλοιπα συστατικά του κανονικού μονοπατιού Wnt θα έχουν μεταλλάξεις. Εντούτοις, μεταλλάξεις στα γονίδια *APC*, *AXIN* και *DVL* είναι εξαιρετικά σπάνιες. Σε μελέτες για την ανίχνευση μεταλλαγών στο γονίδιο *APC* σε ασθενείς με καρκίνο μαστού, το εύρος των μεταλλαγών είναι 0,8%-18%. Συγκεκριμένα, μια μελέτη που περιλάμβανε 227 καρκινώματα μαστού, μόλις μια μεταλλαγή (4678delA) ανιχνεύθηκε στο εξόνιο 15 του γονιδίου *APC* (Sorlie et al., 1998). Επιπλέον, σε μια άλλη μελέτη με 24 κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού, μόνο σε μια καρκινική σειρά εντοπίστηκε μια μεταλλαγή (E1577stop) στο γονίδιο *APC* (Schlosshauer et al., 2000). Αξίζει να αναφερθεί ότι, σε μελέτες σε καλοήθεις όγκους μαστού και πιο συγκεκριμένα στην ινομάτωση μαστού ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 18% των περιστατικών παρανοηματικές (truncation) μεταλλαγές στο γονίδιο *APC* και 15%, σωματικές παραλλαγές στο ίδιο γονίδιο (Abraham et al., 2002). Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί ότι ο υποκινητής του γονιδίου *APC* είναι μεθυλιωμένος στο 30%-55% των περιστατικών καρκίνου μαστού, αλλά και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού (Jin et al., 2001, Dulaimi et al., 2004), επομένως η έκφραση του γονιδίου *APC* συσχετίζεται με την κατάσταση της μεθυλίωσης. Για το γονίδιο *AXIN* δεν έχουν ανιχνευθεί μεταλλαγές στον καρκίνο μαστού, αλλά έχει παρατηρηθεί απώλεια ετεροζυγωτίας μιας περιοχής του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος 17, στο οποίο εδράζεται το γονίδιο *AXIN* (Mai et al., 1999, Webster et al., 2000). Αντίστοιχα για το γονίδιο *DVL* δεν έχουν παρατηρηθεί μεταλλαγές παρά μόνο αλλαγές στην έκφραση σε επίπεδο πρωτεΐνης και mRNA σε ποσοστό 60% και 24% αντίστοιχα.

(Nagahata et al., 2003).

Η απουσία μεταλλαγών στα γονίδια *CTNNB1*, *AXIN* και *DVL* και η παρουσία ελάχιστων μεταλλαγών στο γονίδιο *APC*, υποδηλώνει ότι η συσσώρευση της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα ίσως να οφείλεται σε μεταλλαγές σε άλλα συστατικά του κανονικού μονοπατιού Wnt. Μέχρι σήμερα, δεν έχει πραγματοποιηθεί καμία έρευνα για μεταλλαγές στα γονίδια που κωδικοποιούν τους υποδοχείς Frizzleds και τους συνυποδοχείς LRP5/6 στον καρκίνο μαστού. Αντίθετα, σημειακές μεταλλαγές έχουν ανιχνευθεί στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα LRP5, οι οποίες σχετίζονται με υπερ-ενεργοποίηση του μονοπατιού στην ανάπτυξη των οστών (Boyden et al., 2002). Τέλος, μεταλλαγές στους μεταγραφικούς παράγοντες TCF/LEF στον καρκίνο μαστού δεν έχουν μελετηθεί παρόλα αυτά, έχει παρατηρηθεί μειωμένη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα TCF4 σε καρκινώματα μαστού (Shulewitz et al., 2006), ενώ σε άλλη μελέτη έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα LEF1 (Lamb et al., 2013).

Ο ρόλος της κινάσης GSK3-β είναι διττός στην καρκινογένεση και πιθανά διαφέρει μεταξύ διαφορετικών ιστών (Mishra, 2010). Στον καρκίνο μαστού θεωρείται ογκοκατασταλτικό γονίδιο, αφού φαίνεται να εμποδίζει την ανάπτυξη του όγκου (Jia Luo, 2009). Πιο συγκεκριμένα έχει βρεθεί πως η υπερέκφραση της μη ενεργοποιημένης (φωσφορυλιωμένη στο κατάλοιπο σερίνης 9) GSK3-β προάγει την καρκινογένεση (Farago et al., 2005), ενώ αντίστοιχα η υπερέκφραση της ενεργοποιημένης κινάσης καταστέλλει τους όγκους (Ding et al., 2007).

Στη συνέχεια, προχωρώντας ανοδικά του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt, δεν υπάρχουν αναφορές για μεταλλαγές στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες WNTs που να σχετίζονται με τον καρκίνο μαστού, αλλά πολλές μελέτες έχουν περιγράψει την αλλαγή στην έκφραση των προσδετών Wnts. Συγκεκριμένα, η πρώτη μελέτη πραγματοποιήθηκε στο 1994 όπου παρατηρήθηκε υπερέκφραση των Wnts 1,3 και 7 σε ανθρώπινους καρκίνους μαστού και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού (Huguet et al., 1994). Έπειτα, ακολούθησαν μελέτες, οι οποίες απέδειξαν υπερέκφραση και άλλων Wnts σε καρκινώματα μαστού και σε καρκινικές σειρές. Όπως ο προσδέτης Wnt10b έχει υψηλή έκφραση στον τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού ενεργοποιώντας το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης, συμβάλλοντας στην αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Wend et al., 2013). Στον Πίνακα 5 καταγράφονται ορισμένοι προσδέτες Wnts που υπερεκφράζονται στον καρκίνο μαστού, αλλά και σε περιπτώσεις καλοήθων όγκων.

Πίνακας 5. Η έκφραση των Wnts προσδετών σε κακοήθεις και καλοήθεις όγκους μαστού. (Howe & Brown, 2004)

ΠΡΟΣΔΕΤΗΣ WNT	ΕΚΦΡΑΣΗ	%ΤΩΝ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ	ΤΥΠΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	ΑΝΑΦΟΡΕΣ
WNT2	Υπερέκφραση, RNA	45% (5/11)	Πορογενή καρκινώματα μαστού	Dale et al., 1996
WNT2	Υπερέκφραση, RNA	22% (2/9)	Καρκινώματα μαστού	Katoh, 2001
WNT2,4	Υπερέκφραση, RNA	80% (4/5)	Ινωαδένωμα	Huguet et al., 1994
WNT5A	Υπερέκφραση, RNA	36% (10/28)	Καρκινώματα μαστού	Lejeune et al, 1995
WNT7B	Υπερέκφραση, RNA	10% (2/20)	Καρκινώματα μαστού	Huguet et al., 1994
WNT10B	Υπερέκφραση, RNA	6% (3/50)	Καρκινώματα μαστού	Bui et al., 1997, Went et al 2013
WNT13/2B	Υπερέκφραση, RNA	14% (2/14)	Καρκινώματα μαστού	Bergstein et al., 1999
WNT14	Υπερέκφραση, RNA	11% (1/9)	Καρκινώματα μαστού	Kirikoshi et al., 2001

Σύμφωνα, με τον Πίνακα 5 παρατηρείται ότι ορισμένοι προσδέτες Wnts υπερεκφράζονται τόσο σε κακοήθεις όσο και σε καλοήθεις όγκους μαστού. Ειδικότερα, για το προσδέτη WNT2 είχε παρατηρηθεί αρχικά ότι εκφράζεται μόνο από ινοβλάστες του στρώματος του μαστού (Huguer et al, 1994), ενώ στα καρκινώματα εκφράζεται και από τα επιθηλιακά κύτταρα (Dale et al., 1996). Ο μηχανισμός που προτάθηκε ήταν ότι η αλλαγή από παρακρινή σε αυτοκρινή μηχανισμό, κάνει τα καρκινικά κύτταρα αυτόνομα για τη σηματοδότηση Wnt (Dale et al., 1996). Αρχικά, ήταν γνωστό ότι η έκφραση της πρωτεΐνης WNT2 από το στρώμα μπορεί να ελέγχει τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων (Blasband et al., 1992). Επομένως, η ανακάλυψη ότι ο προσδέτης WNT2 εκφράζεται από το επιθήλιο ορισμένων καρκινωμάτων μαστού και ινωαδενομάτων αυξάνει την πιθανότητα ότι η έκφραση της πρωτεΐνης WNT2 και η πρόσληψη της από τα επιθηλιακά κύτταρα δημιουργεί έναν αυτοκρινή μηχανισμό, ο οποίος απορρυθμίζει το φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων. Επιπρόσθετα, αλλαγή στην έκφραση των υποδοχέων Frizzleds έχει παρατηρηθεί και στον καρκίνο μαστού. Πιο αναλυτικά,

έχει παρατηρηθεί η υπερέκφραση των υποδοχέων Frizzled 1 και Frizzled 2 σε κακοήθεις όγκους μαστού (Milovanovic et al., 2004). Επίσης, είναι ενδιαφέρον ότι υπερέκφραση του Frizzled 7 έχει παρατηρηθεί σε περιστατικά τριπλά αρνητικών καρκίνων μαστού σε ποσοστό 67%, σε αντίθεση με τους μη τριπλά αρνητικά καρκίνους μαστού όπου υπερέκφραζαν τον υποδοχέα Frizzled 7 σε ποσοστό μόνο 5% (Yang et al., 2011). Πολλές αναφορές έχουν γίνει στο γεγονός ότι η δυσλειτουργία του μονοπατιού Wnt στον καρκίνο μαστού μπορεί να οφείλεται στη μειωμένη έκφραση των αναστολέων του. Οι μελέτες που έχουν γίνει τόσο σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης αφορούν τους διαλυτούς εξωκυτταρικούς αναστολείς WIF1 (Wnt Inhibitory Factor 1) και sFRP1 (secreted Frizzled Receptor Protein 1). Πιο αναλυτικά, παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση των αναστολέων WIF1 και sFRP1 σε ποσοστό 60% και 46% αντίστοιχα, των δειγμάτων ασθενών με καρκίνο μαστού. έχει παρατηρηθεί στο 60% των διηθητικών καρκινωμάτων μαστού (Wissmann et al., 2003, Klorocki et al., 2004). Η μειωμένη έκφραση των αναστολέων του μονοπατιού Wnt πιθανά να οφείλεται στην υπερμεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων που κωδικοποιούν τους αναστολείς οδηγώντας σε απορρύθμιση του κανονικού μονοπατιού Wnt στον καρκίνο μαστού (Veeck et al., 2006, Klarmann et al., 2008).

Σε αντίθεση με το κανονικό μονοπάτι Wnt (εξαρτημένο από τη β-κατενίνη μονοπάτι Wnt), ο ρόλος του μη κανονικού μονοπατιού (ανεξάρτητο από τη β-κατενίνη) στον καρκίνο μαστού δεν είναι αρκετά μελετημένο. Πολλές έχουν μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση του προσδέτη WNT5A του μη κανονικού μονοπατιού απουσιάζει σε όγκους καρκίνου μαστού και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός βιοδείκτης. Η απουσία του προσδέτη WNT5A στον φυσιολογικό μαστικό αδένιο ποντικών προάγει την ενεργοποίηση του κανονικού μονοπατιού Wnt, όπου η απορρύθμιση του οδηγεί στην καρκινογένεση του μαστού. Η απώλεια του προσδέτη WNT5A έχει ως αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της πυρηνικής β-κατενίνης και συνεπώς την έκφραση γονιδίων στόχων σε καρκινικά κύτταρα μαστού (Roarty et al., 2009). Ωστόσο άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι ο προσδέτης WNT5A υπερεκφραζόταν σε κακοήθεις όγκους μαστού σε σύγκριση με τον φυσιολογικό μαστό. Σε μια μελέτη παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του προσδέτη WNT5A και του υποδοχέα Frizzled 2 σε μεταστατικές καρκινικές σειρές μαστού καθώς και σε όγκους μαστού με υψηλό βαθμό κακοήθειας, καθώς επίσης σχετίζεται με τους δείκτες μετάπτωσης από το επιθήλιο στο παρέγχυμα (EMT) (Gujral et al., 2014). Ένας ακόμη προσδέτης του μη κανονικού μονοπατιού Wnt, ο WNT11

εμπλέκεται επίσης στην ογκογένεση του μαστού. Έχειδειχθεί ότι η έκφραση του προσδέτη WNT11 που προκαλείται από σχετιζόμενο υποδοχέα ERα (Estrogen-related receptor alpha) και από τη β-κατενίνη βοηθάει περαιτέρω τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων (Dwyer et al., 2010).

1.6. ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ WNT ΣΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Έχει αποδειχθεί ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt αυξάνει την αντίσταση στην ακτινοβολία των προγονικών κυττάρων στον μαστικό αδένα ποντικών αλλά και σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού, γεγονός που αποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο μονοπάτι εμπλέκεται στην αντίσταση σε σημερινά αντικαρκινικά φάρμακα πιθανά ρυθμίζοντας βλαστοκυτταρικούς και προγονικούς κυτταρικούς πληθυσμούς (Chen et al., 2007; Woodward et al., 2007). Δεδομένης της συμμετοχής του μονοπατιού Wnt σε διάφορους τύπους καρκίνου, το μονοπάτι αυτό αποτελεί ένα σημαντικό στόχο για θεραπευτική προσέγγιση (Novellademunt, Antas, & Li, 2015, Krishnamurthy & Kurzrock, 2017). Έχουν δημιουργηθεί φαρμακευτικές ουσίες τα οποία αναστέλλουν τη σηματοδότηση του μονοπατιού Wnt είτε ανοδικά είτε καθοδικά του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, αυτές οι φαρμακευτικές ουσίες έχουν τις εξής δράσεις: 1) εμποδίζουν την αλληλεπίδραση προσδετών και υποδοχέων του μονοπατιού Wnt, 2) σταθεροποιούν το σύμπλοκο αποικοδόμησης της β-κατενίνης και 3) εμποδίζουν την μεταγραφική δραστηριότητα της β-κατενίνης στον πυρήνα.

1. Αντισώματα που δρουν στην αλληλεπίδραση προσδετών/υποδοχέων

- OMP-18R5 ή Vantictumab

Πρόκειται για ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο αλληλεπιδρά με πέντε υποδοχείς Frizzleds (FZD 1, 2, 5, 7, 8) και μπλοκάρει τη σηματοδότηση του μονοπατιού Wnt εμποδίζοντας την πρόσδεση ενός συνδέτη Wnt με τον υποδοχέα Frizzled. Το παραπάνω αντίσωμα βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές σε ασθενείς με διάφορους συμπαγείς όγκους όπως ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα και καρκίνος μαστού σε ασθενείς που δεν υπερεκφράζουν τον υποδοχέα HER2.

- OMP-54F28

Είναι μια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από τμήμα του υποδοχέα Frizzled 8 το οποίο συνδέεται με έναν προσδέτη Wnt και ένα τμήμα IgG1. Το συγκεκριμένο αντίσωμα δρα μιμούμενο κάποιο συστατικό του μονοπατιού Wnt και στοχεύει τον προσδέτη Wnt και έχει χρησιμοποιηθεί τόσο σε xenografts μοντέλα παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη διαφόρων συμπαγών όγκων όσο και σε κλινικές δοκιμές σε ασθενείς με πορογενές αδενοκαρκίνωμα παγκρέατος και με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.

2. Φάρμακα που σταθεροποιούν το σύμπλοκο αποικοδόμησης της β-κατενίνης

- Αναστολείς Tankyrase: G244-LM, G007-LK, XAV939, IWR-1, και JW55

Το συστατικό του μονοπατιού Wnt, Tankyrase δρα σε poly-ADP-ribosylate AXIN το οποίο εμποδίζει την καταστροφή της β-κατενίνης από το σύμπλοκο αποικοδόμησης. Οι αναστολείς της Tankyrase σταθεροποιούν την Axin, ενισχύοντας την καταστροφή της β-κατενίνης. Πολλά μικρά συνθετικά μόρια χρησιμοποιούνται ως αναστολείς της Tankyrase τα οποία προκαλούν μείωση της ενεργότητας του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου με μεταλλάξεις στο γονίδιο APC αλλά και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές πνεύμονα. Επομένως, σχεδιάζονται να δοκιμαστούν σε κλινικές μελέτες.

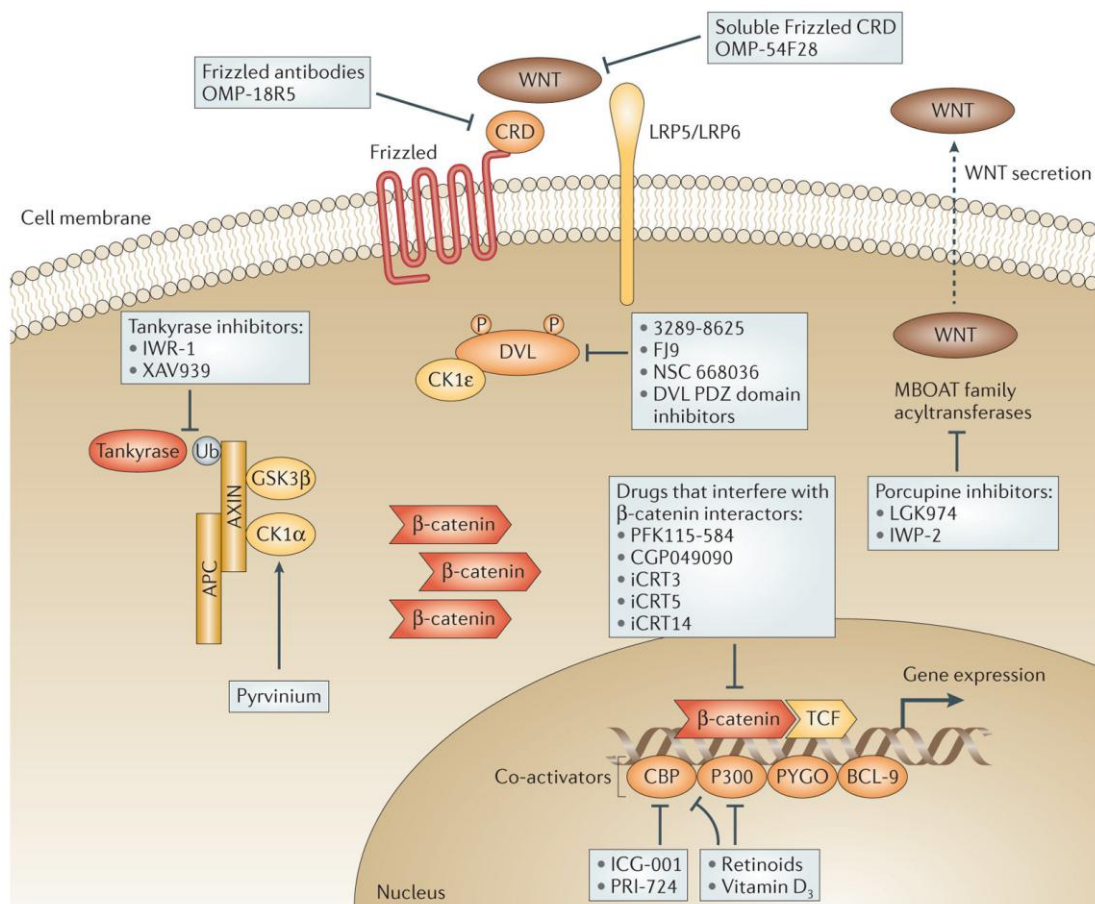
3. Φάρμακα τα οποία εμποδίζουν την πρόσδεση της β-κατενίνης με μεταγραφικούς παράγοντας στον πυρήνα

- PRI-724

Η β-κατενίνη όταν εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου προσδέεται με ένα σύμπλοκο μεταγραφικών παραγόντων όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες LEF και TCF. Το φάρμακο PRI-724 είναι ένας μικρός αναστολέας, ο οποίος εμποδίζει την πρόσδεση της β-κατενίνης με έναν μεταγραφικό παράγοντα. Αυτό το φάρμακο χρησιμοποιείται στις κλινικές δοκιμές φάσης I & II σε

μυελοειδείς κακοήθειες, στο παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα και στον καρκίνο παχέος εντέρου.

Η στόχευση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt μπορεί να είναι σημαντική για τη θεραπεία των κακοηθειών αλλά εγκυμονεί κινδύνους καθώς η γενική αναστολή του παραπάνω μονοπατιού από πολλά φαρμακευτικά μόρια, τα οποία ερευνώνται ως αντικαρκινική θεραπεία, μπορεί να προκαλέσει βλάβη στη φυσιολογική λειτουργία των βλαστοκυττάρων που απαιτούνται για την διατήρηση της ομοιόστασης των φυσιολογικών ιστών. Συνεπώς, είναι απαραίτητη η προσεκτική αξιολόγηση της ασφάλειας των υπό διερεύνηση φαρμακευτικών μορίων που δρουν έναντι του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt (Zhang & Hao, 2015).



Εικόνα 23. Αναπαράσταση της δράσης των φαρμακευτικών ουσιών στα συστατικά του σηματοδοτικού κανονικού σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt (Kahn, 2014).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των επιπέδων έκφρασης των σηματοδοτικών μορίων του μονοπατιού Wnt στον καρκίνο μαστού και της πιθανής προγνωστικής σημασίας τους. Πιο αναλυτικά, μελετήθηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης mRNA των γονιδίων των σηματοδοτικών μορίων του μονοπατιού, τα οποία εμπλέκονται στην καρκινογένεση και συγκεκριμένα των προσδετών WNT2, WNT3 και WNT5A, των υποδοχέων FRIZZLED 4, FRIZZLED 7 και FRIZZLED 6, του γονιδίου *CTNNB1*, το οποίο κωδικοποιεί την β-κατενίνη, της κινάσης GSK3-β και των μεταγραφικών παραγόντων TCF4 και LEF1 σε δείγματα καρκίνου μαστού. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση γραμμικών συσχετίσεων της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων. Στη συνέχεια, ακολούθησε συσχέτιση των αποτελεσμάτων με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών και συγκεκριμένα με την ηλικία, το βαθμό διαφοροποίησης, το μέγεθος του όγκου, την παρουσία ή απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων, τον ιστολογικό τύπο, το προγνωστικό στάδιο, με την ανοσοϊστοχημική έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων, προγεστερόνης και HER2. Ακολούθησε μελέτη των πρωτεϊνών β-κατενίνη και GSK3-β με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας και ανοσοαποτύπωμα κατά Western, αντίστοιχα. Τέλος, μελετήθηκε η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των μορίων του μονοπατιού Wnt α) με την παρουσία μεταλλαγών του γονιδίου *PIK3CA* το οποίο εμπλέκεται στο μονοπάτι PI3K/AKT και β) μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *APC* (απουσία έκφρασης της πρωτεΐνης).

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 68 δείγματα φρέσκου ιστού, διατηρημένα στους -20°C και 32 δείγματα ιστών εγκλεισμένα σε παραφίνη από γυναίκες με καρκίνο μαστού. Συγκεκριμένα, από την κάθε ασθενή απομονώθηκαν από χειρουργικές επεμβάσεις δύο ειδών δείγματα, το ένα δείγμα από την περιοχή του όγκου και το άλλο από παρακείμενο στον όγκο φυσιολογικό ιστό.

Η συλλογή δειγμάτων ασθενών με καρκίνο μαστού και η κωδικοποίηση τους έγινε με την αυστηρή τήρηση της αρχής ανωνυμίας και του απορρήτου για οποιοδήποτε προσωπικό στοιχείο των ασθενών. Για τον κάθε ασθενή υπάρχουν κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα. Στον παρακάτω πίνακα καταγράφονται τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκίνο μαστού.

Πίνακας 1. Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκίνο μαστού.

Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά	Σύνολο: 100	Ποσοστό %
Ηλικία (μέση ηλικία 65)		
>65	54	54%
≤65	46	46%
Εύρος 35-95		
Ιστολογικός τύπος		
Λοβιακό	14	14%
Πορογενές	81	81%
Θηλώδες	2	2%
Μικτό	2	2%
Μυελοειδές	1	1%
pT-κατηγορία		
T1	23	23%

	T2	51	51%
	T3	22	22%
	T4	4	4%
pN-κατηγορία			
	N0	43	43%
	N1	20	20%
	N2	20	20%
	N3	17	17%
Βαθμός διαφοροποίησης			
	Καλά διαφοροποιημένο καρκίνωμα, G1	1	1%
	Μέτρια διαφοροποιημένο καρκίνωμα, G2	21	21%
	Φτωχά διαφοροποιημένο καρκίνωμα, G3	78	78%
Προγνωστικό στάδιο			
	Στάδιο I	22	22%
	Στάδιο II	24	24%
	Στάδιο III	54	54%
	Στάδιο IV	0	0%
Μοριακός υπότυπος			
	Luminal A	31	31%
	Luminal B	46	46%
	Τριπλά αρνητικός	10	10%
	Υπότυπος HER2 (HER2 enriched)	13	13%
Έκφραση ER			
	Θετική	68	68%
	Αρνητική	32	32%
Έκφραση PR			
	Θετική	64	64%
	Αρνητική	36	36%

Έκφραση υποδοχέα HER2

Θετική	54	54%
Αρνητική	46	46%

3.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΦΡΕΣΚΟ ΙΣΤΟ

Οργανολογία

- Λαβίδα
- Νυστέρι
- Ζυγός
- Φυγόκεντρος
- Vortex
- Μηχάνημα ομογενοποίησης Minilys®, Bertin Instruments

Αντιδραστήρια

- RNAisoPlus (Takara)
- Χλωροφόρμιο
- Ισοπροπυλική αλκοόλη
- 75% Αιθανόλη
- Νερό (DEPC-H₂O)

Πριν ξεκινήσει η διαδικασία απομόνωσης του RNA πρέπει να γίνει καθαρισμός των υλικών και της περιοχής εργασίας με διάλυμα που περιέχει αναστολείς RNA νουκλεασών. Αρχικά, κόβεται ένα κομμάτι ιστού βάρους περίπου 50mg, τοποθετείται σε σωληνάριο erppendorf των 1,5ml και ακολουθεί ψύξη του ιστού σε υγρό άζωτο N₂. Έπειτα, ακολουθεί ομογενοποίηση με 1ml TRIzol[®] Reagent με τη βοήθεια ενός μηχανήματος ομογενοποίησης. Το μίγμα αφήνεται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 12.000g για 5 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούργιο σωληνάριο erppendorf των 1,5ml και γίνεται η προσθήκη 200μl χλωροφορμίου. Ύστερα, ακολουθεί ανάδευση με το χέρι μέχρι το διάλυμα να γίνει γαλακτώδες και το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12.000g για 15 λεπτά στους 4 °C. Μετά την φυγοκέντρηση σχηματίζονται τρεις

στιβάδες: η πρώτη στιβάδα περιέχει το RNA, η δεύτερη στιβάδα περιέχει το DNA και η τρίτη στιβάδα τις πρωτεΐνες. Με προσοχή χωρίς να ανακινηθεί η μεσαία στιβάδα γίνεται μεταφορά της υδάτινης φάσης (πρώτης στιβάδας) σε καθαρό σωληνάριο erppendorf των 1,5ml και προστίθονται 500μl παγωμένης ισοπροπανόλης. Ακολουθεί ανάδευση με το χέρι, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και έπειτα το μίγμα φυγοκεντρείται στα 12.000g για 10 λεπτά στους 4 °C με σκοπό την κατακρήμνιση του RNA. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απορρίπτεται, προστίθεται 1ml 75% παγωμένης αιθανόλης και πραγματοποιείται ανάδευση με vortex. Αφού διαλυθεί το ίζημα ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 7.500g για 5 λεπτά στους 4 °C. Έπειτα, απομακρύνεται με προσοχή η αιθανόλη και το σωληνάριο παραμένει ανοιχτό ώστε να εξατμιστεί η περίσσεια αιθανόλης και για να γίνει καλό στέγνωμα του ιζήματος. Το ίζημα διαλυτοποιείται σε 30μl νερού-DEPC και τοποθετείται στο heatblock για 10 λεπτά. Αμέσως μετά το δείγμα αποθηκεύεται στους -20 °C. Τέλος, ακολουθεί ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA στο δείγμα.

3.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΣΕ RCL2 ΚΑΙ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΟ ΣΕ ΚΥΒΟ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ

Οργανολογία:

- Heat Block
- Φυγόκεντρος
- Vortex
- Μικροτόμος

Αντιδραστήρια

- NucleoSpin[®] totalRNA FFPE XS

Για την απομόνωση RNA από κύβο παραφίνης γίνεται η λήψη τομών από μικροτόμο σε ένα σωληνάριο erpendorf 1,5ml. Η απομόνωση του RNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο απομόνωσης NucleoSpin® totalRNA FFPE XS (Macherey-Nagel). Για την αποπαραφίνωση προστίθεται 1ml Paraffin Dissolver στο δείγμα και αφήνεται για επώαση στους 56 °C για 5 λεπτά με σκοπό να λιώσει η παραφίνη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 16.000g για 2 λεπτά. Έπειτα προστίθονται 140μl του διαλύματος MLF χωρίς να γίνει ανάμειξη και το δείγμα φυγοκεντρείται στα 16.000g για 2 λεπτά. Στη συνέχεια το διάλυμα Paraffin Dissolver απορρίπτεται και προστίθονται 12μl πρωτεϊνάσης όπου ακολουθεί ανάδευση με τη πιπέτα χωρίς την χρήση vortex. Το δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία 56 °C για 90 λεπτά. Έπειτα προστίθονται 2μl του διαλύματος MKA, ακολουθεί vortex, επώαση στο πάγο για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση 16.000g για 5 λεπτά. Προστίθονται 400μl του διαλύματος MX και το δείγμα αφήνεται για επώαση 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια όλη η ποσότητα μεταφέρεται σε στήλη NucleoSpin® RNA FFPE XS με σωληνάριο περισυλλογής. Ακολουθούν στάδια ξεπλύματος της μεμβράνης της στήλης με ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις. Τέλος η στήλη τοποθετείται σε σωληνάριο erpendorf των 1,5ml όπου προστίθεται 30μl RNase-free H₂O, αφήνεται για επώαση θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και φυγοκεντρείται 16.000g για 1 λεπτό. Αμέσως μετά ακολουθεί ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA και το δείγμα αποθηκεύεται στους -20 °C.

3.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΦΡΕΣΚΟ ΙΣΤΟ

Οργανολογία:

- Φυγόκεντρος

Αντιδραστήρια:

- 75% & 100% Αιθανόλη
- 0,1M Κιτρικό Νάτριο σε 10% αιθανόλη, pH 8,5
- Νερό (DEPC-H₂O)

Όπως αναφέρεται και στη ενότητα **3.2** κατά τη διάρκεια της απομόνωσης με TRIzol® Reagent δημιουργούνται 3 στιβάδες. Αφού έχει γίνει η αφαίρεση της πρώτης στιβάδας στην οποία βρίσκεται το RNA και η μεταφορά της σε άλλο σωληνάριο erpendorf, στο ήδη υπάρχον σωληνάριο erpendorf διατηρούνται η δεύτερη στιβάδα η οποία περιέχει το DNA και η τρίτη στιβάδα οι οποία έχει τις πρωτεΐνες. Για την απομόνωση DNA αρχικά πραγματοποιείται η αφαίρεση όποιας ποσότητας της υδάτινης πρώτης στιβάδας έχει παραμείνει. Το στάδιο αυτό είναι πολύ σημαντικό για τη ποιότητα του DNA που θα απομονωθεί ώστε να μην περιέχει προσμίξεις με RNA. Στη συνέχεια προστίθονται 3 ml 100% αιθανόλη και ακολουθεί ανάδευση με το χέρι για αρκετές φορές και αφήνεται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά. Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρηση 2.000g για 5 λεπτά στους 4 °C και η αφαίρεση του υπερκειμένου φαινόλης-αιθανόλης και η μεταφορά του άλλο σωληνάριο erpendorf. Στο ήδη υπάρχον σωληνάριο το ίζημα περιέχει το DNA, στο οποίο προστίθεται 1ml διαλύματος κιτρικού νατρίου/ αιθανόλης (0,1M Κιτρικό Νάτριο σε 10% αιθανόλη, pH 8,5) και ακολουθεί ομογενοποίηση. Στη συνέχεια το δείγμα αφήνεται σε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Κατά διαστήματα γίνεται ανάδευση με το χέρι. Μετά τη επώαση ακολουθεί φυγοκέντρηση 2.000g για 5 λεπτά στους 4 °C και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Τα στάδια που περιλαμβάνουν το διάλυμα κιτρικού νατρίου/ αιθανόλης, επώαση και φυγοκέντρηση με διατήρηση του ιζήματος επαναλαμβάνεται μια ακόμα φορά. Στη συνέχεια στο ίζημα προστίθεται 1,5ml 75% αιθανόλη και ακολουθεί ομογενοποίηση και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ενδιάμεση ανάδευση με το χέρι ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Τέλος, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση 2.000g για 5 λεπτά στους 4 °C, απόρριψη όλου του υπερκειμένου και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα επαναδιαλυτοποιείται σε 30μl νερού-DEPC. Ακολουθεί ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του DNA στο δείγμα και διατηρείται στους 4°C.

3.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΣΕ RCL2 ΚΑΙ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΟ ΣΕ ΚΥΒΟ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ

Οργανολογία:

- Heat Block
- Φυγόκεντρος
- Vortex
- Μικροτόμος
- Αντιδραστήρια

Αντιδραστήρια:

- Ξυλόλη
- 100% αιθανόλη
- NucleoSpin® Tissue

Όπως και στην απομόνωση RNA έτσι και στην DNA γίνεται η λήψη τομών παραφίνης σε σωληνάριο eppendorf 1,5ml. Αρχικά γίνεται η αποπαραφίνωση με την προσθήκη 900μl ξυλόλης στο δείγμα και την ανάδευση με vortex το δείγμα αφήνεται για επώαση στους 56 °C για 10 λεπτά. Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15.000g για 2 λεπτά και η απόρριψη του υπερκείμενου. Στη συνέχεια ακολουθούν ξανά τα στάδια ξυλόλης, επώασης, φυγοκέντρησης μέχρι να λιώσει η παραφίνη. Αφού γίνει αυτό μετά την απόρριψη της ξυλόλης προστίθεται 900μl 100% αιθανόλη, ακολουθεί ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση 15.000g για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία για 2 φορές. Αφού γίνει η απόρριψη της αιθανόλης το δείγμα αφήνεται για να στεγνώσει σε θερμοκρασία 56 °C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 180μl του διαλύματος T1 και 25μl πρωτεΐνης K. Το δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία 56 °C για 1 έως 15 ώρες. Μετά την επώαση προστίθενται 200μl του διαλύματος B3 και το δείγμα αφήνεται για επώαση στους 70 °C για 10 λεπτά. Ακολουθούν τα εξής στάδια: η προσθήκη 100% αιθανόλης, ανάδευση, η μεταφορά του δείγματος στη στήλη NucleoSpin® Tissue με το σωληνάριο περισυλλογής, φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 1 λεπτό, ξέπλυμα της μεμβράνης με τα κατάλληλα διαλύματα με ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις. Τέλος, η στήλη τοποθετείται σε σωληνάριο eppendorf 1,5ml και προστίθενται 100μl του διαλύματος έκλουσης του DNA, BE, το δείγμα επωάζεται για

1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρείται στα 11.000 g για 1 λεπτό. Ακολουθεί ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του DNA στο δείγμα και διατηρείται στους 4⁰C.

3.6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ DNA & RNA

Οργανολογία:

- Φωτόμετρο Nanodrop 2000

Η φωτομέτρηση για το RNA, όπως και για το DNA γίνεται σε μήκος κύματος 260nm, ενώ για τις πρωτεΐνες στα 280nm. Το Nanodrop υπολογίζει αυτόματα τη συγκέντρωση των DNA και RNA από τη τιμή της οπτικής απορρόφησης (O.D.). Ο λόγος της O.D.260/280nm εκφράζει την καθαρότητα του DNA και RNA. Όταν ο λόγος αυτός είναι 2, τότε το δείγμα θεωρείται καθαρό από άλλες προσμίξεις πρωτεϊνών, φαινολών ή αλκοόλης στο δείγμα, οι οποίες απορροφούν κοντά σε μήκος κύματος 280nm. Ο λόγος της O.D. 230/260 χρησιμοποιείται ως δεύτερο μέτρο καθαρότητας του RNA και δηλώνει το ποσοστό των προσμείξεων του σε οργανικούς διαλύτες και πολυσακχαρίτες.

3.7. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (Reverse Transcription-RT)

Οργανολογία:

- TechGene Thermal Cycle, Techne

Αντιδραστήρια:

- PrimeScript Reverse Transcriptase, Takara Bio
- Recombinant Ribonuclease Inhibitor
- Random Hexamer
- dNTPs
- RNase free dH₂O

Η σύνθεση του cDNA μπορεί να γίνει με τη χρήση διαφόρων ειδών εκκινητών, όπως τυχαία εξαμερή ολιγονουκλεοτίδια (random hexamers primers), oligo-dT και

ειδικούς για το γονίδιο εκκινητές (gene specific primers). Στο συγκεκριμένο πειραματικό μέρος χρησιμοποιήθηκαν τα εξαμερή ολιγονουκλεοτίδια (random hexamers primers) τυχαίας αλληλουχίας [d(N)₆], τα οποία προσδένονται σε τυχαίες συμπληρωματικές θέσεις του RNA για να λειτουργήσουν ως εκκινητές για τη σύνθεση του cDNA από την αντίστροφη μεταγραφάση.

Για την αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA χρησιμοποιήθηκε η αντίστροφη μεταγραφάση PrimeScript Reverse Transcriptase της Takara, η οποία είναι αποτελεσματική για τη σύνθεση cDNA έως 12kb και πλήρους μήκους cDNA, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί σε τεχνικές, όπως PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR). Επιπλέον, η συγκεκριμένη αντίστροφη μεταγραφάση μπορεί να δράσει σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (42 °C), μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο αποικοδόμησης του RNA που προκαλείται σε υψηλότερες θερμοκρασίες.

Στο σύστημα ανάστροφης μεταγραφής μπορεί να εισαχθεί αρχική ποσότητα ολικού mRNA ≤ 1μg. Σε όλες τις αντιδράσεις της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε mRNA συγκέντρωσης 400ng. Αρχικά, σε σωληνάριο 200μl προστίθονται 400ng mRNA, 50pmol τυχαίοι εξαμερές εκκινητές, 1ml dNTPs και απεσταγμένο νερό ελεύθερο από RNA νουκλεάσες (RNasefree dH₂O) έως 10μl. Έπειτα, το δείγμα mRNA υφίσταται αποδιάταξη για 5 λεπτά στους 65⁰C και αμέσως μετά τοποθετήθηκε στον πάγο. Στη συνέχεια ακολούθησε η προσθήκη των παρακάτω αντιδραστηρίων, μέχρι τον τελικό όγκο των 20μl.

Πίνακας 2. Αντιδραστήρια για την αντίστροφη μεταγραφάση.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	Όγκος/αντίδραση (μl)
PrimeScript Buffer	5x	4μl
Recombinant Ribonuclease Inhibitor	20 Units	0,5μl
PrimeScript Reverse Transcriptase	100-200 Units	1μl
RNase free dH₂O		4,5μl

Ακολουθεί επώαση του μίγματος της αντίδρασης για 10 λεπτά στους 30 °C (στο στάδιο αυτό προσδένονται οι εκκινητές στο RNA) στη συνέχεια για μια ώρα στους 42 °C, όπου πραγματοποιείται η σύνθεση του cDNA και τέλος για 15 λεπτά στους 70 °C, όπου στη θερμοκρασία αυτή η αντίστροφη μεταγραφάση καταστρέφεται. Η φύλαξη του cDNA γίνεται στους -20 °C.

3.8. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

Οι εκκινητές είναι μικρές συνθετικές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες, μήκους 17-25 νουκλεοτιδίων, που σχεδιάζονται βάσει της αλληλουχίας της περιοχής που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Οι πιο σημαντικές παραμέτρους που πρέπει να ληφθούν υπόψη για τον σχεδιασμό των εκκινητών είναι:

- **Θερμοκρασία Τήξης (Tm):** είναι η θερμοκρασία κατά την οποία το 50% των μορίων του DNA είναι δίκλιωνα και εξαρτάται κυρίως από τη σύσταση της αλληλουχίας του DNA. Ένας σχετικά ακριβής, εμπειρικός τρόπος υπολογισμού του Tm ενός μορίου DNA είναι αυτός που περιγράφεται από την εξίσωση:

$$T_m \text{ } ^\circ\text{C} = N_1 (\text{AT}) \times 2 + N_2 (\text{GC}) \times 4$$

Όπου: Tm °C, η ζητούμενη θερμοκρασία τήξεως του μορίου σε °C, N1(AT) και N2 (GC) ο αριθμός αδενίνης και θυμίνης και γουανίνης και κυτοσίνης, αντίστοιχα.

- **Συμπληρωματικότητα:** Ο πρόσθιος και ο ανάστροφος εκκινητής πρέπει να είναι κατάλληλα σχεδιασμένοι ώστε να λειτουργούν στις ίδιες συνθήκες. Τα ζεύγη των εκκινητών πρέπει να έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες τήξης και δεν πρέπει να διαφέρουν παραπάνω από 3-5 °C.
- **Σύσταση βάσεων:** επηρεάζει την υβριδοποίηση, τη θερμοκρασία τήξης/πρόσδεσης και τη σταθερότητα. Προτιμάται μέση περιεκτικότητα σε γουανίνη και κυτοσίνη, περίπου 50-60% και απαιτούνται οι ιδανικές θερμοκρασίες τήξης/πρόσδεσης και υβριδοποίησης.

- **Εσωτερικές δομές:** η απόδοση της αντίδρασης PCR μειώνεται δραματικά στις περιπτώσεις που οι εκκινητές υβριδοποιούνται μεταξύ τους και σχηματίζουν δομές φουρκέτας ή ομοδιμερίζονται.

Ο σχεδιασμός και η επιλογή της αλληλουχίας των εκκινητών είναι αρκετά πολύπλοκος και ως εκ τούτου πραγματοποιείται σχεδόν πάντα μέσω υπολογιστικών προγραμμάτων. Το υπολογιστικό εργαλείο που χρησιμοποιήθηκε για το σχεδιασμό των απαραίτητων εκκινητών των συγκεκριμένων πειραματικών διαδικασιών είναι: www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast.

3.8.1. ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ WNT/B-KATENINΗΣ

Στον παρακάτω Πίνακα καταγράφονται τα ζεύγη εκκινητών των γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 3. Τα ζεύγη εκκινητών των υπό μελέτη γονιδίων.

