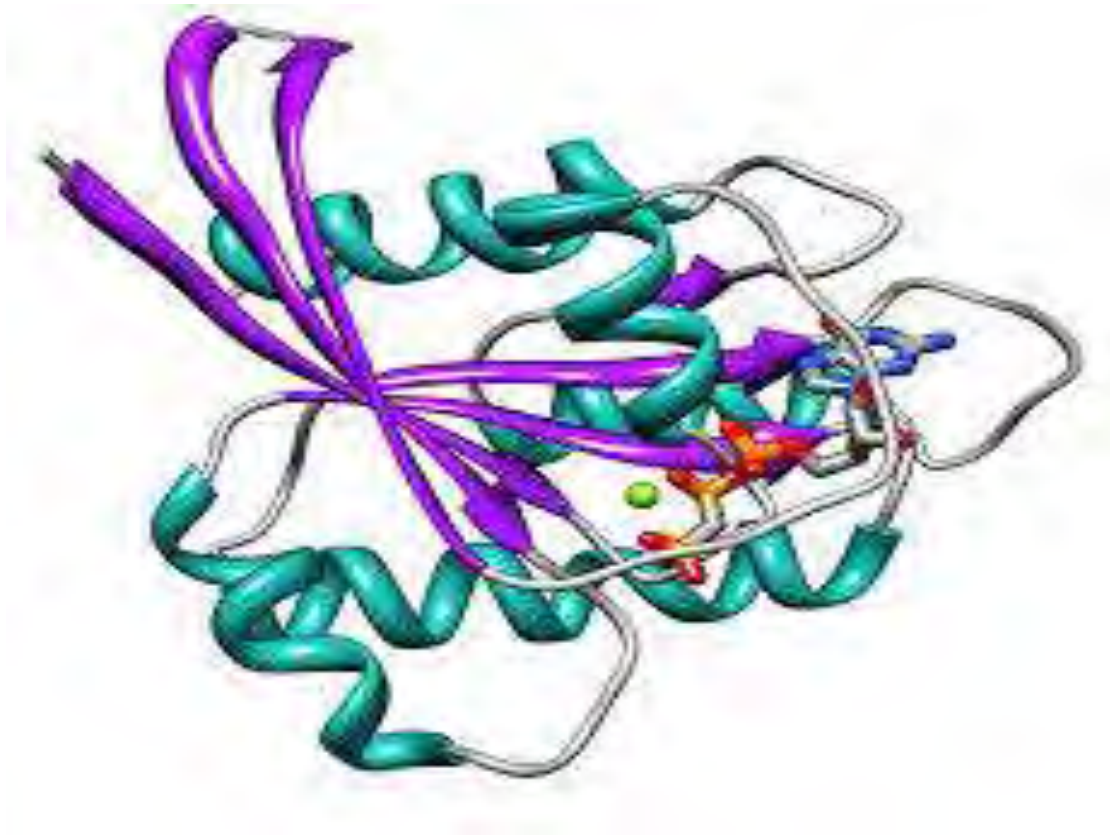


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Μοριακή ανάλυση των γονιδίων *RAS* σε καρκινώματα θυρεοειδούς
στον ελληνικό πληθυσμό.**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ-ΠΑΠΟΥΤΣΙΔΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2014

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ), στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Υπεύθυνη καθηγήτρια: **Λιαδάκη Καλλιόπη**, Επίκουρος Καθηγήτρια ΤΒΒ, Π.Θ.

Τριμελής επιτροπή:

Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια ΤΒΒ, Π.Θ.

Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής ΤΒΒ, Π.Θ.

Σαραφίδου Θεολογία, Επίκουρος Καθηγήτρια ΤΒΒ, Π.Θ.

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και ιδιαίτερα την καθηγήτρια μου, κύρια Καλλιόπη Λιαδάκη για την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση και την κατανόησή της. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω το εργαστήριο της Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για τη φιλοξενία αλλά και το εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας για τη παροχή απαραίτητου εξοπλισμού για την εργασία.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	5
1. Εισαγωγή	7
1.1 Η φυσιολογία του θυρεοειδούς αδένος	7
1.2 Η ιστολογία του θυρεοειδή αδένος.....	7
1.3 Ο καρκίνος του θυρεοειδή.....	8
1.4 Θεραπευτική αντιμετώπιση καρκίνου του θυρεοειδούς	9
1.5 Γενετικές μεταλλάξεις στον καρκίνο του θυρεοειδούς.....	10
Α. Γονίδιο b-raf.....	11
Β. RET/PTC	13
Γ. Οικογένεια γονιδίων Ras.....	13
Δ. PAX8/PPARγ.....	14
Ε. Σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK	14
1.6 Μοριακή διαγνωστική	16
1.6.1 Κυτταρολογία	16
1.6.2 Μοριακοί δείκτες.....	17
1.7 Προεγχειρητική χρήση του Braf ως διαγνωστικό μέσο	18
1.8 Θεραπευτική χρήση της μετάλλαξης BRAF.....	20
1.9 Μελλοντικές θεραπευτικές προσεγγίσεις	20
Σκοπός	23
2. Υλικά και Μέθοδοι	24
2.1. Υλικά	24
Α. Χημικά αντιδραστήρια	24
Β. Δείγματα ασθενών	24
2.2. Μέθοδοι.....	25
Α. Απομόνωση DNA από ιστό σε παραφίνη (FFPE)	25
Β. Ανάλυση-ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης.	27
Γ. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	30
Γ1. Διαδικασία αντίδρασης PCR.....	31
Δ. Καθαρισμός προϊόντων PCR (PCR-clean-up)	36
Ε. Αλληλούχιση των προϊόντων PCR	37
3. Αποτελέσματα.....	38
1. Απομόνωση DNA από βιοψίες ασθενών	38