ΓΟΝΙΔΙΟ	Εμπρόσθιος εκκινητής (Forward Prime) 5'-3'	Ανάστροφος εκκινητής (Reverse Primer) 5'-3'	Μέγεθος προϊόντος (bp)
WNT2 (NM_003391.2)	CTCCGAAGTAGTCGGGA ATCTG	GCAGCCACCCCAATCA AAAA	168
WNT3 (NM_030753.4)	GCGTGTAGTGTCCAGG GAG	GTGGTCCAGGATAGTC GTGC	110
WNT5A (NM_001256105.1)	GATGGCTGGAAGTGCAA TGT	TCATACCTAGCGACCA CCAAG	110
FRIZZLED4 (NM_012193.1)	AGCTGCAGTTCTTCCTTT GTTC	TTCAGGACGGGTTCAC AGC	121

3)

FRIZZLED7 (NM_003507. 1)	CCCATCATCTTCCTGTCTG GG	GGTAGCCATCGTCCGA GAAG	112
---------------------------------------	---------------------------	--------------------------	-----

FRIZZLED 6 (NM_003506. 3)	GCGGAGTGAAGGAAGG ATTAGT	GAAGAACTGGGGACCT GCAA	87
--	----------------------------	--------------------------	----

CTNNB1 (NM_0010982 10.1)	TTGTCCCGCAAATCATG CAC	GACCCCTCCACAAATT GCT	136
---------------------------------------	--------------------------	-------------------------	-----

LEF1 (NM_016269. 4)	TATCCAGGCTGGTCTGC AAG	TCTTGGACCTGTACCTG ATGC	93
----------------------------------	--------------------------	---------------------------	----

TCF4 (NM_030756)	CGAGGGTGATGAGAACC TGC	GGTCCTCATCGTCATTA TTGCTAGT	107
----------------------------	--------------------------	-------------------------------	-----

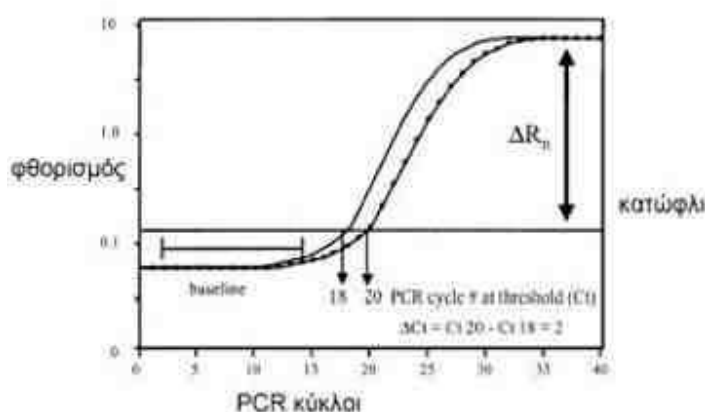
GSK3-B (NM_00114615 6.1)	TACGGGACCCAAATGTC AAACT	GAGGTGGATTACTTGA CAGTTCTTG	90
---------------------------------------	----------------------------	-------------------------------	----

PIK3CA (NM_006218.3) Exon 9	TCTGTAAATCATCTGTGA ATCC	GCACTTACCTGTGACTC C	100
--	----------------------------	------------------------	-----

PIK3CA (NM_006218.3) Exon 20	CTCTGGAATGCCAGAAC TAC	ATGCTGTTTAATTGTGT GGAAG	110
---	--------------------------	----------------------------	-----

3.9. PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL TIME PCR)

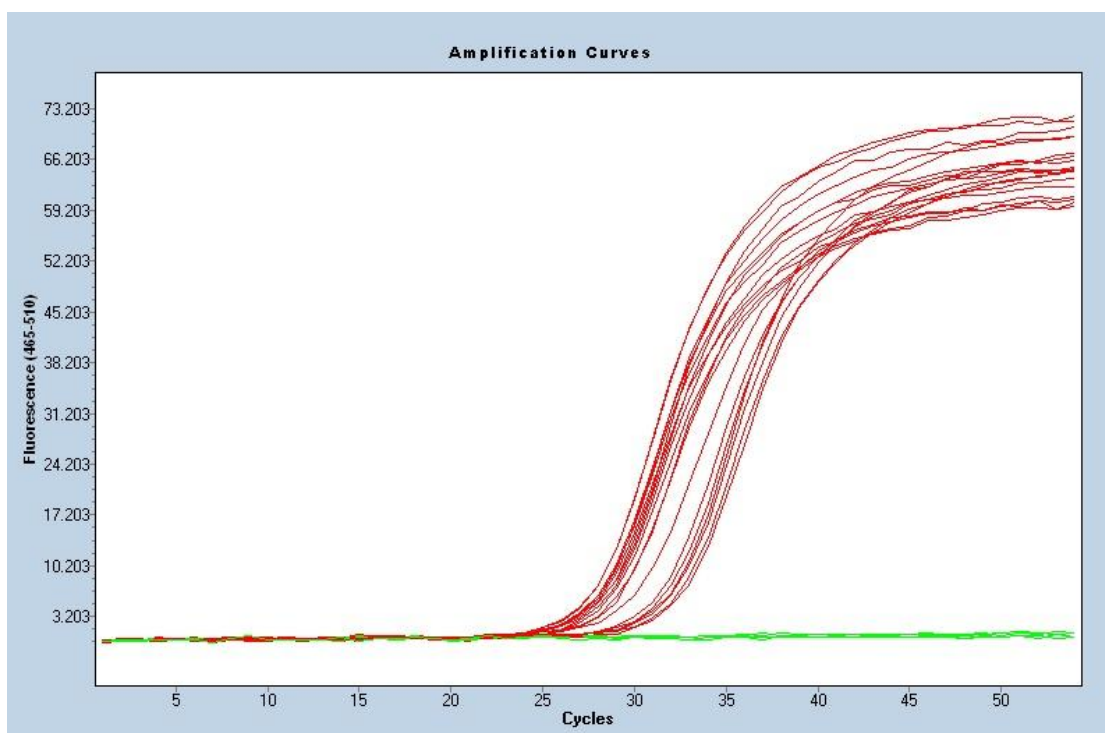
Η PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) είναι μια διαδεδομένη τεχνική που επιτρέπει τη μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων, και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός μορίου-στόχου, σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης PCR. Αν υπάρχουν περισσότερα μόρια-στόχοι στην αρχή, θα χρειαστούν λιγότεροι κύκλοι για να αρχίσει η εκθετική φάση.



Εικόνα 1. Υποθετική γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού σε πειράματα Real Time PCR.

Η γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού είναι η συνάρτηση του φθορισμού σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων. Στον άξονα x παρουσιάζεται ο αριθμός κύκλου της αντίδρασης PCR (cycle), και ο φθορισμός (fluorescence), ο οποίος είναι ανάλογος με την ποσότητα του ενισχυμένου προϊόντος, παρουσιάζεται στον άξονα y. Η καμπύλη ενίσχυσης αποτελείται από τρεις φάσεις, μια εκθετική φάση στην οποία η ποσότητα του PCR προϊόντος διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο, μια γραμμική φάση στην οποία παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου εξαιτίας της μείωσης της ποσότητας των αντιδραστηρίων και μια στατική φάση (πλατώ) κατά την οποία δεν συντίθενται νέα μόρια DNA λόγω της εξάντλησης ενός ή περισσότερων αντιδραστηρίων. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, ένα κατώφλι-σήμα (threshold) φθορίζουσας χρωστικής καθορίζει σε ποιο σημείο τα δείγματα μπορούν να συγκριθούν.

Αυτό το κατώφλι υπολογίζεται ως συνάρτηση του ποσού του υπόβαθρου της φθορίζουσας χρωστικής, και τελικά ο κλασματικός αριθμός των κύκλων PCR που απαιτούνται για να παράγουν αρκετό σήμα φθορίζουσας χρωστικής που θα φθάσει στο κατώφλι-σήμα χαρακτηρίζεται ως κατώφλι κύκλου (Cycle threshold, Ct ή Crossing point, Cp). Οι τιμές Ct εξαρτώνται απόλυτα από το αρχικό ποσό του δείγματος και είναι η βάση για τον υπολογισμό των DNA αντιγράφων, δηλαδή αν υπάρχουν περισσότερα μόρια-στόχοι στην αρχή, θα χρειαστούν λιγότεροι κύκλοι για να αρχίσει η εκθετική φάση και αντίθετα αν υπάρχουν λιγότερα μόρια-στόχοι θα χρειαστούν περισσότεροι κύκλοι. Στην Εικόνα 4 απεικονίζεται η καμπύλη ενίσχυσης προϊόντων της αντίδρασης Real Time PCR.



Εικόνα 2. Παράδειγμα καμπύλη ενίσχυσης προϊόντων της αντίδρασης Real Time PCR για το γονίδιο- στόχος που κωδικοποιεί τη β-κατενίνη. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται τα καρκινικά δείγματα όπου ενισχύθηκε η αλληλουχία-στόχος του γονιδίου της β-κατενίνης. Με πράσινο χρώμα παρουσιάζεται ο αρνητικός μάρτυρας.

Είναι σημαντικό για το σχεδιασμό της Real Time PCR η επιλογή των κατάλληλων φθορίζουσων ουσιών για την ενίσχυση του μορίου-στόχου. Υπάρχει μια ποικιλία φθορίζουσων ουσιών, οι οποίες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο βασικούς τύπους: α) στη χρωστική ουσία που συνδέεται στο DNA (SYBR Green I) β) στους ολιγονουκλεοτιδικούς ιχνηθέτες οι οποίοι υβριδίζονται με μια εσωτερική αλληλουχία του μορίου-στόχου (molecular beacons, TaqMan probes and Eclipse probes). Στο συγκεκριμένο πειραματικό μέρος χρησιμοποιήθηκε η χρωστική ουσία SYBR Green I.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΗΣ REAL TIME PCR

Οργανολογία:

- Cobas z480 Analyzer, Roche
- LightCycler480 System, Roche

Εξοπλισμός:

- Plate 96 θέσεων

Υλικά:

- Maxima SyBR Green qPCR Master Mix:
 - Hotstart Taq DNA πολυμεράση
 - MgCl₂
 - dNTPs
 - UDG (uracil-DNA glycosylase)
 - Χρωστική SyBR Green I
- Εκκινητές
- cDNA
- απεσταγμένο dH₂O

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια για την αντίδραση της Real Time PCR.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	Όγκος/αντίδραση (μl)
Maxima SYBR Green qPCR master mix (2x)	10μl
Απεσταγμένο dH₂O	10,8μl
Εμπρόσθιος εκκινητής	0,4 μl
Ανάστροφος εκκινητής	0,4 μl
Δείγμα cDNA (400ng/μl)	0,5 μl

Στο πειραματικό μέρος για την αντίδραση της Real Time PCR χρησιμοποιήθηκε Maxima SYBR Green qPCR Master Mix, Thermo Fischer Scientific. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 20μl. Συνήθως, για τη σχετική ποσοτικοποίηση το κάθε δείγμα χρησιμοποιείται εις διπλούν (duplicates) και υπολογίζεται ο μέσος όρος των τιμών Ct για κάθε γονίδιο. Στην αντίδραση της Real Time PCR χρησιμοποιείται και ένας αρνητικός μάρτυρας, ο οποίος περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός του DNA προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι δεν έχει γίνει κάποια επιμόλυνση κατά τη διάρκεια προετοιμασίας του πειράματος. Τα δείγματα φορτώνονται σε ένα Plate 96 θέσεων.

Συνθήκες της αντίδρασης: το στάδιο της αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA διαρκεί για 2sec στους 95 °C για έναν κύκλο, ακολουθούν 60 κύκλοι, οι οποίοι περιλαμβάνουν το στάδιο της αποδιάταξης στους 95 °C για 15sec, το στάδιο της σύνδεσης των εκκινητών στους 61 °C για 15sec και το στάδιο της επιμήκυνσης των εκκινητών για 1min στους 72 °C.

3.9.1. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ REAL TIME PCR

Με την τεχνική της Real Time PCR μπορεί να γίνει ο προσδιορισμός της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων με την απόλυτη και την σχετική ποσοτικοποίηση.

ΣΧΕΤΙΚΗ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ

Με την σχετική ποσοτικοποίηση προσδιορίζονται οι αλλαγές στην έκφραση του mRNA ενός γονιδίου που μελετάται σε σχέση με το επίπεδο έκφρασης ενός εσωτερικού γονιδίου αναφοράς. Επομένως, σε αυτή την περίπτωση δε χρειάζεται η κατασκευή πρότυπης καμπύλης με δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων, καθώς όλα τα δείγματα εκφράζονται σαν λόγοι ως προς το γονίδιο αναφοράς. Ως γονίδιο αναφοράς (reference gene) ορίζεται ένα διατηρημένο (housekeeping) γονίδιο, το οποίο εκφράζεται συνεχώς μεταξύ των διαφορετικών κυττάρων και των παθολογικών κυττάρων (πχ. καρκινικών κυττάρων). Ορισμένα ευρέως χρησιμοποιούμενα γονίδια αναφοράς είναι το GADPH, η β-ακτίνη, η β₂μικροσφαιρίνη, 18SrRNA. Στην παρούσα εργασία, ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο PPIa.

Έχουν αναπτυχθεί δύο μαθηματικά μοντέλα, τα οποία χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς. Τα μοντέλα αυτά είναι: α) η μέθοδος του $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak&Schmittgen, 2001) και β) το μαθηματικό μοντέλο του Pfaffl (Pfaffl, 2001). Για την ανάλυση στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Η παραπάνω μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως είναι κατάλληλη για αντιδράσεις με ίδια τιμή απόδοσης (Efficiency, E). Η απόδοση (E) αποτελεί ένα σημαντικό δείκτη αξιοπιστίας και επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Επίσης, πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν και όταν γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων διαφορετικών αντιδράσεων. Ιδανικά, η απόδοση της PCR πρέπει να είναι 100%, πράγμα που σημαίνει ότι για κάθε κύκλο η ποσότητα του προϊόντος διπλασιάζεται (E=2). Στη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C_t}$ θεωρείται ότι η απόδοση ισούται με 2. Οι λόγοι έκφρασης γονιδίου-στόχο ως προς το γονίδιο αναφοράς υπολογίζονται από την εξίσωση:

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{δείγματος}} - \Delta Ct_{\text{βαθμονομητής}}$$

$$\Delta Ct_{\text{δείγματος}} = Ct_{\text{δείγματος, γονιδίου-στόχου}} - Ct_{\text{δείγματος γονιδίου αναφοράς}}$$

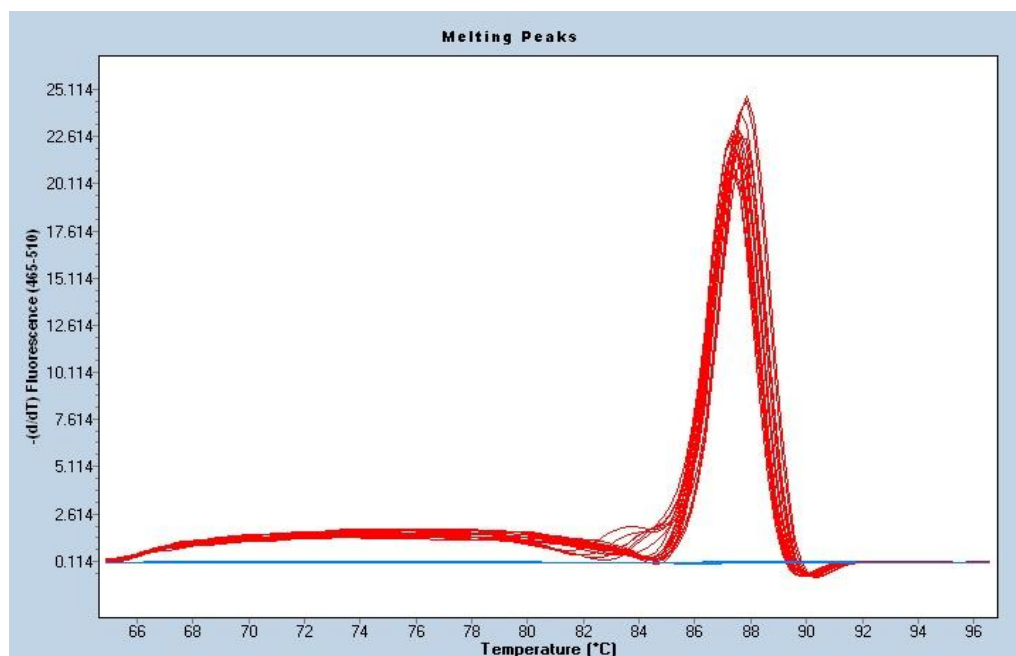
$$\Delta Ct_{\text{βαθμονομητή}} = Ct_{\text{βαθμονομητή, γονιδίου-στόχου}} - Ct_{\text{βαθμονομητή, γονιδίου αναφοράς}}$$

Όπου Fold change είναι οι τιμές πολλαπλασίας μεταβολής. Αυτή η μορφή της εξίσωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να συγκρίνει την έκφραση του γονιδίου σε δύο διαφορετικά δείγματα. Το ένα δείγμα είναι το εξεταζόμενο και στη συγκεκριμένη εργασία είναι καρκινικό και το άλλο δείγμα που ορίζεται ως βαθμονομητής (calibrator) είναι ένα φυσιολογικό δείγμα. Ως βαθμονομητής μπορεί να χρησιμοποιηθεί δείγμα φυσιολογικού ιστού (normal) παρακείμενα του καρκινικού όγκου ή ένα μίγμα δειγμάτων φυσιολογικών ιστών (pool normal) ή ένα μίγμα δειγμάτων αίματος από υγιείς δότες (pool blood).

3.9.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ –ΤΗΞΗΣ (Melt Curve)

Δεδομένου ότι η φθορίζουσα χρωστική SyBR Green I δεσμεύεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο DNA, δεν μπορεί να διακρίνει μεταξύ του πολλαπλασιασμού ενός στόχου DNA και τον πολλαπλασιασμό άσχετων αλληλουχιών ή τον πολλαπλασιασμό διμερών μεταξύ των εκκινητών (primers-dimers). Συνεπώς, οι αλληλουχίες αυτές δε μπορούν να διακριθούν από τον πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας στόχου στις καμπύλες φθορισμού. Για το λόγο αυτό, όταν χρησιμοποιείται η χρωστική SyBR Green I, είναι απαραίτητο να επιβεβαιώνεται ότι η αλληλουχία στόχος είναι αυτή που ενισχύεται. Αυτό μπορεί να γίνει με την ανάλυση καμπύλης τήξης μετά το τέλος του πολλαπλασιασμού, προκειμένου να διακριθούν τα προϊόντα της αντίδρασης και να αναλυθεί η εξειδίκευση της αντίδρασης. Η αρχή της ανάλυσης αυτής είναι ότι η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά από μια χαμηλή τιμή, στην οποία όλες οι αλληλουχίες είναι υβριδοποιημένες, σε υψηλή τιμή, προκαλώντας το διαχωρισμό των αλυσίδων. Καθώς, το DNA αποδιατάσσεται, η χρωστική SyBR

Green I απελευθερώνεται και παρατηρείται μείωση στον φθορισμό. Στην Εικόνα 5 απεικονίζεται η καμπύλη τήξης που αφορά το γονίδιο *CTNNB1*, το οποίο κωδικοποιεί τη β-κατενίνη.



Εικόνα 5. Παράδειγμα καμπύλη τήξεως των προϊόντων της Real Time PCR για το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β-κατενίνη.

3.10. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΤΗΣ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL TIME PCR)

Η δημιουργία της πρότυπης καμπύλης βασίζεται σε διαδοχικές αραιώσεις ενός δείγματος. Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ισομοριακό μίγμα 7 δειγμάτων αίματος από υγιείς δότες (Pool Blood) συγκέντρωσης 400ng/μl για το οποίο δημιουργήθηκαν τρεις διαδοχικές αραιώσεις 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} και 10^{-4} . Η διαδικασία των αραιώσεων έχει ως εξής: σε τρία σωληνάρια erpendorf 0,5ml προστίθονται 45μl απεσταγμένο νερό και στη συνέχεια αφαιρούνται 5μl από το μίγμα PB και μεταφέρονται στο πρώτο σωληνάριο της αραιώσης 10^{-1} . Μετά τη μεταφορά της ποσότητας στο σωληνάριο ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση. Έπειτα από το σωληνάριο της αραιώσης 10^{-1} αφαιρούνται 5μl και μεταφέρονται στο δεύτερο σωληνάριο της αραιώσης 10^{-2} και στη συνέχεια πραγματοποιείται ξανά πολύ καλή ανάδευση. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται για τις αραιώσεις 10^{-3} και 10^{-4} .

Μετά τη δημιουργία των διαδοχικών αραιώσεων ακολουθεί η αντίδραση Real Time PCR ώστε να σχεδιαστεί η πρότυπη καμπύλη και να υπολογιστεί η απόδοση της αντίδρασης PCR.

Ως απόδοση (Efficiency) ορίζεται η ποσότητα του προϊόντος PCR που ενισχύεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και εκφράζεται σε ποσοστό. Το επιθυμητό ποσοστό μιας αντίδρασης PCR πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 90-100%. Σημαντικό κριτήριο για τον προσδιορισμό της απόδοσης είναι η κλίση της πρότυπης καμπύλης (slope). Όταν η κλίση είναι -3,32 τότε η απόδοση της αντίδρασης είναι 100%, αντίθετα όταν είναι μικρότερη από -3,32 τότε η απόδοση θεωρείται χαμηλή. Ο υπολογισμός της απόδοσης βασίζεται στον εξής τύπο:

$$E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$$

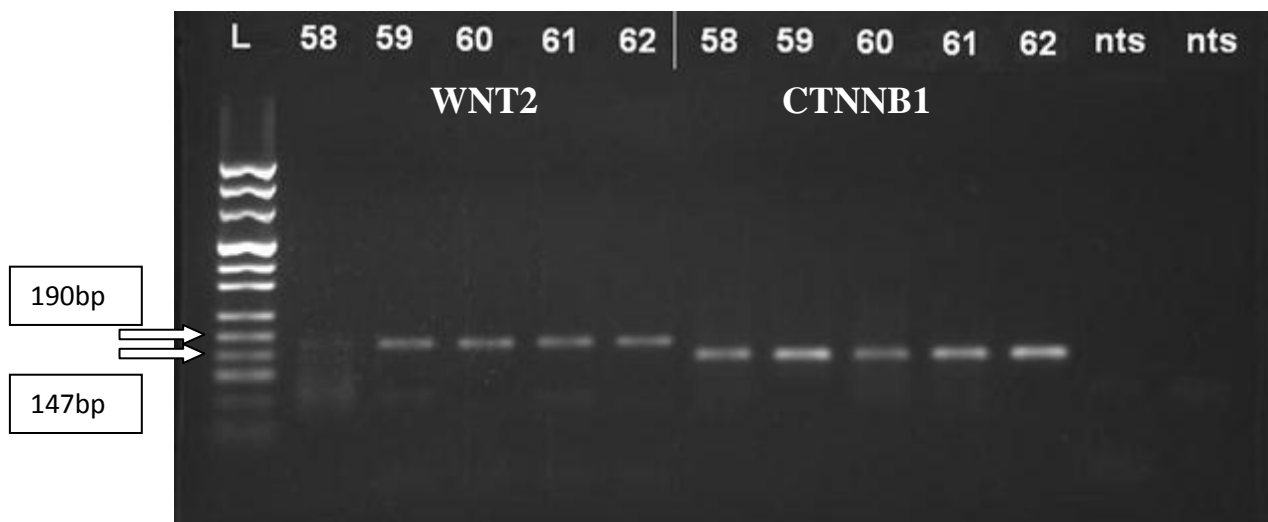
Όπου E είναι η απόδοση της αντίδρασης PCR (Efficiency).

3.11. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΟΡΙΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ (FOLD CHANGE)

Για την ανάλυση των σχετικών επιπέδων mRNA των υπό μελέτη γονιδίων στα δείγματα καρκίνου μαστού, χρειάστηκε να γίνει η σύγκριση με τα φυσιολογικά δείγματα, επομένως έπρεπε να υπολογιστεί μια τιμή-όριο πάνω από το οποίο θεωρείται ότι υπάρχουν αυξημένα επίπεδα mRNA του εξεταζόμενου γονιδίου. Η τιμή αυτή προέκυψε από τον υπολογισμό των τιμών πολλαπλασίας μεταβολής των δειγμάτων φυσιολογικών ιστών παρακείμενα των καρκινικών όγκων ή του μίγματος δειγμάτων αίματος από υγιής δότες. Συγκεκριμένα απομονώθηκε RNA από 10 δείγματα φυσιολογικών ιστών αντίστοιχων των καρκινικών δειγμάτων. Μετά τον υπολογισμό της τιμής πολλαπλασίας μεταβολής (Fold Change) του κάθε δείγματος για κάθε γονίδιο ακολούθησε ο υπολογισμός του μέσου όρου και της τυπικής απόκλισης των τιμών πολλαπλασίας μεταβολής. Στη συνέχεια κατασκευάστηκε ένα μίγμα των φυσιολογικών δειγμάτων. Επιπλέον, ως φυσιολογικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν αίματα από υγιής δότες. Από τα 10 δείγματα αίματος απομονώθηκε RNA και έπειτα 7 από αυτά είχαν συγκέντρωση μεγαλύτερη από 40ng/μl έγιναν ισομοριακά (ίδια συγκέντρωση ~40ng/μl) και κατασκευάστηκε ένα μίγμα από φυσιολογικά δείγματα.

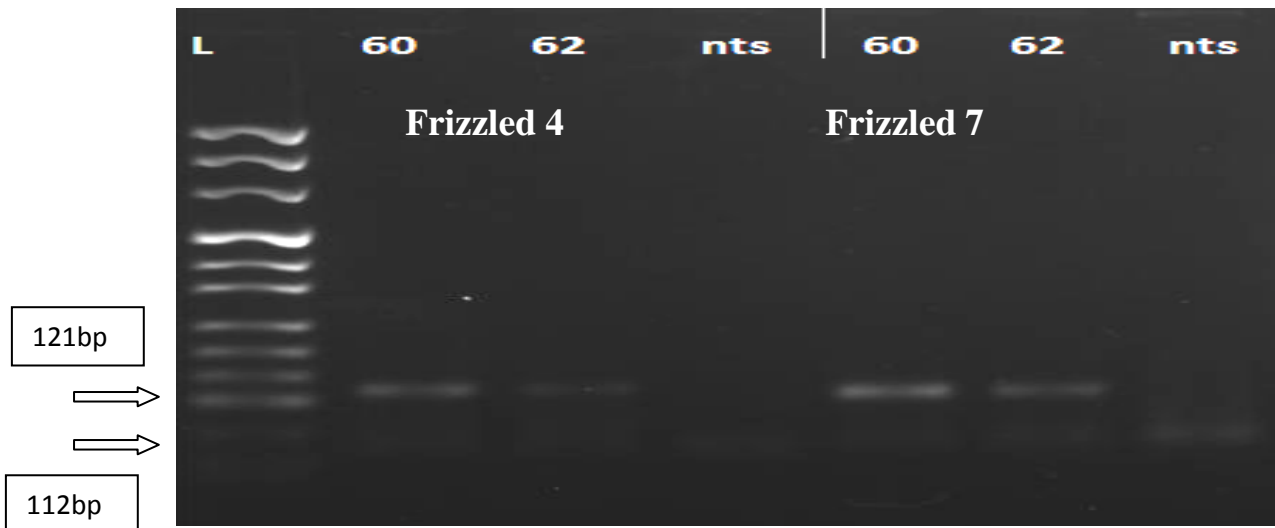
3.12. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών με τις αλληλουχίες-στόχους των υπό μελέτη γονιδίων πραγματοποιήθηκε μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR διαδοχικών θερμοκρασιών (58-62 °C).

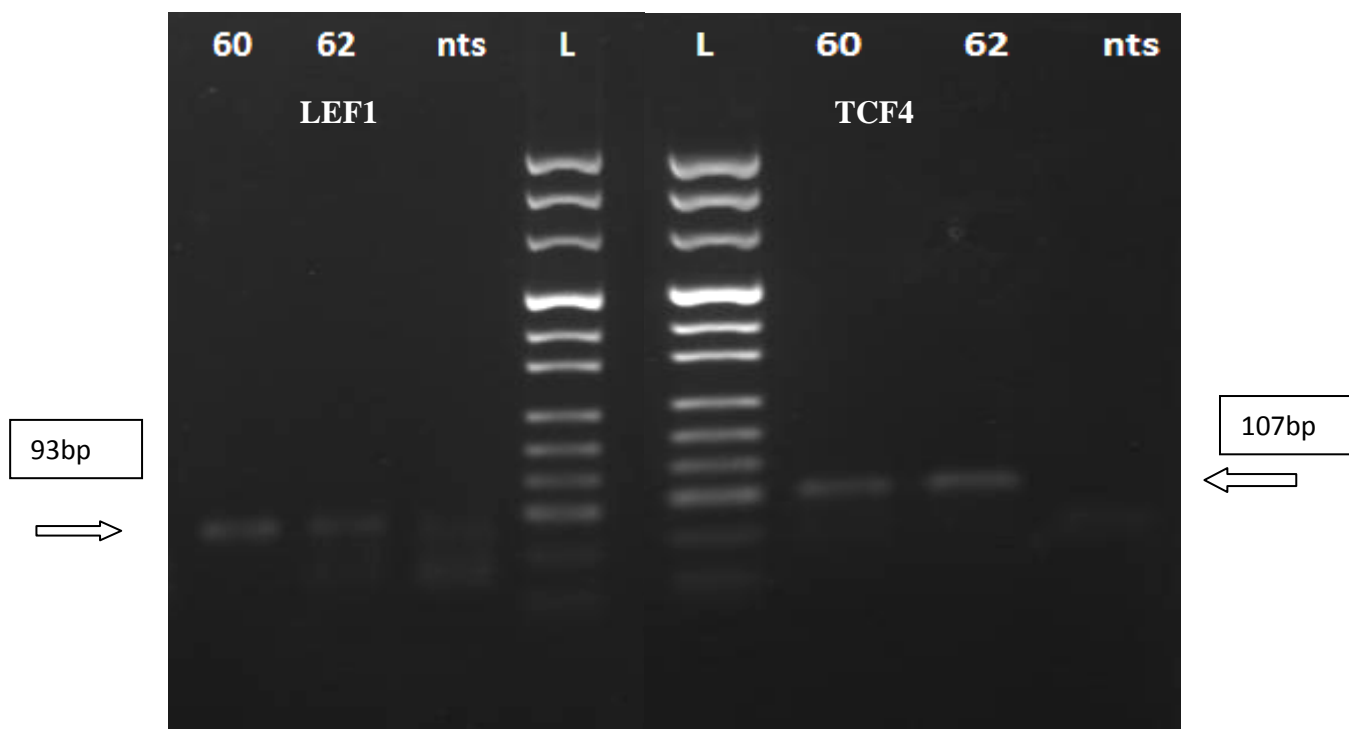


Εικόνα 6. Απεικόνιση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της αντίδρασης PCR για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών υβριδοποίησης των εκκινητών των γονιδίων *CTNNB1* (Στήλες 2-6 και 12, προϊόν PCR 136 ζεύγη βάσεων) και *WNT2* (Στήλες 7-11 και 13, προϊόν PCR 168 ζεύγη βάσεων). Στήλη 1: ο μάρτυρας μοριακού βάρους (L).

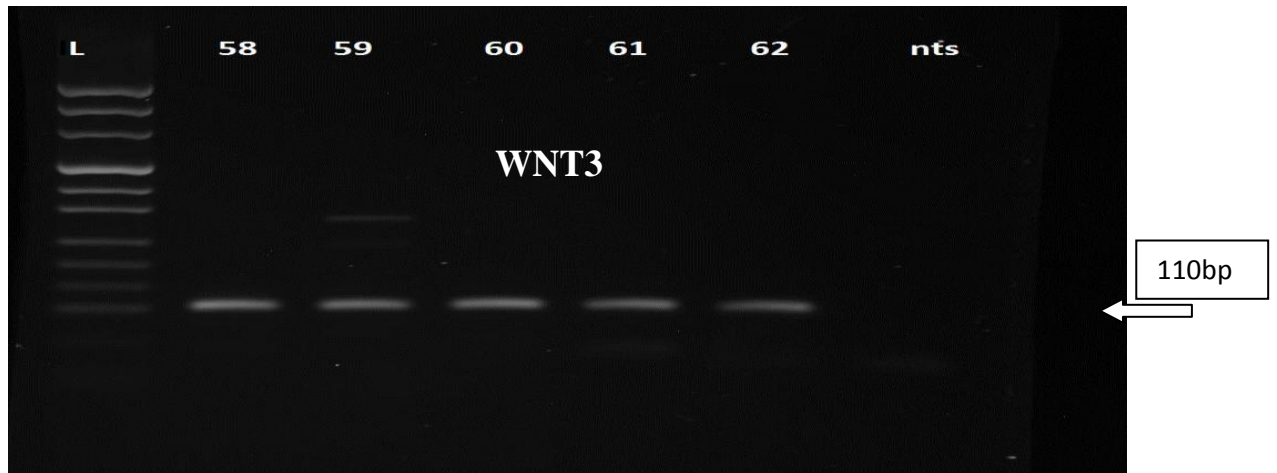
Στην Εικόνα 6 απεικονίζονται τα προϊόντα πολλαπλασιασμού της αντίδρασης PCR, έπειτα από την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%w/v. Παρατηρήθηκε ενίσχυση των αλληλουχιών των υπό μελέτη γονιδίων και στις τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες (58 °C, 59 °C, 60 °C, 61 °C, 62 °C) στις οποίες πραγματοποιήθηκε η αντίδραση PCR. Η θερμοκρασία που επιλέχθηκε για την πρόσδεση των εκκινητών στην συμπληρωματική τους αλληλουχία σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης ήταν οι 61 °C. Η ίδια θερμοκρασία επιβεβαιώθηκε ως κατάλληλη για την ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδίων με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR).



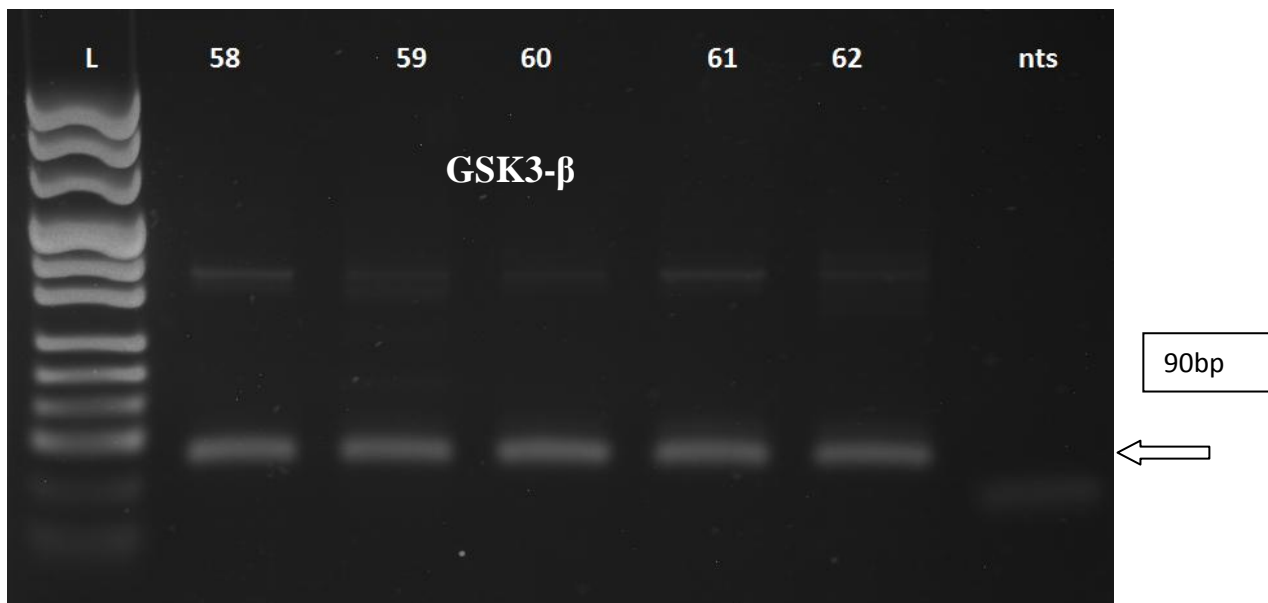
Εικόνα 7. Απεικόνιση σε πήκτωμα αгарόζης των προϊόντων της αντίδρασης PCR για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών υβριδοποίησης των εκκινητών των υποδοχέων Frizzled 4 (Στήλες 2-4, προϊόν PCR 124 ζεύγη βάσεων), Frizzled 7 (Στήλες 5-7, προϊόν PCR 112 ζεύγη βάσεων). Στήλη 1: ο μάρτυρας μοριακού βάρους (L).



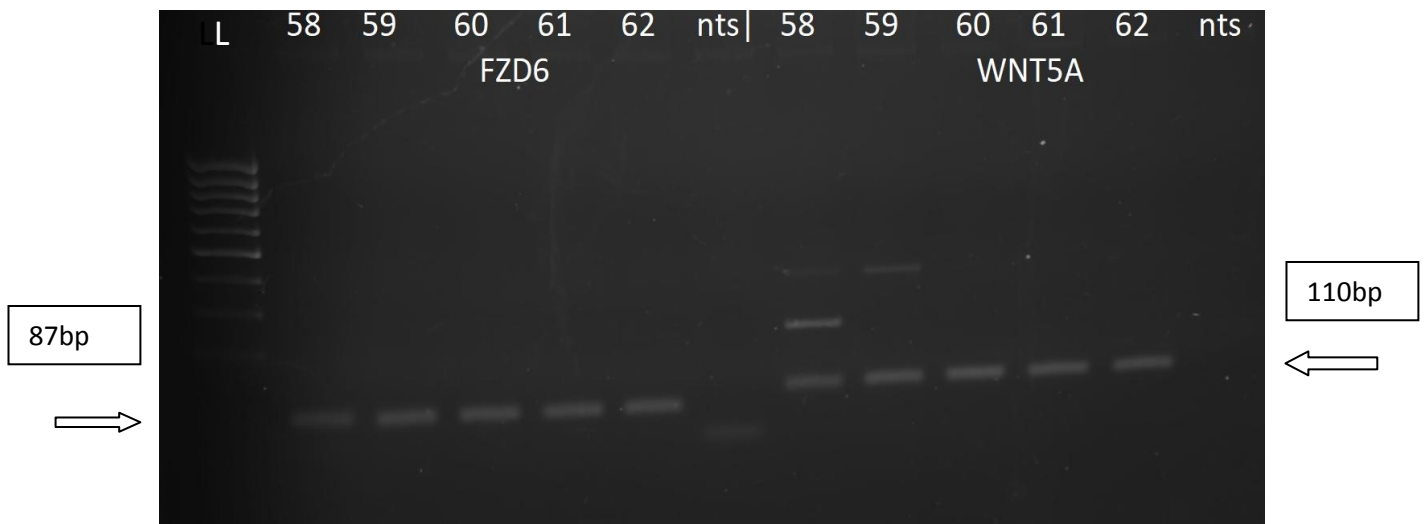
Εικόνα 8. Απεικόνιση σε πήκτωμα αгарόζης των προϊόντων της αντίδρασης PCR για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών υβριδοποίησης των εκκινητών των μεταγραφικών παραγόντων LEF1 (Στήλες 1-3, προϊόν PCR 93 ζεύγη βάσεων) και TCF4 Στήλες 6-8, προϊόν PCR 107 ζεύγη βάσεων). Στήλη 1: ο μάρτυρας μοριακού βάρους (L).



Εικόνα 9. Απεικόνιση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της αντίδρασης PCR για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών υβριδοποίησης των εκκινητών του προσδέτη WNT3 (Στήλες 2-6, προϊόν PCR 110 ζεύγη βάσεων). Στήλη 1: ο μάρτυρας μοριακού βάρους (L).



Εικόνα 10. Απεικόνιση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της αντίδρασης PCR για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών υβριδοποίησης των εκκινητών της κινάσης GSK3-β (Στήλες 2-6, προϊόν PCR 90 ζεύγη βάσεων). Στήλη 1: ο μάρτυρας μοριακού βάρους (L).

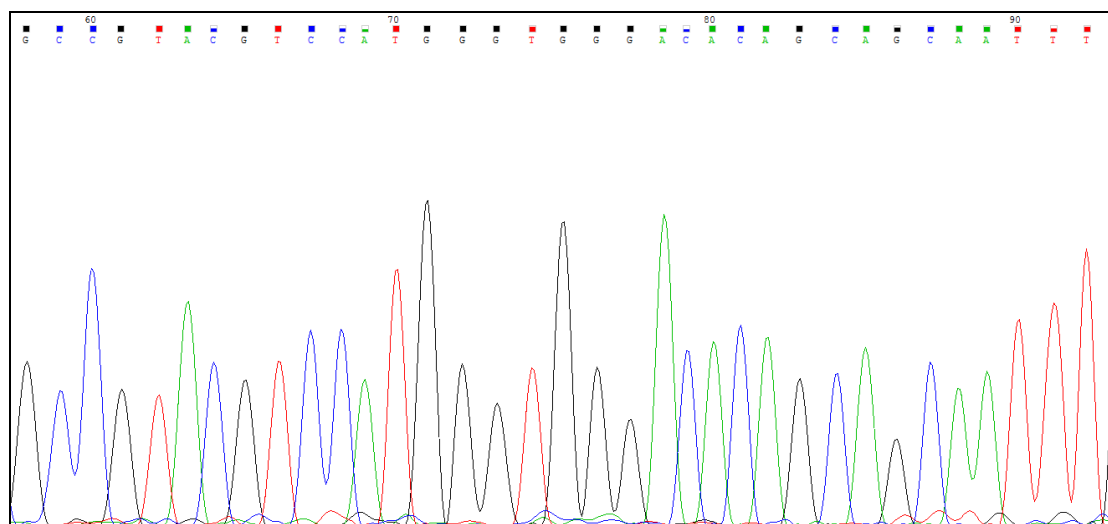


Εικόνα 11. Απεικόνιση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της αντίδρασης PCR για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών υβριδοποίησης των εκκινητών *Frizzled 6* και *WNT5A* (Στήλες 2-7 και στήλες 8-12, αντίστοιχα, προϊόν PCR 87 και 110 ζεύγη βάσεων αντίστοιχα). Στήλη 1: ο μάρτυρας μοριακού βάρους (L).

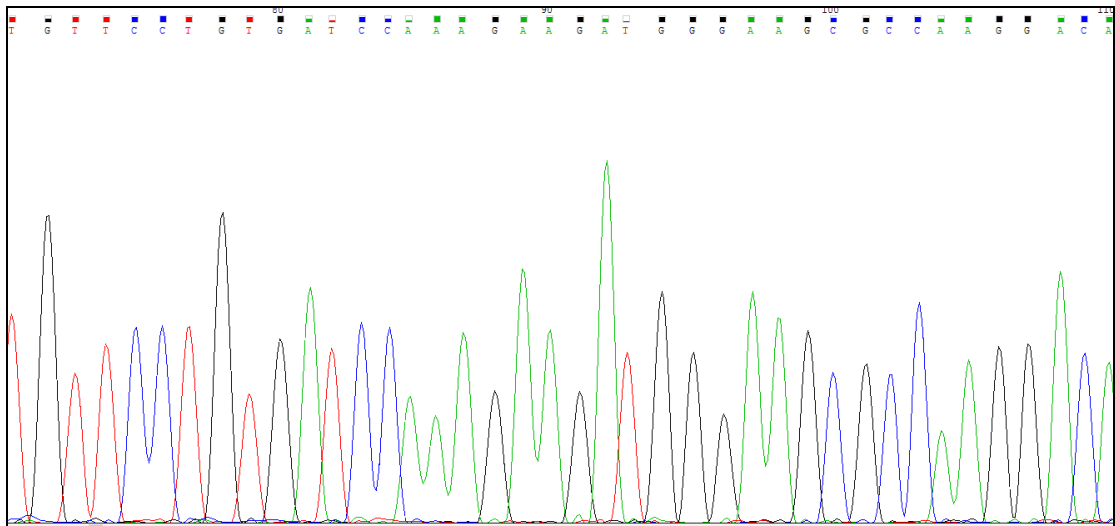
Στις Εικόνες 7 και 8 απεικονίζονται τα προϊόντα πολλαπλασιασμού της αντίδρασης PCR στις θερμοκρασίες 60 °C και 62 °C για τα γονίδια *Frizzled 4*, *Frizzled 7*, *TCF4* και *LEF1* σε πήκτωμα αγαρόζης 2%w/v. Η θερμοκρασία που επιλέχθηκε για την πρόσδεση των εκκινητών στην συμπληρωματική τους αλληλουχία σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης ήταν οι 60 °C. Η θερμοκρασία που επιβεβαιώθηκε ως κατάλληλη για την ενίσχυση των γονιδίων *Frizzled 4*, *Frizzled 7*, *TCF4* και *LEF1* με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) ήταν οι 61 °C. Στις Εικόνες 9, 10 και 11 απεικονίζονται τα προϊόντα πολλαπλασιασμού της αντίδρασης PCR στο εύρος θερμοκρασιών 58 °C έως 62 °C για τα γονίδια *WNT3*, *GSK3-β*, *WNT5A* και *FRIZZLED 6* σε πήκτωμα αγαρόζης 2%w/v. Η θερμοκρασία που επιβεβαιώθηκε ως κατάλληλη για την ενίσχυση των παραπάνω γονιδίων με τη μέθοδο Real Time PCR ήταν 61 °C, εκτός για το γονίδιο *WNT5A* όπου η κατάλληλη θερμοκρασία ήταν 62 °C.