2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	38
3. Καθαρισμός των προϊόντων PCR	40
4. Αλληλούχηση καθαρισμένων PCR products	41
Συζήτηση	42
Βιβλιογραφία.....	44

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1. Σύγκριση διαφορετικών προσεγγίσεων μοριακής διαγνωστικής.....	18
Πίνακας 2. Δείγματα ασθενών.....	24-25
Πίνακας 3. Οι συνθήκες για την αντίδραση Touchdown PCR.....	34
Πίνακας 4. Οι αναλογίες αντιδραστηρίων στις αντιδράσεις PCR.....	35
Πίνακας 5. . Επιλογή των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.....	35

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1. Οι κυτταρικοί τύποι του θυρεοειδούς αδένος.....	8
Εικόνα 2. Ιστολογία θυρεοειδικού καρκίνου.....	9
Εικόνα 3. Μονοπάτια MAPK και PI3K-AKT-MTOR και θεραπευτικοί στόχοι.....	11
Εικόνα 4. Μονοπάτι μεταγωγής σήματος MAPK	16
Εικόνα 5. Ηλεκτροφόρηση γονιδιωματικών DNA.....	38
Εικόνα 6. Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR	39
Εικόνα 7. Ηλεκτροφόρηση προϊόντος touchdown PCR.....	40
Εικόνα 8. Ηλεκτροφόρηση καθαρισμένων προϊόντων PCR	40
Εικόνα 9. Χρωματογράφημα.....	41

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το καρκίνωμα του θυρεοειδούς αδένα αποτελεί μια από τις πιο συνηθισμένες ενδοκρινείς κακοήθειες. Η εμφάνισή του παρουσιάζει ποικίλα ιστολογικά πρότυπα, με το πιο συχνό να είναι αυτό του θηλώδους καρκινώματος που προέρχεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του θυρεοειδούς. Η ερευνητική δραστηριότητα αποκάλυψε ότι ορισμένες μεταλλάξεις, ιδιαίτερα αυτές που οδηγούν στην ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών, συμμετέχουν στην παθογένεια του καρκινώματος του θυρεοειδούς. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον δημιουργεί το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις αυτές όταν υπάρχουν, κατά τεκμήριο αποκλείουν την ύπαρξη άλλων μεταλλάξεων. Οι μεταλλάξεις των οποίων η μελέτη έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι η μετάλλαξη BRAF V600E, οι μεταλλάξεις των γονιδίων RAS και οι μετατοπίσεις RET/PTC και PAX8/PPARγ. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συσχέτιση μεταλλάξεων στο γονίδιο HRAS και συγκεκριμένα στα κωδικόνια 12 και 13, με την εκδήλωση καρκίνου του θυρεοειδούς αδένα στον ελληνικό πληθυσμό. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε γονιδιωματικό DNA από δείγματα ιστού ασθενών διαγνωσμένων με διάφορες μορφές καρκίνου του θυρεοειδούς. Στη συνέχεια με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ενισχύθηκε με τους κατάλληλους εκκινητές η περιοχή του γονιδίου που περιλαμβάνει τα κωδικόνια 12/13 του HRAS και τα προϊόντα της PCR αλληλουχήθηκαν για τον εντοπισμό της συγκεκριμένης μετάλλαξης. Στη συγκεκριμένη εργασία δεν ταυτοποιήθηκε καμία μετάλλαξη στα κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου HRAS σε κανένα από τα 24 που μελετήθηκαν. Εντούτοις, για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων είναι απαραίτητο η μελέτη να επεκταθεί σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και στις υπόλοιπες μεταλλάξεις των γονιδίων RAS.

ABSTRACT

Thyroid carcinoma is one of the most common malignancy of the endocrine system. Thyroid carcinoma displays a variety of histological patterns with the most common being that of papillary carcinoma. Previous studies have demonstrated that various

genetic alterations, especially the ones which result in the activation of the MAPK kinase signaling pathway, contribute to the pathogenesis of thyroid carcinoma. These mutations include point mutations of the B-RAF or RAS genes as well as RET/PTC or PAX8/PPAR γ gene rearrangements. It should be noted that the above mutations are mutually exclusive. The present study aims to investigate the association of the HRAS gene mutations (at codons 12/13) with the onset of thyroid carcinoma in the Greek population. Genomic DNA was isolated from biopsies of patients diagnosed with various types of thyroid carcinoma and the region of the HRAS gene including codons 12/13 was amplified using Polymerase Chain Reaction (PCR). The sequencing of the PCR products failed to identify mutations in codons 12 and 13 of the 26 samples analyzed. However, in order to be able to draw firm conclusions this study must be expanded to include the other mutations of the RAS genes in a larger population.