3.13. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΚΑΤΑ SANGER ΓΙΑ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ WNT

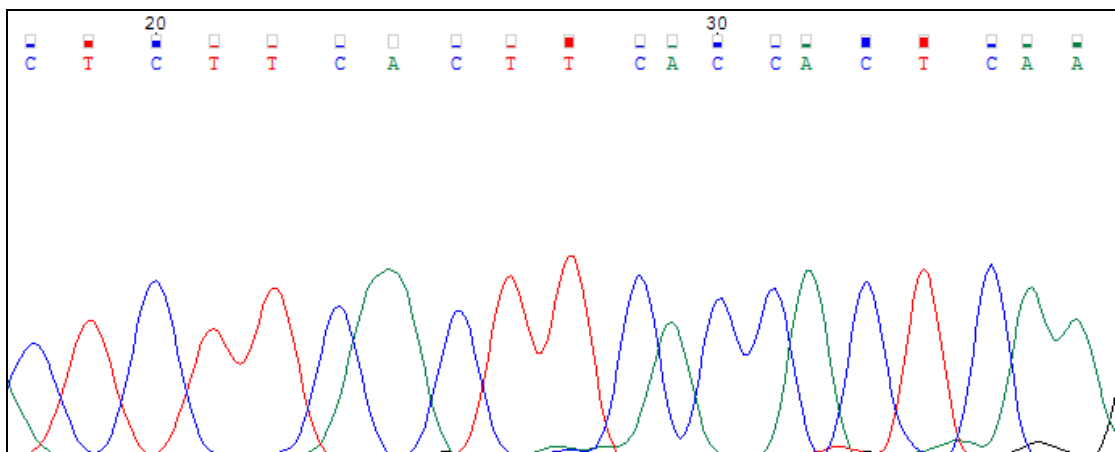
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση κατά Sanger των προϊόντων της αντίδρασης Real Time PCR προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ενίσχυση του ειδικού προϊόντος των γονιδίων. Παρακάτω απεικονίζονται τα αποτελέσματα για ορισμένα υπό μελέτη γονίδια με τη μορφή χρωματογραφήματος, όπως φαίνεται στις Εικόνες 12-15. Μετά την επιβεβαίωση της επιθυμητής αλληλουχίας ακολούθησε ο υπολογισμός της απόδοσης της αντίδρασης PCR.



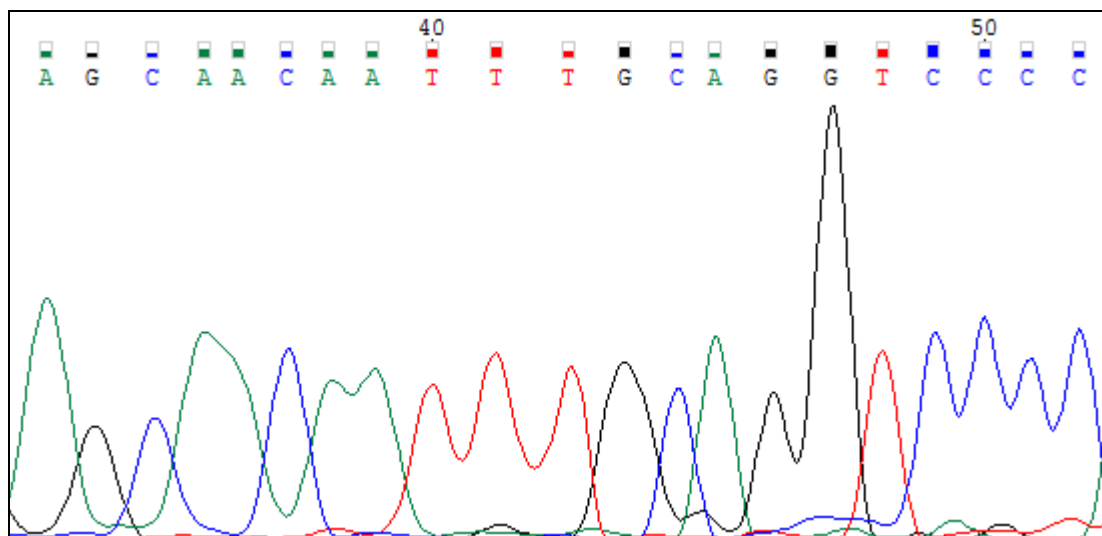
Εικόνα 12. Το αποτέλεσμα της αλληλούχισης κατά Sanger του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου *CTNNB1*. Τα χρώματα αναπαριστούν τις τέσσερις βάσεις του DNA όπου το μπλε χρώμα αντιστοιχεί στην κυτοσίνη (C), το πράσινο στην αδενίνη (A), το μαύρο στη γουανίνη (G) ενώ το κόκκινο στη θυμίνη (T).



Εικόνα 13. Το αποτέλεσμα της αλληλούχισης κατά Sanger του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου *WNT2*.



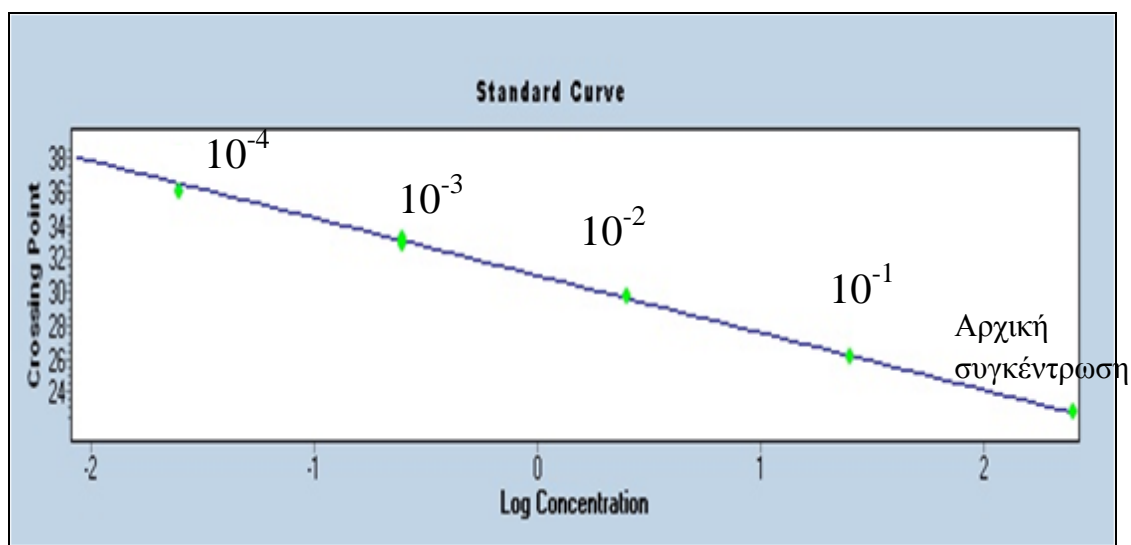
Εικόνα 14. Το αποτέλεσμα της αλληλούχισης κατά Sanger του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου *GSK3-B*.



Εικόνα 15. Το αποτέλεσμα της αλληλούχησης κατά Sanger του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου *FRIZZLED 6*.

3.14. ΑΠΟΛΟΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ REAL TIME PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ mRNA ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *CTNNB1*

Η απόδοση της αντίδρασης Real Time PCR του mRNA του γονιδίου *CTNNB1* υπολογίστηκε με τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης από διαδοχικές αραιώσεις του δείγματος θετικού ελέγχου (PB), όπως αναφέρθηκε στην ενότητα (3.8). Οι διαδοχικές αραιώσεις αναλύθηκαν με την αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR). Το αποτέλεσμα της ανάλυσης παρουσιάζεται στην Εικόνα 16.



Εικόνα 16. Πρότυπη καμπύλη διαδοχικών αραιώσεων για το γονίδιο *CTNNB1*.

Η απόδοση (Efficiency) υπολογίστηκε 1,964 και η κλίση πρότυπης καμπύλης υπολογίστηκε -3,411. Μετά τη βελτιστοποίηση των συνθηκών ακολούθησε η επεξεργασία δειγμάτων με την αντίδραση Real Time PCR.

3.15. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΜΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ WESTERN

Η μέθοδος ανοσοαποτύπωμα κατά Western (Western Blot) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση, τη ταυτοποίηση, ακόμα και για την ποσοτική εκπροσώπηση των πρωτεϊνών μετά το διαχωρισμό τους με ηλεκτροφόρηση κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήκτωμα σε μεμβράνη PVDF και ανιχνεύονται με μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα.

3.15.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΦΡΕΣΚΟ ΙΣΤΟ

Οργανολογία

- Λαβίδα
- Νυστέρι
- Ζυγός
- Φυγόκεντρος
- Μηχάνημα ομογενοποίησης Minilys®, Bertin Instruments

Υλικά

- 100x protease inhibitors cocktail (Sigma-Aldrich)
- Lysis buffer (pH=7,5, 100ml) 25 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 200 μ M Na₃VO₄

Αρχικά, κόβεται ένα κομμάτι ιστού βάρους περίπου 30mg, τοποθετείται σε σωληνάριο eppendorf των 1,5ml και ακολουθεί ψύξη του ιστού σε υγρό άζωτο N₂. Έπειτα, ακολουθεί ομογενοποίηση προσθέτοντας στο δείγμα 300μl RIPA Buffer 1x και 3μl Αναστολέα πρωτεασών. Το μίγμα αφήνεται για επώαση στον πάγο για 30 λεπτά. Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14.000g για 20 λεπτά στους 4 °C. Τέλος, απομακρύνεται το υπερκείμενο κυτταρικού εκχυλίσματος από το ίζημα και φυλάσσεται στους -20 °C.

3.15.2. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Υλικά

- Micro BCA™ Protein Assay Kit
- Ειδική πλάκα 96, θέσεων (Microplate, 96 well)

Αρχικά, παρασκευάζονται τα πρότυπα διαλύματα BSA με εύρος συγκέντρωσης 2,5μg/ml-200μg/ml. Στη συνέχεια, παρασκευάζονται τα διαλύματα των πρωτεϊνών σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Micro BCA™ Protein Assay Kit σε μία ειδική πλάκα 96 θέσεων. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 2 ώρες. Τέλος, ακολουθεί η φωτομέτρηση των πρωτεϊνών στα 592 nm.

3.15.3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS-PAGE

Οργανολογία

- Συσκευή κατακόρυφης ηλεκτροφόρησης (Bio Rad) και τροφοδοτικό σταθερής έντασης
- Τζαμάκια
- χτενάκι

Υλικά

- 30% ακρυλαμίδιο
- 1.5 M Tris-HCl pH 8.8
- 0.5 M Tris-HCl pH 6.8
- 10% (w/v) SDS
- TEMED
- 10% (w/v) APS
- 5 x Loading buffer (100% γλυκερόλη, 10% SDS, 0,5M Tris με 0,1% βρωμοφαινόλη και Urea)
- 5 x Running buffer (για δημιουργία 1L: Glycine 144gr, Tris 30gr, SDS 5gr, dH₂O 800ml)
- dH₂O

- Μάρτυρας με γνωστό μοριακό βάρος: Color Prestained Protein Ladder 11-245 kDa, New England BioLabs Inc
- Βουτανόλη

Αρχικά, αφού στηθεί η συσκευή ηλεκτροφόρησης, παρασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού (Resolving Gel 12%) και μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Έπειτα, προστίθεται βουτανόλη και το πήκτωμα διαχωρισμού αφήνεται να πολυμεριστεί για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, η βουτανόλη αφαιρείται και παρασκευάζεται στο πήκτωμα επιστοίβασης (Stacking Gel 5%) όπου τοποθετείται πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού. Έπειτα τοποθετείται με προσοχή το χτενάκι προκειμένου να σχηματιστούν τα πηγαδάκια. Στο διάστημα αναμονής του πολυμερισμού του πηκτώματος επιστοίβαξης ετοιμάζονται τα δείγματα (20μg πρωτεΐνη + 8μl Loading Buffer + 2μl DTT). Έπειτα, τα δείγματα τοποθετούνται αμέσως στο υδατόλουτρο στους 95 °C για 5 λεπτά. Αφού πολυμεριστεί το πήκτωμα διαχωρισμού, αφαιρείται το χτενάκι και καθαρίζονται τα πηγαδάκια με τη βοήθεια μια σύριγγας, ρίχνοντας το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης Running Buffer 1x. Στη συνέχεια, φορτώνονται τα δείγματα πρωτεϊνών και ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους και προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης Running Buffer 1x. Τέλος, το τροφοδοτικό συνεχούς ρεύματος εφαρμόζεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και ρυθμίζεται στα 100V μέχρι το τέλος της ηλεκτροφόρησης.

3.15.4. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΜΑ ΚΑΤΑ WESTERN

Οργανολογία

- Συσκευή και κασέτα μεταφοράς

Υλικά

- Μembrάνη PVDF : Porablot PVDF, Polyvinylidene difluoride membrane, Macherey Nagel
- Σφουγγαράκια
- Μεθανόλη
- 10x Transfer buffer : 800ml Running Buffer 10x χωρίς SDS & 200ml μεθανόλη
- Διηθητικό χαρτί Whatmann

- TBS 1x: 1,2g Tris Base, 8,4g NaCl
- TBS-Tween 1% (σε 50 mL TBS προσθέτω 25μL Tween-20)
- TBS-Tween 1% άπαχο γάλα σε σκόνη: 50ml TBS-T%, 2,5gr άπαχο γάλα σε σκόνη
- Luminata™ Forte Western HRP Substrate, Millipore

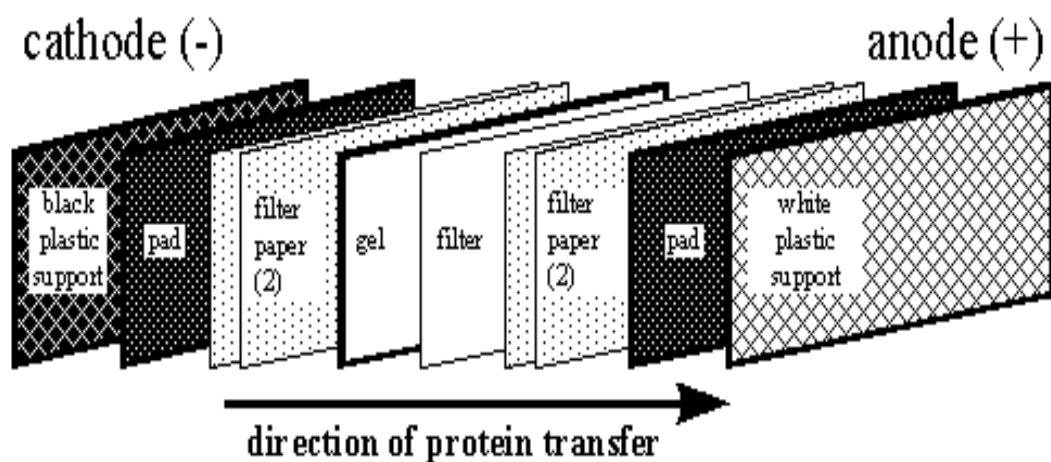
Πρωτογενή Αντισώματα:

- GSK3- sc-7291, Santa Cruz Biotechnology, Inc.
- B- Actin (c4) HRP sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Δευτερογενές Αντίσωμα:

Goat Anti-Mouse IgG (H+L)(peroxidase/HRP conjugated), Elabscience®

Η μεμβράνη PVDF για να γίνει υδρόφιλη, εμβαπτίζεται πρώτα σε μεθανόλη για 30 λεπτά, μετά σε ddH₂O και τέλος στο ρυθμιστικό διάλυμα Transfer Buffer 10x. Επίσης, εμβαπτίζονται τα σφουγγαράκια, τα διηθητικά χαρτιά Whatmann στο διάλυμα Transfer Buffer. Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών το gel και η μεμβράνη τοποθετούνται στην κασέτα μαζί με ειδικά σφουγγαράκια και απορροφητικά χαρτιά ως εξής:



Στη συνέχεια η κασέτα τοποθετείται στη συσκευή για να γίνει η μεταφορά των πρωτεϊνών από το gel στην μεμβράνη, όπου προσθέτουμε το διάλυμα Transfer Buffer 10x. Η διάρκεια της μεταφοράς είναι 1 ώρα στα 150V. Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη ακολουθούν μία πλύση με TBS 1x για 5 λεπτά και στη συνέχεια η μεμβράνη εμβαπτίζεται στο διάλυμα TBS-T 1% άπαχο γάλα σε σκόνη για 1 ώρα. Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαζεται με το πρωτογενές αντίσωμα για 16-18 ώρες στους 4 °C. Έπειτα, ακολουθούν 3 πλύσεις σε TBS-Tween 0,1% για 5 λεπτά και επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα. Τέλος, ακολουθεί ξέπλυμα της μεμβράνης με TBS-Tween 0,1%, δύο φορές για 5 λεπτά αντίστοιχα και μία πλύση με TBS 1x για 10 λεπτά. Ακολουθεί, η επώαση της μεμβράνης με το εμφανιστικό διάλυμα Luminata και γίνεται η εμφάνιση της μεμβράνης.

3.16. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

Για την ανοσοϊστοχημική ανάλυση ελήφθησαν τομές παραφίνης πάχους 4μm από 33 ιστούς εγκλεισμένους σε κύβο παραφίνης. Οι τομές τοποθετήθηκαν σε θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρες πλάκες και επώαστηκαν σε κλίβανο. Εφαρμόστηκε η ανοσοϊστοχημική μέθοδος στρεπταβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης LSAB2 της DAKO/Agilent. Το εφαρμοσμένο αντίσωμα ήταν beta-catenin sc-7963, Santa Cruz Biotechnology, Inc, σε αραιώση 1:50.

Επιγραμματικά τα βασικά στάδια της ανοσοϊστοχημείας είναι:

- 1) Αποπαραφίνωση με βάση το πρωτόκολλο της LEICA (Bond Dewax Solution)
- 2) Αντιγονική ανάκτηση (Bond Epitope Retrieval ER2 Solution 20min, 100 °C)
- 3) Καταστολή της ενδογενούς υπεροξειδάσης (Peroxide Block, 5 min)
- 4) Επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα
- 5) Επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα (Post primary mouse Linker, 10 min)
- 6) Επώαση με το πολυμερές αντιδραστήριο συνδεδεμένο με υπεροξειδάση ελεύθερο βιοτίνης (Polymer/HRP, 10 min)
- 7) Επώαση με το χρωμογόνο DAB (Mixed DAB Refine, 10 min)
- 8) Χρώση υποστρώματος με αιματοξυλίνη (Refine Hematoxylin, 5 min)

- 9) Αφυδάτωση με 95% και 100% αιθανόλη
- 10) Στέγνωμα
- 11) Εμβάπτιση σε διάλυμα Ξυλόλη
- 12) Επίστρωση πλακιδίων με καλυπτρίδα και παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο

3.17. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΜΕ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΤΗΞΗΣ ΥΨΗΛΗΣ ΕΥΚΡΙΝΕΙΑΣ (Real Time High Resolution Melting PCR)

Για την ανάλυση μεταλλαγών χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση η KAPA HRM FAST qPCR της KapaBiosystems (Willmington). Το ένζυμο αυτό, είναι μια ειδικά σχεδιασμένη μορφή τη Taq DNA πολυμεράσης όπου ενισχύει το DNA με την παρουσία της φθορίζουσας χρωστικής EvaGreen η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις χωρίς την παρουσία αναστολέων PCR και επιπλέον έχει ισοδύναμη συγγένεια δέσμησης για περιοχές πλούσιες σε GC και AT. Η πολυμεράση είναι βελτιστοποιημένη για την ανάλυση υψηλής ευκρίνειας τήξης τελικού σημείου (HRM endpoint analysis) και για την ανάλυση μεταλλαγών. Στον πίνακα 5 καταγράφονται τα αντιδραστήρια της HRM και στον πίνακα 6 καταγράφονται η αλληλουχία

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια για την αντίδραση της HRM.

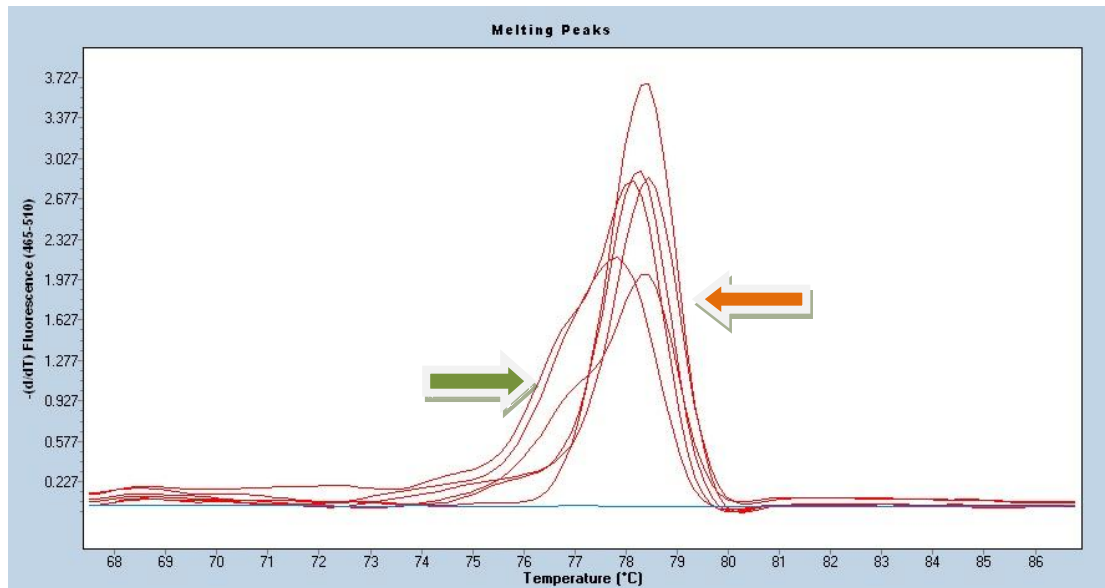
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	Όγκος/αντίδραση (μl)
KAPA HRM FAST Master Mix	10μl
MgCl ₂ 25mM	2 μl
Εμπρόσθιος εκκινητής	0,2 μl
Ανάστροφος εκκινητής	0,2 μl
Δείγμα cDNA (400ng/μl)	20ng
Απεσταγμένο H ₂ O	Έως 10μl τελικού όγκου

Συνθήκες της αντίδρασης: το στάδιο της αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA διαρκεί για 3sec στους 95 °C για έναν κύκλο, ακολουθούν 60 κύκλοι, οι οποίοι περιλαμβάνουν το στάδιο της αποδιάταξης στους 95 °C για 5sec, το στάδιο της σύνδεσης των εκκινητών σε θερμοκρασία κατάλληλη ανά γονίδιο στους 57-63 °C και το στάδιο της επιμήκυνσης των εκκινητών για 1min στους 72 °C.

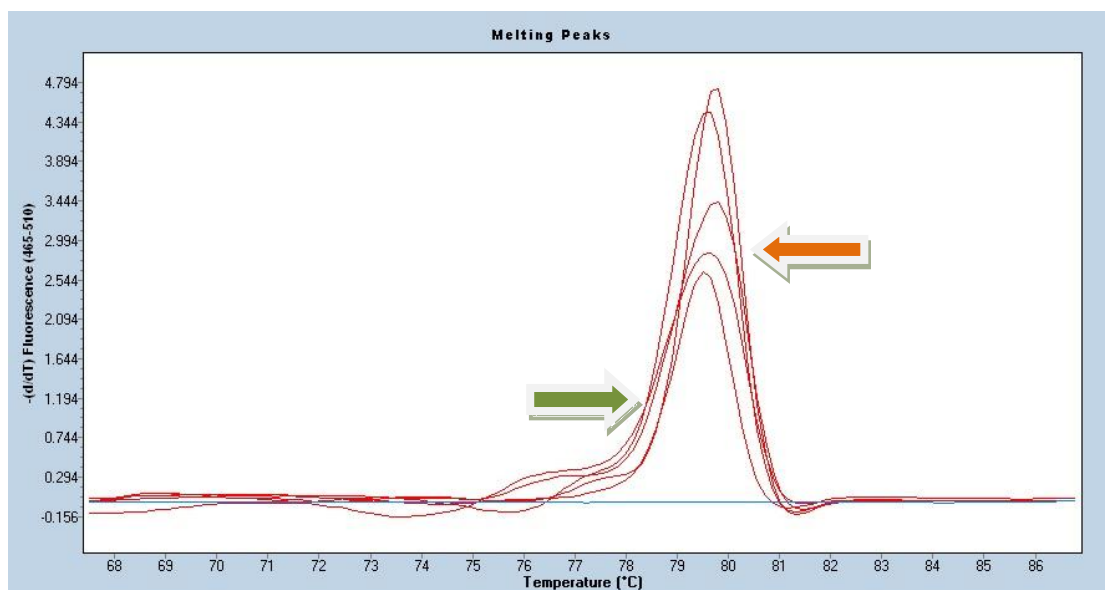
Μετά την ενίσχυση των προϊόντων PCR ακολουθεί η ανάλυση τήξης των προϊόντων με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα λόγω της φθορίζουσας χρωστικής EvaGreen. Από την ανάλυση της καμπύλης τήξης πραγματοποιείται η ανίχνευση μεταλλαγών, πολυμορφισμών και επιγενετικών αλλαγών.

Κατά τη διαδικασία της HRM εκτελείται θέρμανση του ενισχυμένου προϊόντος DNA από 55 °C έως 95 °C. Σε κάποιο σημείο αυτής της διαδικασίας επιτυγχάνεται η θερμοκρασία τήξης του ενισχυμένου προϊόντος και οι δυο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται καθώς το δείγμα θερμαίνεται με αποτέλεσμα η παρουσία δίκλωνων μορίων μειώνεται, επομένως μειώνεται και ο φθορισμός . Η μείωση αυτή ανιχνεύεται από ειδικούς αισθητήρες του μηχανήματος LightCycler. Στη συνέχεια καταγράφονται τα δεδομένα με τη μορφή της ειδικής καμπύλης αναφοράς της τήξης δείχνοντας τα επίπεδα φθορισμού ως προς την θερμοκρασία.

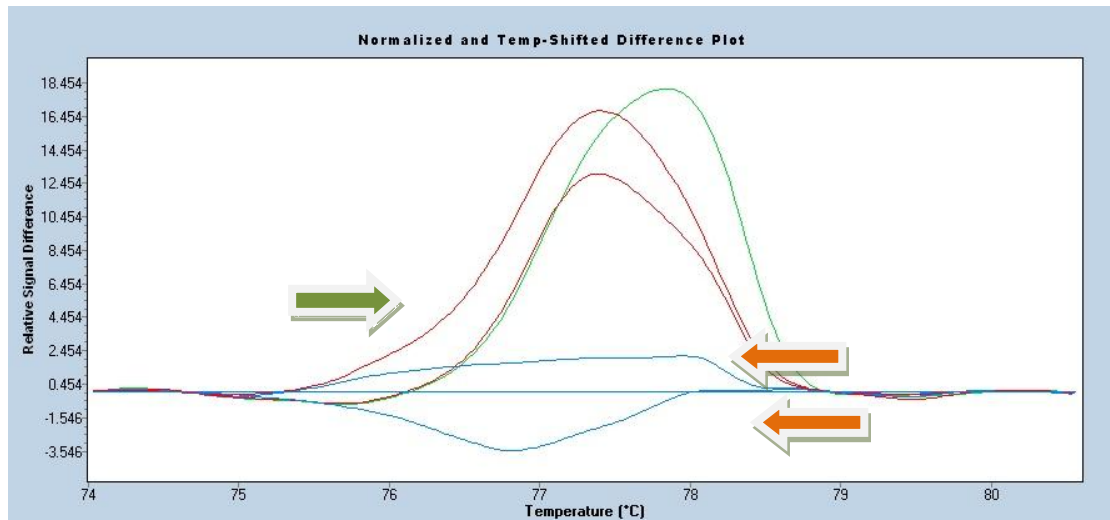
Σε κάθε αντίδραση HRM χρησιμοποιούνται δείγματα αναφοράς, δηλαδή ένα δείγμα που είναι θετικός μάρτυρας με γνωστή μεταλλαγή στο γονίδιο που μελετάται και ένας αρνητικός μάρτυρας, δηλαδή δείγμα το οποίο δεν φέρει μεταλλαγή έτσι ώστε να γίνεται καλύτερη η διάκριση των δειγμάτων που εξετάζονται. Από την ανάλυση της καμπύλης τήξης (Εικόνες 17 & 18) του υπό εξέταση δείγματος γίνεται η σύγκριση για την παρουσία ή απουσία μεταλλαγής με αυτές των δειγμάτων αναφοράς. Με αυτό τον τρόπο διαπιστώνεται με τη βοήθεια του λογισμικού ανάλυσης και ανίχνευσης μεταλλαγών (Gene Scanning Analysis Software) αν υπάρχει αλλαγή στην καμπύλη και στην θερμοκρασία τήξης του προϊόντος. Επιπλέον με την γραφική απεικόνιση διαφοράς ως προς τη θερμοκρασία τήξης (Difference plot) απεικονίζεται η διαφορά του δείγματος ως προς τα δείγματα αναφοράς (Εικόνες 19 & 20). Τέλος, στην περίπτωση που κάποιο δείγματα υπό εξέταση θεωρηθεί θετικό για μεταλλαγή ακολουθεί η επιβεβαίωση με τεχνικές αλληλούχισης DNA όπως αλληλούχιση κατά Sanger.



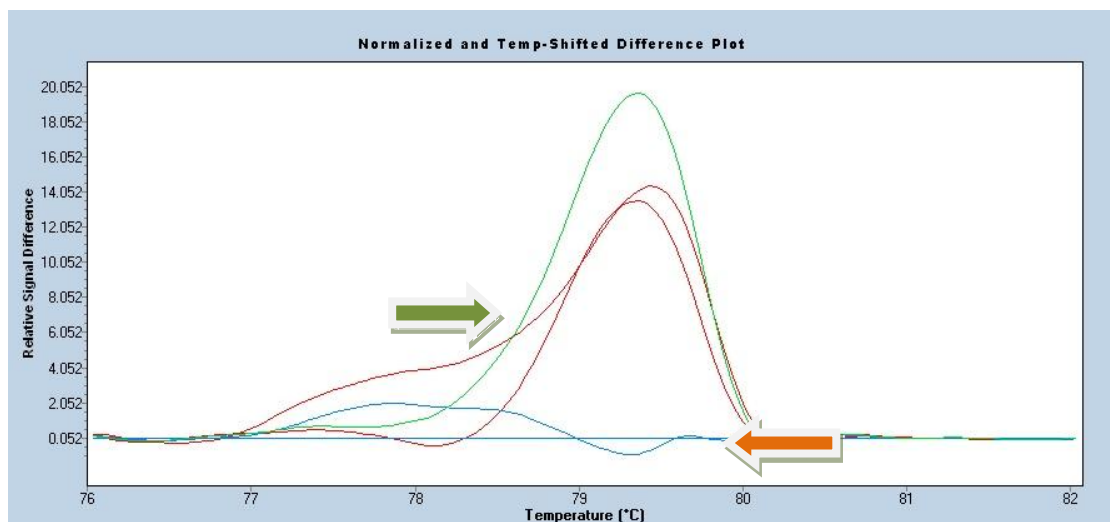
Εικόνα 17. Ανάλυση καμπύλης τήξης για μεταλλαγές στο εξώνιο 9 του γονίδιου *PIK3CA*. Με πράσινα βέλη απεικονίζονται τα μεταλλαγμένα δείγματα και με πορτοκαλί βέλη απεικονίζονται τα φυσιολογικά.



Εικόνα 18. Ανάλυση καμπύλης τήξης για μεταλλαγές στο εξώνιο 20 του γονίδιου *PIK3CA*. Με πράσινα βέλη απεικονίζονται τα μεταλλαγμένα δείγματα και με πορτοκαλί βέλη απεικονίζονται τα φυσιολογικά.



Εικόνα 19. Ανάλυση καμπύλης τήξης για μεταλλαγές στο εξόνιο 9 του γονίδιου *PIK3CA*. Με πράσινα βέλη απεικονίζονται τα μεταλλαγμένα δείγματα και με πορτοκαλί βέλη απεικονίζονται τα φυσιολογικά.



Εικόνα 20. Ανάλυση καμπύλης τήξης για μεταλλαγές στο εξόνιο 20 του γονίδιου *PIK3CA*. Με πράσινα βέλη απεικονίζονται τα μεταλλαγμένα δείγματα και με πορτοκαλί βέλη απεικονίζονται τα φυσιολογικά.

3.18. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ REAL TIME PCR

Η επιβεβαίωση ενίσχυσης του ειδικού προϊόντος των υπό μελέτη γονιδίων πραγματοποιείται με την αυτοματοποιημένη αλληλούχιση κατά Sanger. Μετά την αντίδραση της Real Time PCR πρέπει να γίνει καθαρισμός των προϊόντων ώστε να απομακρυνθούν παραπροϊόντα της αντίδρασης, όπως περίσσεια εκκινητών και dNTPs.

Αρχικά, σε ένα σωληνάριο eppendorf των 0,5ml προστίθονται 20μl της αντίδρασης Real Time PCR και 20μl Binding Buffer (αναλογία όγκου αντίδρασης και binding buffer 1:1) και έπειτα ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση με vortex μέχρι το μίγμα να γίνει κίτρινο. Επειδή τα τμήματα cDNA έχουν μέγεθος μικρότερο από 500 ζεύγη βάσεων προστίθονται 100μl ισοπροπανόλης και το μίγμα αναδεύεται με vortex. Έπειτα, το μίγμα μεταφέρεται στις ειδικές στήλες καθαρισμού και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 30-60sec, όπου στη συνέχεια το διάλυμα που συλλέγεται στο σωληνάριο της στήλης απορρίπτεται. Ύστερα, ακολουθεί η προσθήκη 700μl Wash Buffer και φυγοκέντρηση για 30-60sec. Το διάλυμα που εκλούεται στο σωληνάριο της στήλης απορρίπτεται και πραγματοποιείται μια δεύτερη φυγοκέντρηση για 1min. Η στήλη καθαρισμού μεταφέρεται σε ένα σωληνάριο eppendorf των 1,5ml και προστίθονται 25μl Elution Buffer, το οποίο προηγουμένως έχει θερμανθεί στους 65 °C. Το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και έπειτα φυγοκεντρείται για 1 min. Η στήλη καθαρισμού απορρίπτεται και το δείγμα διατηρείται στους -20 °C.

3.19. ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΚΑΤΑ SANGER

Για την αλληλούχιση ενός τμήματος DNA πραγματοποιείται μια σύνθετη αντίδραση τερματισμού. Η αντίδραση γίνεται παρουσία των τεσσάρων κανονικών τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) σε σχετικά μεγάλη συγκέντρωση και τεσσάρων διδεοξυριβονουκλεοτιδίων (ddNTPs) σε μικρότερη συγκέντρωση, τα οποία είναι σημασμένα το καθένα με διαφορετική φθορίζουσα χημική ομάδα στο 3' άκρο τους. Τα ddNTPs, περιέχουν μία ομάδα υδρογόνου επί του 3' άνθρακα αντί της μιας ομάδας υδροξυλίου (OH). Εάν αυτά τα διδεοξυνουκλεοτίδια ενσωματωθούν σε μια αλυσίδα DNA που συντίθεται, εμποδίζουν τη πολυμεράση του DNA να προσθέσει την επόμενη συμπληρωματική βάση. Αυτό συμβαίνει επειδή δεν μπορεί να σχηματιστεί 3'-5' φωσφοδιεστερικός δεσμός μεταξύ του διδεοξυνουκλεοτιδίου και του επόμενου εισερχόμενου νουκλεοτιδίου. Έτσι σχηματίζεται μείγμα προϊόντων τερματισμού που μπορούν να έχουν οποιαδήποτε από τις τέσσερις βάσεις στο 3' άκρο τους. Τα προϊόντα αυτά προκύπτουν από ενσωμάτωση ενός διδεοξυριβονουκλεοτιδίου σε μια τυχαία θέση κατά τη σύνθεση. Οι τέσσερις φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται εκπέμπουν φωτεινή ακτινοβολία σε διαφορετικό μήκος κύματος. Τα προϊόντα της αντίδρασης αφού καθαριστούν, ηλεκτροφορούνται στην ίδια διαδρομή του τριχοειδούς σωληναρίου της συσκευής αυτόματης αλληλούχισης.

Πίνακας 6. Αντιδραστήρια για την αντίδραση αλληλούχισης.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	Όγκος/αντίδραση (μl)
Ready Reaction Mix	0,5μl
BigDye Sequencing Buffer (5X)	1,8 μl
Εκκινητής	0,5 μl
H ₂ O	6,2 μl
PCR product	1 μl

Για την αντίδραση αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκε το BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Science) το οποίο περιέχει τα αντιδραστήρια: BigDye Sequencing Buffer (5X) και το Ready Reaction Mix. Το Ready Reaction Mix είναι ένα αντιδραστήριο που περιέχει πολυμεράση, dNTPs και ddNTPs. Το BigDye Sequencing Buffer περιέχει Tris- HCl, MgCl₂ pH 9. Η επιλογή του εκκινητή που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από το μήκος της αλληλουχίας που θέλουμε να μελετήσουμε, αλλά από την ύπαρξη συστοιχίας επαναλαμβανόμενων βάσεων. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 10μl. Συνθήκες της αντίδρασης: το στάδιο της αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA διαρκεί για 1 min στους 94 °C για έναν κύκλο, ακολουθούν 25 κύκλοι, οι οποίοι περιλαμβάνουν το στάδιο της αποδιάταξης στους 94 °C για 10sec, το στάδιο της σύνδεσης των εκκινητών σε θερμοκρασία κατάλληλη ανά γονίδιο στους 50 °C για 5 sec και το στάδιο της επιμήκυνσης των εκκινητών για 4 min στους 60 °C.

Μετά τον καθαρισμό του προϊόντος PCR το δείγμα φορτώνεται σε ειδική πλάκα 96 θέσεων προκειμένου να γίνει η ανάγνωση της αλληλουχίας από τη μηχανήμα αυτόματης αλληλούχισης.

3.20. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για τη συσχέτιση της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών (ηλικία, σταδιοποίηση TNM, βαθμός διαφοροποίησης και ιστολογικός τύπος), τον μοριακό υπότυπο του όγκου και το προγνωστικό στάδιο. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι αναλύσεις Pearson's Chi square και Fischer's Exact, ενώ για την συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης μεταξύ των υπό μελέτη γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική στατιστική δοκιμασία Spearman. Οι στατιστικοί υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS v24.0. Στατιστικά σημαντικά θεωρήθηκαν τα αποτελέσματα με p-value <0.05, ενώ για τη στατιστική δοκιμασία Spearman, ισχυρή θεωρήθηκε η συσχέτιση με δείκτη $R \geq 0,6$.

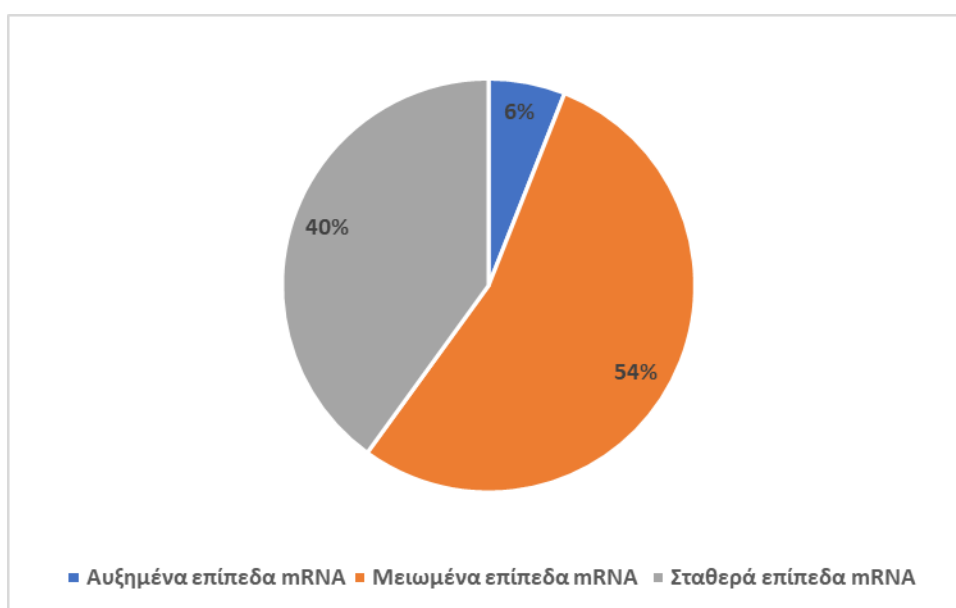
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ WNT

Για τον προσδιορισμό των σχετικών επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων, *WNT2*, *WNT3*, *WNT5A*, *FRIZZLED 4*, *FRIZZLED 7*, *FRIZZLED 6*, *CTNNB1*, *GSK3-β*, *TCF4* και *LEF1* σε σχέση με το ενδογενές γονίδιο *PPIA*, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του $2^{-\Delta\Delta C_t}$ στην οποία υπολογίζεται η τιμή πολλαπλάσιας μεταβολής (Fold Change). Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι η πιο διαδεδομένη καθώς χρησιμοποιείται για αντιδράσεις με ίδια απόδοση (Efficiency, E), η οποία ισούται με 2. Για την ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων της παρούσας εργασίας υπολογίστηκε το όριο της πολλαπλάσιας μεταβολής σύμφωνα με το οποίο μπορεί να πραγματοποιηθεί η σύγκριση των καρκινικών δειγμάτων με τα φυσιολογικά δείγματα ως προς τα επίπεδα έκφρασης του mRNA των μελετώμενων γονιδίων. Η τιμή αυτή προέκυψε από τον υπολογισμό των τιμών πολλαπλάσιας μεταβολής των δειγμάτων φυσιολογικών ιστών παρακείμενα των καρκινικών όγκων.