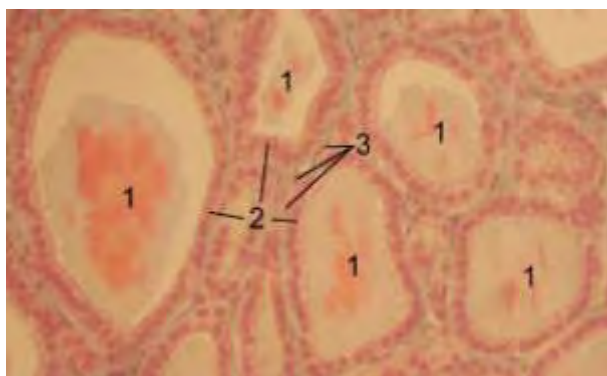
1. Εισαγωγή

1.1 Η φυσιολογία του θυρεοειδούς αδένος

Ο θυρεοειδής αδένος θεωρείται ένας από τους μεγαλύτερους ενδοκρινείς αδένες και αποτελείται από δύο λοβούς ενωμένους μεταξύ τους στον ισθμό. Ο συγκεκριμένος αδένος εντοπίζεται στο πρώτο ή δεύτερο ημικρίκιο της τραχείας (Σμοκοβίτης, 2007). Η βασική μορφολογική μονάδα του θυρεοειδούς αδένος είναι το θυρεοειδές θυλάκιο (Σμοκοβίτης, 2007) στο οποίο παράγονται οι βασικές ορμόνες του θυρεοειδή, η θυροξίνη(T_4) και η τριιωδιοθυρονίνη(T_3). Για τη σύνθεση των ορμονών αυτών είναι απαραίτητη η συμμετοχή του ιωδίου. Μέσω αυτών των ορμονών, ο θυρεοειδής αδένος συμμετέχει στον έλεγχο πολλών διαδικασιών όπως ο ρυθμός κατανάλωσης ενέργειας, η παραγωγή πρωτεϊνών και η απόκριση σε άλλες ορμόνες (Σμοκοβίτης, 2007). Η λειτουργική δραστηριότητα του αδένος ελέγχεται κυρίως από την θυρεοειδοτρόπο ορμόνη του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης (TSH) και αυτή από την επιτρεπτική ορμόνη της θυρεοτροπίνης (TRH) του υποθαλάμου.

1.2 Η ιστολογία του θυρεοειδή αδένος

Σε μικροσκοπικό επίπεδο, υπάρχουν 3 κυτταρικοί τύποι στον θυρεοειδή: τα θυρεοειδή θυλάκια, τα επιθηλιακά κύτταρα του θυρεοειδούς και τα παραθυρεοειδή ή κύτταρα C (Εικόνα 1) (Fawcett & Jensch, 2002). Τα πρώτα είναι υπεύθυνα για την εκλεκτική απορρόφηση του ιωδίου, τα δεύτερα εκκρίνουν τις ορμόνες T_3 και T_4 ενώ τα κύτταρα C εκκρίνουν μια άλλη βασική ορμόνη του θυρεοειδή, την καλσιτονίνη (Fawcett & Jensch, 2002).

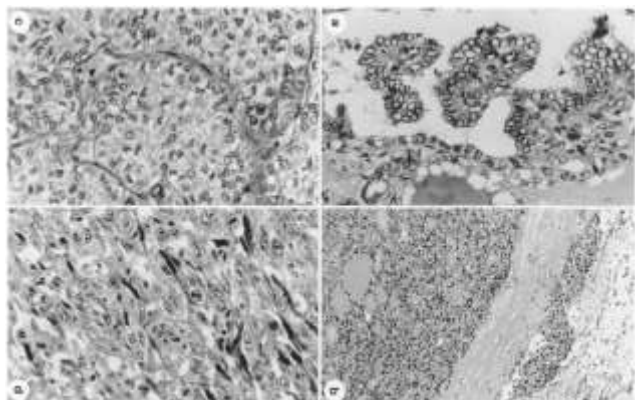


Εικόνα 1: 1.Τα θυροειδικά θυλάκια 2. Τα επιθηλιακά κύτταρα του θυροειδούς 3. Τα κύτταρα C

1.3 Ο καρκίνος του θυροειδή

Ο καρκίνος του θυροειδούς προέρχεται από δύο τύπους συγκεκριμένων κυττάρων: τα επιθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα C (**Nikiforov, 2011**). Ανάλογα με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά ο καρκίνος του θυροειδούς διακρίνεται σε θηλώδη (papillary) (Εικόνα 2a), θυλακιώδη (follicular) (Εικόνα 2b), αναπλαστικό (anaplastic), ο οποίος αν και σπάνιος επιδεικνύει υψηλά επίπεδα θνησιμότητας, και σε μυελοειδές (myeloid) καρκίνο. Τα ποσοστά του θηλώδους, θυλακιώδους, αναπλαστικού και μυελοειδούς αντιστοιχούν στο 85%, 15%, 2% και 3%-αντίστοιχα της κακοήθειας του θυροειδούς αδένα (**Goutas et al. 2003**). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι όλοι οι τύποι καρκίνου προέρχονται από τα θυροειδή επιθηλιακά κύτταρα, εκτός από το μυελοειδές καρκίνωμα που προέρχεται από τα κύτταρα C (**Nikiforov, 2011**). Ο θηλώδης και ο θυλακιώδης καρκίνος μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στους καλά διαφοροποιημένους καρκίνους σε αντίθεση με τους ελάχιστα διαφοροποιημένους καρκίνους (Εικόνα 2c) (**DeLelli et al. 2004 , Nikiforov et al. 2009**). Οι τελευταίοι, μπορούν να προκύψουν είτε *de novo* είτε από προϋπάρχον καλά διαφοροποιημένο θηλώδες ή θυλακιώδες καρκίνωμα (**Nikiforov, 2011**). Οι θυλακιώδεις όγκοι υποκατηγοριοποιούνται στο συμβατικό καρκίνωμα, στο ογκοκυττικό καρκίνωμα αλλά και στα καλοήγη θυλακιώδη και ογκοκυττικά αδενώματα (**Nikiforova et al. 2003**). Το συμβατικό καρκίνωμα, κατ' ουσίαν, δεν περιλαμβάνει ποτέ περιφερικούς λεμφαδένες αλλά προκαλεί μεταστάσεις στα οστά και στους πνεύμονες (**Nikiforova et al. 2003**). Τα ογκοκυττικά αδενώματα

προσβάλλουν περιφερικούς λεμφαδένες ενώ παράλληλα προκαλούν και μεταστάσεις που μεταδίδονται μέσω του αίματος (Nikiforova et al. 2003).