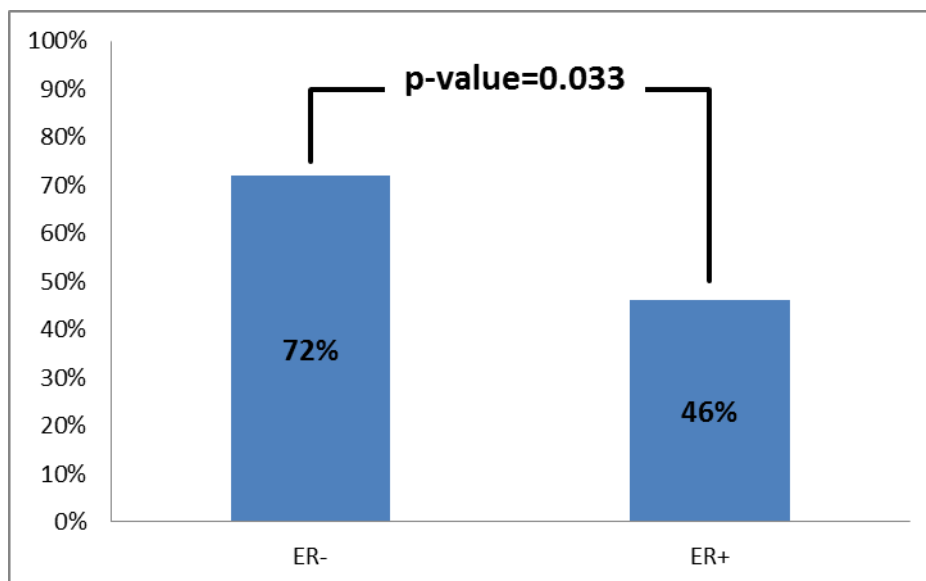
4.1.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ WNT2 ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Από την ανάλυση των σχετικών επιπέδων mRNA του γονιδίου WNT2 παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα mRNA σε 6 από 100 δείγματα καρκίνου μαστού (6%) στα οποία υπήρξε ενίσχυση του προϊόντος cDNA. Σε 40 από 100 δείγματα (40%) δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στα επίπεδα mRNA, ενώ μειωμένα επίπεδα παρατηρήθηκαν σε 54 από τα 100 δείγματα (54%) (Γράφημα 1).



Γράφημα 1. Τα επίπεδα έκφρασης mRNA του γονιδίου WNT2.

Στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των επιπέδων έκφρασης mRNA WNT2 και του υποδοχέα ER ($p=0,033$). Πιο αναλυτικά, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα mRNA του προσδέτη WNT2 με την απουσία του υποδοχέα ER σε 23 από τα 32 δείγματα καρκίνου μαστού (72%), και σε 31/68 με παρουσία του υποδοχέα (46%) (Γράφημα 2). Τέλος δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα υπόλοιπα κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα των ασθενών.



Γράφημα 2. Συσχέτιση των μειωμένων επιπέδων mRNA γονιδίου *WNT2* σε σχέση με την έκφραση του υποδοχέα ER.

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *WNT2* ύστερα από τη συσχέτιση τους με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά.

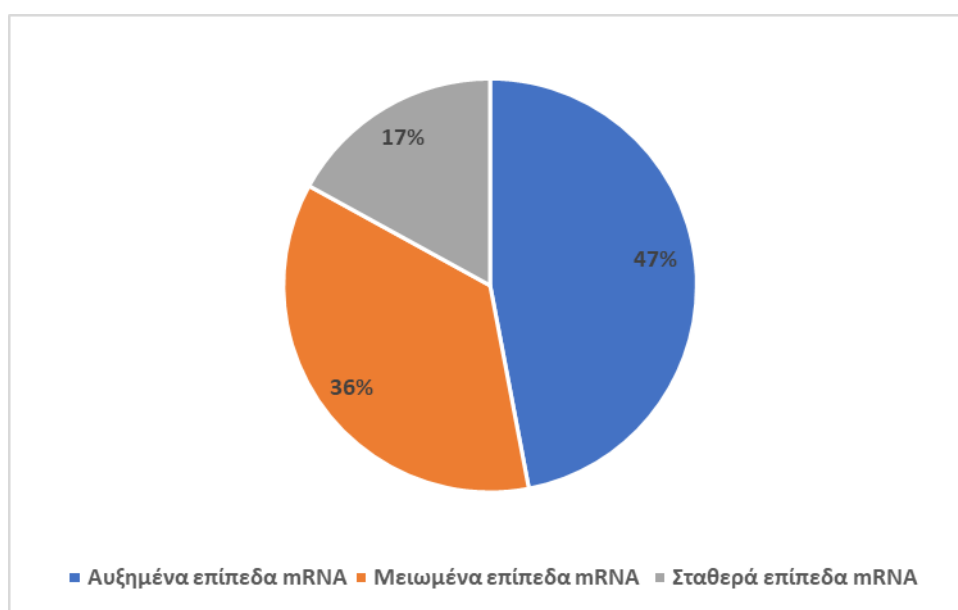
Πίνακας 1. Συσχέτιση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *WNT2* με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά.

	Αυξημένα επίπεδα mRNA (fold change>2,5)	Μη αλλαγή των επιπέδων mRNA	Μειωμένα επίπεδα mRNA	P value
Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά				
Ηλικία				
Ηλικία ≤65 έτη	3/46 (7%)	18/46 (40%)	25/46 (53%)	1,000
Ηλικία >65 έτη	3/54 (6%)	22/54 (41%)	29/54 (53%)	
Σύνολο 100				
Ιστολογικός τύπος				
Πορογενές	6/81 (7%)	34/81 (42%)	41/81 (51%)	0,192
Λοβιακό	0/14 (0%)	3/14 (21%)	11/14 (79%)	
Μυελοειδές	0/1 (0%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)	
Μικτό	0/2 (0%)	0/2 (0%)	2/2 (100%)	
Θηλώδες	0/2 (0%)	2/2 (100%)	0/2 (0%)	
Σύνολο 100				
Βαθμός διαφοροποίησης (Grade)				

Grade 1 & 2	2/22 (9%)	9/22 (41%)	11/22 (50%)	0,733
Grade 3	4/78 (5%)	31/78 (40%)	43/78 (55%)	
Σύνολο 100				
<u>Προγνωστικό στάδιο</u>				
I&II	2/46 (4%)	23/46 (50%)	21/46 (46%)	0,171
III&IV	4/54 (7%)	17/54 (31%)	33/54 (62%)	
Σύνολο 100				
<u>Μέγεθος πρωτοπαθούς όγκου</u>				
T1/T2	4/74 (5%)	33/74 (45%)	37/74 (50%)	0,226
T3/T4	2/26 (8%)	7/26 (27%)	17/26 (65%)	
Σύνολο 100				
<u>Επιγώριοι λεμφαδένες</u>				
Παρουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες N	3/57 (5%)	22/57 (39%)	32/57 (56%)	0,852
Απουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες (N0)	3/43 (7%)	18/43 (42%)	22/43 (51%)	
Σύνολο 100				
<u>Ορμονικοί υποδοχείς (ER,PR, HER2)</u>				
ER+	4/68 (6%)	33/68 (48%)	31/68 (46%)	0,033
ER-	2/32 (6%)	7/32 (22%)	23/32 (72%)	
Σύνολο 100				
PR+	5/64 (8%)	29/64 (44%)	5/64 (8%)	0,171
PR-	1/36 (3%)	11/36 (31%)	24/36 (66%)	
Σύνολο 100				
HER2 +	3/54 (6%)	23/54 (43%)	28/54 (51%)	0898
HER2 -	3/46 (6%)	17/46 (37%)	17/46 (37%)	
Σύνολο 100				
<u>Μοριακοί υπότυποι</u>				
Luminal A	1/31 (3%)	12/31 (39%)	18/31 (58%)	0,142
Luminal B	4/46 (9%)	23/46 (50%)	19/46 (41%)	
Τριπλά αρνητικός	1/10 (10%)	3/10 (30%)	6/10 (60%)	
Υπότυπος HER2	0/13 (0%)	2/13 (15%)	11/13 (85%)	
Σύνολο 100				

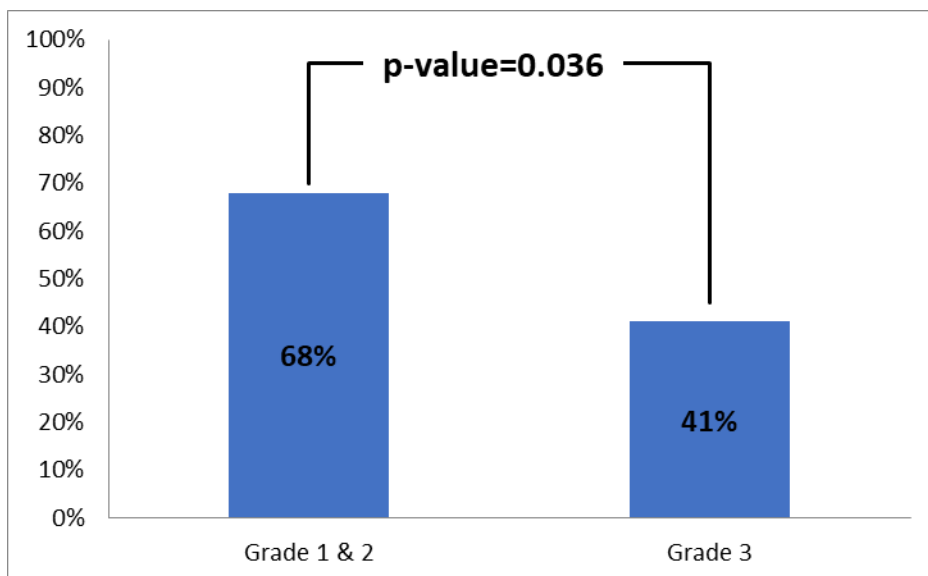
4.1.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ WNT3 ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Από με την ανάλυση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του προσδέτη WNT3 παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα mRNA σε 47 από τα 100 (47%) συνολικά δείγματα καρκίνου μαστού. Τα 17 από τα 100 δείγματα (17%) δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου, ενώ σε 36 από τα 100 δείγματα παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα mRNA (36%). Στο Γράφημα 3 απεικονίζονται τα επίπεδα του mRNA του προσδέτη WNT3.



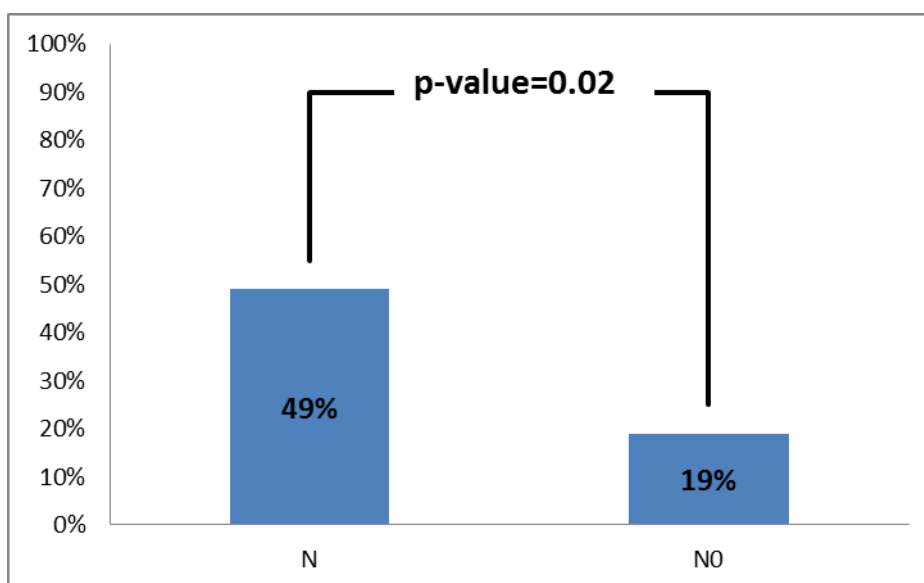
Γράφημα 3. Τα επίπεδα έκφρασης mRNA του γονιδίου WNT3.

Στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου WNT3 και του βαθμού διαφοροποίησης ($p=0,036$). Πιο αναλυτικά, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα του προσδέτη WNT3 σε 15 από τα 22 δείγματα με καλή-μέτρια διαφοροποίηση (Grade 1 & 2) (68%) και σε 32 από τα 78 δείγματα με χαμηλή-φτωχή διαφοροποίηση (Grade 3) (42%) (Γράφημα 4).



Γράφημα 4. Συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων mRNA γονιδίου *WNT3* με τη διαφοροποίηση του όγκου.

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των σχετικών επιπέδων mRNA του γονιδίου *WNT3* σύμφωνα με την παρουσία ή απουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες. Παρατηρήθηκαν μειωμένα mRNA επίπεδα του γονιδίου σε 28 από τα 57 δείγματα (49%) με παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων σε αντίθεση με την απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων σε 8 από τα 43 δείγματα (19%) ($p=0,02$) (Γράφημα 5). Τέλος δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα υπόλοιπα κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα των ασθενών.



Γράφημα 5. Συσχέτιση των μειωμένων επίπεδα mRNA γονιδίου *WNT3* με την παρουσία μεταστάσεων στους λεμφαδένες.

Οι συσχετίσεις των επιπέδων mRNA με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά καταγράφονται στον Πίνακα 2.

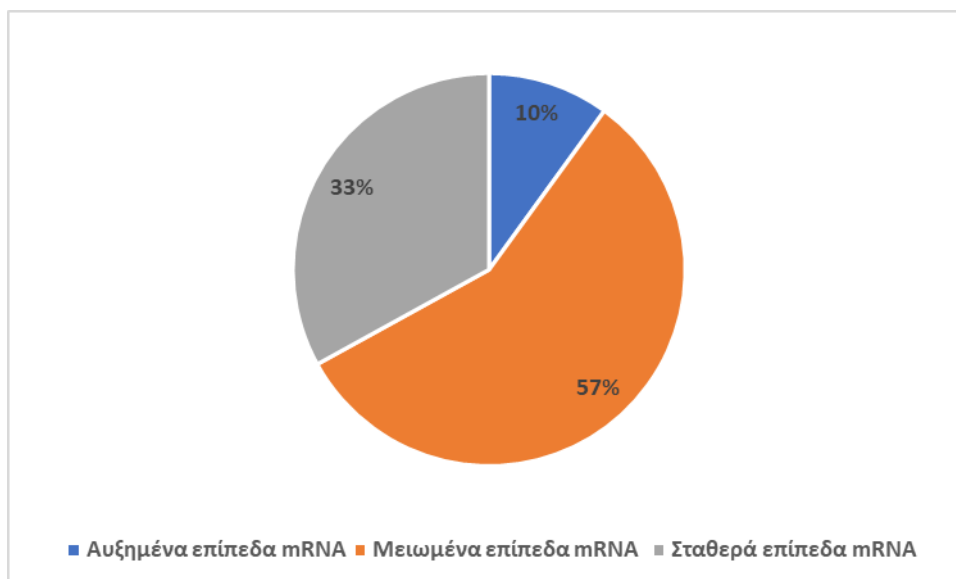
Πίνακας 2. Συσχέτιση των σχετικών επιπέδων mRNA του γονιδίου WNT3 με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά.

	Αυξημένα επίπεδα mRNA (fold change>2,5)	Μη αλλαγή των επιπέδων mRNA	Μειωμένα επίπεδα mRNA	P value
Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά				
<u>Ηλικία</u>				
Ηλικία ≤65 έτη	26/46 (57%)	4/46 (9%)	16/46 (34%)	0,077
Ηλικία >65 έτη	21/54 (39%)	13/54 (24%)	20/54 (37%)	
Σύνολο 100				
<u>Ιστολογικός τύπος</u>				
Πορογενές	37/81 (46%)	12/81 (15%)	32/81 (39%)	0,176
Λοβιακό	7/14 (50%)	3/14 (20%)	4/14 (30%)	
Μυελοειδές	1/1 (100%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	
Μικτό	2/2 (100%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	
Θηλώδες	0/2 (0%)	2/2 (100%)	0/2 (0%)	
Σύνολο 100				
<u>Βαθμός διαφοροποίησης (Grade)</u>				
Grade I & II	15/22 (68%)	4/22 (18%)	3/22 (14%)	0,036
Grade III & IV	32/78 (41%)	13/78 (17%)	33/78 (42%)	
Σύνολο 100				
<u>Προγνωστικό στάδιο</u>				
I&II	25/46 (54%)	9/46 (20%)	12/46 (26%)	0,163
III&IV	22/54 (41%)	8/54 (15%)	24/54 (44%)	
Σύνολο				
<u>Μέγεθος πρωτοπαθούς όγκου</u>				
T1/T2	38/74 (51%)	11/74 (15%)	25/74 (34%)	0,317
T3/T4	9/26 (35%)	6/26 (23%)	11/26 (42%)	
Σύνολο 100				
<u>Επιγόριοι λεμφαδένες</u>				0,02
Παρουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες N	24/57 (42%)	5/57 (9%)	28/57 (49%)	
Απουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες (N0)	23/43 (53%)	12/43 (28%)	8/43 (19%)	
Σύνολο 100				
<u>Ορμονικοί υποδοχείς (ER,PR,HER2)</u>				
ER+	34/68 (50%)	10/68 (15%)	24/68 (35%)	0,579
ER-	13/32 (41%)	7/32 (22%)	12/32 (37%)	
Σύνολο 100				

PR+	26/64 (40%)	12/64 (20%)	26/64 (40%)	0,233
PR-	21/36 (58%)	5/36 (14%)	10/36 (28%)	
Σύνολο 100				
HER2 +	22/54 (41%)	9/54 (17%)	23/54 (42%)	0,301
HER2 -	25/46 (54%)	8/46 (17%)	13/46 (29%)	
Σύνολο 100				
<u>Μοριακοί υπότυποι</u>				
Luminal A	11/31 (35%)	7/31 (23%)	13/31 (42%)	0,345
Luminal B	24/46 (52%)	5/46 (11%)	17/46 (37%)	
Τριπλά αρνητικός	7/10 (70%)	1/10 (10%)	2/10 (20%)	
Υπότυπος HER2	5/13 (38%)	4/13 (31%)	4/13 (31%)	
Σύνολο 100				

4.1.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ WNT5A ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Από τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης mRNA του προσδέτη WNT5A παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα σε 57 από τα 100 δείγματα καρκίνου μαστού (57%), αυξημένα επίπεδα σε 10 από τα 100 δείγματα (10%) και καμία αλλαγή στην έκφραση παρατηρήθηκε σε 33 από τα 100 δείγματα (33%). Στο Γράφημα 6 απεικονίζονται τα επίπεδα του mRNA του προσδέτη WNT5A.



Γράφημα 6. Τα επίπεδα έκφρασης mRNA του γονιδίου WNT5A.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα υπόλοιπα κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα των ασθενών.

Οι συσχετίσεις των επιπέδων mRNA με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά καταγράφονται στον Πίνακα 3

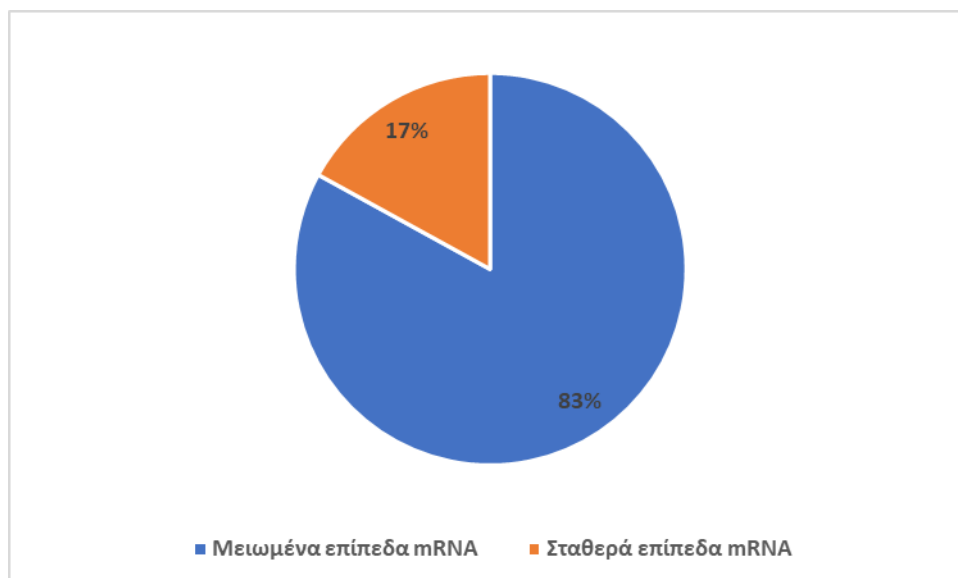
Πίνακας 3. Συσχέτιση των σχετικών επιπέδων mRNA του γονιδίου WNT5A με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά.

	Αυξημένα επίπεδα mRNA (fold change>2,5)	Μη αλλαγή των επιπέδων mRNA	Μειωμένα επίπεδα mRNA	P value
Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά				
Ηλικία				
Ηλικία ≤65 έτη	7/46 (15%)	22/46 (48%)	17/46 (37%)	0,137
Ηλικία >65 έτη	3/54 (6%)	16/54 (30%)	35/54 (64%)	
Σύνολο 100				
Ιστολογικός τύπος				
Πορογενές	7/81 (9%)	25/81 (31%)	49/81 (60%)	0,197
Λοβιακό	2/14 (14%)	6/14 (43%)	6/14 (43%)	
Μυελοειδές	0/1 (0%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)	
Μικτό	0/2 (0%)	0/2 (0%)	2/2 (100%)	
Θηλώδες	1/2 (50%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	
Σύνολο 100				
Βαθμός διαφοροποίησης (Grade)				
Grade 1 & 2	3/22 (14%)	7/22 (32%)	12/22 (64%)	0,813
Grade 3	7/78 (9%)	26/78 (33%)	45/78 (58%)	
Σύνολο 100				
Προγνωστικό στάδιο				
I&II	6/46 (13%)	16/46 (35%)	24/46 (52%)	0,544
III&IV	4/54 (7%)	17/54 (31%)	33/54 (62%)	
Σύνολο 100				
Μέγεθος πρωτοπαθούς όγκου				
T1/T2	9/74 (12%)	26/74 (35%)	39/74 (53%)	0,266
T3/T4	1/26 (4%)	7/26 (27%)	18/26 (69%)	
Σύνολο 100				
Επιγώριοι λεμφαδένες				
Παρουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες N	5/57 (9%)	36/57 (63%)	16/57 (28%)	0,357
Απουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες (N0)	5/43 (12%)	17/43 (40%)	21/43 (48%)	
Σύνολο 100				
Ορμονικοί υποδοχείς (ER,PR, HER2)				

ER+	8/68 (12%)	21/68 (31%)	39/68 (57%)	0,620
ER-	2/32 (6%)	12/32 (38%)	18/32 (56%)	
Σύνολο 100				
PR+	8/64 (13%)	18/64 (28%)	38/64 (59%)	0,277
PR-	2/36 (6%)	15/36 (42%)	19/36 (52%)	
Σύνολο 100				
HER2 +	4/54 (7%)	19/54 (35%)	31/54 (68%)	0,618
HER2 -	6/46 (13%)	14/46 (30%)	26/46 (57%)	
Σύνολο 100				
<u>Μοριακοί υπότυποι</u>				
Luminal A	5/31 (16%)	8/31 (26%)	18/31 (58%)	0,712
Luminal B	3/46 (7%)	15/46 (33%)	28/46 (60%)	
Τριπλά αρνητικός	1/10 (10%)	4/10 (40%)	5/10 (50%)	
Υπότυπος HER2	1/13 (8%)	6/13 (46%)	6/13 (46%)	
Σύνολο 100				

4.1.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *FRIZZLED 4* ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

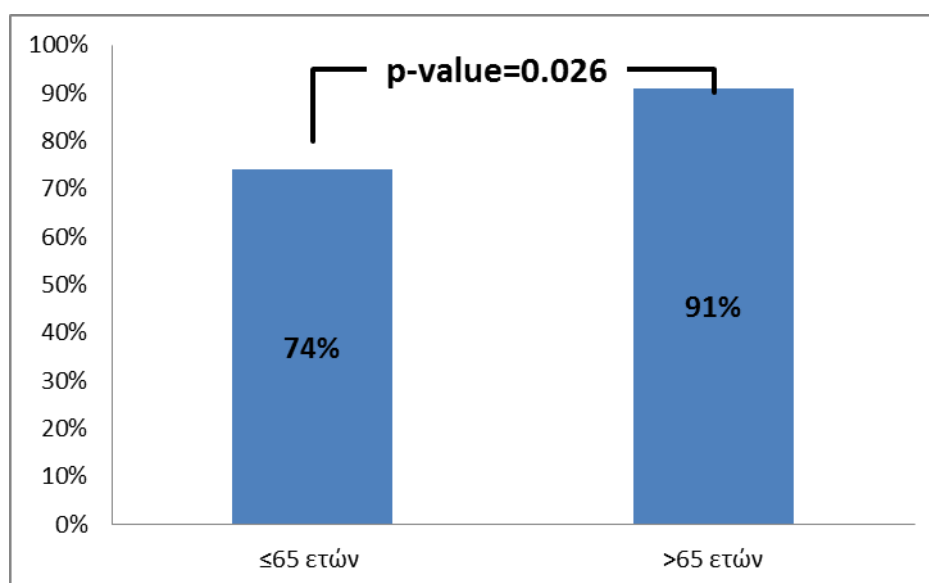
Από με την ανάλυση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του υποδοχέα Frizzled 4 παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα mRNA σε 83 από τα 100 (83%) συνολικά δείγματα καρκίνου μαστού. Τα 17 από τα 100 δείγματα (17%) δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Στο Γράφημα 7 απεικονίζονται τα επίπεδα του mRNA του υποδοχέα Frizzled 4.



Γράφημα 7. Τα επίπεδα έκφρασης mRNA του γονιδίου *FRIZZLED 4*.

Στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των επιπέδων έκφρασης mRNA του υποδοχέα Frizzled 4 με την ηλικία εμφάνισης της νόσου. Πιο αναλυτικά, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης σε 91% (49/54) ασθενών με ηλικία μεγαλύτερη των 65 ετών σε αντίθεση με 74% (34/46) ασθενών με ηλικία μικρότερη των 65 ετών ($p=0,026$) (Γράφημα 8).

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με τα υπόλοιπα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών.



Γράφημα 8. Συσχέτιση των μειωμένων επίπεδα mRNA γονιδίου *FZD4* με την ηλικία των ασθενών.

Οι συσχετίσεις των επιπέδων mRNA με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά καταγράφονται στον Πίνακα 4.

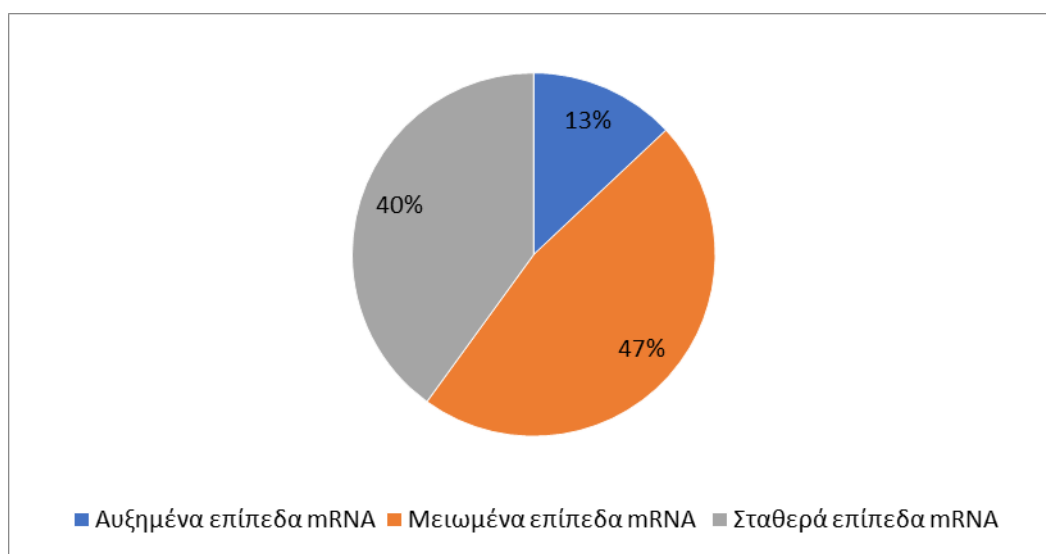
Πίνακας 4. Συσχέτιση των σχετικών επιπέδων mRNA του γονιδίου FZD4 με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά.

	Μειωμένα επίπεδα mRNA	Μη αλλαγή των επιπέδων mRNA	P value
Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά			
Ηλικία			
Ηλικία ≤65 έτη	34/46 (74%)	12/46 (26%)	0,026
Ηλικία >65 έτη	49/54 (91%)	5/54 (9%)	
Σύνολο 100			
Ιστολογικός τύπος			
Πορογενές	68/81 (84%)	13/81 (16%)	0,662
Λοβιακό	11/14 (79%)	3/14 (21%)	
Μυελοειδές	1/1 (100%)	0/1 (0%)	
Μικτό	2/2 (100%)	0/2 (0%)	
Θηλώδες	1/2 (50%)	1/2 (50%)	
Σύνολο 100			
Βαθμός διαφοροποίησης (Grade)			
Grade 1	16/22 (73%)	6/22 (27%)	0,146
Grade 2 & 3	67/78 (86%)	11/78 (14%)	
Σύνολο 100			
Προγνωστικό στάδιο			
I&II	39/46 (85%)	7/46 (15%)	0,661
III&IV	44/54 (82%)	10/54 (16%)	
Σύνολο 100			
Μέγεθος πρωτοπαθούς όγκου			
T1/T2	64/74 (86%)	10/74 (14%)	0,117
T3/T4	19/26 (73%)	7/26 (27%)	
Σύνολο 100			
Επιγώριοι λεμφαδένες			
Παρουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες N	46/57 (81%)	11/57 (19%)	0,481
Απουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες (N0)	37/43 (86%)	6/43 (14%)	
Σύνολο 100			
Ορμονικοί υποδοχείς (ER,PR, HER2)			
ER+	57/68 (84%)	11/68 (16%)	0,749
ER-	26/32 (81%)	6/32 (19%)	
Σύνολο 100			
PR+	53/64 (83%)	11/64 (17%)	0,947

PR-	30/36 (83%)	6/36 (17%)	
Σύνολο 100			
HER2 +	43/54 (80%)	11/54 (20%)	0,331
HER2 -	40/46 (87%)	6/46 (13%)	
Σύνολο 100			
<u>Μοριακοί υπότυποι</u>			
Luminal A	26/31 (84%)	5/31 (16%)	0,529
Luminal B	39/46 (85%)	7/46 (15%)	
Τριπλά αρνητικός	9/10 (90%)	1/10 (10%)	
Υπότυπος HER2	9/13 (69%)	4/13 (31%)	
Σύνολο 100			

4.1.5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *FRIZZLED 6* ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Ο δεύτερος υποδοχέας που μελετήθηκε ήταν ο υποδοχέας του μη κανονικού Wnt, ο υποδοχέας Frizzled 6. Από την ανάλυση 100 δειγμάτων καρκίνου μαστού 13 δείγματα είχαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης mRNA του υποδοχέα FZD6 (13%), 47 δείγματα είχαν μειωμένα επίπεδα mRNA (47%), ενώ 40 δείγματα δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης mRNA του συγκεκριμένου υποδοχέα (Γράφημα 9).



Γράφημα 9. Τα επίπεδα έκφρασης mRNA του γονιδίου *FRIZZLED 6*.

Από την στατιστική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης mRNA του υποδοχέα Frizzled 6 δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα των ασθενών.

Στον Πίνακα 5 καταγράφονται οι συσχετίσεις των επιπέδων έκφρασης του υποδοχέα FZD 6 με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

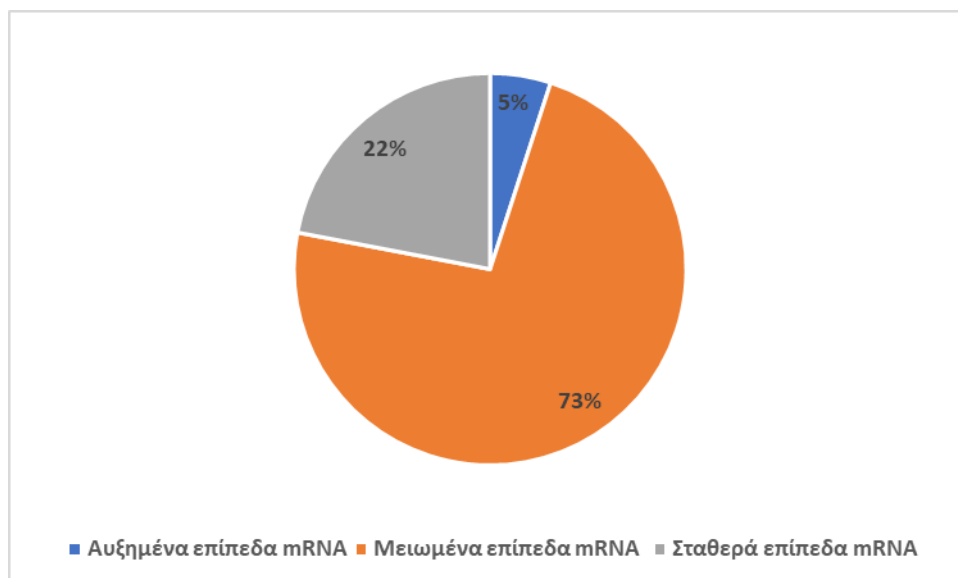
Πίνακας 5. Συσχέτιση των σχετικών επιπέδων mRNA του γονιδίου FZD6 με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά.

	Αυξημένα επίπεδα mRNA (fold change>2,5)	Μη αλλαγή των επιπέδων mRNA	Μειωμένα επίπεδα mRNA	P value
Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά				
Ηλικία				
Ηλικία ≤65 έτη	6/46 (13%)	23/46 (50%)	17/46 (36%)	0,138
Ηλικία >65 έτη	7/54 (13%)	17/54 (31%)	30/54 (56%)	
Σύνολο 100				
Ιστολογικός τύπος				
Πορογενές	12/81 (15%)	30/81 (37%)	39/81 (48%)	0,806
Λοβιακό	1/14 (7%)	6/14 (43%)	7/14 (50%)	
Μυελοειδές	0/1 (0%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)	
Μικτό	0/2 (0%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	
Θηλώδες	0/2 (0%)	2/2 (100%)	0/2 (0%)	
Σύνολο 100				
Βαθμός διαφοροποίησης (Grade)				
Grade 1	5/22 (23%)	10/22 (45%)	7/22 (32%)	0,162
Grade 2 & 3	8/78 (10%)	30/78 (38%)	40/78 (52%)	
Σύνολο 100				
Προγνωστικό στάδιο				
I&II	10/46 (22%)	17/46 (37%)	19/46 (41%)	0,055
III&IV	3/54 (6%)	23/54 (43%)	28/54 (52%)	
Σύνολο 100				
Μέγεθος πρωτοπαθούς όγκου				
T1/T2	12/74 (16%)	31/74 (42%)	31/74 (42%)	0,129
T3/T4	1/26 (4%)	9/26 (35%)	16/26 (61%)	
Σύνολο 100				
Επιγώριοι λεμφαδένες				
Παρουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες N	5/57 (9%)	26/57 (46%)	26/57 (45%)	0,232
Απουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες (N0)	8/43 (19%)	14/43 (33%)	8/43 (18%)	
Σύνολο 100				

<u>Ορμονικοί υποδοχείς (ER,PR,HER2)</u>				
ER+	11/68 (16%)	26/68 (38%)	31/68 (46%)	0,386
ER-	2/32 (6%)	14/32 (44%)	16/32 (50%)	
Σύνολο 100				
PR+	11/64 (17%)	28/64 (44%)	25/64 (39%)	0,067
PR-	2/36 (6%)	12/36 (33%)	22/36 (61%)	
Σύνολο 100				
HER2 +	8/54 (15%)	19/54 (35%)	27/54 (50%)	0,548
HER2 -	5/46 (11%)	21/46 (46%)	20/46 (43%)	
Σύνολο 100				
<u>Μοριακοί υπότυποι</u>				
Luminal A	3/31 (10%)	15/31 (48%)	13/31 (42%)	0,401
Luminal B	9/46 (20%)	18/46 (39%)	19/46 (41%)	
Τριπλά αρνητικός	0/10 (0%)	4/10 (40%)	6/10 (60%)	
Υπότυπος HER2	1/13 (8%)	3/13 (23%)	9/13 (69%)	
Σύνολο 100				

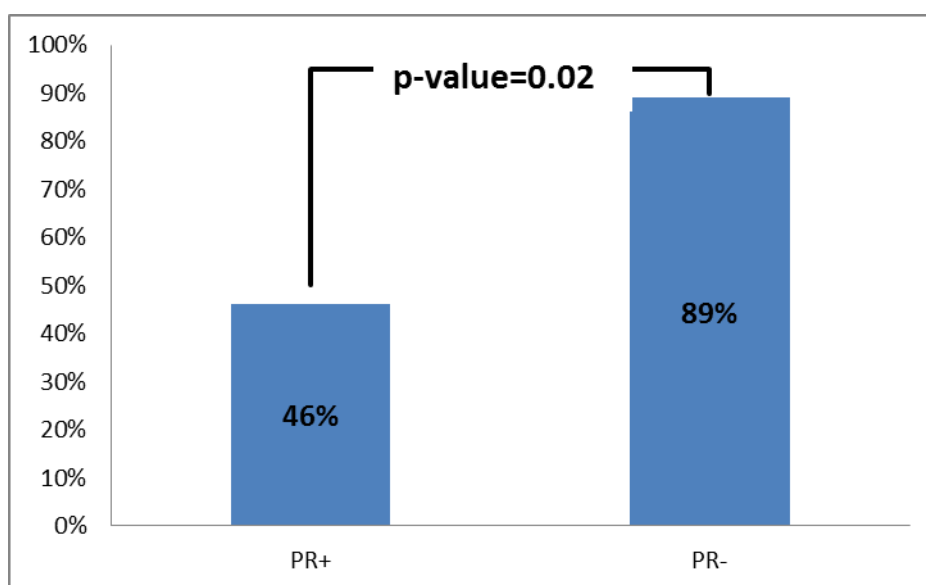
4.1.6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *FRIZZLED 7* ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Ο τρίτος υποδοχέας που μελετήθηκε ήταν ο υποδοχέας Frizzled 7. Από με την ανάλυση των σχετικών επιπέδων mRNA παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα mRNA σε 73 από τα 100 (73%) συνολικά δείγματα καρκίνου μαστού και αυξημένα επίπεδα mRNA σε 5 από τα 100 δείγματα (5%). Τα 22 από τα 100 δείγματα (22%) δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Στο Γράφημα 10 απεικονίζονται τα επίπεδα του mRNA του υποδοχέα Frizzled 7.



Γράφημα 10. Τα επίπεδα έκφρασης mRNA του γονιδίου *FRIZZLED 7*.

Από τη στατιστική ανάλυση καταγράφηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης mRNA του υποδοχέα Frizzled 7 και του υποδοχέα PR. Συγκεκριμένα, στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των μειωμένων επιπέδων έκφρασης mRNA του υποδοχέα Frizzled 7 σε 32 από τα 36 δείγματα με απουσία έκφρασης του προγεστερονικού υποδοχέα PR (89%) σε αντίθεση με τα 41 από τα 64 δείγματα (64%) με την παρουσία έκφρασης του προγεστερονικού υποδοχέα PR ($p=0,020$) (Γράφημα 11).



Γράφημα 11. Συσχέτιση των μειωμένων επιπέδων mRNA γονιδίου *FZD7* με την έκφραση του προγεστερονικού υποδοχέα PR.

Τέλος δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση του υποδοχέα FZD7 και των υπολοίπων κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των ασθενών.

Στον Πίνακα 6 καταγράφονται οι συσχετίσεις των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου FZD7 και των κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών.

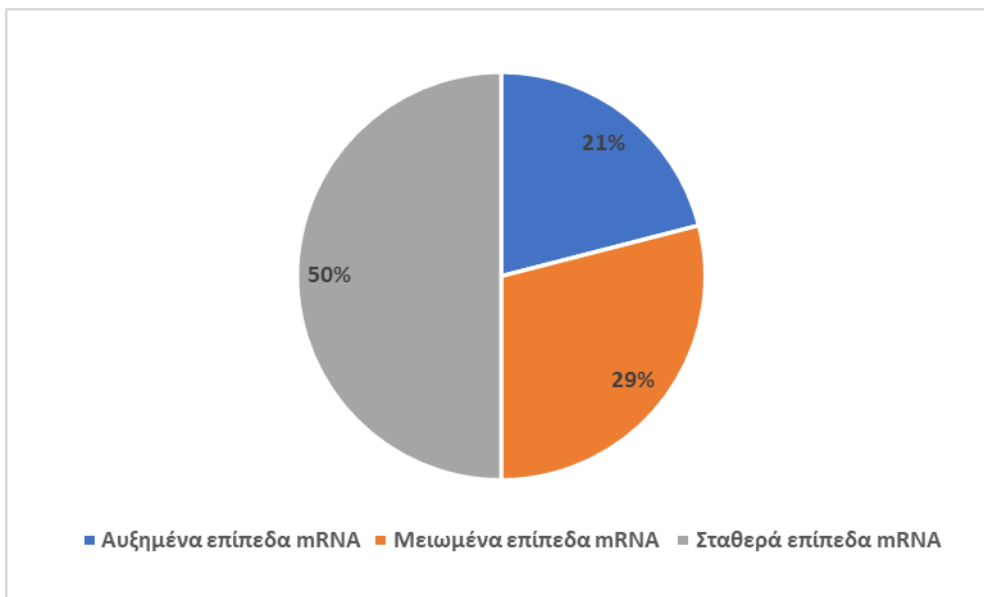
Πίνακας 6. Συσχέτιση των σχετικών επιπέδων mRNA του γονιδίου FZD7 με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά.