Εικόνα 2. Ιστολογία θυρεοειδικού καρκίνου (Motoi et al. 2000)

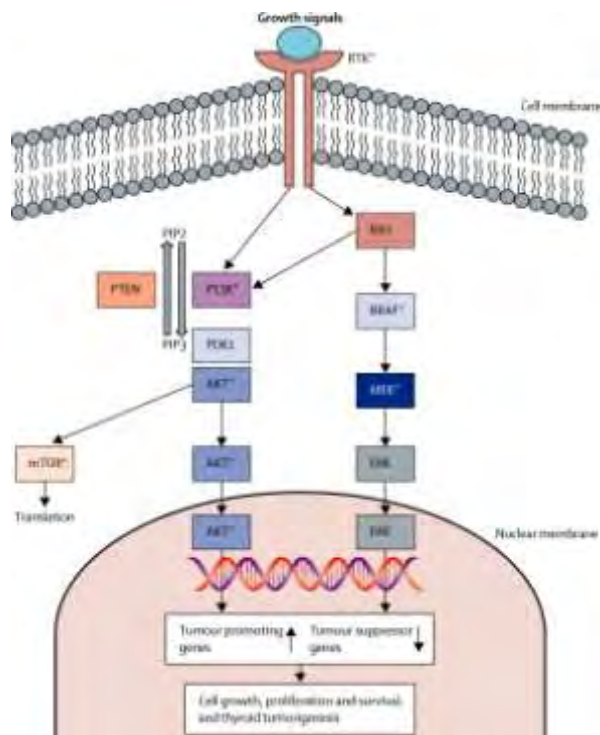
1.4 Θεραπευτική αντιμετώπιση καρκίνου του θυρεοειδούς

Η κλασική θεραπεία για τους πάσχοντες από καρκίνο του θυρεοειδούς είναι η ολική θυρεοειδεκτομή, ακολουθούμενη σε ορισμένες περιπτώσεις από θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο (Xing et al. 2013). Προς το παρόν, ο διαφοροποιημένος, ο μη καλά διαφοροποιημένος και ο αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς είναι οι κύριες αιτίες θανάτου που σχετίζονται με τον καρκίνο του θυρεοειδούς διότι είναι δύσκολα χειρουργήσιμοι και ανθεκτικοί στη θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο (Xing et al. 2013). Υπάρχει δυσκολία στην εκτίμηση του κινδύνου του κάθε ασθενούς με καρκίνο του θυρεοειδούς, ενώ παράλληλα ένα θέμα που προκύπτει είναι και η πρόκληση για εξισορρόπηση των πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων των θεραπειών που χρησιμοποιούνται (Xing et al. 2013). Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αδένου αποτελεί ίσως την πιο κοινή ενδοκρινή κακοήθεια και σε η εμφάνισή της όλο και αυξάνεται παγκοσμίως (Albores-Saavedra et al. 2007, Davies et al. 2006, Hodgson et al. 2004). Η αύξηση αυτή παραλληλίζει με την αύξηση των γεγονότων διαγνωσμένων οζιδίων του θυρεοειδούς, τα οποία έχουν ένα συνολικό κακοήθη ρίσκο 5-10% (Xing et al. 2013). Μάλιστα, ο κύριος στόχος για την εκτίμηση των ασθενών με οζίδια του θυρεοειδούς είναι να ξεχωρίσουν εάν πρόκειται για καρκίνο

ή για καλοήθη οζίδια (**Xing et al. 2013**). Αυτός ο στόχος παραδοσιακά μπορεί να επιτευχθεί με συμβατικούς τρόπους όπως το υπερηχογράφημα και η βιοψία μέσω λεπτής βελόνας (παρακέντηση) (Fine Needle Aspiration) αλλά θα πρέπει να επισημανθεί ότι αυτά τα διαγνωστικά εργαλεία, σε πολλές περιπτώσεις, δε προσφέρουν ασφαλή διάγνωση (**Cooper et al. 2009**).