	Αυξημένα επίπεδα mRNA (fold change>2,5)	Μη αλλαγή των επιπέδων mRNA	Μειωμένα επίπεδα mRNA	P value
Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά				
<u>Ηλικία</u>				
Ηλικία ≤65 έτη	1/46 (22%)	6/46 (13%)	39/46 (85%)	0,056
Ηλικία >65 έτη	4/54 (7%)	16/54 (30%)	34/54 (63%)	
Σύνολο 100				
<u>Ιστολογικός τύπος</u>				
Πορογενές	5/81 (6%)	15/81 (19%)	61/81 (75%)	0,477
Λοβιακό	0/14 (0%)	5/14 (36%)	9/14 (64%)	
Μυελοειδές	1/1(100%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	
Μικτό	0/2 (0%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	
Θηλώδες	0/2 (0%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	
Σύνολο 100				
<u>Βαθμός διαφοροποίησης (Grade)</u>				
Grade 1 & 2	0/22 (0%)	6/22	16/22	0,567
Grade 3	5/78 (6%)	16/78 (21%)	57/78 (73%)	
Σύνολο 100				
<u>Προγνωστικό στάδιο</u>				
I&II	0/46 (0%)	12/46 (26%)	34/46 (74%)	0,088
III&IV	5/54 (9%)	10/54 (19%)	39/54 (72%)	
Σύνολο 100				
<u>Μέγεθος πρωτοπαθούς όγκου</u>				
T1/T2	2/74 (3%)	17/74 (23%)	55/74 (74%)	0,210
T3/T4	3/26 (12%)	5/26 (19%)	18/26 (69%)	
Σύνολο 100				
<u>Επιγώριοι λεμφαδένες</u>				
Παρουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες N	4/57 (7%)	17/74 (23%)	55/74 (74%)	0,210
Απουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες (N0)	1/43 (2%)	5/26 (19%)	18/26 (69%)	
Σύνολο 100				

<u>Ορμονικοί υποδοχείς (ER,PR,HER2)</u>				
ER+	4/68 (6%)	16/68 (24%)	48/68	0,736
ER-	1/32 (3%)	6/32 (19%)	25/32 (78%)	
Σύνολο 100				
PR+	4/64 (6%)	19/64 (30%)	41/64 (46%)	0,020
PR-	1/36 (3%)	3/36 (8%)	32/36 (89%)	
Σύνολο 100				
HER2 +	3/54 (6%)	9/54 (17%)	42/54 (77%)	0,381
HER2 -	2/46 (4%)	13/46 (28%)	31/46 (68%)	
Σύνολο 100				
<u>Μοριακοί υπότυποι</u>				
Luminal A	2/31 (6%)	14/31 (45%)	15/31 (49%)	0,179
Luminal B	2/46 (4%)	6/46 (13%)	38/46 (83%)	
Τριπλά αρνητικός	1/10 (10%)	0/10 (0%)	9/10 (90%)	
Υπότυπος HER2	0/13 (0%)	2/13 (15%)	11/13 (85%)	
Σύνολο 100				

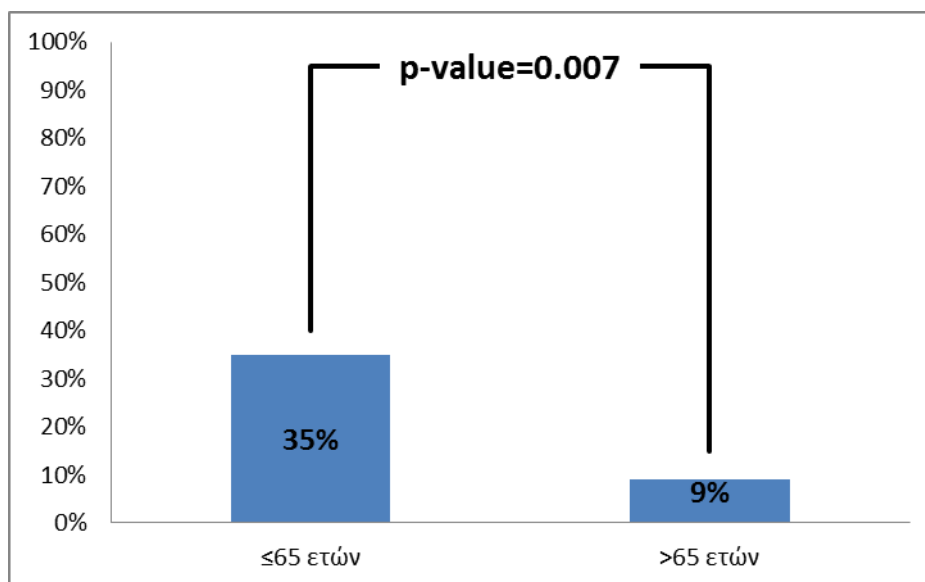
4.1.7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *CTNNB1* ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Σύμφωνα με την ανάλυση των σχετικών επιπέδων έκφρασης παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα mRNA του γονιδίου *CTNNB1* σε 21 από τα 100 δείγματα (21%) καρκίνου μαστού που παρουσίασαν ενίσχυση του προϊόντος cDNA. Τα 50 από τα 100 δείγματα (50%) δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή στα επίπεδα mRNA, ενώ σε 29 από τα 100 δείγματα (29%) παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα mRNA. Στο Γράφημα 12 παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του γονιδίου *CTNNB1* που κωδικοποιεί τη β-κατενίνη.



Γράφημα 12. Τα επίπεδα έκφρασης mRNA του γονιδίου *CTNNB1*.

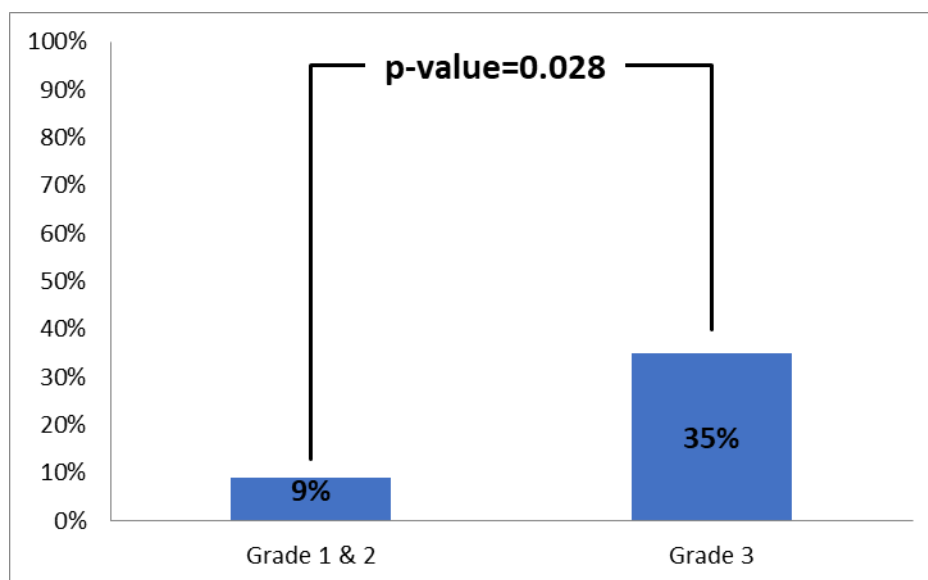
Στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των επιπέδων έκφρασης mRNA της β-κατενίνης με την ηλικία εμφάνισης της νόσου ($p=0,007$). Πιο 16 από τις 46 γυναίκες (35%) με ηλικία μικρότερη από τα 65 έτη, παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα του γονιδίου *CTNNB1*, ενώ μόνο 5 από τις 54 γυναίκες (9%) με ηλικία μεγαλύτερη ηλικία από τα 65 έτη παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα (Γράφημα 13).



Γράφημα 13. Συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων mRNA γονιδίου *CTNNB1* σε σχέση με την ηλικία εμφάνισης καρκίνου μαστού.

Επιπρόσθετα, στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ του βαθμού διαφοροποίησης του όγκου (Grade) και των επιπέδων έκφρασης mRNA της β-κατενίνης ($p=0,028$). Πιο αναλυτικά, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα της β-

κατενίνης σε 27 από τα 78 δείγματα με χαμηλή-φτωχή διαφοροποίηση (Grade 3) (35%) και σε 2 από τα 22 δείγματα με καλή-μέτρια διαφοροποίηση (Grade 1 & 2) (9%). (Γράφημα 14). Τέλος δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα υπόλοιπα κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα των ασθενών.



Γράφημα 14. Συσχέτιση των μειωμένων επιπέδων έκφρασης mRNA γονιδίου *CTNNB1* με τη διαφοροποίηση του όγκου.

Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *CTNNB1* ύστερα από τη συσχέτιση τους με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά.

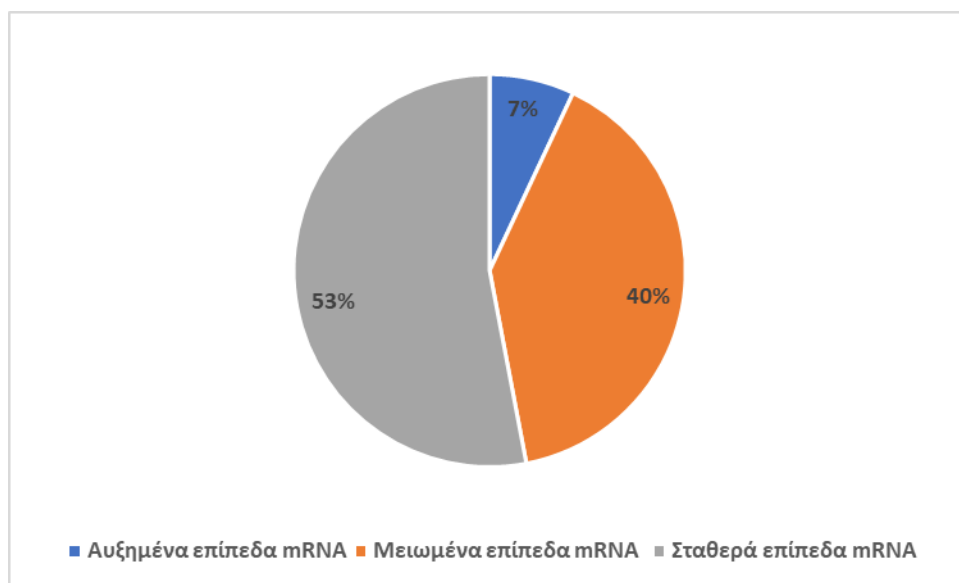
Πίνακας 7. Συσχέτιση των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA του γονιδίου *CTNNB1* με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά.

	Αυξημένα επίπεδα mRNA (change>2,5)	Μη αλλαγή των επιπέδων mRNA	Μειωμένα επίπεδα mRNA	P value
Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά				
Ηλικία				
Ηλικία ≤65 έτη	16/46 (35%)	18/46 (39%)	12/46 (26%)	0,007
Ηλικία >65 έτη	5/54 (9%)	32/54 (59%)	17/54 (32%)	
Σύνολο 100				
Ιστολογικός τύπος				
Πορογενές	16/81 (20%)	41/81 (50%)	24/81 (30%)	0,499
Λοβιακό	3/14 (21%)	8/14 (58%)	3/14 (21%)	
Μυελοειδές	1/1 (100%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	

Μικτό	1/2 (50%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	
Θηλώδεις	0/2 (0%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	
Σύνολο 100				
<u>Βαθμός διαφοροποίησης (Grade)</u>				
Grade 1 & 2	8/22 (36%)	12/22 (55%)	2/22 (9%)	0,028
Grade 3	13/78 (17%)	38/78 (48%)	27/78 (35%)	
Σύνολο 100				
<u>Προγνωστικό στάδιο</u>				
I&II	10/46 (22%)	22/46 (48%)	14/46 (30%)	0,922
III&IV	11/54 (20%)	28/54 (52%)	15/54 (28%)	
Σύνολο 100				
<u>Μέγεθος πρωτοπαθούς όγκου</u>				
T1/T2	16/74 (22%)	38/74 (51%)	20/74 (27%)	0,764
T3/T4	5/26 (19%)	12/26 (46%)	9/26 (35%)	
Σύνολο 100				
<u>Επιγώριοι λεμφαδένες</u>				
Παρουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες N	14/57 (25%)	23/57 (40%)	20/57 (35%)	0,084
Απουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες (N0)	7/43 (16%)	27/43 (63%)	9/43 (21%)	
Σύνολο 100				
<u>Ορμονικοί υποδοχείς (ER,PR, HER2)</u>				
ER+	18/68 (26%)	30/68 (44%)	20/68 (30%)	0,105
ER-	3/32 (9%)	20/32 (63%)	9/32 (28%)	
Σύνολο 100				
PR+	15/64 (23%)	30/64 (47%)	19/64 (30%)	0,644
PR-	6/36 (17%)	20/36 (56%)	10/36 (27%)	
Σύνολο 100				
HER2 +	9/54 (17%)	24/54 (44%)	21/54 (39%)	0,057
HER2 -	12/46 (26%)	26/46 (57%)	8/46 (17%)	
Σύνολο 100				
<u>Μοριακοί υπότυποι</u>				
Luminal A	6/31 (19%)	6/31 (19%)	19/31 (62%)	0,169
Luminal B	12/46 (26%)	18/46 (39%)	16/46 (35%)	
Τριπλά αρνητικός	3/10 (30%)	4/10 (40%)	3/10 (30%)	
Υπότυπος HER2	0/13 (0%)	9/13 (69%)	4/13 (31%)	
Σύνολο 100				

4.1.8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *GSK3-β* ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Από τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης mRNA της κινάσης *GSK3-β* παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα σε 40 από τα 100 δείγματα καρκίνου μαστού (40%), αυξημένα επίπεδα σε 7 από τα 100 δείγματα (7%) και καμία αλλαγή στην έκφραση παρατηρήθηκε σε 53 από τα 100 δείγματα (53%). Στο Γράφημα 15 απεικονίζονται τα επίπεδα του mRNA της κινάσης *GSK3-β*.



Γράφημα 15. Τα επίπεδα έκφρασης mRNA του γονιδίου *GSK3-β*.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA της κινάσης *GSK3-β* με τα υπόλοιπα κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα των ασθενών.

Οι συσχετίσεις των επιπέδων mRNA της *GSK3-β* με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά καταγράφονται στον Πίνακα 8.

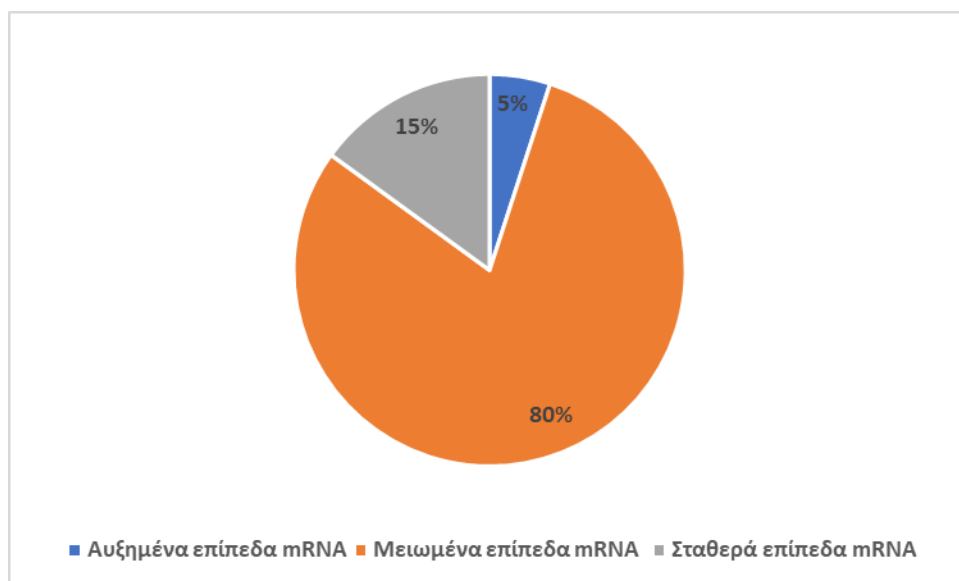
Πίνακας 8. Συσχέτιση των σχετικών επιπέδων mRNA της GSK3-β με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά.

	Αυξημένα επίπεδα mRNA (fold change>2,5)	Μη αλλαγή των επιπέδων mRNA	Μειωμένα επίπεδα mRNA	P value
Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά				
<u>Ηλικία</u>				
Ηλικία ≤65 έτη	3/46 (7%)	28/46 (61%)	15/46 (32%)	0,343
Ηλικία >65 έτη	4/54 (8%)	25/54 (46%)	25/54 (46%)	
Σύνολο 100				
<u>Ιστολογικός τύπος</u>				
Πορογενές	6/81 (7%)	43/81 (53%)	32/81 (40%)	0,446
Λοβιακό	0/14 (0%)	8/14 (57%)	6/14 (43%)	
Μυελοειδές	1/1 (100%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	
Μικτό	0/2 (0%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	
Θηλώδες	0/1 (0%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)	
Σύνολο 100				
<u>Βαθμός διαφοροποίησης (Grade)</u>				
Grade 1 & 2	1/22 (5%)	15/22 (68%)	6/22 (27%)	0,271
Grade 3	6/78 (8%)	38/78 (49%)	34/78 (43%)	
Σύνολο 100				
<u>Προγνωστικό στάδιο</u>				
I&II	3/46 (7%)	25/46 (54%)	18/46 (39%)	1,000
III&IV	4/54 (7%)	28/54 (52%)	22/54 (41%)	
Σύνολο 100				
<u>Μέγεθος πρωτοπαθούς όγκου</u>				0,640
T1/T2	6/74 (8%)	40/74 (54%)	28/74 (38%)	0,536
T3/T4	1/26 (4%)	13/26 (50%)	12/26 (46%)	
Σύνολο 100				
<u>Επιγώριοι λεμφαδένες</u>				
Παρουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες N	3/57 (5%)	29/57 (51%)	25/57 (44%)	0,751
Απουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες (N0)	4/43 (9%)	24/43 (56%)	15/43 (35%)	
Σύνολο 100				
<u>Ορμονικοί υποδοχείς (ER,PR, HER2)</u>				
ER+	5/68 (7%)	34/68 (50%)	29/68 (43%)	0,751
ER-	2/32 (6%)	19/32 (59%)	11/32 (34%)	
Σύνολο 100				
PR+	3/64 (5%)	33/64 (52%)	28/64 (43%)	0,352
PR-	4/36 (11%)	20/36 (56%)	12/36 (33%)	

Σύνολο 100				
HER2 +	3/54 (6%)	26/54 (48%)	25/54 (46%)	0,379
HER2 -	4/46 (9%)	27/46 (58%)	15/46 (33%)	
Σύνολο 100				
<u>Μοριακοί υπότυποι</u>				
Luminal A	3/31(10%)	16/31 (52%)	12/31 (38%)	0,669
Luminal B	2/46 (4%)	23/46 (50%)	21/46 (46%)	
Τριπλά αρνητικός	0/10 (0%)	7/10 (70%)	3/10 (30%)	
Υπότυπος HER2	2/13 (15%)	7/13 (54%)	4/13 (31%)	
Σύνολο 100				

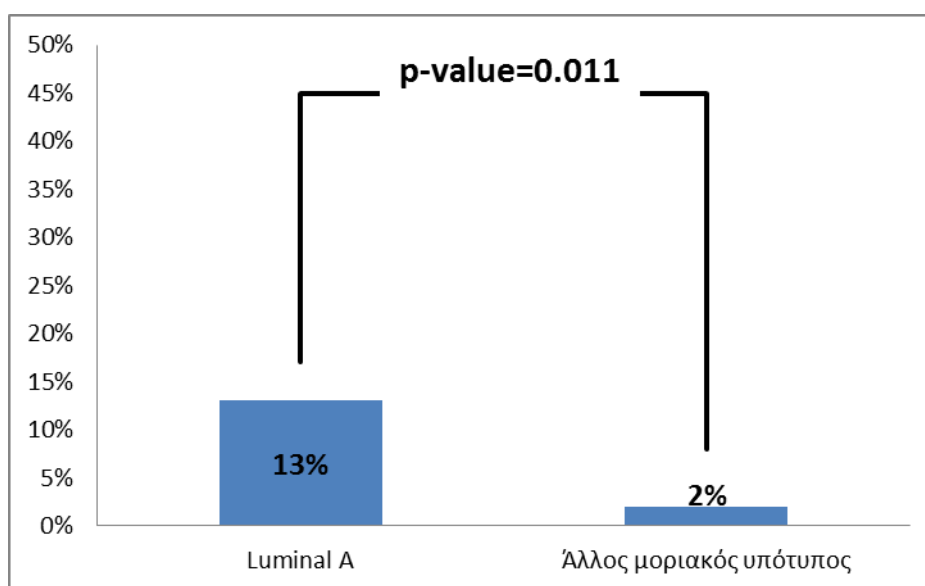
4.1.9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *TCF4* ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Από την ανάλυση των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA του μεταγραφικού παράγοντα TCF4 παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης σε ένα σημαντικό αριθμό δειγμάτων 80 από τα 100 δείγματα καρκίνου μαστού (80%), σε μόλις 5 δείγματα (5%) παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα TCF4, ενώ σε 15 από τα 100 δείγματα (15%) δεν παρατηρήθηκε αλλαγή των επιπέδων έκφρασης (Γράφημα 16).



Γράφημα 16. Τα επίπεδα έκφρασης mRNA του γονιδίου TCF4.

Από την συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του mRNA του γονιδίου TCF4 με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις. Πιο αναλυτικά, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης mRNA του μεταγραφικού παράγοντα TCF4 και του μοριακού υποτύπου. Παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του TCF4 σε 13% (4/31) ασθενών με μοριακό υπότυπο Luminal A σε αντίθεση με 2% (1/69) ασθενών που είχαν άλλον μοριακό υπότυπο ($p=0,011$) (Γράφημα 17).



Γράφημα 17. Συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων mRNA γονιδίου TCF4 με τον μοριακό υπότυπο Luminal A.

Τέλος δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης mRNA του μεταγραφικού παράγοντα TCF4 και των κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των ασθενών.

Οι συσχετίσεις των επιπέδων mRNA του TCF4 με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά καταγράφονται στον Πίνακα 7.

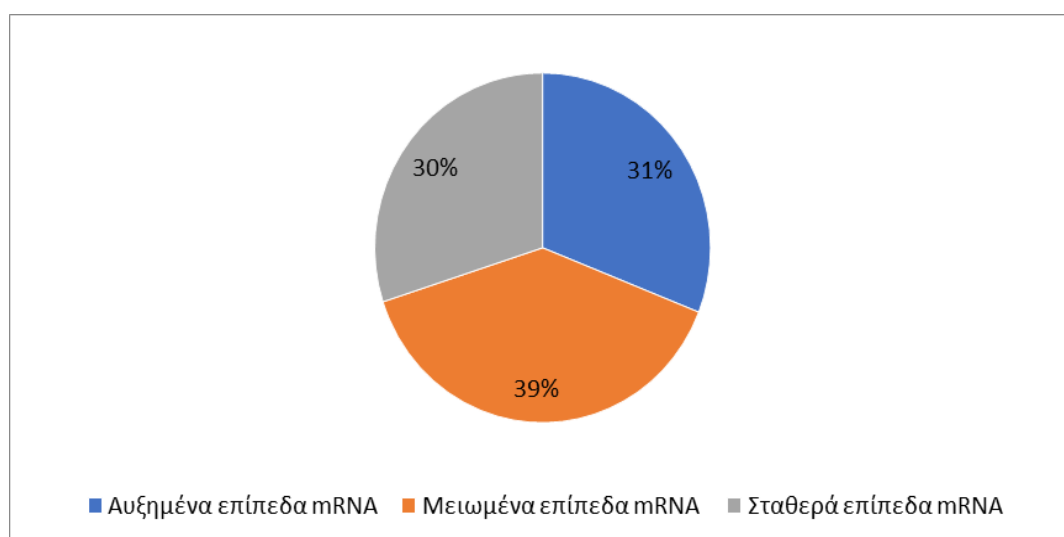
Πίνακας 9. Συσχέτιση των σχετικών επιπέδων mRNA του γονιδίου TCF4 με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά.

	Αυξημένα επίπεδα mRNA (fold change>2,5)	Μη αλλαγή των επιπέδων mRNA	Μειωμένα επίπεδα mRNA	P value
Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά				
<u>Ηλικία</u>				
Ηλικία <65 έτη	3/46 (7%)	6/46 (13%)	37/46 (80%)	0,731
Ηλικία >65 έτη	2/54 (4%)	9/54 (16%)	43/54 (80%)	
Σύνολο 100				
<u>Ιστολογικός τύπος</u>				
Πορογενές	3/81 (4%)	9/81 (11%)	69/81 (85%)	0,059
Λοβιακό	2/14 (14%)	5/14 (36%)	7/14 (50%)	
Μυελοειδές	0/1 (0%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)	
Μικτό	0/2 (0%)	0/2 (0%)	2/2 (100%)	
Θηλώδες	0/2 (0%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	
Σύνολο 100				
<u>Βαθμός διαφοροποίησης (Grade)</u>				
Grade 1 & 2	0/22 (0%)	5/22 (23%)	17/22 (77%)	0,304
Grade 3	5/78 (6%)	10/78 (13%)	63/78 (81%)	
Σύνολο 100				
<u>Προγνωστικό στάδιο</u>				
I&II	2/46 (4%)	7/46 (15%)	37/46 (81%)	1,000
III&IV	3/54 (6%)	8/54 (15%)	43/54 (79%)	
Σύνολο 100				
<u>Μέγεθος πρωτοπαθούς όγκου</u>				1,000
T1/T2	4/74 (5%)	11/74 (15%)	59/74 (80%)	1,000
T3/T4	1/26 (4%)	4/26 (15%)	21/26 (81%)	
Σύνολο 100				
<u>Επιγώριοι λεμφαδένες</u>				
Παρουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες N	3/57 (5%)	9/57 (16%)	45/57 (79%)	1,000
Απουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες (N0)	2/43 (5%)	6/43 (14%)	35/43 (81%)	
Σύνολο 100				
<u>Ορμονικοί υποδοχείς (ER,PR, HER2)</u>				
ER+	4/68 (6%)	11/68 (16%)	53/68 (78%)	0,843
ER-	1/32 (3%)	4/32 (13%)	27/32 (84%)	
Σύνολο 100				
PR+	3/64 (5%)	11/64 (17%)	50/64 (78%)	0,714
PR-	2/36 (6%)	4/36 (11%)	30/36 (83%)	
Σύνολο 100				
HER2 +	2/54 (4%)	7/54 (13%)	45/54 (83%)	0,673

HER2 -	3/46 (7%)	8/46 (17%)	35/46 (76%)	
Σύνολο 100				
<u>Μοριακοί υπότυποι</u>				
Luminal A	4/31 (13%)	7/31(23%)	20/31 (64%)	0,011
Luminal B	0/46 (0%)	5/46 (11%)	41/46 (89%)	
Τριπλά αρνητικός	0/10 (0%)	1/10 (10%)	9/10 (90%)	
Υπότυπος HER2	1/13 (8%)	2/13 (15%)	10/13 (77%)	
Σύνολο 100				

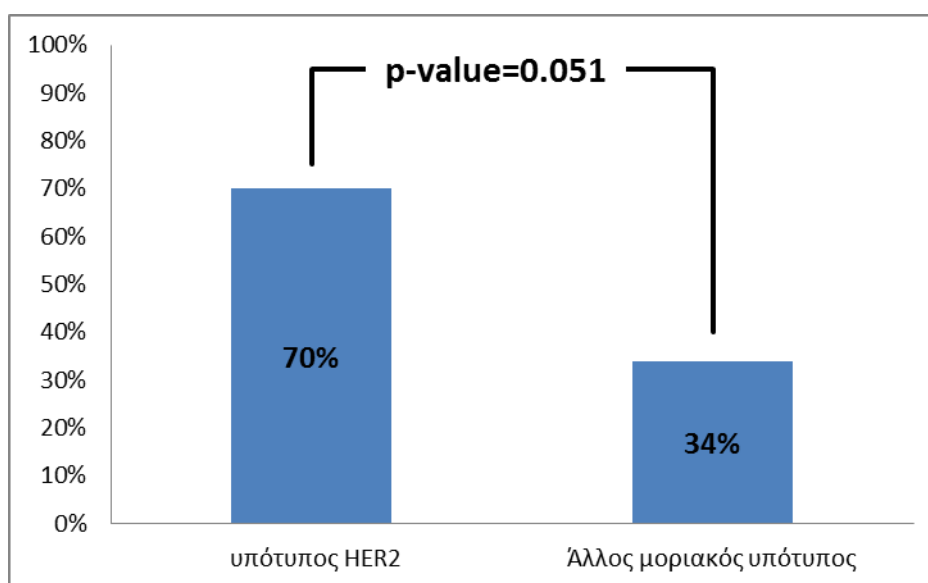
4.1.10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *LEF1* ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Από την ανάλυση των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA του δεύτερου υπό μελέτη μεταγραφικού παράγοντα, *LEF1*, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα mRNA σε 39 από τα 100 δείγματα καρκίνου μαστού (39%), αυξημένα επίπεδα mRNA σε 31 από τα 100 δείγματα (31%), ενώ σε 30 δείγματα (30%), δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στα επίπεδα mRNA (Γράφημα 18).



Γράφημα 18. Τα επίπεδα έκφρασης mRNA το γονιδίου *LEF1*.

Από την συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του mRNA του μεταγραφικού παράγοντα LEF1 με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρατηρήθηκε οριακή στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον μοριακό υπότυπο.. Παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης του LEF1 σε 70% (9/13) ασθενών με μοριακό υπότυπο HER2 σε αντίθεση με 34% (30/87) ασθενών που παρουσίαζαν άλλον μοριακό υπότυπο ($p=0,051$) (Γράφημα 19).



Γράφημα 19. Οριακή συσχέτιση των μειωμένων επιπέδων mRNA γονιδίου *LEF1* σε σχέση με τον μοριακό υπότυπο HER2.

Τέλος δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης mRNA του μεταγραφικού παράγοντα LEF1 και των υπολοίπων κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των ασθενών.

Οι συσχετίσεις των επιπέδων mRNA του LEF1 με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά καταγράφονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10. Συσχέτιση των σχετικών επιπέδων mRNA του TCF4 με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά.

	Αυξημένα επίπεδα mRNA (fold change>2,5)	Μη αλλαγή των επιπέδων mRNA	Μειωμένα επίπεδα mRNA	P value
Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά				
<u>Ηλικία</u>				
Ηλικία ≤65 έτη	14/46 (30%)	15/46 (33%)	17/46 (37%)	0,864
Ηλικία >65 έτη	17/54 (32%)	15/54 (28%)	22/54 (40%)	
Σύνολο 100				
<u>Ιστολογικός τύπος</u>				
Πορογενές	23/81 (28%)	26/81 (32%)	32/81 (40%)	0,503
Λοβιακό	6/14 (43%)	3/14 (21%)	5/14 (36%)	
Μυελοειδές	1/1 (100%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	
Μικτό	0/2 (0%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	
Θηλώδες	2/2 (100%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	
Σύνολο 100				
<u>Βαθμός διαφοροποίησης (Grade)</u>				
Grade 1 & 2	8/22 (36%)	3/22 (14%)	11/22 (50%)	0,161
Grade 3	23/78 (29%)	27/78 (35%)	28/78 (36%)	
Σύνολο 100				
<u>Προγνωστικό στάδιο</u>				
I&II	18/46 (40%)	12/46 (26%)	16/46 (34%)	0,267
III&IV	13/54 (24%)	18/54 (33%)	23/54 (43%)	
Σύνολο 100				
<u>Μέγεθος πρωτοπαθούς όγκου</u>				
T1/T2	24/74 (32%)	24/74 (32%)	26/74 (36%)	0,399
T3/T4	7/26 (27%)	6/26 (23%)	13/26 (50%)	
Σύνολο 100				
<u>Επιγώριοι λεμφαδένες</u>				
Παρουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες N	16/57 (38%)	21/57 (37%)	20/57 (35%)	0,228
Απουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες (N0)	15/43 (35%)	9/43 (21%)	19/43 (44%)	
Σύνολο 100				
<u>Ορμονικοί υποδοχείς (ER,PR, HER2)</u>				
ER+	24/68 (35%)	20/68 (30%)	24/68 (35%)	0,361
ER-	7/32 (22%)	10/32 (31%)	15/32 (47%)	
Σύνολο 100				
PR+	21/64 (33%)	21/64 (33%)	22/64 (34%)	0,442
PR-	10/36 (28%)	9/36 (25%)	17/36 (47%)	
Σύνολο 100				
HER2 +	14/54 (26%)	16/54 (30%)	24/54 (44%)	0,392

HER2 -	17/46 (37%)	14/46 (30%)	15/46 (33%)	
Σύνολο 100				
<u>Μοριακοί υπότυποι</u>				
Luminal A	14/31 (45%)	9/31 (29%)	8/31 (26%)	0,051
Luminal B	10/46 (22%)	16/46 (35%)	20/46 (43%)	
Τριπλά αρνητικός	4/10 (40%)	4/10 (40%)	2/10 (20%)	
Υπότυπος HER2	1/13 (8%)	3/13 (23%)	9/13 (70%)	
Σύνολο 100				

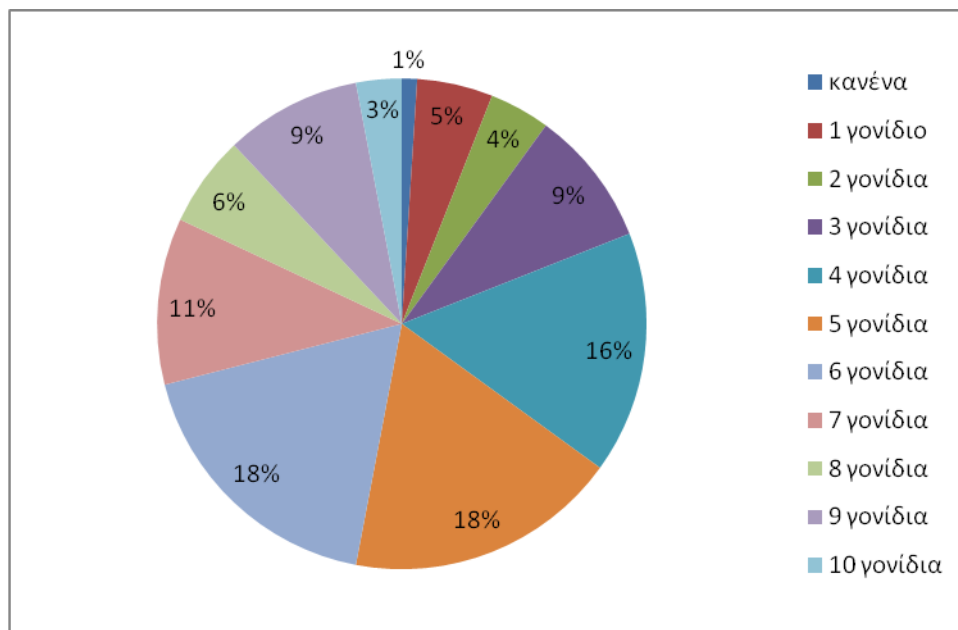
4.2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ WNT

Από την στατιστική ανάλυση μεταξύ των υπό μελέτη γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι Wnt παρατηρήθηκαν γραμμικές συσχετίσεις οι οποίες παρατίθενται στον Πίνακα 11.

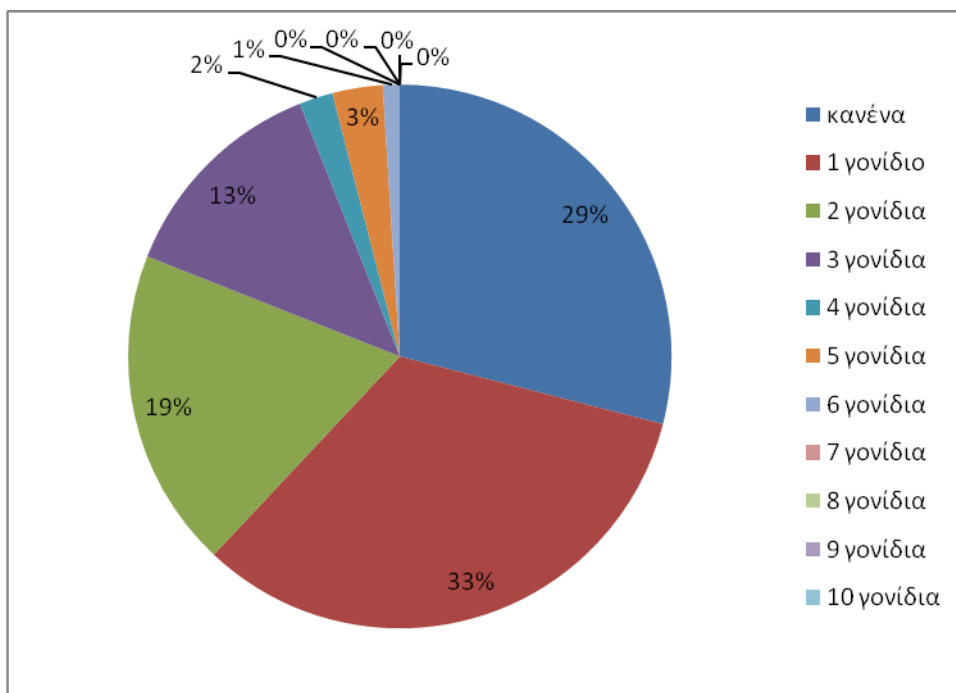
Πίνακας 11. Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των υπό μελέτη γονιδίων.

Γονίδια	Τιμή P value	Συντελεστής R
<i>WNT3/WNT5A</i>	<0,01	0,540
<i>WNT3/GSK3B</i>	<0,01	0,525
<i>WNT3/CTNNB1</i>	<0,01	0,510
<i>WNT5A/FZD6</i>	<0,01	0,464
<i>WNT5A/CTNNB1</i>	<0,01	0,408
<i>CTNNB1/GSK3B</i>	<0,01	0,464
<i>FZD6/CTNNB1</i>	<0,01	0,401
<i>FZD7/LEF1</i>	<0,01	0,351
<i>LEF1/GSK3B</i>	<0,01	0,333
<i>WNT3/FZD6</i>	<0,01	0,301
<i>WNT5A/GSK3B</i>	<0,01	0,292
<i>WNT5A/LEF1</i>	<0,01	0,269
<i>FZD4/TCF4</i>	<0,01	0,262
<i>FZD6/LEF1</i>	<0,01	0,260
<i>TCF4/LEF1</i>	0,017	0,239
<i>WNT2/LEF1</i>	0,017	0,238
<i>FZD6/GSK3B</i>	0,020	0,232
<i>LEF1/CTNNB1</i>	0,046	0,200
<i>FZD4/GSK3B</i>	0,047	0,199

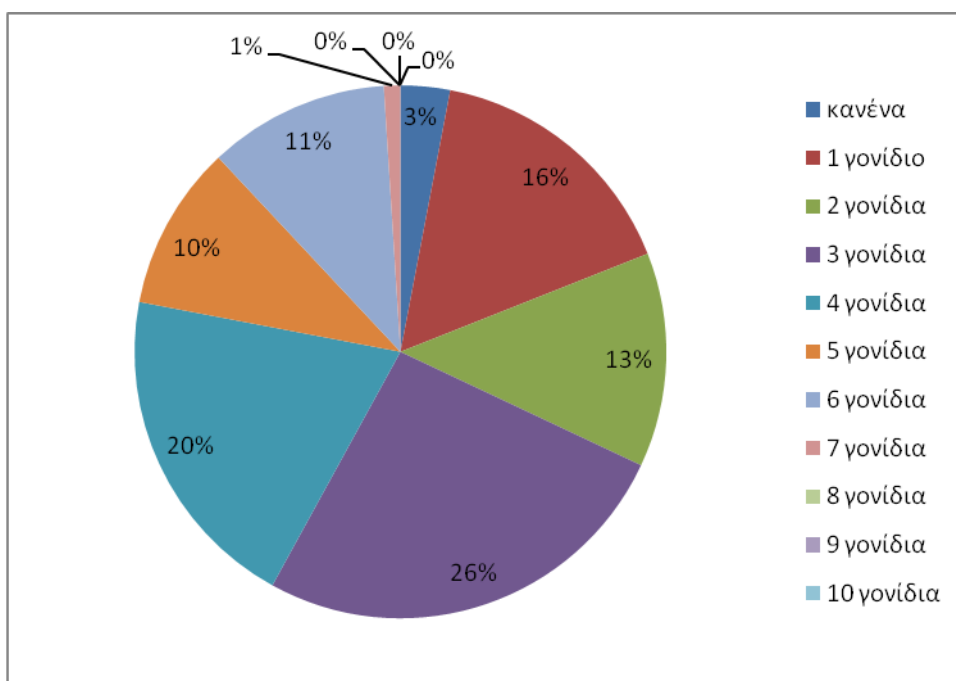
Στα παρακάτω γραφήματα (Γράφημα 21-23), παρουσιάζονται τα ποσοστά των δειγμάτων καρκίνου που εκφράζουν σε μειωμένα, αυξημένα ή σταθερά επίπεδα mRNA ταυτόχρονα 1 έως 10 από τα υπό μελέτη γονίδια του μονοπατιού Wnt.



Γράφημα 21. Το ποσοστό δειγμάτων με μειωμένα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι Wnt.



Γράφημα 22. Το ποσοστό δειγμάτων με αυξημένα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι Wnt.



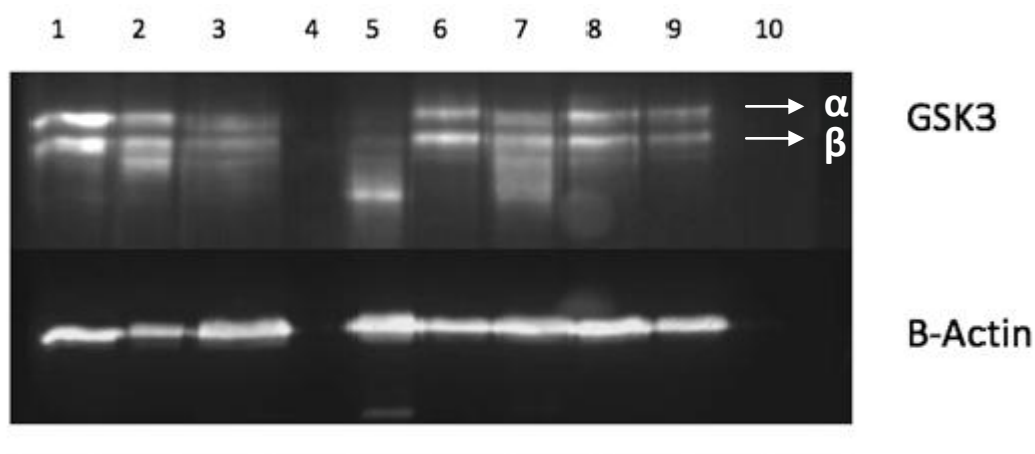
Γράφημα 23. Το ποσοστό δειγμάτων με σταθερά επίπεδα έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι Wnt.

4.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ Β-ΚΑΤΕΝΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ GSK3-B

Μετά την ανάλυση των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA σημαντικών γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης, ακολούθησε η μελέτη ορισμένων γονιδίων σε επίπεδο πρωτεϊνών. Ειδικότερα για το γονίδιο *GSK3-B* το οποίο εμπλέκεται στο σύμπλοκο αποικοδόμησης της β-κατενίνης ακολούθησε η μελέτη της πρωτεΐνης με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωμα κατά Western και για το γονίδιο *CTNNB1* το οποίο κωδικοποιεί τη β-κατενίνη πραγματοποιήθηκε η μελέτη της πρωτεΐνης με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας.