1.5 Γενετικές μεταλλάξεις στον καρκίνο του θυρεοειδούς

Ποικίλες γενετικές αλλαγές έχουν ανακαλυφθεί στον καρκίνο του θυρεοειδούς αδένου, οι οποίες έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην έναρξη και ανάπτυξη της συγκεκριμένης ασθένειας (**Nikiforov 2011**). Οι κλασικές γενετικές αλλαγές που εντοπίζονται συνήθως, περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια B-RAF (**Cohen 2003**) και RAS (**Bongarzone & Pierotti 2003**), ανακατατάξεις στα γονίδια RET/PTC (**Tallini 2002**) καθώς και τη δημιουργία ογκογονιδίου λόγω σύντηξης των γονιδίων PAX8-PPAR γ (**McIver et al 2004**). Τα θηλώδη καρκινώματα προκαλούνται από τις σημειακές μεταλλάξεις των γονιδίων Braf και Ras παράλληλα με τις ανακατατάξεις των γονιδίων RET/PTC και TRK (Tyrosin Receptor Kinases, υποδοχείς κινασών τυροσίνης), όλες εκ των οποίων φαίνεται να εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών (**Nikiforov 2011**). Τα θυλακιδώδη καρκινώματα (σε ποσοστό περίπου 75%) περιλαμβάνουν τις μεταλλάξεις στα γονίδια Ras και τις ανακατατάξεις των γονιδίων PAX/PPAR γ (**Nikiforov , 2011**). Η μεγάλη πρόοδος που έχει λάβει χώρα τα τελευταία χρόνια στο πεδίο του θυρεοειδικού καρκίνου, καταδεικνύεται από την αποσαφήνιση των μονοπατιών MAPK και PI3K/AKT και τη μοριακή παθογένεια στο συγκεκριμένο καρκίνο (**Xing, 2013, Εικόνα 3**). Όπως γίνεται κατανοητό, προσφέρεται μια μεγάλη ευκαιρία για εύρεση καινοφανών διαγνωστικών δεικτών αλλά και θεραπευτικών στόχων μέσω των οποίων μπορεί να σχεδιαστούν στρατηγικές για καλύτερη προσέγγιση στο θέμα του καρκίνου του θυρεοειδούς (**Xing, 2013**). Στη συνέχεια αναλύονται οι μεταλλάξεις που αναφέρθηκαν και η επίδρασή τους στην ανάπτυξη του καρκίνου του θυρεοειδούς.



Εικόνα 3. Μονοπάτια MAPK και PI3K-AKT-MTOR *Οι θεραπευτικοί στόχοι των 2 μονοπατιών που εξετάζονται κλινικά σημειώνονται με * (Xing, 2013).

A. Γονίδιο b-raf

Το γονίδιο braf κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη η οποία ανήκει στην raf/mil οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών σερίνης-θρεονίνης (Sithanandam et al. 1990; Sithanandam et al. 1992), ενώ εκφράζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα αιμοποιητικά κύτταρα, στους όρχεις, σε νευρώνες και στα επιθηλιακά κύτταρα του θυρεοειδούς (Daum et al. 1994 ; Kondo et al. 2007). Η πρωτεΐνη αυτή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μονοπατιού μεταγωγής σήματος των MAP κινασών/ERK το οποίο επηρεάζει την κυτταρική διαίρεση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Robinson, & Cobb 1997 ; MacCorkle & Tan 2005). Οι μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο είναι πολλαπλές, αν και αυτή που συναντάται συχνότερα είναι η δεύτερη πιο συχνή σωματική μετάλλαξη σε όλους τους ανθρώπινους καρκίνους (Tang & Lee, 2010) και οδηγεί στην αντικατάσταση του

αμινοξέος βαλίνη από το γλουταμικό στο κατάλοιπο 600 (V600E), λόγω μιας σημειακής μετάλλαξης που αφορά στο νουκλεοτίδιο 1799 (T1799A) (Xing, 2005). Η δραστικότητα της κινάσης BRAF^{V600E} είναι 460 φορές μεγαλύτερη από αυτή του αγρίου τύπου και αυτή η ενεργή διαμόρφωση μπορεί να μετατρέψει φυσιολογικά σε καρκινικά κύτταρα (Davies et al., 2002 ; Wan et al., 2004). Η συγκεκριμένη μετάλλαξη συναντάται συχνά σε θηλώδες μικροκαρκίνωμα του θυρεοειδούς, υποδηλώνοντας ότι η μετάλλαξη είναι ένα πρώιμο γεγονός στην ανάπτυξη του θηλώδους καρκίνου (Ugolini et al., 2007; Kim et al., 2005). Ο καρκίνος του θυρεοειδούς βέβαια εξαρτάται, πέραν των γενετικών αλλαγών, και από άλλους παράγοντες που προδιαθέτουν για τη συγκεκριμένη μορφή καρκίνου όπως το περιβάλλον, η ραδιενέργεια και ο τρόπος ζωής (Dal Maso et al. 2009). Πολλές μελέτες συσχέτισαν την εν λόγω μετάλλαξη με υψηλού ρίσκου κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά όπως η μεγάλη ηλικία (Trovisco et al. 2005), το φύλλο (Xu et al. 2003), το μέγεθος του όγκου (Frasca et al 2008) και τον επιθετικό υπότυπο (Lupi et al. 2007). Τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και τα συστήματα σταδιοποίησης σχεδιάζονται έτσι ώστε να προβλέπουν την επανεμφάνιση του όγκου και την ασθένεια (Döbert et al. 2004). Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με μεγάλο αριθμό ασθενών, κατέληξαν ότι η μετάλλαξη στο BRAF σχετίζεται με επιθετικά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και ότι αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη επανεμφάνισης του καρκίνου μετά από συγκεκριμένα διαστήματα, (Kebebew et al. 2007 ; Elisei et al. 2008 ; Xing et al. 2005). Τα αποτελέσματα ωστόσο αυτών των μελετών δεν είναι παντού ομοιόμορφα και αυτό μπορεί να οφείλεται σε διακύμανση στον πληθυσμό της μελέτης όσον αφορά στο μέγεθος, την ηλικία, τους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, τα στάδια της νόσου κατά την αρχική διάγνωση και τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει βρεθεί σε κλασικά ιστολογικά δείγματα θηλώδους θυρεοειδικού καρκίνου αλλά και σε θυλακιώδεις παραλλαγές θηλώδους καρκίνου (papillary carcinoma of follicular subtype) (Gianoukakis et al. 2011).