4.3.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΜΑ WESTERN ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ GSK3-B

Μετά τη μελέτη των επιπέδων mRNA της κινάσης GSK3-β πραγματοποιήθηκε μελέτη των επιπέδων πρωτεΐνης σε δείγματα καρκίνου μαστού. Για τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης της κινάσης GSK3-β πραγματοποιήθηκε η μέθοδος ανοσοαποτύπωμα κατά Western. Συνολικά αναλύθηκαν 28 δείγματα καρκίνου μαστού για τα οποία υπήρχε διαθέσιμος ιστός. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε αναγνωρίζει και τις δυο isoμορφές (α/β) της GSK3-, αλλά μπορούμε να διακρίνουμε την GSK3-β στη χαμηλότερη ζώνη



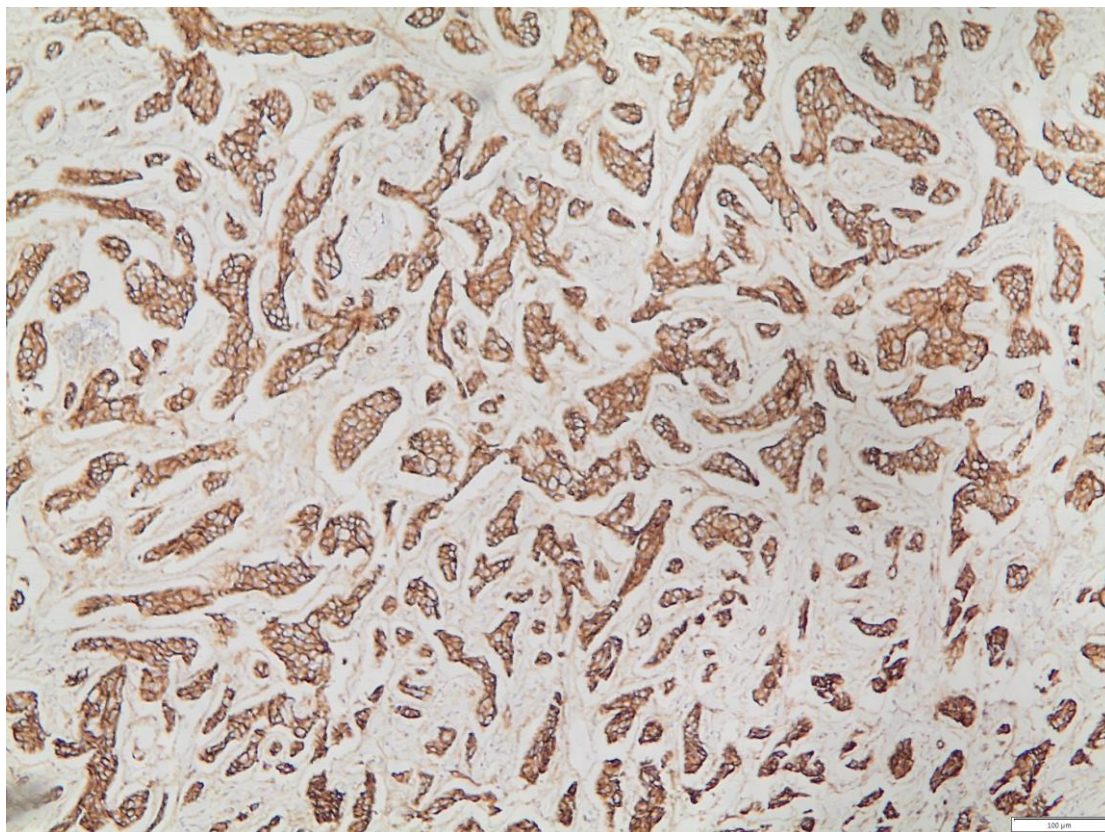
Εικόνα 1. Ανοσοαποτύπωμα κατά Western, 1: καρκινική κυτταρική σειρά SW-480, 4: Ladder, 2-3, 5-9 δείγματα καρκίνου μαστού, 10: Loading Buffer.

Παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης GSK3-β σε 22 δείγματα καρκίνου μαστού (78%).

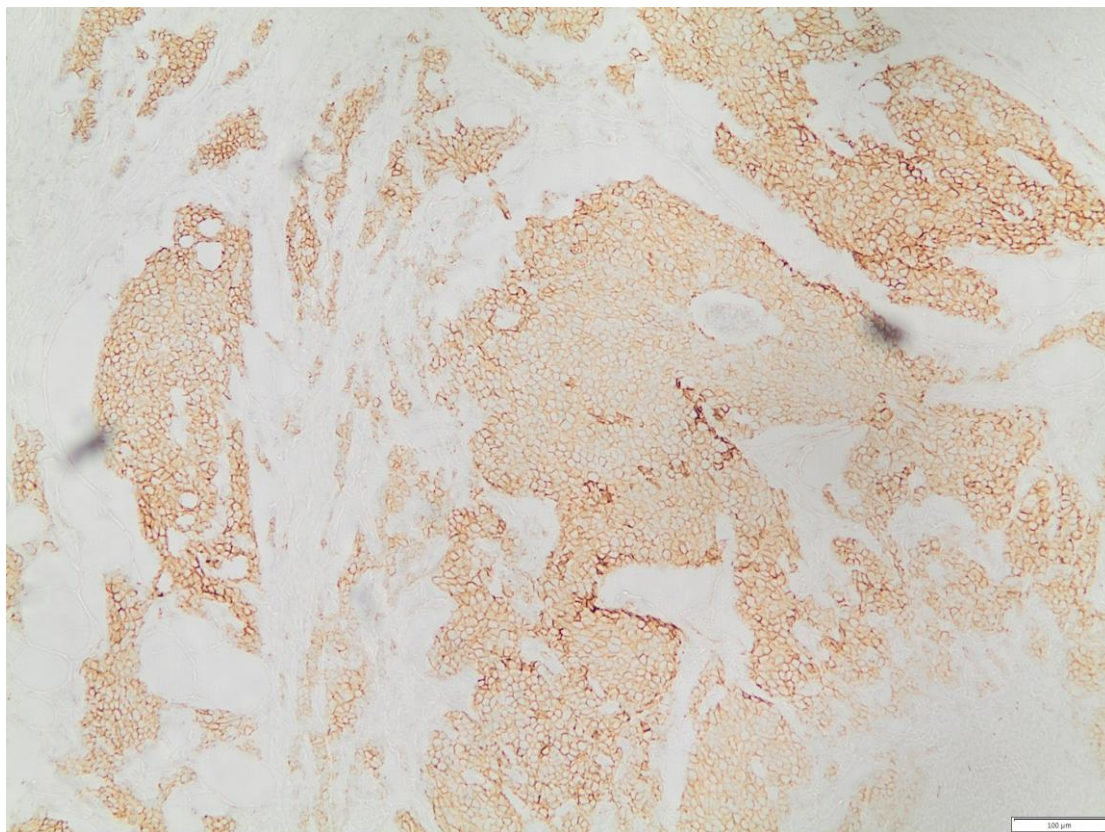
4.3.2. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ Β-ΚΑΤΕΝΙΝΗΣ

Η μελέτη των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης β-κατενίνη πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας και αξιολογήθηκε ανάλογα με την κυτταρική της εντόπιση (μεμβρανική, κυτταροπλασματική, πυρηνική). Ελήφθησαν αχρωμάτιστες τομές από 31 δείγματα τα οποία είχαν επαρκή καρκινικό ιστό.

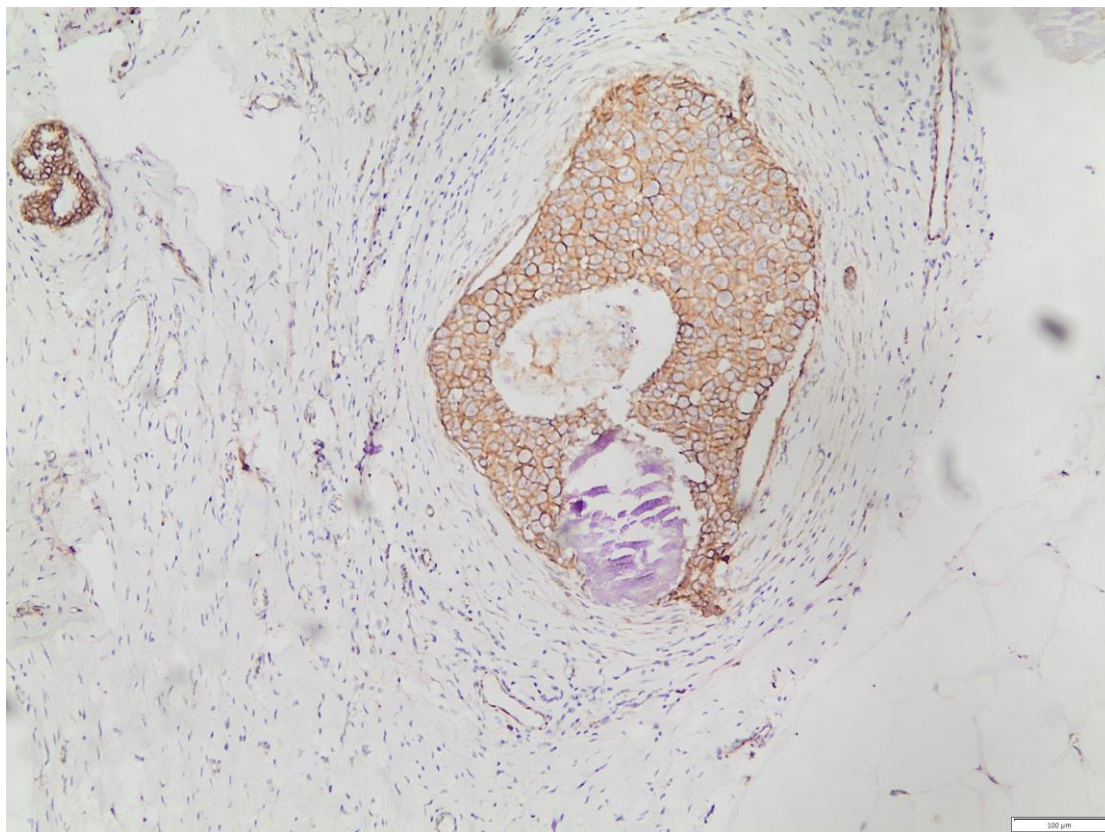
Στα δείγματα καρκίνου μαστού παρατηρήθηκε στην πλειοψηφία των δειγμάτων χαμηλή μεμβρανική έκφραση της β-κατενίνης (65%, 20 από τα 31), ενώ υψηλά κυτταροπλασματικά επίπεδα της β-κατενίνης παρατηρήθηκαν σε ποσοστό 31% (4 από τα 31). Δεν παρατηρήθηκε η παρουσία της β-κατενίνης στο πυρήνα των καρκινικών δειγμάτων. Στις Εικόνες 2-7 παρουσιάζεται η ανοσοϊστοχημική χρώση δειγμάτων καρκίνου μαστού.



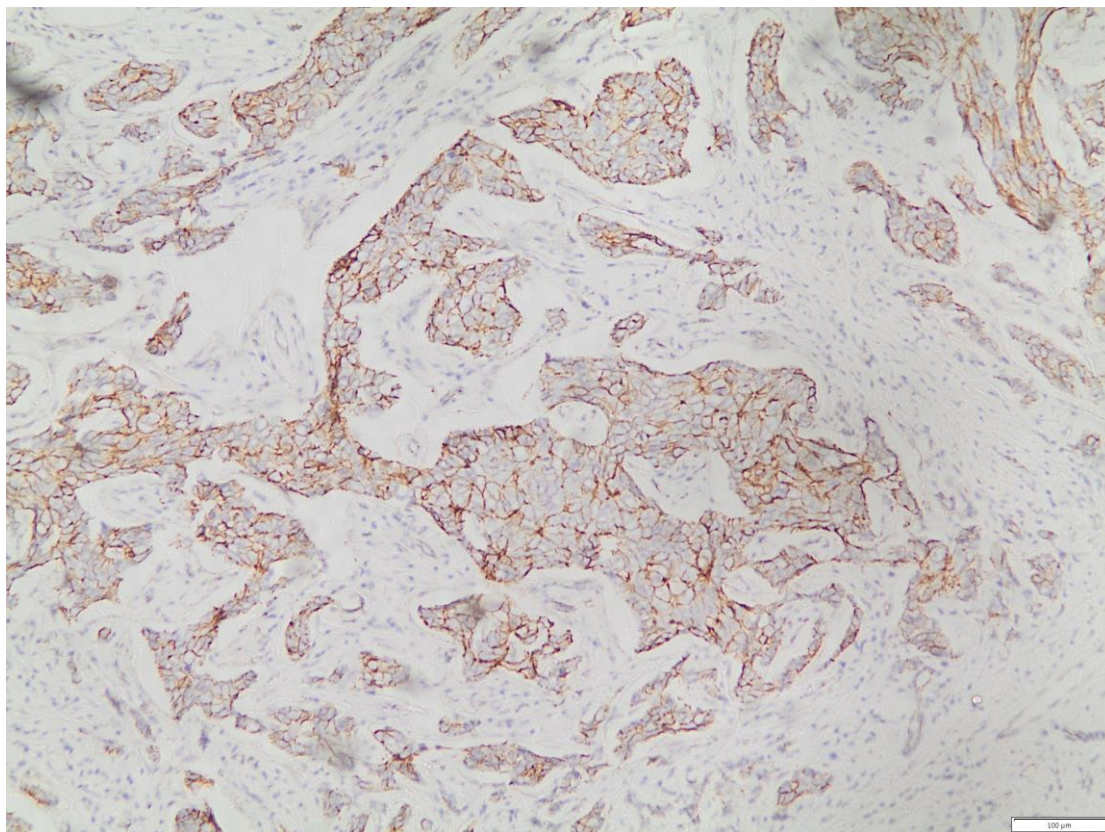
Εικόνα 2. Υψηλή μεμβρανική έκφραση της β-κατενίνης σε δείγμα με διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μαστού (100X).



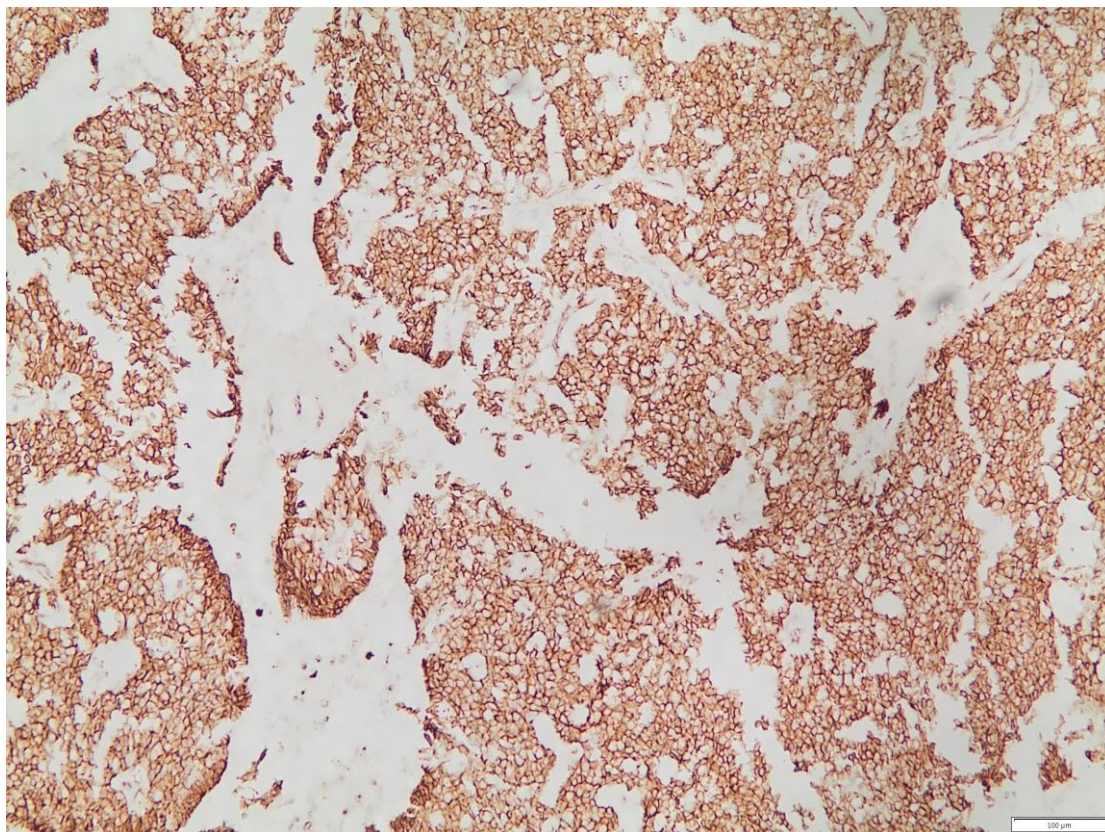
Εικόνα 3. Υψηλή μεμβρανική έκφραση και χαμηλή κυτταροπλασματική έκφραση της β-κατενίνης σε δείγμα με διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μαστού (100X).



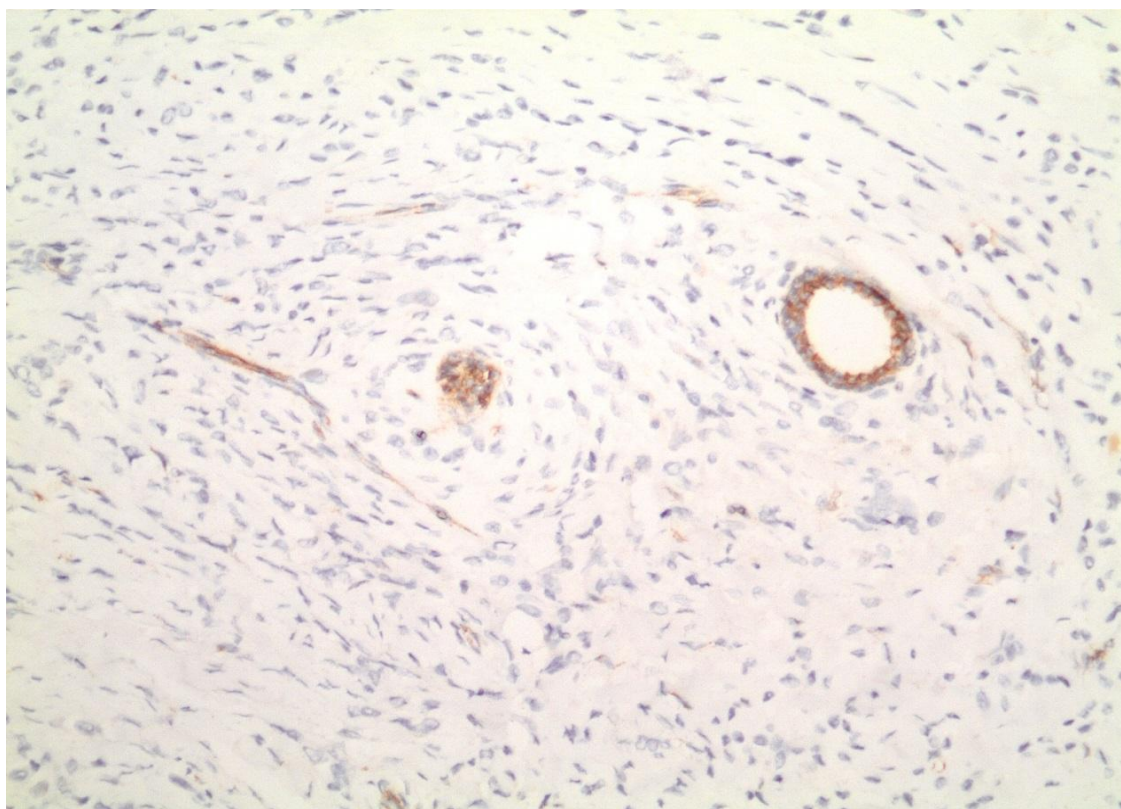
Εικόνα 4. In situ καρκίνωμα μαστού με υψηλή μεμβρανική έκφρασης και μέτρια κυτταροπλασματική (100X).



Εικόνα 5. Υψηλή μεμβρανική και καθόλου κυτταροπλασματική έκφραση της β-κατενίνης σε δείγμα με διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μαστού (100X).



Εικόνα 6. Υψηλή μεμβρανική και μέτρια κυτταροπλασματική έκφραση της β-κατενίνης σε διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μαστού (100X).



Εικόνα 7. Απουσία έκφρασης της β-κατενίνης τόσο στην μεμβράνη όσο και στο κυτταρόπλασμα σε δείγμα με διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα (200X).

4.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ APC

Σε παλαιότερη μελέτη του εργαστηρίου που πραγματοποιήθηκε για τη μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου APC στον καρκίνο μαστού, παρατηρήθηκε άφθονη μεθυλίωση σε 25 από 46 δείγματα μαστού (Tserga et al., 2011). Πιο αναλυτική παρατηρήθηκε άφθονη μεθυλίωση σε 17 από 31 (54,83%) διηθητικά πορογενή καρκινώματα μαστού και σε 6 από τα 8 (75%) διηθητικά λοβιακά καρκινώματα μαστού. Στην παρούσα εργασία ακολούθησε στατιστική ανάλυση των επιπέδων mRNA των υπό μελέτη γονιδίων του μονοπατιού με την παρουσία ή απουσία μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου APC.

Αρχικά, έγινε συσχέτιση των σχετικών επιπέδων mRNA του γονιδίου WNT2 και παρατηρήθηκε μεθυλίωση του γονιδίου APC στα 14 από τα 23 δείγματα (61%) με μειωμένα επίπεδα έκφρασης WNT2 και στα 3 από τα 4 δείγματα (75%) με αυξημένα επίπεδα έκφρασης. Στη συνέχεια, ακολούθησε συσχέτιση με τα επίπεδα mRNA των υπολοίπων προσδετών. Πιο αναλυτικά, 20 από τα 37 δείγματα (54%) με αυξημένα επίπεδα mRNA του προσδέτη έχει μεθυλίωση του γονιδίου. Επιπλέον, 3 από τα 5 δείγματα (60%) με αυξημένα επίπεδα mRNA του WNT2 είχαν υποστεί μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου APC, ενώ 7 από τα 14 δείγματα (50%) με μειωμένα επίπεδα mRNA του WNT2 παρουσίασαν μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου APC. Επιπρόσθετα, 22 από τα 37 δείγματα (54%) με μειωμένα επίπεδα mRNA του υποδοχέα Fzd4 είχαν υποστεί μεθυλίωση του APC. Ως προς τη συσχέτιση με τον δεύτερο υποδοχέα Fzd6, παρατηρήθηκε μεθυλίωση του υποκινητή σε 4 από τα 8 δείγματα (50%) με αυξημένα επίπεδα mRNA και σε 7 από τα 16 δείγματα (44%) με μειωμένα επίπεδα έκφρασης. Επίσης, 16 από τα 33 δείγματα (48%) με μειωμένα επίπεδα έκφρασης mRNA του υποδοχέα Fzd7 παρουσίασαν μεθυλίωση του υποδοχέα του υποκινητή του γονιδίου APC. Από τη συσχέτιση των σχετικών mRNA επιπέδων του γονιδίου CTNNB1 με τη μεθυλίωση του γονιδίου APC προέκυψε ότι 6 δείγματα από τα 14 (43%) με αυξημένα επίπεδα mRNA παρουσίασαν μεθυλίωση. Αντίθετα, 2 από τα 6 δείγματα (33%) με αυξημένα επίπεδα mRNA της β-κατενίνης είχαν απουσία μεθυλίωσης του υποκινητή. Στη συνέχεια, μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου APC καταγράφηκαν σε 3 από τα 4 δείγματα (75%) με αυξημένα επίπεδα έκφρασης

της GSK3-β και σε 7 από τα 12 δείγματα (58%) με μειωμένα επίπεδα έκφρασης της GSK3-β. Τέλος, από τη συσχέτιση των σχετικών mRNA επιπέδων των μεταγραφικών παραγόντων παρατηρήθηκε μεθυλίωση του υποκινητή *APC* σε 2 δείγματα με αυξημένα επίπεδα mRNA του γονιδίου *TCF4* και σε 20 από τα 37 δείγματα (54%) με μειωμένα επίπεδα mRNA. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *APC* σε 5 από τα 11 δείγματα (45%) με αυξημένα επίπεδα mRNA του γονιδίου *LEF1* και σε 9 από τα 18 δείγματα (50%) με μειωμένα επίπεδα mRNA. Επιπλέον, 5 από τα 8 δείγματα (62,5%) με μειωμένα σχετικά mRNA επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα *TCF4* είχαν μεθυλιωμένο το γονίδιο *APC*, ενώ στα υπόλοιπα 3 δείγματα ήταν μη μεθυλιωμένο (37,5%). Επίσης, μεθυλίωση παρατηρήθηκε σε 2 από τα 5 δείγματα (40%) με αυξημένα επίπεδα mRNA του γονιδίου *LEF1*, ενώ στα υπόλοιπα 3 δείγματα (60%) δεν υπήρξε μεθυλίωση του υποκινητή.

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης mRNA των υπό μελέτη γονιδίων με την παρουσία ή απουσία μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *APC*.

4.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ PI3K/AKT.

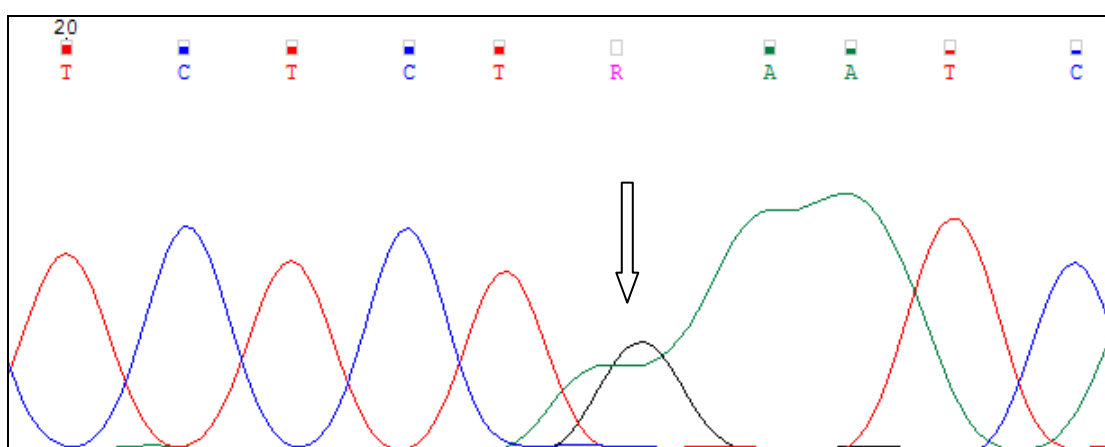
Μελετήθηκαν 81 δείγματα καρκίνου μαστού για μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA* και συγκεκριμένα στα εξώνια 9 και 20. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου με ανάλυση καμπύλης τήξης υψηλής ευκρίνειας. Για τα δείγματα που φαίνονταν να φέρουν μεταλλαγή ακολούθησε για επιβεβαίωση αλληλούχιση κατά Sanger (Εικόνες 8 & 9).

Παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA* σε ποσοστό 35% (28 από τα 81 δείγματα καρκίνου μαστού). Πιο αναλυτικά σε 16 από τα 28 δείγματα είχαν μεταλλαγή στο εξώνιο 9 του γονιδίου *PIK3CA* (20%), ενώ τα υπόλοιπα είχαν μεταλλαγή στο εξώνιο 20 του γονιδίου (12 από τα 28 δείγματα, 15%).

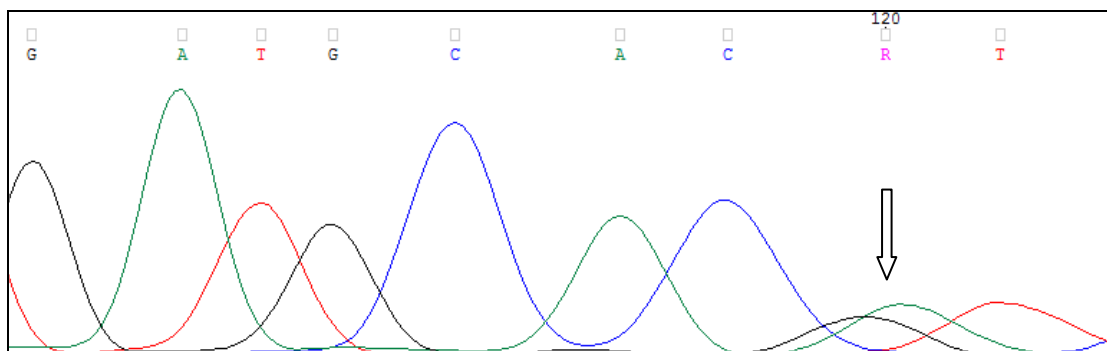
Η πιο συχνή μεταλλαγή που ανιχνεύθηκε στο εξώνιο 9 του γονιδίου *PIK3CA* είναι η c. 1624G>A (p.Glu542Lys) σε ποσοστό 53% (9 από τα 16 δείγματα), ακολουθεί η μεταλλαγή c. 1633 G>A (p.Glu545Lys) σε ποσοστό 20% (3 από τα 16 δείγματα), ενώ σε δύο δείγματα ανιχνεύθηκε η μεταλλαγή c.1634 A>G. Σε ένα δείγμα ανιχνεύθηκε η μεταλλαγή c.1637A>C (p.Gln546Pro) και σε ένα δείγμα βρέθηκε η μεταλλαγή c.1636C>A (p.Gln546Lys).

Στο εξώνιο 20 του γονιδίου *PIK3CA* η πιο συχνή μεταλλαγή που ανιχνεύθηκε ήταν η c.3140 A>G (p.His1047Arg) σε ποσοστό 92% (11 από τα 12 δείγματα) και σε ένα δείγμα ανιχνεύθηκε η μεταλλαγή c.3129G>A (p.Met1043Ile). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των μεταλλαγών στο γονίδιο *PIK3CA* με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Στη συνέχεια ακλούθησε στατιστική ανάλυση με σκοπό να βρεθεί εάν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση των μεταλλαγών που παρουσιάζονται στο γονίδιο *PIK3CA* με τα επίπεδα έκφρασης των συστατικών του μονοπατιού Wnt που μελετήθηκαν. Παρατηρήθηκε οριακή στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας μεταλλαγών στο γονίδιο *PIK3CA* και των επιπέδων έκφρασης της κινάσης GSK3-β. Πιο αναλυτικά παρατηρήθηκε ότι 3 από τα 6 δείγματα είχαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης της GSK3-β, παρουσίαζαν μεταλλαγή στο εξώνιο 9 (p=0,088). Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας μεταλλαγών του γονιδίου το οποίο εμπλέκεται στο μονοπάτι PIK3K/AKT και των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA των υπό μελέτη γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι Wnt.



Εικόνα 8. Το αποτέλεσμα της αλληλούχισης δίνεται με τη μορφή χρωματογραφήματος. Παρατηρείται η μεταλλαγή 1624G>A (με το βέλος) στο εξώνιο 9 του γονιδίου *PIK3CA*.



Εικόνα 9. Παρατηρείται η μεταλλαγή 3140 A>G (με το βέλος) στο εξόνιο 20 του γονιδίου *PIK3CA*.

4.6. ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ mRNA ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ακολουθεί συγκεντρωτικός πίνακας (Πίνακας 12) με τα αποτελέσματα της ανάλυσης των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *WNT2*, *WNT3*, *WNT5A*, *FRIZZLED 4*, *FRIZZLED 6*, *FRIZZLED 7*, *CTNNB1*, *GSK3-B*, *TCF4*, *LEF1* στο σύνολο των δειγμάτων καρκίνου μαστού.

Πίνακας 12. Τα επίπεδα έκφρασης των μελετώμενων γονιδίων του μονοπατιού Wnt.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	<i>WNT2</i>	<i>WNT3</i>	<i>WNT5 A</i>	<i>FZD4</i>	<i>FZD7</i>	<i>FZD6</i>	<i>CTN NB1</i>	<i>GSK3- B</i>	<i>TCF4</i>	<i>LEF1</i>
6	-	↑	↓	↓	↓	↑	-	-	↓	↓
14	↓	↑	-	↓	↓	-	↑	↑	↓	-
16	↓	-	↑	↓	↓	↓	-	↓	↓	-
18	↓	↑	↑	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓
20	-	↑	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-
24	-	↑	↓	↓	↓	↓	-	-	↓	↑
28	↓	↑	↓	↓	↓	↑	-	-	↓	-
30	-	↑	-	↓	↓	-	-	↑	↓	-
34	-	↑	-	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓

38	-	↑	-	↓	↓	↑	↑	-	↓	↓
46	↓	↑	↓	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓
50	↓	↑	-	↓	↓	↓	-	-	↓	↓
54	↑	↑	-	↓	↓	↓	-	↓	↓	-
62	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↑	-	↓	↓
64	↑	↑	-	↓	↓	-	↑	↓	↓	-
68	↓	↑	-	↓	↓	-	↑	-	↓	-
70	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↑	-	↓	↓
72	↓	↑	↓	↓	↓	-	-	-	↓	↓
76	-	↑	↓	↓	↓	↓	↓	-	↓	↓
78	-	↑	↓	↓	↓	-	-	-	↓	↓
80	-	↑	-	↓	↓	↑	-	↓	↓	↓
82	-	-	-	↓	↓	↑	↑	-	↓	↓
84	-	↑	-	-	↓	-	↑	-	-	↑
86	↓	↑	-	↓	↓	-	-	-	↓	↓
88	↓	↑	↓	↓	↓	↑	↑	-	↓	↓
94	↓	↑	↑	↓	↓	-	↑	-	↓	↓
98	-	↑	-	-	↓	-	↑	-	↓	-
104	↓	↑	↓	↓	↓	-	-	↑	↓	↑
106	↑	↑	↓	↓	↓	-	-	↓	↓	-
108	↓	↑	-	↓	↓	↑	↓	-	↓	↑
112	-	↑	↑	-	↓	↓	-	-	↓	-
116	-	↑	-	-	↓	-	↑	↓	↓	↑
118	↓	-	-	↓	-	↓	-	-	↓	↑
126	-	↑	-	↓	↓	-	↑	↓	↓	↑
128	-	↑	↑	↓	↓	↑	↑	-	↓	↑
164	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓	-	↓	↓

168	↓	-	-	↓	↓	↓	-	↑	↓	↓
178	↓	↑	-	↓	↓	↓	-	-	↓	↑
180	↓	↑	-	↓	↓	-	-	↓	↓	-
184	↓	↑	↓	↓	-	↓	↓	↓	↓	↓
188	↓	↑	-	↓	-	-	-	-	↓	-
196	↓	↑	↓	↓	↓	-	↑	-	↓	-
198	-	↑	↑	-	-	-	↑	-	-	↑
200	↓	-	-	↓	-	↓	↓	↓	↓	↓
214	-	↑	-	-	-	↑	↑	↑	↓	↑
240	↓	-	↓	↓	↑	↓	-	-	-	↑
258	↓	↑	-	↓	-	-	↑	-	↓	↑
282	-	↑	↑	-	↑	-	↑	-	↓	↑
308	-	↑	↑	↓	-	↑	↑	↑	↓	↑
310	↓	↑	-	↓	-	-	-	-	↑	↑
318	↓	↑	↑	↓	↓	-	-	-	↑	↑
322	-	-	-	↓	-	-	-	-	↑	↑
354	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-	-	↓	↓
356	↓	↓	-	↓	↓	-	↓	-	↓	-
358	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-
364	-	-	↓	↓	↓	↓	-	-	-	-
372	↓	↓	↓	-	↓	↓	↑	-	-	↓
374	↑	-	↓	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓
406	↓	↓	-	↓	↓	-	-	-	↓	↓
412	↓	↓	↓	↓	↓	-	↓	-	↓	↑
414	-	-	↑	-	↓	-	-	↑	-	↑
416	-	↓	↓	↓	↓	↓	-	-	-	↑
418	-	-	↓	-	↓	↓	-	-	↑	-

424	↓	↓	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
428	↑	-	↓	-	-	↓	-	-	↓	↓
432	-	↑	↓	-	-	↓	-	-	-	↑
434	↓	↑	↓	-	↓	↓	-	-	-	↓
436	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
462	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
464	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-	↓
468	-	-	↓	↓	↓	↓	-	-	-	↑
472	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
488	↓	↓	↓	-	↓	-	↓	↓	↓	-
512	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-
524	-	↓	↓	↓	↓	↓	-	↓	↑	↑
526	-	↓	↓	-	↓	↓	-	↓	-	↓
544	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-
560	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑
562	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓
700	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
702	↓	↓	↓	↓	↓	-	-	↓	↓	↓
706	↓	-	↓	↓	↓	-	-	↓	-	↓
708	↓	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
710	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓
664	-	↓	-	↓	↑	↑	↓	-	↓	↑
666	-	↓	-	↓	-	↑	↓	-	↓	-
668	-	-	-	↓	-	-	↓	-	↓	↑
670	-	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓	↓	↑
672	-	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓	↓	-
674	↓	↓	↓	↓	↓	-	↓	-	↓	↑

676	↓	↓	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓	↑
678	↓	↓	↓	↓	↑	↓	-	-	-	-
680	↓	↓	↓	↓	-	-	-	-	↓	-
682	↓	↓	↓	↓	↓	-	-	-	↓	-
684	↓	-	↓	↓	-	↑	-	↓	↓	↓
686	-	↓	↓	↓	-	-	-	-	↓	-
690	↓	↓	↓	↓	-	-	-	-	↓	-
692	↓	↓	↓	↓	-	-	-	↓	↓	-
694	-	↓	↓	↓	-	-	-	↓	-	-
696	-	↓	↓	↓	↑	-	-	↓	↓	↑

(↑: αυξημένα επίπεδα έκφρασης mRNA, ↓: μειωμένα επίπεδα έκφρασης mRNA, - : σταθερά επίπεδα έκφρασης mRNA)

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt ρυθμίζει ένα πλήθος θεμελιωδών κυτταρικών λειτουργιών στους φυσιολογικούς ιστούς, ενώ η απορρύθμιση του είναι ένα συχνό συμβάν στην καρκινογένεση (Paul Polakis, 2012). Η σύνδεση προσδέτη-υποδοχέα ρυθμίζει τη σηματοδότηση Wnt που διαμεσολαβείται από 19 προσδέτες Wnts, οι οποίοι δεσμεύονται σε 10 υποδοχείς Frizzleds. Παρόλο που έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στην αποσαφήνιση της αλληλεπίδρασης Wnt/Frizzled, η ειδικότητα των Wnt/Frizzled ζευγαριών και η καθοδική σηματοδότηση δεν έχουν συστηματικά μελετηθεί (Voloshanenko et al, 2017, Dijksterhuis et al, 2014). Τα τελευταία χρόνια, το μονοπάτι Wnt αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο αντικαρκινικό θεραπευτικό στόχο. Έχουν αναπτυχθεί διάφορα αντισώματα και πεπτίδια τα οποία μπλοκάρουν τους προσδέτες Wnts, τους υποδοχείς Frizzleds και μόρια καθοδικά του μονοπατιού και αρκετά από αυτά τα θεραπευτικά στοχευμένα μόρια δοκιμάζονται σε τρέχουσες κλινικές δοκιμές (Kahn, 2014).

Η παρουσία μεταλλαγών σε σηματοδοτικά μόρια όπως η β-κατενίνη, APC, ή Axin είναι ένας από τους πιο κοινούς μηχανισμούς απορρύθμισης του συγκεκριμένου σηματοδοτικού μονοπατιού στον καρκίνο, όμως ελάχιστες τέτοιες μεταλλαγές έχουν ανιχνευθεί στον καρκίνο μαστού (Polakis, 2000, Smalley et al., 2001). Παρόλα αυτά έχουν παρατηρηθεί μεταβολές των επιπέδων έκφρασης ορισμένων μορίων του μονοπατιού, οι οποίες οδηγούν σε απορρύθμιση της σηματοδότησης και σχετίζονται με την καρκινογένεση του μαστού και αυτό αποδεικνύεται με την παρατήρηση αυξημένων επιπέδων της κυτταροπλασματικής β-κατενίνης, τη παρουσία της στον πυρήνα και την έκφραση γονιδίων-στόχων του μονοπατιού Wnt (Brown et al., 2001, Howe L. & Brown A., 2004).

Ο σκοπός της διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA γονιδίων των προσδετών και υποδοχέων καθώς και σηματοδοτικών μορίων αλλά και μεταγραφικών παραγόντων του μονοπατιού Wnt στον καρκίνο μαστού. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης mRNA των προσδετών WNT2, WNT3, WNT5A, των υποδοχέων FRIZZLED 4 (FZD4), FRIZZLED 6 (FZD6) και FRIZZLED 7 (FZD7), της β-κατενίνης, της κινάσης GSK3-β (μέλος του συμπλόκου της αποικοδόμησης της β-κατενίνης) και τέλος των μεταγραφικών παραγόντων TFC4 και LEF1 με την εφαρμογή της PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) σε 100 δείγματα καρκίνου μαστού. Έπειτα ακολούθησε

στατιστική ανάλυση για τη συσχέτιση των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA των παραπάνω γονιδίων με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών όπως ηλικία, ιστολογικός τύπος, βαθμός διαφοροποίησης, μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου, επιχώριες λεμφαδενικές μεταστάσεις, προγνωστικό στάδιο και με την ανοσοϊστοχημική έκφραση των ορμονικών υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης και του υποδοχέα HER-2 και με τον μοριακό υπότυπο. Επιπρόσθετα, έγινε γραμμική συσχέτιση των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA των υπό μελέτη γονιδίων. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ενδεικτική μελέτη των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών β-κατενίνης με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας και της κινάσης GSK3-β με ανοσοαποτύπωμα κατά Western σε μικρό αριθμό δειγμάτων για τα οποία υπήρχε διαθέσιμος ιστός. Επιπλέον, για την συσχέτιση των μονοπατιών Wnt και PI3K/AKT στον καρκίνο μαστού έγινε ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου *PIK3CA* και στατιστική συσχέτιση των αποτελεσμάτων. Τέλος, ακολούθησε συσχέτιση των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA των υπό μελέτη μορίων του μονοπατιού Wnt με την παρουσία μεθυλίωσης του υποκινητή γονιδίου *APC* από αποτελέσματα προηγούμενης έρευνας.

ΣΧΕΤΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ WNT2, WNT3, WNT5A

Στη παρούσα μελέτη των επιπέδων mRNA του προσδέτη WNT2 παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης στους μισούς ασθενείς, ενώ η αυξημένη έκφραση ήταν αρκετά σπάνιο γεγονός. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προηγούμενη μελέτη RNA με τη μέθοδο *in situ* υβριδισμού που αναφέρει χαμηλή έκφραση του προσδέτη WNT2 στο φυσιολογικό επιθήλιο μαστού καθώς και στα διηθητικά καρκινώματα (Milovanovic et al., 2004). Σε δυο προγενέστερες μελέτες mRNA σε καρκινικές σειρές μαστού και σε καρκινώματα μαστού δεν αναφέρθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του προσδέτη WNT2, ένα γεγονός που καταγράφηκε σε μια μικρή υποομάδα των ασθενών που μελετήσαμε (Huguet et al., 1994, Benhaj et al., 2006). Σε μελέτη με δεδομένα που έχουν ληφθεί από τη βάση δεδομένων cBioPortal και αφορούν τους ασθενείς που έχουν μελετηθεί στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος The Cancer Genome Atlas (TCGA) παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης mRNA του παραπάνω προσδέτη σε δείγματα καρκίνου μαστού σε σύγκριση με υγιή ιστό ασθενών με καρκίνο μαστού (Koval & Katanaev, 2018). Κυρίως, έχει παρατηρηθεί ότι ο προσδέτης WNT2 υπερεκφράζεται από κύτταρα του

στρώματος σε καλοήθεις όγκους μαστού όπως στα ινωαδενώματα ενώ υποεκφράζεται σε κακοήθεις όγκους μαστού μαζικό αδένα (Huguet et al., 1994).

Στην στατιστική ανάλυση καταδείχθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των μειωμένων επιπέδων έκφρασης του προσδέτη WNT2 και της απουσίας έκφρασης του οιστρογονικού υποδοχέα ER. Σε μελέτη της έκφρασης των προσδετών WNT2 και WNT5A σε ποντικών μετά από χορήγηση οιστρογόνων και προγεστερόνης, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του προσδέτη WNT2 ρυθμίζεται άμεσα από το μονοπάτι ER (Humphreys et al., 1997). Η συσχέτιση της έκφρασης του προσδέτη WNT2 με την έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα χρειάζεται να επιβεβαιωθεί, τόσο σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων καρκίνου μαστού όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης.

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία η μελέτη των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA του προσδέτη WNT3 στον καρκίνο του μαστού είναι περιορισμένη. Στην παρούσα διατριβή παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης mRNA του προσδέτη WNT3 στους μισούς ασθενείς. Σε μελέτη με δεδομένα που έχουν ληφθεί από τη βάση δεδομένων TCGA παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης mRNA του παραπάνω προσδέτη σε δείγματα καρκίνου μαστού σε σύγκριση με υγιή ιστό ασθενών με καρκίνο μαστού (Koval & Katanaev, 2018). Σε μελέτη με καρκινικές σειρές μαστού δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης mRNA του προσδέτη WNT3 (Benhaj et al., 2006), ενώ σε καρκινικές σειρές μαστού με αντίσταση στο trastuzumab παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του WNT3, οδηγώντας στην υπόθεση ότι τα αυξημένα επίπεδα WNT3 ενεργοποιούν το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης (Wu et al., 2012).

Από την στατιστική ανάλυση προέκυψε σημαντική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης mRNA του προσδέτη WNT3 τόσο με τον βαθμό διαφοροποίησης του όγκου όσο και με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία είναι η πρώτη μελέτη στην οποία παρατηρούνται αυτές οι συσχετίσεις, προτείνοντας την πιθανή προγνωστική αξία της έκφρασης του προσδέτη WNT3 στον καρκίνο μαστού, γεγονός που απαιτεί επιβεβαίωση με περαιτέρω μελέτες.

Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει ότι ο προσδέτης WNT2 πιθανά να μην έχει ισχυρή εμπλοκή στην καρκινογένεση του μαστού, σε αντίθεση με τον προσδέτη WNT3 που φαίνεται να έχει ένα σημαντικότερο ρόλο λόγω της συσχέτισης της έκφρασης του με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των όγκων.

Ο προσδέτης WNT5A παρουσίασε μειωμένα επίπεδα έκφρασης σε περισσότερους από τους μισούς ασθενείς, αποτέλεσμα που έρχεται σε συμφωνία με παλαιότερη μελέτη στην οποία καταγράφηκαν μειωμένα επίπεδα mRNA του προσδέτη WNT5A σε δείγματα καρκίνου μαστού σε σύγκριση με δείγματα φυσιολογικού ιστού με τη μέθοδο RT-qPCR. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς που είχαν είτε μειωμένα επίπεδα έκφρασης mRNA του προσδέτη WNT5A είτε απουσία έκφρασης του οιστρογονικού υποδοχέα είχαν κακή πρόγνωση της νόσου (Leris AC et al., 2005). Τέλος, σε μελέτη του WNT5A σε επίπεδο πρωτεΐνης με την μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση, σε ποσοστό πάνω από 50%, σε διηθητικά καρκινώματα μαστού (Dejmek et al., 2005).

Ο WNT5A αν και έχει θεωρηθεί ως προσδέτης του μη κανονικού μονοπατιού Wnt έχει βρεθεί ότι αναστέλλει το κανονικό μονοπάτι Wnt σε νεφρικές εμβρυικές κυτταρικές σειρές, χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα της β-κατενίνης αλλά δρώντας στο επίπεδο της μεταγραφής επηρεάζοντας την ενεργότητα των μεταγραφικών παραγόντων TCF/LEF (Mikels & Nusse, 2006). Παρόλα αυτά στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε ότι ο WNT5A μπορεί να ενεργοποιεί το κανονικό μονοπάτι Wnt μέσω πρόσδεσης στους υποδοχείς FZD4 και FZD5 και τον συνυποδοχέα LRP5 (συμμετέχουν στο κανονικό μονοπάτι) και απουσία του υποδοχέα ROR2. Πιθανά η δράση του προσδέτη WNT5A στη σηματοδότηση να εξαρτάται από την έκφραση του υποδοχέα στον οποίο συνδέεται και αποτελεί αντικείμενο περαιτέρω διερεύνησης. Στην παρούσα διατριβή καταγράφηκαν θετικές γραμμικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης mRNA του προσδέτη WNT5A και ορισμένων μορίων του κανονικού μονοπατιού, συμπεριλαμβανομένων β-κατενίνης, GSK3-β και LEF1, γεγονός που υποδηλώνει τη συνέργεια μεταξύ τους και κατά συνέπεια το πιθανό ρόλο του στο κανονικό μονοπάτι στην καρκινογένεση του μαστού. Αυτή η υπόθεση πρέπει να επιβεβαιωθεί σε μεγαλύτερη ομάδα ασθενών και με περαιτέρω αναλύσεις.

ΣΧΕΤΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ FRIZZLED 4 (FZD4), FRIZZLED 6 (FZD6), FRIZZLED 7 (FZD7)

Ο υποδοχέας FZD4 θεωρείται υποψήφιος υποδοχέας για τον προσδέτη WNT2 όπως έχει δειχθεί σε ηπατικά ενδοθηλιακά κύτταρα, όμως η αλληλεπίδραση τους δεν έχει μελετηθεί στον καρκίνο μαστού (Klein et al., 2008). Στην βιβλιογραφία υπάρχουν ελάχιστες αναφορές για την έκφραση του υποδοχέα FZD4. Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης mRNA του υποδοχέα FZD4 στην πληθώρα των αναλυθέντων δειγμάτων. Το παραπάνω αποτέλεσμα έρχεται σε συμφωνία με ανάλυση δεδομένων του TCGA, που κατέδειξε μειωμένα επίπεδα του υποδοχέα σε δείγματα καρκίνου μαστού σε σύγκριση με υγιή ιστό ασθενών με καρκίνο μαστού (Koval & Katanaev, 2018).

Η στατιστική ανάλυση κατέδειξε συσχέτιση της έκφρασης mRNA του υποδοχέα FZD4 με την ηλικία εμφάνισης της νόσου, η οποία δεν έχει αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία. Εφόσον η παρατήρηση αυτή επιβεβαιωθεί σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων καθώς και σε επίπεδο πρωτεΐνης, η έκφραση του θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός προβλεπτικός βιοδείκτης για την θεραπευτική στόχευση του μονοπατιού Wnt σε ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας με καρκίνο μαστού.

Ο υποδοχέας FZD6 του μη κανονικού μονοπατιού Wnt δεσμεύεται με τον προσδέτη WNT5A σε νεφρικές εμβρυικές κυτταρικές σειρές (Kilander et al., 2014). Στην παρούσα ανάλυση των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA του υποδοχέα FZD6 παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα περίπου στα μισά δείγματα που μελετήθηκαν. Στην διεθνή βιβλιογραφία ανευρίσκονται ελάχιστα δεδομένα για την έκφραση του παραπάνω υποδοχέα στον καρκίνο μαστού. Στη μελέτη των Koval & Katanaev, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα FZD6 σε σύγκριση με υγιή ιστό ασθενών με καρκίνο μαστού, για όλους τους μοριακούς υποτύπους καρκίνου του μαστού με εξαίρεση τον τριπλά αρνητικό (Koval & Katanaev 2018). Στην παρούσα διατριβή δεν καταγράφηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του παραπάνω υποδοχέα με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Σε παλαιότερη μελέτη του υποδοχέα FZD6 σε δείγματα καρκίνου μαστού παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των αυξημένων μεταγραφών (copy number) με τον τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού (Corda et al., 2017). Επομένως, είναι απαραίτητη η μελέτη του παραπάνω υποδοχέα σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων

αλλά και σε πρωτεϊνικό επίπεδο με σκοπό να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του στην καρκινογένεση του μαστού.

Ο FZD7 θεωρείται υποψήφιος υποδοχέας για τον προσδέτη WNT3 όπως έχει δειχθεί σε ηπατοκυτταρικές καρκινικές κυτταρικές σειρές και εμβρυικές σειρές νεφρού (Kim et al., 2008; Voloshanenko et al., 2017). Στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε συσχέτιση της έκφρασης του WNT3 και του υποδοχέα FZD7 που να δηλώνει την ταυτόχρονη έκφραση τους. Ο υποδοχέας FZD7 παρουσίασε μειωμένα επίπεδα mRNA σε πολύ υψηλό ποσοστό του συνόλου των δειγμάτων. Το παραπάνω αποτέλεσμα έρχεται σε συμφωνία με τη μελέτη που αναλύει τα δεδομένα από το TCGA και καταγράφει μειωμένα επίπεδα έκφρασης mRNA του υποδοχέα στους όγκους μαστού σε σύγκριση με υγιή ιστό ασθενών με καρκίνο μαστού, σε όλους τους μοριακούς υποτύπους εκτός από τον τριπλά αρνητικό (Koval & Katanaev, 2018). Αυξημένα επίπεδα mRNA του υποδοχέα FZD7 έχουν αναφερθεί σε μικρό αριθμό περιστατικών τριπλά αρνητικού καρκίνου μαστού. Πιο αναλυτικά, σε αρχικό έλεγχο για την έκφραση των υποδοχέων Frizzleds με μικροσυστοιχίες παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του υποδοχέα FZD7. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε με μέθοδο RT-qPCR αλλά και σε επίπεδο πρωτεΐνης με ανοσοϊστοχημεία καθώς παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα FZD7 στο 67% των δειγμάτων με τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού (Finak et al., 2008).

Στην παρούσα εργασία καταγράφηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των μειωμένων επιπέδων έκφρασης mRNA του υποδοχέα FZD7 με την απουσία έκφρασης του προγεστερονικού υποδοχέα. Στη βιβλιογραφία έχει παρατηρηθεί συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων έκφρασης του υποδοχέα FZD7 με την έκφραση του προγεστερονικού υποδοχέα (Kazi et al., 2018). Η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του υποδοχέα FZD7 με την έκφραση του προγεστερονικού υποδοχέα πρέπει να επιβεβαιωθεί τόσο σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων καρκίνου μαστού όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης με σκοπό τη χρήση του FZD7 ως μελλοντικού προβλεπτικού βιοδείκτη στην κλινική πράξη καθώς θεωρείται θεραπευτικός στόχος με μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο βρίσκεται σε κλινικές μελέτες φάσης 1 & 2 σε ασθενείς με καρκίνο μαστού.

Σε μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα έχει παρατηρηθεί ότι με την αποσιώπηση ενός υποδοχέα Frizzled, ένας άλλος υποδοχέας Frizzled μπορεί να αντισταθμίσει την απουσία του έτσι ώστε το μονοπάτι Wnt να ενεργοποιείται κανονικά. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι με αποσιώπηση του υποδοχέα FZD5 σε μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα με τη χρήση si-RNA, η έκτοπη έκφραση mRNA του υποδοχέα FZD7 μπορεί να αντισταθμίσει την έλλειψη του υποδοχέα FZD5. Αντίστοιχα, με την αποσιώπηση του υποδοχέα FZD7, η έκτοπη έκφραση του υποδοχέα FZD5 ήταν ικανή να διασφαλίσει την ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt στα κύτταρα αυτά (Kolben et al., 2012). Συνεπώς, η μειωμένη έκφραση των υποδοχέων FZD4, FZD6 και FZD7 που καταγράφηκε στην παρούσα διατριβή, οδηγεί στη υπόθεση ότι άλλοι υποδοχείς FZDs, όπως ο Frizzled 2 (σύμφωνα με δεδομένα από το TCGA, Koval & Katanaev 2018), θα πρέπει να εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα ώστε να ενεργοποιείται το μονοπάτι Wnt στους όγκους μαστού στην πλειονότητα των ασθενών. Θα πρέπει λοιπόν να μελετηθούν και οι υπόλοιποι υποδοχείς Frizzleds με σκοπό να αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους στο μονοπάτι Wnt καθώς και οι ειδικές αλληλεπιδράσεις προσδέτη/υποδοχέα στην καρκινογένεση του μαστού. Τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης mRNA των υπό μελέτη υποδοχέων FZD4, FZD6, FZD7 μάλλον υποδεικνύουν δευτερεύοντα ρόλο στην ενεργοποίηση του μονοπατιού στην καρκινογένεση του μαστού, όμως φαίνεται ότι πιθανά σχετίζονται με την απορρύθμισή του.

ΣΧΕΤΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ Β-ΚΑΤΕΝΙΝΗΣ

Ένα σημαντικό συστατικό του κανονικού μονοπατιού Wnt είναι η β-κατενίνη η οποία έχει θεωρηθεί ως πιθανός προγνωστικός δείκτης για τον καρκίνο μαστού καθώς έχει παρατηρηθεί σε υψηλά επίπεδα στο κυτταρόπλασμα και επίσης η παρουσία της στον πυρήνα του κυττάρου έχει σχετιστεί με κακή πρόγνωση (Lin et al., 2000, López-Knowles et al., 2010). Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα mRNA του γονιδίου *CTNNB1*, το οποίο κωδικοποιεί για τη β-κατενίνη σχεδόν στο 1/3 των αναλυθέντων δειγμάτων καρκίνου μαστού και αυξημένα επίπεδα mRNA σε μια μικρότερη υπο-ομάδα ασθενών. Η έκφραση της β-κατενίνης έχει μελετηθεί στη βιβλιογραφία κυρίως σε επίπεδο πρωτεΐνης με ανοσοϊστοχημεία και ανοσοαποτύπωμα κατά Western. Στη μελέτη των Koval & Katanaev, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης mRNA της β-κατενίνης σε σύγκριση με υγιή ιστό ασθενών με καρκίνο μαστού (Koval & Katanaev, 2018).

Επιπρόσθετα, στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της β-κατενίνης με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών και συγκεκριμένα των αυξημένων επιπέδων έκφρασης της β-κατενίνης με ηλικία μικρότερη των 65 ετών. Επιπλέον, καταγράφηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των μειωμένων επιπέδων έκφρασης mRNA της β-κατενίνης με τους όγκους χαμηλής διαφοροποίησης, αναδεικνύοντας την πιθανή προγνωστική αξία τους στον καρκίνο του μαστού. Δεδομένου, ότι η β-κατενίνη έχει μελετηθεί κυρίως σε επίπεδο πρωτεΐνης πολλές έρευνες έχουν αναφέρει συσχέτιση των υψηλών επιπέδων έκφρασης της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα και την κυτταρική μεμβράνη με τους όγκους καλής διαφοροποίησης (Khalil et al., 2012, López-Knowles et al., 2010; Wang et al., 2015). Επομένως, είναι πιθανό να υπάρχει διαφορά στα επίπεδα mRNA της β-κατενίνης σε σχέση με τα επίπεδα πρωτεΐνης στο κύτταρο. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι το mRNA είναι ασταθές στο κυτταρόπλασμα και αποικοδομείται σε σύντομο διάστημα, ενώ η β-κατενίνη σταθεροποιείται στο κύτταροπλασμα όταν δεν αποικοδομείται από το σύμπλοκο αποικοδόμησης της. Η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης mRNA και πρωτεΐνης της β-κατενίνης με το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

Από την ανοσοϊστοχημική μελέτη της β-κατενίνης στην παρούσα διδακτορική διατριβή παρατηρήθηκε χαμηλή έκφραση της μεμβρανικής β-κατενίνης στο 65% των αναλυθέντων δειγμάτων, ενώ υψηλή έκφραση της κυτταροπλασματικής β-κατενίνης παρατηρήθηκε στο 13% των δειγμάτων. Δεν παρατηρήθηκε πυρηνική έκφραση της β-κατενίνης. Τα ευρήματά μας έρχονται σε συμφωνία με την διεθνή βιβλιογραφία διότι η παρουσία της β-κατενίνης στον πυρήνα έχει καταγραφεί σε ελάχιστες μελέτες (Lin et al., 2000; Prasad et al., 2007), ενώ οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν μεμβρανική και κυτταροπλασματική εντόπιση. Πιο αναλυτικά, η κυτταροπλασματική έκφραση της β-κατενίνης ποικίλλει ευρέως στη βιβλιογραφία και κυμαίνεται μεταξύ 8% - 96% των δειγμάτων καρκίνου μαστού, ενώ η μεμβρανική έκφραση κυμαίνεται μεταξύ 9% και 78% (Lin et al., 2000; Lopez-Knowles et al., 2010 ; Karayiannakis et al., 2001; Khalil et al., 2012; Nakopoulou et al., 2000). Σε μελέτη της β-κατενίνης με ανοσοϊστοχημεία σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων καρκίνου μαστού, παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα, τα οποία συσχετίστηκαν με το μέγεθος του όγκου, μεταστάσεις στους λεμφαδένες, τη διαφοροποίηση του όγκου, την απουσία έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων και

προγεστερόνης (Lopez-Knowles et al., 2010). Στην παρούσα διατριβή δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις της εντόπισης της β-κατενίνης με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών πιθανά λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων που αναλύθηκαν με ανοσοϊστοχημεία εξαιτίας περιορισμών του διαθέσιμου ιστού.

ΣΧΕΤΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ GSK3-B

Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης mRNA της GSK3β σε περισσότερους από τους μισούς ασθενείς και αυξημένα σε μια πολύ μικρή υποομάδα ασθενών. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προγενέστερη μελέτη του mRNA της GSK3-β σε περιφερικό αίμα γυναικών με καρκίνο μαστού στην οποία παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης (Aristizabal-Pachon & Castillo, 2017). Στη μελέτη από τα δεδομένα του TCGA παρατηρήθηκε ελάχιστη αύξηση στα επίπεδα mRNA της GSK3-β (Koval & Katanaev, 2018). Έχει αναφερθεί ότι ο ρόλος της GSK3-β στην καρκινογένεση είναι διττός και πιθανά να διαφέρει μεταξύ διαφορετικών ιστών (Mishra 2010). Σε αντίθεση με τον καρκίνο του παχέος εντέρου όπου το γονίδιο *GSK3-B* φαίνεται να έχει ρόλο ογκογονιδίου, στον καρκίνο του μαστού έχει αναφερθεί ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο (Jia Luo, 2009) καθώς φαίνεται να εμποδίζει την ανάπτυξη του καρκίνου μαστού. Πιο συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι η υπερέκφραση της μη ενεργοποιημένης (φωσφορυλιωμένη στο κατάλοιπο σερίνης 9) GSK3-β πιθανά προάγει την καρκινογένεση (Farago et al., 2005) ενώ αντίστοιχα η υπερέκφραση της ενεργοποιημένης κινάσης, καταστέλλει τους όγκους στον μαστό (Ding et al., 2007). Ακόμα έχει δειχθεί ότι η ενεργοποιημένη GSK3-β αυξάνει τη χημειοευαισθησία και την ανταπόκριση κατά τη χορήγηση ραπαμυκίνης καθώς ενισχύει την αναστολή της ανάπτυξης του όγκου που προκαλεί η ραπαμυκίνη και σταματά τον κυτταρικό κύκλο (Dong et al., 2005). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν την αναγκαιότητα για την διαλεύκανση του ρόλου της GSK3-β στην καρκινογένεση του μαστού.

ΣΧΕΤΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ TCF4 ΚΑΙ LEF1

Στη μελέτη των επιπέδων mRNA του μεταγραφικού παράγοντα TCF4 παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα στην πλειοψηφία των δειγμάτων. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με πρόσφατη μελέτη από την ανάλυση δεδομένων από το ερευνητικό πρόγραμμα TCGA στην οποία καταγράφηκαν μειωμένα επίπεδα του TCF4 σε δείγματα καρκίνου μαστού συμπεριλαμβανομένων των τριπλά αρνητικών όγκων σε σύγκριση με υγιή ιστό (Koval & Katanaev, 2018). Σε προγενέστερες μελέτες η μειωμένη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα TCF4 έχει επιβεβαιωθεί τόσο με την εφαρμογή της RT-qPCR όσο και με ανοσοϊστοχημική χρώση, σε περιορισμένο όμως αριθμό Καυκάσιων ασθενών (Shulewitz et al., 2006). Πιο αναλυτικά, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα mRNA σε 6 από τα 10 δείγματα καρκίνου μαστού σε σύγκριση με 10 διαφορετικά φυσιολογικά δείγματα μαστού με τη τεχνική της ποσοτικής PCR και το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε με την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας. Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι όταν ένας μεταγραφικός παράγοντας παρουσιάζει μειωμένη έκφραση, κάποιος άλλος μεταγραφικός παράγοντας υπερκφράζεται ώστε να αντισταθμιστεί η μειωμένη έκφραση του πρώτου (Nguyen et al., 2005). Ο δεύτερος μεταγραφικός παράγοντας που αναλύθηκε, δηλαδή ο LEF1, εμφάνισε αυξημένα επίπεδα mRNA στο 1/3 των αναλυθέντων δειγμάτων σε συμφωνία με πρόσφατη μελέτη στην οποία καταγράφηκαν αυξημένα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα LEF1 σε κλινικά δείγματα μαστού από δεδομένα του TCGA (Koval & Katanaev, 2018).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων mRNA του μεταγραφικού παράγοντα TCF4 με το μοριακό υπότυπο Luminal A. Στην διεθνή βιβλιογραφία δεν έχει αναφερθεί συσχέτιση του TCF4 με τον συγκεκριμένο μοριακό υπότυπο ή οποιονδήποτε από τους υπόλοιπους. Η παρατήρηση αυτή χρειάζεται επιβεβαίωση σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων αλλά και σε πρωτεϊνική μελέτη, καθώς η έκφρασή του θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μελλοντικός προβλεπτικός βιοδείκτης για τη θεραπεία που περιλαμβάνει στόχευση του μονοπατιού Wnt σε ασθενείς με τον μοριακό υπότυπο Luminal A.

Επιπλέον, καταγράφηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των μειωμένων επιπέδων έκφρασης mRNA του LEF1 και του μοριακού υποτύπου HER2 (HER2 enriched). Μια προγενέστερη μελέτη ανοσοϊστοχημείας παρουσίασε ότι τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του LEF1 σχετίζονται με την απουσία έκφρασης του υποδοχέα HER2 (Nguyen et al., 2005). Επομένως, η συσχέτιση της έκφρασης του LEF1 με την έκφραση του HER2 απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Από τη συσχέτιση των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA των υπό μελέτη γονιδίων παρατηρήθηκε ταυτόχρονη έκφραση των περισσότερων γονιδίων του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt. Πιο αναλυτικά παρατηρήθηκαν οι εξής στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ: 1) προσδετών WNT3/WNT5A, 2) προσδετών με υποδοχείς WNT5A/FDZ6, WNT3/FZD6, 3) προσδετών με μόρια καθοδικά του μονοπατιού Wnt και μεταγραφικούς παράγοντες WNT3/β-κατενίνη, WNT5A/β-κατενίνη, WNT5A/GSK3-B, WNT3/GSK3-B, WNT5A/LEF1 και WNT2/LEF1, 4) υποδοχέων με μόρια καθοδικά του μονοπατιού Wnt και μεταγραφικούς παράγοντες FZD6/β-κατενίνη, FZD6/GSK3-B, FZD4/GSK3-B και FZD7/LEF1, FZD4/TCF4, FZD6/LEF1 5) της β-κατενίνης και GSK3-B, 6) του μεταγραφικού παράγοντα LEF1 τη β-κατενίνη και GSK3-B, 7) των μεταγραφικών παραγόντων TCF4 και LEF1.

Σύμφωνα με τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι Wnt είναι οργανωμένα σε δίκτυα συν-έκφρασης όπου η διακύμανση στα επίπεδα έκφρασης τους πιθανά εμπλέκεται στην απορρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού. Στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί συσχετίσεις μεταξύ των γονιδίων του μονοπατιού Wnt όπως μεταξύ προσδετών WNTs και υποδοχέων FRIZZLEDs σε εμβρυικές καρκινικές σειρές παγκρέατος και ήπατος (Kim et al., 2008; Voloshanenko et al., 2017). Σχετικά με τον καρκίνο μαστού υπάρχουν ελάχιστες αναφορές για την μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Η αποσιώπηση της έκφρασης του γονιδίου WNT3 με si-RNA οδήγησε σε μείωση της έκφρασης της β-κατενίνης στον πυρήνα σε καρκινικές σειρές μαστού SKBR3/100-8 και BT474/100-2 -που είναι ανθεκτικές στο φάρμακο trastuzumab καθώς και μείωση της έκφρασης του υποδοχέα EGFR. Αντιθέτως δεν παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του προσδέτη WNT3 μετά από αποσιώπηση του υποδοχέα EGFR. Επομένως,

φαίνεται ότι ο προσδέτης WNT3 λειτουργεί ως ρυθμιστής για την εντόπιση της β-κατενίνης μέσα στο κύτταρο επάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την διήθηση (Yanyuan et al., 2012). Επίσης, αναφορικά με τη συσχέτιση μεταξύ β-κατενίνης και LEF1, στη βιβλιογραφία έχει παρατηρηθεί σε μελέτη με ανοσοϊστοχημεία, η ταυτόχρονη παρουσία LEF1 και β-κατενίνης στον πυρήνα του κυττάρου (Nguyen et al., 2005).

Η μέτρια θετική γραμμική συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ των WNT5A και FZD6 που ανήκουν στο μη κανονικό μονοπάτι Wnt, υποστηρίζεται από μελέτη αλληλεπίδρασης τους μέσω ανοσοκατακρήμνισης (Dijksterhuis et al., 2013). Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι ο προσδέτης WNT5A συνδέεται στον υποδοχέα FZD6 και υπερεκφράζονται στα γλοιοβλαστώματα, οδηγώντας σε κυτταρική μετανάστευση και διήθηση (Hirano et al., 2014; Kamino et al., 2011). Έχει δειχθεί ότι ο υποδοχέας FZD6 μπορεί να δρα ως αρνητικός ρυθμιστής του κανονικού μονοπατιού Wnt όταν συν-εκφράζεται με τον υποδοχέα FZD1 χωρίς να επηρεάζει το σύμπλοκο αποικοδόμησης της β-κατενίνης ή την ίδια την β-κατενίνη, αλλά επηρεάζοντας την ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα TCF4 (Golan et al., 2004). Παρόλα αυτά σε μεταγενέστερη μελέτη παρατηρήθηκε ότι ο υποδοχέας FZD6 μετά από υπερδιέγερση του κανονικού μονοπατιού Wnt με χορήγηση του προσδέτη WNT3A ή μέσω αποσιώπησης της έκφρασης του γονιδίου APC και την καταστολή του μονοπατιού Wnt σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα εμφανίζει θετική συσχέτιση με το κανονικό μονοπάτι Wnt (Kolben et al., 2012).

Στην παρούσα διατριβή παρατηρούμε ταυτόχρονη έκφραση των επιπέδων mRNA του υποδοχέα FZD6 και των επιπέδων mRNA μορίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης όπως η κινάση GSK3-β, η β-κατενίνη και ο μεταγραφικός παράγοντας LEF1 γεγονός που υποδηλώνει τη συνεργασία μεταξύ τους και συνεπώς την ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt. Αυτή η παρατήρηση πρέπει να επιβεβαιωθεί με περαιτέρω μελέτες.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ WNT ΜΕ ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ PI3K/AKT ΚΑΙ ΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ APC

Στην παρούσα διατριβή αναζητήθηκε η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων του μονοπατιού Wnt με την παρουσία μεταλλαγών του γονιδίου *PIK3CA*, το οποίο εμπλέκεται στο μονοπάτι PI3K/AKT. Οι μεταλλαγές αυτές αποτελούν συχνό γεγονός στον καρκίνο του μαστού και σήμερα αποτελούν προβλεπτικό βιοδείκτη για την εξατομικευμένη και στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκαν μεταλλαγές στα εξόνια 9 και 20 του γονιδίου *PIK3CA*, με πιο συχνή τη μεταλλαγή c.1624G > A (p.Glu542Lys) στο εξόνιο 9 και τη μεταλλαγή c.3140 A > G (p.His1047Arg) στο εξόνιο 20. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της παρουσίας των μεταλλαγών με τα κλινικοπαθολογο-ανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών και με τα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη μορίων του μονοπατιού Wnt. Σε μία και μοναδική μελέτη όπου συσχετίστηκε ο εντοπισμός της β-κατενίνης στο κύτταρο με μεταλλαγές σε γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι PI3K/AKT -μεταξύ και των οποίων και το γονίδιο *PIK3CA*- παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της κυτταροπλασματικής β-κατενίνης με τη παρουσία μεταλλαγών του γονιδίου *PIK3CA* (Lopez-Knowles et al., 2010), αυτή η παρατήρηση όμως δεν επιβεβαιώθηκε στην παρούσα μελέτη. Σε μεταγενέστερη μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκαν συνεργιστικά δύο αναστολείς: buparlisib (pan-PI3K) και WNT974 (WNT-pathway), τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* πειράματα σε ποντίκια με μεταμόσχευση ξένων καρκινικών ιστών (xenografts) και καρκινικές σειρές μαστού φάνηκε ότι η συνδυαστική αναστολή των δυο μονοπατιών μπορεί να είναι αποτελεσματική ως θεραπευτική επιλογή για ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού (Solzak et al., 2017). Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης mRNA γονιδίων του μονοπατιού Wnt με την παρουσία μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *APC*.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Δεδομένης της υψηλής συχνότητας του καρκίνου του μαστού στις γυναίκες, είναι πολύ σημαντική η δυνατότητα διερεύνησης νέων προγνωστικών και προβλεπτικών δεικτών με σκοπό την επιλογή της αποτελεσματικότερης θεραπείας για αυτές τις ασθενείς. Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης mRNA πολλαπλών σηματοδοτικών μορίων του μονοπατιού Wnt σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης mRNA των προσδετών WNT2, WNT3, WNT5A, των υποδοχέων FRIZZLED 4, FRIZZLED 6, FRIZZLED 7, της β-κατενίνης, της κινάσης GSK3-β και των μεταγραφικών παραγόντων TCF4 και LEF1. Τα αποτελέσματα της διδακτορικής διατριβής κατέδειξαν μεταβαλλόμενη έκφραση των γονιδίων αυτών, ταυτόχρονη έκφραση των μορίων του μονοπατιού Wnt, καθώς και την πιθανή προγνωστική τους σημασία στην νόσο. Οι πιο σημαντικές στατιστικές συσχετίσεις των επιπέδων έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων του μονοπατιού με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά είναι: 1) των επιπέδων έκφρασης του προσδέτη WNT3 και της β-κατενίνης με τη διαφοροποίηση του όγκου 2) των επιπέδων έκφρασης του προσδέτη WNT2 και υποδοχέα FZD7 με την έκφραση του οιστρογονικού και προγεστερονικού υποδοχέα, αντίστοιχα 3) των επιπέδων έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα TCF4 με τον μοριακό υπότυπο Luminal A. Επίσης πρόεκυψε οριακή στατιστική συσχέτιση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα LEF1 και του μοριακού υποτύπου HER2 (HER2 enriched). Η μελέτη της έκφρασης της β-κατενίνης και της κινάσης *GSK3-B* σε επίπεδο πρωτεΐνης (σε μικρή υπο-ομάδα περιστατικών για τα οποία υπήρχε διαθέσιμος ιστός) με τη μέθοδο ανοσοϊστοχημείας και ανοσοαποτύπωμα κατά Western, αντίστοιχα έδειξε χαμηλή μεμβρανική έκφραση της β-κατενίνης 65% και υψηλή κυτταροπλασματική έκφραση 31% ενώ δεν παρατηρήθηκε έκφραση στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων. Μειωμένα επίπεδα έκφρασης της κινάσης GSK3-β παρατηρήθηκαν σε ποσοστό 78%. Για τη συσχέτιση των μονοπατιών Wnt και PIK3/AKT έγινε καταγραφή των μεταλλαγών του γονιδίου *PIK3CA*, που παρατηρήθηκαν σε ποσοστό 35%. Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δύο μονοπατιών. Από την συσχέτιση της παρουσίας μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *APC* με τα υπό μελέτη μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις. Τα παραπάνω δεδομένα επισημαίνουν την πολυπλοκότητα του μονοπατιού Wnt στον

καρκίνο μαστού και τη σημασία της ανεύρεσης νέων προβλεπτικών βιοδεικτών με σκοπό την επιλογή ασθενών οι οποίες θα έχουν όφελος από τη χορήγηση θεραπειών που στοχεύουν το σηματοδοτικό αυτό μονοπάτι. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκαν διαφορετικά μοτίβα έκφρασης μορίων τα οποία εμπλέκονται στο μονοπάτι Wnt. Για κάποια από τα παραπάνω μόρια υπάρχουν στοχευμένοι παράγοντες σε κλινικές δοκιμές, ενώ αναδείχτηκαν και νέα όπως οι WNT2, WNT3 και TCF4 τα οποία θα μπορούσαν μελλοντικά να χρησιμοποιηθούν ως προβλεπτικοί βιοδείκτες για τη μεγιστοποίηση της αποτελεσματικότητας των στοχευμένων θεραπειών.

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt παίζει σημαντικό ρόλο τόσο κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης όσο και στην μεταγεννητική ανάπτυξη και την ομοιόσταση των ενήλικων ιστών καθώς ρυθμίζει μια ποικιλία κυτταρικών διαδικασιών όπως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση, τη μορφολογία και τον σχηματισμό του άξονα. Το μονοπάτι Wnt συμμετέχει στην ανάπτυξη του μαστικού αδένα και στη διαφοροποίηση του κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Επίσης, έχει παρατηρηθεί η επικοινωνία του μονοπατιού Wnt με άλλα σημαντικά μονοπάτια όπως το PI3K/AKT. Η απορρύθμιση του μονοπατιού Wnt σχετίζεται με την καρκινογένεση, η οποία μπορεί να προκληθεί από μεταβολές των επιπέδων έκφρασης συστατικών του μονοπατιού. Έχει παρατηρηθεί απορρύθμιση του συγκεκριμένου σηματοδοτικού μονοπατιού σε πολλούς τύπους καρκίνου μεταξύ των οποίων και στον καρκίνο μαστού. Επομένως, η μελέτη του στον καρκίνο μαστού μπορεί να το καταστήσει ως ένα πολλά υποσχόμενο δείκτη πρόγνωσης της νόσου αλλά και μελλοντικό στόχο νέων θεραπευτικών στρατηγικών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ: Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 100 δείγματα καρκίνου μαστού εκ των οποίων 68 ήταν φρέσκοι συντηρημένοι ιστοί στους -20°C και 32 δείγματα μονιμοποιημένα σε RCL2 και εγκλεισμένα σε κύβους παραφίνης. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν 10 δείγματα φυσιολογικού ιστού παρακείμενα του όγκου. Αρχικά από τα δείγματα απομονώθηκε RNA και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αντίστροφη μεταγραφή του σε cDNA. Έπειτα ακολούθησε η ημιποσοτική PCR πραγματικού χρόνου για την ανάλυση των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων του μονοπατιού Wnt στα οποία συμπεριλαμβάνονται οι προσδέτες WNT2, WNT3, WNT5A, οι υποδοχείς FRIZZLED 4 (FZD4), FRIZZLED 6 (FZD6) και FRIZZLED 7 (FZD7), η β -κατενίνη, η κινάση GSK3- β και οι μεταγραφικοί παράγοντες TCF4 και LEF1. Η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης έγινε με τη μέθοδο $\Delta\Delta\text{Ct}$, χρησιμοποιώντας ως ενδογενές γονίδιο το PPIa. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε σε 31 δείγματα καρκίνου μαστού η ανοσοϊστοχημική μελέτη της β -κατενίνης και σε 28 δείγματα η μελέτη έκφραση της πρωτεΐνης GSK3- β με ανοσοαποτύπωμα κατά Western. Επίσης σε 81 δείγματα DNA μελετήθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA* το οποίο εμπλέκεται στο μονοπάτι PI3K/AKT με τη μέθοδο της HRM-PCR και η επιβεβαίωση έγινε με την αλληλούχιση κατά Sanger.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών και αναζήτηση γραμμικών συσχετίσεων της έκφρασης mRNA των υπό μελέτη γονιδίων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Από την ανάλυση των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA των γονιδίων *WNT2*, *WNT3*, *WNT5A*, *FRIZZLED 4*, *FRIZZLED 6*, *FRIZZLED 7*, *CTNNB1*, *GSK3-B*, *TCF4* και *LEF1*, παρατηρήθηκαν: αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε ποσοστό 6%, 47%, 10%, 0%, 13%, 5%, 21%, 7%, 5%, 31%, αντίστοιχα, μειωμένα επίπεδα έκφρασης σε ποσοστό 54%, 36%, 57%, 83%, 47%, 73%, 29%, 40%, 80%, 39%, αντίστοιχα, ενώ σταθερά επίπεδα έκφρασης σε ποσοστό 40%, 17%, 33%, 17%, 40%, 22%, 50%, 53%, 15%, 30% αντίστοιχα. Επιπρόσθετα παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA των υπό μελέτη γονιδίων με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά και με τον μοριακό υπότυπο των ασθενών με καρκίνου μαστού. Πιο αναλυτικά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των μειωμένων επιπέδων έκφρασης του προσδέτη *WNT2* με την απουσία του οιστρογονικού υποδοχέα ($p=0,033$). Για τον προσδέτη *WNT3* καταγράφηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων έκφρασης με τους όγκους καλής-μέτριας διαφοροποίησης ($p=0,026$) και των μειωμένων επιπέδων έκφρασης με τη παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων ($p=0,02$). Για τον υποδοχέα *FZD4* παρατηρήθηκε ότι τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης σχετίζονται σημαντικά με τους ασθενείς ηλικία άνω των 65 ετών ($p=0,026$). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των μειωμένων επιπέδων έκφρασης του υποδοχέα *FZD7* με την απουσία του προγεστερονικού υποδοχέα ($p=0,02$). Στατιστικά σημαντική συσχέτιση καταγράφηκε μεταξύ των αυξημένων επιπέδων έκφρασης της β-κατενίνης και των ασθενών ηλικίας κάτω των 65 ετών ($p=0,007$) και των μειωμένων επιπέδων έκφρασης με τους όγκους χαμηλής διαφοροποίησης ($p=0,028$). Επιπρόσθετα, στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των αυξημένων επιπέδων έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα *TCF4* με τα δείγματα με μοριακό υπότυπο Luminal A ($p=0,011$). Για τον μεταγραφικό παράγοντα *LEF1* παρατηρήθηκε οριακή στατιστική συσχέτιση μεταξύ των μειωμένων επιπέδων έκφρασης με τον μοριακό υπότυπο HER2 (HER2 enriched). Στη συνέχεια ακολούθησε συσχέτιση των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA μεταξύ των υπό μελέτη γονιδίων από την οποία προέκυψαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις: *WNT3/WNT5* $p<0,01$, *WNT5A/FDZ6* $p<0,01$, *WNT3/FZD6* $p<0,01$, *WNT3/β-κατενίνη* $p<0,01$, *WNT5A/β-κατενίνη* $p<0,01$, *WNT3/GSK3-B* $p<0,01$,

WNT5A $p < 0,01$, FZD6/GSK3-B $p = 0,020$, FZD4/GSK3-B $p = 0,047$, β -κατενίνη/GSK3-B $p < 0,01$, FZD4/TCF4 $p < 0,01$, TCF4/LEF1 $p = 0,017$, WNT5A/LEF1 $p < 0,01$, WNT2/LEF1 $p = 0,017$, FZD7/LEF1 $p = 0,01$, FZD6/LEF1 $p < 0,01$, LEF1/GSK3-B $p < 0,01$, LEF1/ β -κατενίνη $p = 0,046$. Σε παλαιότερη μελέτη του εργαστηρίου παρατηρήθηκε μεθυσία του υποκινητή του γονιδίου *APC* σε ποσοστό 55%, η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί εμπλέκεται στο σύμπλοκο αποικοδόμησης της β -κατενίνης. Από την ανάλυση της παρουσίας ή απουσίας μεθυσίας του υποκινητή του γονιδίου *APC* σε σχέση με τα υπό μελέτη μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt της παρούσας διατριβής δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Από την μελέτη έκφρασης των γονιδίων *GSK3-B* και *CTNNB1* σε επίπεδο πρωτεΐνης με ανοσοαποτύπωμα κατά Western και ανοσοϊστοχημείας αντίστοιχα παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης της κινάσης GSK3- β σε ποσοστό 78%. Από την ανοσοϊστοχημική μελέτη της β -κατενίνης παρατηρήθηκε σε 65% χαμηλή μεμβρανική έκφραση και σε 31% υψηλή κυτταροπλασματική έκφραση, ενώ δεν παρατηρήθηκε έκφραση της β -κατενίνης στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων. Τέλος, ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA* σε ποσοστό 35%, και συγκεκριμένα 20% στο εξόνιο 9 του γονιδίου και 15% στο εξόνιο 20. Από τη συσχέτιση των μεταλλαγών με τα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων του μονοπατιού Wnt με σκοπό να δείχθει εάν υπάρχει σχέση μεταξύ των δύο μονοπατιών στα δείγματα μαστού δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Από τα παραπάνω δεδομένα παρατηρείται απορρύθμιση του μονοπατιού Wnt, ταυτόχρονη έκφραση μορίων και συσχετίσεις με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών, επισημαίνοντας την πολυπλοκότητα του στον καρκίνο μαστού και την ανάδειξη πιθανών προβλεπτικών βιοδεικτών με σκοπό την επιλογή κατάλληλων ασθενών οι οποίοι θα έχουν όφελος από τη χορήγηση θεραπείας, η οποία στοχεύει το μονοπάτι Wnt.

7. ABSTRACT

INTRODUCTION: Wnt signaling pathway plays an important role in embryonic development and adult tissue homeostasis, regulating important cell functions such as proliferation and migration, morphogenesis and planar cell polarity. In the mammary gland, Wnt signals are strongly implicated in initial development of the mammary rudiments, and in the ductal branching and alveolar morphogenesis that occurs during pregnancy. In addition crosstalk between the Wnt pathway and growth factor signaling pathway has been observed, such PI3K/AKT pathway. Alterations in Wnt pathway components' expression are implicated in the pathogenesis of several tumor types, such as breast cancer. Therefore, Wnt pathway constitutes a promising anticancer therapeutic target with several agents currently in clinical trials.

MATERIALS AND METHODS: One hundred breast carcinomas were analyzed of which 68 were fresh frozen tissues and 32 were RCL2 fixed paraffin-embedded tissues. In addition 10 normal adjacent breast samples were analyzed. The relative mRNA expression levels of WNT2, WNT3, WNT5A, FRIZZLED 4 (FZD4), FRIZZLED 6 (FZD6), FRIZZLED 7 (FZD7), CTNNB1 (encoded β -catenin), GSK3-B, TCF4, LEF1 genes were determined by semi-quantitative Real Time PCR and $\Delta\Delta$ CT. Data were analyzed using the comparative $\Delta\Delta$ Ct method and PPIA was used as reference gene. In addition for the determination Relative mRNA expression levels were determined by RT-PCR and analyzed with the $\Delta\Delta$ Ct method. Furthermore, for the determination of protein levels of β -cetenin, 31 RCL2 fixed paraffin-embedded breast tissues were analyzed with immunochemistry, while GSK3- β protein expression levels were determined with Western Blot. In addition 41 breast carcinomas were investigated for mutations in *PIK3CA* gene using HRM-PCR and Sanger sequencing. Statistical analysis between the results and clinicopathological data, was performed by SPSSv2 package.