B. RET/PTC

Η ανακατάταξη RET/PTC προκύπτει από τη σύντηξη του 3' άκρου του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης RET και του 5' άκρου ενός άσχετου γονιδίου (**Grieco et al. 1990**). Αυτή η μετάλλαξη οδηγεί στην παραγωγή μιας χιμαιρικής πρωτεΐνης με ιδιόσυστατη ενεργότητα της ενδοκυττάριας περιοχής κινάσης τυροσίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση διάφορων μονοπατιών όπως αυτά των MAPK και PI3K (**Fusco et al. 1995 ; Santoro et al. 1995**). Οι RET/PTC 1 και 3 είναι οι πιο καλά μελετημένες μεταλλάξεις και σχετίζονται με τον καρκίνο του θυρεοειδούς (**Nikiforov 2002**). Ο θηλώδης καρκίνος ο οποίος χαρακτηρίζεται από ανακατάταξη RET/PTC παρουσιάζει χαρακτηριστικό ιστολογικό πρότυπο ενώ παράλληλα η συγκεκριμένη μετάλλαξη εμφανίζεται και σε θυλακιώδη παραλλαγή θηλώδους καρκίνου (**Nikiforov 2002 ; Basolo et al. 2000**) αλλά και σε κάποια θυλακιώδη αδενώματα (**Bounacer et al. 1997**).

Γ. Οικογένεια γονιδίων Ras

Στην οικογένεια των ογκογονιδίων Ras ανήκουν τα Hras, Kras και Nras και σχετίζονται με τα γονίδια μετασχηματισμού των ρετροϊών σαρκώματος των θηλαστικών (**Posch & Ortiz-Urda, 2013**). Είναι γονίδια που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια όπως αυτά των MAPK και PI3K/AKT. Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών προσδένουν GTP και GDP και έχουν ενδογενή δράση GTPρασης. Η εναλλαγή μεταξύ GDP/GTP ρυθμίζεται από πρωτεΐνες-προσαρμοστές (adaptors) και παράγοντες εναλλαγής νουκλεοτιδίων (nucleotide exchange factors). Αυτές οι πρωτεΐνες διευκολύνουν την ένωση της ενεργής Ras με το GTP ώστε αυτό να υδρολυθεί και να επιστρέψει στην ανενεργή της μορφή προσδένοντας GDP (**Wittinghofer & Nassar 1996 ; Hancock 2003**). Σημειακές μεταλλάξεις σε αυτή την οικογένεια γονιδίων κωδικοποιούν για ιδιόσυστατικά ενεργοποιούμενες πρωτεΐνες και εμπλέκονται σε μια ποικιλία καρκίνων μεταξύ των οποίων είναι και ο θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις στα κωδικόνια 61 των Hras και Nras , έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με μείωση της δραστηριότητας GTPρασης και με την ογκογένεση από τα επιθηλιακά θυρεοειδικά κύτταρα (**Esapa et al. 1999 ; Vasko et al. 2003**). Οι μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 και 13 σχετίζεται με

ανικανότητα πρόσδεσης GTP (**Bos 1989 ; Lowy & Willumsen 1993**). Η μετάλλαξη αυτή είναι συγκεκριμένη για τον θυλακιώδη καρκίνο και ανιχνεύεται σε πολύ μικρά ποσοστά στα θηλώδη αδενώματα ή καρκινώματα (**Namba et al. 1990 ; Karga et al. 1991 ; Hara et al. 1994 ; Basolo et al. 2000**). Αξίζει να επισημανθεί ότι η μετάλλαξη στο συγκεκριμένο γονίδιο έχει ανιχνευθεί και σε θυλακιώδεις παραλλαγές του θηλώδους καρκίνου, δηλαδή θηλώδη καρκινώματα τα οποία φέρουν τη θυλακιώδη αρχιτεκτονική (**Zhu et al. 2003 ; Di et al. 2006**).