RESULTS: Increased relative mRNA expression levels of *WNT2*, *WNT5A*, *FZD4*, *FZD6*, *FZD7*, *CTNNB1*, *GSK3-B*, *TCF4* and *LEF1* genes 6%, 47%, 10%, 0%, 13%, 5%, 21%, 7%, 5%, 31%, were found in of carcinomas, respectively. Furthermore, decreased relative mRNA expression levels were found in 54%, 36%, 57%, 83%, 47%, 73%, 29%, 40%, 80%, 39% in breast carcinomas, respectively, and stable relative mRNA expression levels were observed in 40%, 17%, 33%, 17%, 40%, 22%, 50%, 53%, 15%, 30% in carcinomas, respectively. Statistical significant correlations were established, in breast carcinomas between mRNA expression levels and clinicopathological features. Specially, mRNA relative levels of WNT2 ligand was decreased in samples with the absent of estrogen receptor ($p=0,033$). A statistically significant correlation emerged between increased mRNA expression levels of WNT3 and low grade tumours (Grade I & II) and decreased mRNA expression levels of WNT3 and pN-category (0,02). Statistical significant correlation was found between decreased expression levels of FZD6 and older patients (>65 years old). Expression levels of FZD7 receptor were significantly correlated with PR negative cases ($p=0,02$). In addition, statistical significant correlations were established between decreased relative expression levels of β -catenin and high grade tumours (Grade III & IV) ($p=0,028$) and increased relative expression levels of β -catenin and age of patients below 65 gears old ($p=0,007$). Expression levels of *TCF4* were significantly correlated with Luminal A molecular subtype ($p=0,011$) of breast tumours. Marginal correlation was found between LEF1 expression levels and HER2 enriched molecular subtype. Statistical significant linear correlations among the expression levels of investigated genes were observed: WNT3/WNT5 $p<0,01$, WNT5A/FDZ6 $p<0,01$, WNT3/FZD6 $p<0,01$, WNT3/ β -catenin $p<0,01$, WNT5A/ β -catenin $p<0,01$, WNT3/GSK3-B $p<0,01$, WNT5A $p<0,01$, FZD6/GSK3-B $p=0,020$, FZD4/GSK3-B $p=0,047$, β -catenin/GSK3-B $p<0,01$, FZD4/TCF4 $p<0,01$, TCF4/LEF1 $p=0,017$, WNT5A/LEF1 $p<0,01$, WNT2/LEF1 $p=0,017$, FZD7/LEF1 $p,0,01$, FZD6/LEF1 $p<0,01$, LEF1/GSK3-B $p<0,01$, LEF1/ β -catenin $p=0,046$. Furthermore, no statistical significant correlation was found in mRNA expression levels of investigated genes and *APC* methylation. Protein expression levels of GSK3- β showed decreased expression in 78% of the examined samples, while protein expression levels of β -catenin showed increased cytoplasmic and expression and decreased membranous expression in the majority of our samples. Lastly, mutations in *PIK3CA* gene were

found 35% of breast carcinomas. Specially, 20% and 15% of the mutated samples were showed mutations in exon 9 and 20 in *PIK3CA* gene, respectively.

CONCLUSIONS: Our results demonstrate the deregulation of Wnt signaling pathway, highlight the complexity of Wnt pathway in breast cancer as well as the emergence of possibly future predictive biomarkers in an effort to maximize the efficacy of Wnt targeted therapies.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abraham SC, Reynolds C, Lee JH, Montgomery EA, Baisden BL, Krasinskas AM, Wu TT. fibromatosis of the breast and mutations involving the APC/beta-catenin pathway. *Hum Pathol.* 2002 Jan;33(1):39-46.
- Abrahamsson AE, Geron I, Gotlib J, Dao KH, Barroga CF, Newton IG, Giles FJ, Durocher J, Creusot RS, Karimi M, et al. 2009. Glycogen synthase kinase 3b missplicing contributes to leukemia stem cell generation. *Proc Natl Acad Sci* 106: 3925–3929.
- Aristizabal-Pachon Felipe Andrés and Castillo Orlando Willian, Role of GSK3-β in breast cancer susceptibility, *Cancer Biomarkers -1* (2016) 1–7.
- Armes JE, Venter DJ. The pathology of inherited breast cancer. *Pathology.* 2002;34:309–14.
- Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y, Alkalay I. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the wnt pathway. *Genes Dev.* 2002 May 1;16(9):1066-76.
- Anderson, W.F., et al., Comparison of age-specific incidence rate patterns for different histopathologic types of breast carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004. 13(7): p. 1128-35.
- Andrew J. McCluskey, Andrew J. Olive, Michael N. Starnbach,^a and R. John Collier^a Targeting HER2-positive cancer cells with receptor-redirectioned anthrax protective antigen *Mol Oncol.* 2013 June ; 7(3): 440–451
- Bänziger, C., Soldini, D., Schütt, C., Zipperlen, P., Hausmann, G., and Basler, Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *cell.* 2006 May 5;125(3):509-22.
- Barcellos-Hoff MH, Park C, Wright EG, Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy, *Nat Rev Cancer.* 2005 Nov;5(11):867-75.
- Benhaj K., Akcali K.C., Ozturk M., Redundant expression of canonical Wnt ligands in human breast cancer cell lines, *Oncol. Rep.* 15 (2006) 701–707.
- Berg WA, Gutierrez L, NessAiver MS, Carter WB, Bhargavan M, Lewis RS, et al. Diagnostic accuracy of mammography, clinical examination, US, and MR imaging in preoperative assessment of breast cancer. *Radiology.* 2004;233(3):830–849.
- Bergstein et al., WNT genes and breast cancer *Molecular Genetics, Pathogenesis and Therapeutics*, 1999
- Beric R. Henderson^a and Francois Fagotto, The ins and outs of APC and β-catenin nuclear transport, *EMBO Rep.* 2002 Sep 16; 3(9): 834–839.
- Bilic J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M, Niehrs C. 2007. Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes Dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* 316: 1619–1622.
- Blasband, A., Schryver, B., and Papkoff, J. The biochemical properties and transforming potential of human Wnt-2 are similar to Wnt-1. *Oncogene*, 7: 153-161, 1992.
- Børresen-Dale AL. TP53 and breast cancer. *Hum Mutat.* 2003 Mar;21(3):292-300.

Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP. high bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med.* 2002 May 16;346(20):1513-21.

Bray Fr., Ferlay J., Soerjomataram I, Siegel R., Torre L., Jemal A., Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA CANCER J CLIN* 2018;68:394–424.

Bui TD, Beier DR, Jonssen M, Smith K, Dorrington SM, Kaklamanis L, Kearney L, Regan R, Sussman DJ, Harris A.L Biochemical and biophysical research communications. 1997 ; 239 (2) 510-516.

Bui, T. D., Rankin, J., Smith, K., Huguet, E. L., Ruben, S., Strachan, T., Harris, A. L., Lindsay, S. A novel human Wnt gene, WNT10B, maps to 12q13 and is expressed in human breast carcinomas. *Oncogene* 14: 1249-1253, 1997.

Bryan D. White, et al., Dysregulation of Wnt/ β -catenin Signaling in Gastrointestinal Cancers *Gastroenterology*. 2012 February 142(2): 219–232.

Bryan T. MacDonald, Keiko Tamai, and Xi He Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases *Dev Cell*. 2009 Jul; 17(1): 9–26.

Cancer Research UK 2011, www.cancerresearchuk.org

Chen MS, Woodward WA, Behbod F, et al. Wnt/beta-catenin mediates radiation resistance of Sca1 β progenitors in an immortalized mammary gland cell line. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 3):468e477

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer Breast cancer and hormone replacement therapy, 1997

Collins FS, Morgan M, Patrinos A., The Human Genome Project: lessons from large scale biology, *Science*. 2003 Apr 11;300(5617):286-90.

Corcia Gabriele, Sala Gianluca, Lattanzio Rossano, Iezzi Manuela et al., Functional and prognostic significance of the genomic amplification of frizzled 6 (FZD6) in breast cancer, *J Pathol* 2017; 241: 350–361

Dale TC, Weber-Hall SJ, Smith K, Huguet EL, Jayatilake H, Gusterson BA, Shuttleworth G, O'Hare M, Harris AL. Compartment switching of WNT-2 expression in human breast tumors. *Cancer Res.* 1996;56:4320–4323.

Dan Zhou et al., Association between aberrant APC promoter methylation and Breast cancer pathogenesis: a meta-analysis of 35 observational studies, *PeerJ*. 2016 Jul 14;4:e2203.

Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, Stanek P, Glinka A, Niehrs C. Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature*. 2005 Dec 8;438(7069):867-72.

Dejmek Janna, Leandersson Karin, Manjer Jonas, Bjartell Anders, Emdin Stefan, Vogel Wolfgang, Landberg Go`ran, Andersson Tommy, Expression and Signaling Activity of Wnt-5a/Discoïdin Domain Receptor-1 and Syk Plays Distinct but Decisive Roles in Breast Cancer Patient Survival, *Clinical Cancer Research* 2005, 520–528.

Dejmek Janna, Annette Säfholm, Christian Kamp Nielsen, Tommy Andersson, and Karin Leandersson Wnt-5a/ Ca^{2+} -Induced NFAT Activity Is Counteracted by Wnt-5a/Yes-Cdc42-casein kinase 1 α Signaling in Human Mammary Epithelial Cells, *Mol Cell Biol*.

2006 Aug; 26(16): 6024–6036.

Dijksterhuis, J Petersen and G Schulte WNT/Frizzled signalling: receptor–ligand selectivity with focus on FZ-G protein signalling and its physiological relevance: IUPHAR Review 3 British Journal of Pharmacology (2014) 171 1195–1209.

Ding Q, He X, Xia W, Hsu JM, Chen CT, Li LY, Lee DF, Yang JY, Xie X, Liu JC, Hung MC, Myeloid cell leukemia-1 inversely correlates with glycogen synthase kinase-3beta activity and associates with poor prognosis in human breast cancer, *Cancer Res.* 2007 May 15;67(10):4564-71.

Dominguez I, Itoh K. and Sokol S.Y., Role of glycogen synthase kinase 3 beta as a negative regulator of dorsoventral axis formation in *Xenopus* embryos, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92 (18) (1995), pp. 8498-8502.

Dong J, Peng J, Zhang H, Mondesire WH, Jian W, Mills GB, Hung MC, Meric-Bernstam F. (2005). Role of glycogen synthase kinase 3beta in rapamycin-mediated cell cycle regulation and chemosensitivity. *Cancer Res.* 2005;65:1961–1972.

Dulaimi E, Hillinck J, Ibanez de Caceres I, Al-Saleem T and Cairns P. Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004;10:6189-93.

Dwyer M.A, Joseph J.D., Wade H.E., Eaton M.L, Kunder R.S., Kazmin D., Chang C. P., McDonnell D.P., WNT11 expression is induced by estrogen-related receptor alpha and beta-catenin and acts in an autocrine manner to increase cancer cell migration, *Cancer Res.* 70 (22) (2010) 9298-9308.

Emad A. Rakha, Maysa E. El-Sayed, Andrew H.S. Lee, Christopher W. Elston, Matthew J. Grainger, Zsolt Hodi, Roger W. Blamey, and Ian O. Ellis Prognostic Significance of Nottingham histologic Grade in Invasive Breast Carcinoma, 2008, *J Clin Oncol* 26:3153-3158.

Fagotto F., Gluck, U. and Gumbiner, B.M. (1998) Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of β -catenin. *Curr. Biol.*, 8, 181–190.

Farago M1, Dominguez I, Landesman-Bollag E, Xu X, Rosner A, Cardiff RD, Seldin DC., Kinase inactive glycogen synthase kinase 3beta promotes Wnt signaling and mammary tumorigenesis, *Cancer Res.* 2005 Jul 1;65(13):5792-801.

Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H et al. (2008). Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* 14: 518–527.

Felipe C Geyer, Magali Lacroix-Triki, Kay Savage, Monica Arnedos, Maryou B Lambros, Alan MacKay, Rachael Natrajan and Jorge S Reis-Filho β -Catenin pathway activation in breast cancer is associated with triple-negative phenotype but not with CTNNB1 mutation, *Modern Pathology* (2011) 24, 209–231, 2010.

Feng Y, Spezia M, Huang Sh, Yuan Ch, Zeng Z, Zhang L, Ji X, Liu W, Huang B, Luo W, Liu B, Lei Y, Du S, Vuppapapati A, Luu H, Haydon R, He T, Ren G, Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis, *Genes & Diseases* (2018) 5, 77-106

Fodde R, The multiple functions of tumour suppressors: it's all in APC. *Nature cell biology.* 2003 ; 5 (3) : 190-192.

Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS (2010) Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*

363(20):1938–1948.

Frame S, Cohen P, Biondi RM. A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3- and its inactivation by phosphorylation. *Mol Cell*. 2001 Jun;7(6):1321-7.

George J. Klarmann, Amy Decker & William L. Farrar Epigenetic gene silencing in the Wnt pathway in breast cancer *Epigenetics*, 3:2, 59-63.

Giordano SH, Buzdar AU, Hortobagyi GN. Breast cancer in men. *Ann Intern Med*. 2002;137:678–687.

Golan T, Yaniv A, Bafico A, Liu G, Gazit A (2004). The human Frizzled 6 (HFz6) acts as a negative regulator of the canonical Wnt. beta-catenin signaling cascade. *J Biol Chem* 279: 14879–14888.

Golshan M, Rusby J, Dominguez F, et al. Breast conservation for male breast carcinoma. *breast*. 2007;16:653–656.

Gujral T.S, Chan M., Peshkin L., Sorger P.K., Kirschner M.W, MacBeath G.,
A noncanonical Frizzled2 pathway regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis, *Cell* 159 (4) (2014) 844-856.

Gusterson, Gelber, Goldhirsch, Price, Save-soderbergh, Anbazhagan, Styles, Rudenstam, goluh, Reed, Martinez-tello, Ftiltman, Torhorst, Grigolato, Bettleheim, Neville, Burki, castiglione, Collins, Lindtner, j. The international ludwig breast cancer study group (1992). prognostics importance of c-erb ,b-2 expression in breast cancer. *j. cLIN. oNCOL.*, 10, 1049-1056.

Hanahan and R. A. Weinberg. The Hallmarks of Cancer, *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57-70, 2000.

Hanahan D & Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* (2011) 144:646-674.

Harb J, Lin P.J., Hao J., Recent Development of Wnt Signaling Pathway Inhibitors for Cancer Therapeutics, *Current Oncology Reports* (2019) 21: 12.

Hayes M., Thomas D., Emmons A., Giordano T., Kleer C., Genetic Changes of Wnt Pathway Genes are Common Events in Metaplastic Carcinomas of the Breast, *Clin Cancer Res*. 2008 July 1; 14(13): 4038–4044.

Hermida Miguel A., Kumar J. Dinesh., Leslie Nick R., GSK3- and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signaling Network, *Advances in Biological Regulation* 65 (2017) 5-15.

Hirano H, Yonezawa H, Yunoue S, Habu M, Uchida H, Yoshioka T et al. Immunoreactivity of Wnt5a, Fzd2, Fzd6, and Ryk in glioblastoma: evaluative methodology for DAB chromogenic immunostaining. *Brain Tumor Pathol* 2014; 31: 85–93.

Hoschuetzky H., Aberle H., Kemler R. β -Catenin mediates the interaction of the cadherin–catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biol*. 1994;127:1375–1380.

Hourieh Kalhor, Mansour Poorebrahim & Hamzeh Rahimi & Ali Akbar Shabani & Morteza Karimipoor & Mohammad Reza Akbari Eidgahi & Ladan Teimoori-Toolabi, Structural and dynamic characterization of human WNT2-Fzd7 complex using

computational approaches, *Journal of Molecular Modeling* (2018) 24:274

Hsieh JC, Rattner A, Smallwood PM, Nathans J. Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 30;96(7):3546-51.

Huguet, Jill A. McMahon, Andrew P. McMahon, Roy Bicknell, and Adrian L. Harris² Differential Expression of Human *Wnt* Genes 2, 3, 4, and 7B in Human Breast Cell Lines and Normal and Disease States of Human Breast Tissue¹ *CANCERRESEARCH*54,2615-2621,May15,19941 epi.3.2.5899

Humphreys Robin C, Lydon John, O'Malley Bert W., and M. Rosen Jeffrey, Mammary Gland Development Is Mediated by Both Stromal and Epithelial Progesterone Receptors, *MOL ENDO* · 1997 Vol 11 No. 6 802

Hunter DJ, Willett WC. Nutrition and breast cancer. *Cancer Causes Control* 1996, 7:56–8.

Ikeda S., Kishida S., Yamamoto H., Murai H., Koyama S., Kikuchi A.(1998) Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin.*EMBO J*. 17:1371–1384.

Jay R. Harris, Marc E. Lippman, C. Kent Osborne *Diseases of the Breast*, 1984.

Jeng, Y., Wu, M., Mao, T., Chang, M., and Hsu, H. 2000. Somatic mutations of beta-catenin play a crucial role in the tumorigenesis of sporadic hepatoblastoma. *Cancer Lett*. 152: 45–51. Wei, Y., Fabre, M., Branchereau, S., Gauthier, F., Perilongo, G., and Buendia, M.A. 2000. activation of beta-catenin in epithelial and mesenchymal hepatoblastomas. *Oncogene* 19: 498–504.

Jia Yu* and David M. Virshup, Updating the Wnt pathways, 2014, *Biosci Rep*. 2014; 34(5): e00142.

Jia Luo, The Role of Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK-3 β) in Tumorigenesis and Cancer Chemotherapy, *Cancer Lett*. 2009 January 18; 273(2): 194–200.

Jin, Tamura, Tsuchiya, Sakata, Kashiwaba M, Osakabe M and Motoyama T. adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter hypermethylation in primary breast cancers. *Br J Cancer* 2001; 85:69-73.

Jönsson M, Borg A, Nilbert M, Andersson T. Involvement of adenomatous polyposis coli apc/beta catenin signaling in human breast cancer. *Eur J Cancer*. 2000 Jan;36(2):242-8.

Kahn Michael. Can we safely target the WNT pathway? *Nat Rev Drug Discov*. 2014 July ; 13(7): 513–532.

Kamino M, Kishida M, Kibe T, Ikoma K, Iijima M, Hirano H et al. Wnt- 5a signaling is correlated with infiltrative activity in human glioma by inducing cellular migration and MMP- 2. *Cancer sci* 2011; 102: 540–548.

Karayiannakis AJ, Nakopoulou L, Gakiopoulou H, et al. Expression patterns of h-catenin in in situ and invasive breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2001;27:31–6.

Katoh M Frequent up-regulation of WNT2 in primary gastric cancer and colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2001 Nov;19(5):1003-7.

Kazi, M., Trivedi, T., Kobawala, T., & Ghosh, N. (2016). The Potential of Wnt Signaling Pathway in Cancer: A Focus on Breast Cancer. *Cancer Translational*

Medicine, 2(2), 55.

Ken M. Cadigan and Roel Nusse, Wnt signaling: a common theme in animal development, 1997, *GENES & DEVELOPMENT* 11:3286–330.

Khalil, S., Tan, G. A., Giri, D. D., Zhou, X. K., & Howe, L. R. (2012). Activation status of Wnt/ β -catenin signaling in normal and neoplastic breast tissues: relationship to HER2/neu expression in human and mouse. *PloS One*, 7(3), e33421.

Khramtsov AI, Khramtsova GF, Tretiakova M, Huo D, Olopade OI, Goss KH, Wnt/beta-catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome, *Am J Pathol*. 2010 Jun;176(6):2911-20.

Kilander MB, Dahlström J, Schulte G . Assessment of Frizzled 6 membrane mobility by FRAP supports G protein coupling and reveals WNT-Frizzled selectivity. *Cell Signal* 2014; 26: 1943–1949.

Kim M., Lee H.C., Tsedensodnom O., Hartley R., Lim Y.-S., Yu E., Merle P., Wands J.R., Functional interaction between WNT3 and Frizzled-7 leads to activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells, *J. Hepatol*. 48 (2008) 780-791.

Kirikoshi, H., et al. 2001. Expression of Wnt-14 and Wnt-14b mRNAs in human cancer, up-regulation of Wnt-14 by IFN γ and up-regulation of Wnt-14b by β -estradiol. *Int. J. Oncol*. 19: 1221-1225.

Kishida M, Koyama S, Kishida S, Matsubara K, Nakashima S, Higano K, Takada R, Takada S, Kikuchi A. Axin prevents Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin. *Oncogene*. 1999 Jan 28;18(4):979-85.

Klein, D., Demory, A., Peyre, F., Kroll, J., Augustin, H. G., Helfrich, W., Goerdt, S. (2008). Wnt2 acts as a cell type-specific, autocrine growth factor in rat hepatic sinusoidal endothelial cells cross-stimulating the VEGF pathway. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 47(3), 1018–1031.

Klingensmith, J., Nusse, R., Perrimon, N. (1994). The *Drosophila* segment polarity gene *dishevelled* encodes a novel protein required for response to the wingless signal. *Genes Dev*. 8(1): 118--130.

Klopocki E, Kristiansen G, Wild PJ, Klamann I, Castanos-Velez E, Singer G, Stohr R, Simon R, Sauter G, Leibiger H, Essers L, Weber B, Hermann K, Rosenthal A, Hartmann A, Dahl E. Loss of SFRP1 is associated with breast cancer progression and poor prognosis in early stage tumors. *Int J Oncol*.2004;25:641–649.

Koch, A., Denkhaus, D., Albrecht, S., Leuschner, I., von Schweinitz, D., and Pietsch, T. 1999. childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res*. 59: 269–273.

Kolben T, Perobner I, Fernsebner K, Lechner F, Geissler C, Ruiz-Heinrich L et al. (2012). Dissecting the impact of Frizzler receptors in Wnt/beta-catenin signaling of human mesenchymal stem cells. *Biol Chem* 393: 1433–1447.

Koval A., Katanaev V.L., Dramatic dysbalancing of the Wnt pathway in breast cancers, *Sci. Rep*. 8 (2018) 7329.

Krishnamurthy N. , Kurzrock R., Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer:

- Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treatment Reviews* 62 (2018) 50–60
- Kubba, A.A., Breast cancer and the pill. *J R Soc Med*, 2003. 96(6): p. 280-3.
- Kvale, G. and I. Heuch, Menstrual factors and breast cancer risk. *Cancer*, 1988. 62(8): p. 1625-31.
- Lakhani, S.R., Ellis. I.O., Schnitt, S.J., Tan, P.H., van de Vijver, M.J.
- IARC, WHO Classification of Tumours, Volume 4
- Lamb R, Ablett M, Spence K, Landberg G, Sims A, and Clarke R, Aziz S, Wnt Pathway Activity in Breast Cancer Sub-Types and Stem-Like Cells, *PLoS One*. 2013; 8(7): e67811
- Lee J.S., Ishimoto A., Yanagawa S. (1999) Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway. *J. Biol. Chem.*
- Lejeune S, Huguet EL, Hamby A, Poulsom R, Harris AL WNT5A cloning, expression, and up-regulation in human primary breast cancers. *Clin Cancer Res*. 1995; 1 (2): 215-22.
- Leris A.C., Roberts T.R., Jiang W.G., Newbold R.F., Mokbel K., WNT5A Expression in Human Breast Cancer, *Anticancer Research* 25: 731-734 (2005)
- Li WF, Hu Z, Rao NY, Song CG, Zhang B, Cao MZ, Su FX, Wang YS, He PQ, Di GH, Shen KW, Wu J, Lu JS, Luo JM, Liu XY, Zhou J, Wang L, Zhao L, Liu YB, Yuan WT, Yang L, Shen ZZ, Huang W, Shao ZM (2008) The prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in high-risk breast cancer patients of Chinese Han nationality: two recurrent mutations were identified. *Breast Cancer Res Treat* 110(1):99–109
- Li X, Yost HJ, Virshup DM, Seeling JM, Protein phosphatase 2A and its B56 regulatory subunit inhibit Wnt signaling in *Xenopus*. *The EMBO journal*. 2001 ; 20 (15) : 4122-4131.
- Li, L., Yuan, H., Weaver, C. D., Mao, J., Farr, G. H., 3rd, Sussman, D. J., Jonkers, J., Kimelman, D. and Wu, D. (1999). Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to gsk in Wnt-mediated regulation of LEF-1. *EMBO J*. 18,4233-4240.
- Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y, Pestell RG, Hung MC Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Apr 11;97(8):4262-6.
- Lin Thorstensen and Ragnhild A. Lothe, The WNT Signaling Pathway and Its Role in Human Solid Tumors, 2003, *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*.
- Livak KJ, Schmittgen TD, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
- Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell dev Biol*. 2004;20:781-810.
- López-Knowles E, Zardawi SJ, McNeil CM, Millar EK, Crea P, Musgrove EA, Sutherland RL, O'Toole SA, Cytoplasmic localization of beta-catenin is a marker of poor outcome in breast cancer patients, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 Jan;19(1):301-9.

- Louie SH, Yang XY, Conrad WH, Muster J, Angers S, Moon RT, Cheyette BN. Modulation of the beta-catenin signaling pathway by the dishevelled-associated protein Hipk1. *PLoS ONE*. 2009; 4:e4310.
- Mai M, Qian C, Yokomizo A, Smith DI, Liu W. Cloning of the human homolog of conductin (AXIN2), a gene mapping to chromosome 17q23-q24. *Genomics*. 1999 Feb 1;55(3):341-4.
- Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH 3rd, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L, Wu D. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell*. 2001 Apr;7(4):801-9.
- Marvin ML, Mazzoni SM, Herron CM, Edwards S, Gruber SB, Petty EM. 2011. AXIN2-associated autosomal dominant ectodermal dysplasia and neoplastic syndrome. *Am J Med Genet A* 155A: 898–902.
- McCrea, P. D., Turck, C. W. and Gumbiner, B. (1991). A homolog of the armadillo protein in drosophila (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science* 254, 1359-1361.
- McMahon, A.P. and Moon, R.T.int-1—a protooncogene involved in cell signalling. development. 1989.
- Michael Tompson, Targeting the Wnt pathway in Cancer.
- Miguel A. HermidaJ. Dinesh KumarNick R. Leslie, GSK3- and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network, Miguel A, *Advances in Biological Regulation* 65 (2017) 5-15.
- Mikels J Amanda & Nusse Roel, Purified Wnt5a Protein Activates or Inhibits β -catrnin TCF Signaling Depending on Receptor Context *PLoS Biol* 4(4): e115
- Milovanovic T, Planutis K, Nguyen A, Marsh JL, Lin F, Hope C, Holcombe RF. Expression of Wnt genes and frizzled 1 and 2 receptors in normal breast epithelium and infiltrating breast carcinoma. *Int J Oncol*. 2004 Nov;25(5):1337-42.
- Mirabelli-Primdahl, L., Gryfe, R., Kim, H., Millar, A., Luceri, C., Dale, D., Holowaty, E., Bapat, B., Gallinger, S., and Redston, M. 1999. Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Res*. 59: 3346–3351.
- Mishra R. Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer, *Mol Cancer*. 2010; 9: 144.
- Mohibi Shakur, Mirza Sameer , Band Hamid, Band Vimla, Mouse models of estrogen receptor-positive breast cancer, *J Carcinog*. 2011; 10: 35.
- Moon RT, Brown JD, Torres M, WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development. *Trends Genet*. 1997 Apr;13(4):157-62.
- Mukhopadhyay, Subhankar Chakraborty, Moorthy P. Ponnusamy, Imayavaramban Lakshmanan, Maneesh Jain, and Surinder K. Batra Mucins in the Pathogenesis of Breast Cancer: Implications in Diagnosis, Prognosis and Therapy *Biochim Biophys Acta*. 2011 Apr; 1815(2): 224–240.
- Musolino A, Bella MA, Bortesi B, Michiara M, Naldi N, Zanelli P, Capelletti M, Pezzuolo D, camisa R, Savi M, Neri TM, Ardizzoni A (2007) BRCA mutations, molecular markers, and clinical variables in early-onset breast cancer: a population-based study. *Breast* 16(3):280–292.

- Nagahata T, Shimada T, Harada A, Nagai H, Onda M, Yokoyama S, Shiba T, Jin E, Kawanami O, Emi M. Amplification, up-regulation and over-expression of DVL-1, the human counterpart of the *Drosophila* disheveled gene, in primary breast cancers. *Cancer Sci.* 2003 Jun;94(6):515-8.
- Nakopoulou L, Gakiopoulou H, Keramopoulos A, et al. c-Met tyrosine kinase receptor expression is associated with abnormal h-catenin expression and favourable prognostic factors in invasive breast carcinoma. *Histopathology* 2000;36:313–25.
- Nam JS, Turcotte TJ, Yoon JK. Dynamic expression of R-spondin family genes in mouse development. *Gene Expression Patterns.* 2007b;7:306–312.
- Nguyen A, Rosner A, Milovanovic T, Hope C, Planutis K, Saha B, Chaiwun B, Lin F, Imam SA, Marsh JL, Holcombe RF, Wnt pathway component LEF1 mediates tumor cell invasion and is expressed in human and murine breast cancers lacking ErbB2 (her-2/neu) overexpression, *Int J Oncol.* 2005 Oct;27(4):949-56.
- Niehrs C, Acebron SP. Mitotic and mitogenic Wnt signalling. *EMBO J.* 2012 Jun 13;31(12):2705-13.
- Niehrs, The complex world of WNT receptor signalling, 2012, *Nature Reviews Molecular Cellbiology* 13, 767-779
- Novellademunt L, Antas P, Li VS, Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015 Oct 15;309(8):C511-21
- Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome, *Cell.* 1982 Nov;31(1):99-109.
- Nusse R. Developmental biology. Making head or tail of Dickkopf. *Nature.* 2001 May 17;411(6835):255-6.
- Ossipova O, Dhawan S, Sokol S, Green JB. Distinct PAR-1 proteins function in different branches of Wnt signaling during vertebrate development. *Dev. Cell.* 2005;8:829–841.
- Oving IM, Clevers HC Oving IM, Clevers HC *European journal of clinical investigation.* 2002, 32 (6) : 448-457.
- Ozawa M, Baribault H, Kemler R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.* 1989 Jun;8(6):1711-7.
- Palmer J, Rosenberg L, Clarke E, et al. Breast cancer and cigarette smoking: a hypothesis. *Am J epidemiol* 1991;134:1–13.
- Paul Polakis, Wnt signaling and cancer, 2001, *Genes & Development* 14:1837–1851
- Paul Polakis, Wnt signaling in cancer., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4 (2012) 1–13.
- Peifer, M., Berg, S. and Reynolds., A. B. (1994). A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* 76, 789-791.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:2002-2007.

- Prasad, C. P., Gupta, S. D., Rath, G., & Ralhan, R. (2007). Wnt signaling pathway in invasive ductal carcinoma of the breast: relationship between beta-catenin, dishevelled and cyclin D1 expression. *Oncology*, 73(1–2), 112–117.
- Price MA. CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. *Genes & development* 2006;20:399–410.
- Putti C Thomas, Abd El-Rehim M Dalia, Rakha A Emad, Paish E Claire, Lee HS Andrew, Pinder E Sarah and Ellis O Ian, Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis, *Modern Pathology* (2005) 18, 26–35
- Rebecca Lamb¹, Matthew P. Ablett, Katherine Spence, Goran Landberg, Andrew H. Sims, Robert B. Clarke² Wnt Pathway Activity in Breast , 2013, Plos One
- Reis-Filho JS, Tutt AN (2008) Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* 52(1):108–118
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 2003 Dec 5;302(5651):1704-9.
- Rijsewijk F., Schuermann M., Wagenaar E., Parren P., Weigel D., Nusse R. (1987) The drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 50:649–657.
- Roarty K, Serra R. WNT5A is required for proper mammary gland development and TGF- β -mediated inhibition of ductal growth. *Development*. 2007;134(21):3929–3939.
- Roarty K, Baxley S.E., Crowley M.R, Frost A.R., Serra R., Loss of TGF-beta or Wnt5a results in an increase in Wnt/beta-catenin activity and redirects mammary tumour phenotype, *Breast Cancer Res.* 11 (2) (2009) R19.
- Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Tenth ed. Elsevier, Lyon, France; 2011.
- Rosen PP. Rosen's Breast Pathology. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Lyon, France; 2009.
- Rothbacher, U., Laurent, M. N., Deardorff, M. A., Klein, P. S., Cho, K. W. and Fraser, S. E. (2000). Dishevelled phosphorylation, subcellular localization and multimerization regulate its role in early embryogenesis. *EMBO J.* 19,1010-1022.
- Sadot, Benjamin Geiger, Moshe Oren, and Avri Ben-Ze'ev Down-Regulation of β -Catenin by Activated p53 *Mol Cell Biol.* 2001 Oct; 21(20): 6768–6781.
- Sakanaka C., Leong P., Xu L., Harrison S.D., Williams L.T. (1999) Casein kinase-1 epsilon in the wnt pathway: Regulation of beta-catenin function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:12548–12552.
- Salahshor S, Woodgett JR. 2005. The links between axin and carcinogenesis. *J Clin Pathol* 58: 225–236.
- Schatzkin A, Longnecker MP. Alcohol and breast cancer. Where are we now and where do we go from here? *Cancer* 1994;74:1101–10.

- Schlosshauer PW, Brown SA, Eisinger K, Yan Q, Guglielminetti ER, Parsons R, Ellenson LH, Kitajewski J. APC truncation and increased beta-catenin levels in a human breast cancer cell line. *Carcinogenesis*. 2000 Jul;21(7):1453-6.
- Seeling, J.M., Miller, J.R., Gil, R., Moon, T., White, T.R., and Virshup, D.M. 1999. Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science* 283: 2089–2091.
- Siar CH, Nagatsuka H, Han PP, Buery RR, Tsujigiwa H, Nakano K, Ng KH, Kawakami T, Differential expression of canonical and non-canonical Wnt ligands in ameloblastoma, *J Oral Pathol Med*. 2012 Apr;41(4):332-9.
- Shulewitz M, Soloviev I, Wu T, Koeppen H, Polakis P, Sakanaka C. Repressor roles for TCF-4 and Sfrp1 in Wnt signaling in breast cancer. *Oncogene*. 2006 Jul 20;25(31):4361-9. Epub 2006 Mar 13.
- Smalley M.J. and Dale T.C., Wnt Signaling and Mammary Tumorigenesis, *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, Vol. 6, No. 1, 2001
- Smalley M.J., Sara E., Paterson H., Naylor S., Cook D., Jayatilake H., Fryer L.G., Hutchinson L.Fry M.J., Dale T.C.(1999) Interaction of axin and Dvl-2 proteins regulates Dvl-2-stimulated TCF-dependent transcription. *EMBO J*
- Solzak Jeffrey, Atale Rutuja, Hancock Bradley, Sinn Anthony, Pollok Karen, Jones David R& Radovich Milan, Dual PI3K and Wnt pathway inhibition is a synergistic combination against triple negative breast cancer, *npj Breast Cancer* (2017) 3:17
- Sørli T, Bukholm I, Børresen-Dale AL. Truncating somatic mutation in exon 15 of the APC gene is a rare event in human breast carcinomas. *Mutations in brief no. 179*. Online. *Hum Mutat*. 1998;12(3):215.
- Sparks, A.B., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. 1998. Mutational analysis of the *apc*/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res*. 58: 1130–1134.
- Sujata Persada, Armelle A.Troussarda, Timothy R. McPheea, David J. Mulholl and, and Shoukat Dedhara, Tumor Suppressor Pten Inhibits Nuclear Accumulation of β -Catenin and T Cell/Lymphoid Enhancer Factor 1–Mediated Transcriptional Activation, 2001, *JCB* vol. 153 no. 6 1161-1174
- Tamai K, Zeng X, Liu C, Zhang X, Harada Y, Chang Z, He X. A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell*. 2004 Jan 16;13(1):149-56.
- Thompson WD. Genetic epidemiology of breast cancer. *Cancer* 1994;74 (Suppl. 1):279–87.
- Thorstensen L, Lind GE, Løvig T, Diep CB, Meling GI, Rognum TO, Lothe RA. Genetic and epigenetic changes of components affecting the WNT pathway in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability. *Neoplasia*. 2005 Feb;7(2):99-108.
- Tserga Aggeliki, Michalopoulos V Nicolaos , Levidou Georgia , Penelope Korkolopoulou Penelope , Zografos George, Patsouris Efstratios , Saetta A Angelica, Association of aberrant DNA methylation with clinicopathological features in breast cancer, *Oncol Rep* 2012 May 5;27(5):1630-8
- Van Amerongen R., Nusse R. (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 136, 3205-3214.

- Van Nhieu, J.T., Renard, C.A., Wei, Y., Cherqui, D., Zafrani, E.S., and Buendia, M.A. 1999. nuclear accumulation of mutated beta-catenin in hepatocellular carcinoma is associated with increased cell proliferation. *Am. J. Pathol.* 155: 703–710.
- Veeck J, Niederacher D, An H, Klopocki E, Wiesmann F, Betz B, Galm O, Camara O, Durst M, Kristiansen G, Huszka C, Knuchel R and Dahl E. Aberrant methylation of the Wnt antagonist SFRP1 in breast cancer is associated with unfavourable prognosis. *Oncogene* 2006; 25:3479-88.
- Verkooijen HM, Fioretta G, Vlastos G, Morabia A, Schubert H, Sappino AP, Bouchardy C. important increase of invasive lobular breast cancer incidence in Geneva, Switzerland., 2003, *Int J Cancer.* May 10;104(6):778-81.
- Voloshanenko O., Gmach P., Winter J., Kranz D., Boutros M., Mapping of Wnt-Frizzled interactions by multiplex CRISPR targeting of receptor gene families, *FASEB J.* 31 (2017) 4832–4844 .
- Ueno Koji , Hiroshi Hirata, Yuji Hinoda, and Rajvir Dahiya, Frizzled homolog proteins, microRNAs and Wnt Signaling in Cancer, *Int J Cancer.* 2013 April 15; 132(8): 1731–1740.
- Wallingford JB, Habas R the developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development.* 2005 Oct;132(20):4421-36.
- Wang et al., FOXKs Promote Wnt/ β -Catenin Signaling by Translocating DVL into the Nucleus, 2015 *Developmental Cell.*
- Wang Z, Zhang H, Jianing N, Zhenhai M, Haidong Zhao, Caigang L. Clinical implications of β -catenin protein expression in breast cancer, *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(11):14989-14994.
- Webster MT, Rozycka M, Sara E, Davis E, Smalley M, Young N, Dale TC, Wooster R. sequence variants of the axin gene in breast, colon, and other cancers: an analysis of mutations that interfere with GSK3- binding. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000 Aug;28(4):443-53.
- Wend P, Runke S, Wend K, et al. WNT10B/beta-catenin signaling induces HMGA2 and proliferation in metastatic triple-negative breast cancer. *EMBO Mol Med.* 2013;5:264-279.
- Willert K, Nusse R. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev.* 1998 Feb;8(1):95-102.
- Winchester, D. J., Chang, H. R., Graves, T. A., Menck, H. R., Bland, K. I., & Winchester, D. A comparative analysis of lobular and ductal carcinoma of the breast: presentation, treatment, and outcomes. 1998, *Journal of the American College of Surgeons*, 186(4), 416-422.
- Wissmann C, Wild PJ, Kaiser S, Roepcke S, Stoehr R, Woenckhaus M, Kristiansen G, Hsieh JC, Hofstaedter F, Hartmann A, Knuechel R, Rosenthal A, Pilarsky C. WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer. *J Pathol.* 2003 Oct;201(2):204-12.
- Wodarz A., Nusse R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell dev. Biol.* 14, 59-88.

Wolski H, Drwęska-Matelska N, Seremak-Mrozikiewicz A, Łowicki Z, Czerny B. The role of wnt/ β -catenin pathway and LRP5 protein in metabolism of bone tissue and osteoporosis etiology *Ginekol Pol.* 2015 Apr;86(4):311-4.

Wong HC, Bourdelas A, Krauss A, Lee HJ, Shao Y, Wu D, Mlodzik M, Shi DL, Zheng J. direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell.* 2003 Nov;12(5):1251-60.

Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Alfaro MP, Buchholz TA, Rosen JM. WNT/ β -catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(2):618e623.

Wright, K., Wilson, P., Morland, S., Campbell, I., Walsh, M., Hurst, T., Ward, B., Cummings, M., and Chenevix-Trench, G. 1999. β -catenin mutation and expression analysis in ovarian cancer: Exon 3 mutations and nuclear translocation in 16% of endometrioid tumours. *Int. J. Cancer* 82: 625–629.

Wu G, Xu G, Schulman BA, Jeffrey PD, Harper JW, Pavletich NP 2003. Structure of a β -TrCP1-Skp1- β -catenin complex: Destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(β -TrCP1) ubiquitin ligase. *Mol Cell* 11: 1445–1456.

Wu Y., Ginther C., Kim J., Mosher N., Chung S., Slamon D., Vadgama J.V, Expression of WNT3 activates Wnt/ β -catenin pathway and promotes EMT-like phenotype in trastuzumab-resistant HER2-overexpressing breast cancer cells, *Mol. Cancer Res.* 10 (2012) 1597–1606.

Xu Wen-Huan, Zhe-Bin Liu, Chen Yang, Wenxin Qin, Zhi-Ming Shao, Expression of Dickkopf-1 and Beta-Catenin Related to the Prognosis of Breast Cancer Patients with Triple Negative Phenotype, *PlosOne* 2014.

Yang L, Wu X, Wang Y, Zhang K, Wu J, Yuan YC, Deng X, Chen L, Kim CC, Lau S, Somlo G, Yen Y. FZ7 has a critical role in cell proliferation in triple negative breast cancer, *Oncogene.* 2011 Oct 27;30(43):4437-46.

Yanyuan Wu, Charles Ginther, Juri Kim, Nicole Mosher, Seyung Chung, Denni Slamon, and Jaydutt V. Vadgama, Expression of WNT3 activates Wnt/ β -catenin pathway and promotes EMT-like phenotype in trastuzumab resistant HER2- overexpressing breast cancer cells, *Mol Cancer Res.* 2012 December ; 10(12): 1597–1606.

Yost C, Torres M, Miller J R, Huang E, Kimelman D, and Moon , The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of β -catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3, *Genes Dev.* 10 (12), 1443-1454.

Yu Cissy Qing, Verheyen M. Esther , Zeng Ariel Yi, Mammary Development and Breast Cancer: A Wnt Perspective, *Cancers* 2016, 8, 65.

Zeng X, Huang H, Tamai K, Zhang X, Harada Y, Yokota C, Almeida K, Wang J, Doble B, Woodgett J, et al. 2008. Initiation of Wnt signaling: Control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* 135:367–375.

Zhang Xiangqian & Hao Jijun. Development of anticancer agents targeting the Wnt/ β -catenin signaling. *Am J Cancer Res* 2015;5(8):2344-2360.

Zhong Zheng & Yu Jia & David M. Virshup & Babita Madan, Wnts and the hallmarks of cancer, *Cancer and Metastasis Reviews* (2020) 39:625–645

Γενική και Ειδική Παθολογική Ανατομική, Bocker W., Denk H., Heitz P., 2007.

Εγχειρίδιο Παθολογικής Ανατομικής, Riede N., Werner M., 2008