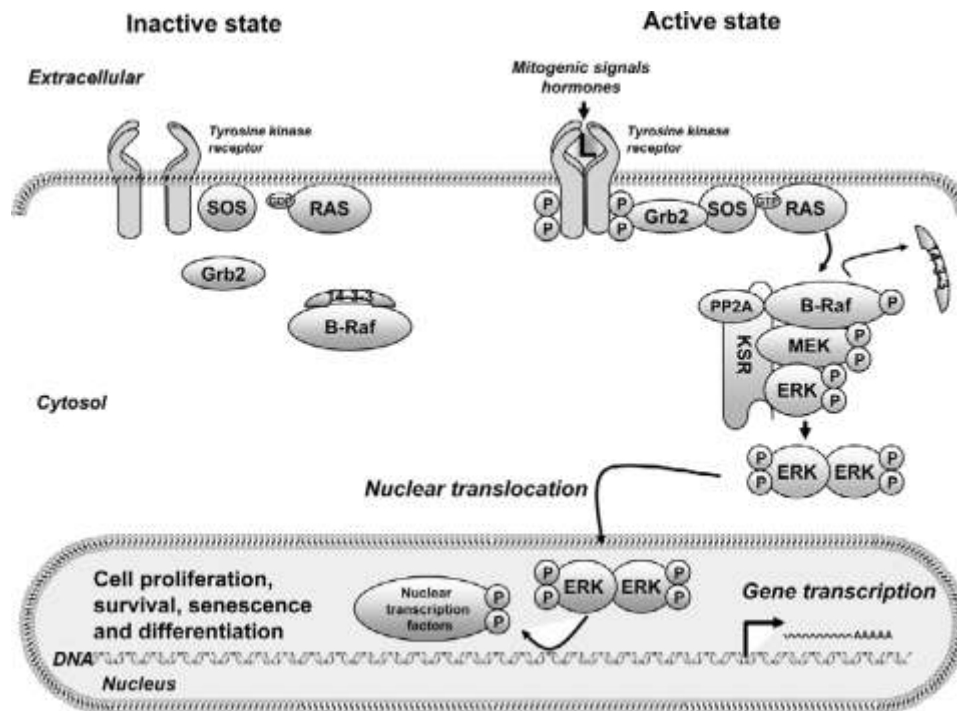
Δ. PAX8/PPAR γ

Το γονίδιο PAX8 κωδικοποιεί για ένα μεταγραφικό παράγοντα ειδικό για τον θυρεοειδή ενώ το γονίδιο PPAR γ κωδικοποιεί για πυρηνικούς υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πολλαπλασιαστές υπεροξυσωμάτων (**Berger & Moller, 2002**). Η ανακατάταξη PAX8/PPAR γ προκύπτει από τη μεταφορά και σύντηξη αυτών των 2 γονιδίων (**Kroll et al. 2000**) και οδηγεί σε μετασχηματισμό του κυττάρου μέσω ενός μηχανισμού που ακόμα δεν έχει κατανοηθεί πλήρως (**Au et al. 2006**). Η μετάλλαξη αυτή συναντάται κατά κύριο λόγο στον θυλακιώδη καρκίνο, αλλά παράλληλα έχει ανιχνευθεί και σε θυλακιώδη παραλλαγή θηλώδη καρκίνου (papillary carcinoma of follicular subtype) (**Dwight et al., 2003 ; Cheung et al. 2003 ; Castro et al., 2006 ; Freitas & Cerutti 2010**).

Ε. Σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK

Γενετικές μεταλλάξεις στο σηματοδοτικό μονοπάτι των MAPK εμφανίζονται πολύ συχνά στον θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς και αφορούν μεταξύ άλλων γονιδίων και το γονίδιο b-raf (**Tang & Lee, 2010**). Το μονοπάτι των MAPK είναι ένα ενδοκυτταρικό μονοπάτι μεταγωγής σήματος, που απαιτείται για πληθώρα δραστηριοτήτων του κυττάρου όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η ανάπτυξη και η απόπτωση που εξαρτάται από τον μεμβρανικό υποδοχέα με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης (**Robinson & Cobb 1997 ; MacCorkle & Tan 2005**). Το μονοπάτι αυτό μεταφέρει το εξωτερικό σήμα από πολλούς αναπτυξιακούς παράγοντες, ορμόνες και κυτοκίνες στον πυρήνα μέσω ενεργοποίησης ενός

σηματοδοτικού καταρράκτη (**Tang & Lee 2010**). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 4, η πρόσδεση των κατάλληλων μορίων στους μεμβρανικούς υποδοχείς RTKs οδηγεί στο διμερισμό τους και την αυτοφωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης. Οι ενεργοποιημένοι πλέον υποδοχείς, μέσω πρωτεϊνών-προσαρμοστών (adaptors), ενεργοποιούν τις κινάσες Ras. Εν συνεχεία, αυτές ενεργοποιούν τις κινάσες Raf μέσω φωσφορυλίωσης και αυτές μετά τις MAPKK (MEK). Οι MEK φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις ERK και αυτές με τη σειρά τους ρυθμίζουν ποικίλους μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι οδηγούν στη γονιδιακή έκφραση. Η ενεργοποίηση της Raf είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που συμβαίνει στη κυτταρική μεμβράνη (**Leicht et al. 2007**). Σ αυτή την ενεργοποίηση σημαντικό ρόλο έχει και η Ras κινάση η οποία προσδέεται σε ειδική για αυτήν περιοχή στη Raf μέσω πρωτεϊνών-ανταπτόρων (adaptors) οι οποίοι προσδέονται στις φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες. Η B-raf περιλαμβάνει συντηρημένες περιοχές φωσφορυλίωσης που υφίστανται φωσφορυλίωση στην ανενεργή της μορφή. Η ενεργοποίηση της B-raf ξεκινάει με τη στρατολόγηση της ανενεργής μορφής στην εσωτερική μεμβράνη, όπου το N-τελικό άκρο αποφωσφορυλιώνεται ώστε να αποσυνδεθεί αυτή, ενώ ακολουθεί η φωσφορυλίωση συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων (**Zhang & Guan ,2001**). Η ανενεργή Braf παρουσιάζει μια χαρακτηριστική δομή η οποία δε μπορεί να προσδέσει ATP (**Tang & Lee, 2010**). Η φωσφορυλίωση συγκεκριμένου αμινοξικού καταλοίπου είναι αυτή που αλλάζει τη δομή της B-raf, καταλήγοντας έτσι στην πρόσδεση του ATP και την ενεργοποίηση της Braf (**Wan et al. 2004**).



Εικόνα 4. Μονοπάτι μεταγωγής σήματος MAPK (Tang & Lee 2010)

1.6 Μοριακή διαγνωστική

1.6.1 Κυτταρολογία

Σε πολλούς ασθενείς στους οποίους πραγματοποιείται βιοψία στον θυρεοειδή μέσω παρακέντησης και υπάρχει υποψία για κακοήθεια, κρίνεται απαραίτητη η χειρουργική επέμβαση αλλά παραμένει το ερώτημα αν με το χειρουργείο στοχεύεται η διάγνωση ή η θεραπεία (Xing et al 2013). Συγκεκριμένα, η πλήρης διαγνωστική θυρεοειδεκτομή πραγματοποιείται ώστε να διαπιστωθεί αν ένα οζίδιο είναι καλόηθες ή κακόηθες ενώ η θεραπευτική επέμβαση πραγματοποιείται με σκοπό να μειώσει τις πιθανότητες επανεμφάνισης και θνησιμότητας (Xing et al 2013). Ασθενείς με θυλακιώδη βλάβη, της οποίας η βαρύτητα δεν μπορεί να προσδιοριστεί ή με υποψία για θυλακιώδες νεόπλασμα έχουν μικρότερο ρίσκο κακοήθειας συγκριτικά με εκείνους στους οποίους έχουν αναπτυχθεί κάποια οζίδια ύποπτα για κακοήθεια. Γενικότερα όσον αφορά στη δυσκολία του προσδιορισμού των κυττάρων, η αναμονή μπορεί να αποδειχθεί ιδιαίτερα επικίνδυνη για την πλειοψηφία των ασθενών. Είναι επομένως σημαντικό να αναπτυχθούν διαγνωστικά προεγχειρητικά εργαλεία για τις περιπτώσεις που δεν απαιτείται η χειρουργική επέμβαση (Xing et al. 2013).

1.6.2 Μοριακοί δείκτες

Η ανάπτυξη κατάλληλων μοριακών δεικτών, οι οποίοι να μπορούν να υποδείξουν την κατεύθυνση της χειρουργικής επέμβασης ή της απλής παρακολούθησης για άτομα με απροσδιόριστη κυτταρολογία των δειγμάτων, αποτελεί τη κορυφαία μέχρι στιγμής προσπάθεια που γίνεται στο πεδίο του καρκίνου του θυρεοειδούς. Αρκετοί δυνητικοί δείκτες αλλά και συνδυασμοί τους έχουν μελετηθεί σε δείγματα θυρεοειδικού ιστού (**Ferraz et al. 2011 ; de la Chapelle 2011 ; Kouniavsky et al. 2012**). Πολλές έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην εκτίμηση αυτών των μοριακών δεικτών σε δείγματα με απροσδιόριστη κυτταρολογία. Οι πιο σημαντικές μετρήσεις για την ανάπτυξη μοριακών δεικτών αποτελούν η ευαισθησία, η ειδικότητα, η θετική και η αρνητική προγνωστική αξία. Η ευαισθησία και η αρνητική προγνωστική αξία θεωρούνται συμπληρωματικές μετρήσεις, και είναι ενδεικτικές του γεγονότος ότι επιτρέπουν στον γιατρό να αναβάλει τη χειρουργική επέμβαση σε ασθενή με ασαφή κυτταρολογική διάγνωση. Η εξειδίκευση και η θετική προγνωστική αξία είναι συμπληρωματικές ενώ παράλληλα υποδεικνύουν ότι ένας ασθενής με ασαφή κυτταρολογική εικόνα πρέπει να προχωρήσει σε χειρουργική επέμβαση. Πολλές μελέτες έχουν εκτιμήσει τη χρήση διαφορετικών τεστ μοριακών δεικτών για την εύρεση ιστοπαθολογικών δεδομένων από ασθενείς με απροσδιόριστη κυτταρολογική εικόνα δειγμάτων του θυρεοειδούς (**Nikiforov et al. 2009 ; Nikiforov et al. 2011 ; Milas 2010**). Οι μοριακοί δείκτες με την υψηλότερη ευαισθησία και αρνητική προγνωστική αξία είναι ποικίλοι και περιλαμβάνουν ανοσοκυτταροχημικούς συνδυασμούς πρωτεϊνικών δεικτών και συνδυασμούς microRNAs (**Xing et al. , 2013**). Οι μοριακοί δείκτες με την υψηλότερη ειδικότητα και θετική προγνωστική αξία είναι εκείνοι που μάλλον βρίσκονται πίσω από πολλούς θυρεοειδικούς καρκίνους. Στον Πίνακα 1 απεικονίζονται μερικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των βασικών μοριακών δοκιμασιών, με την κάθε τεχνική να προσφέρει ποικιλοτρόπως στη διάγνωση (**Xing et al. , 2013**). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι πρωτεϊνικές δοκιμασίες μέσω των οποίων μπορούν να ανιχνευθούν συγκεκριμένες πρωτεΐνες σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. Εντούτοις, αυτές οι μέθοδοι αδυνατούν να ποσοτικοποιήσουν την πρωτεϊνική

έκφραση. Οι γενετικοί μάρτυρες χαρακτηρίζονται από υψηλή ειδικότητα και θετική προγνωστική αξία αν και πολλοί από τους διαφοροποιημένους καρκίνους δεν παρουσιάζουν κάποιους από αυτούς μειώνοντας έτσι την ευαισθησία σε πολύ χαμηλά επίπεδα (Xing et al. , 2013). Οι γενετικοί δείκτες, συμπεριλαμβανομένων των mRNA και miRNA, μπορούν να συνδυαστούν ώστε να προβάλλουν ένα γενετικό “αποτύπωμα” των όγκων και να καθοριστεί προεγχειρητικά αν είναι καλοήθεις ή κακοήθεις. Η σταθερότητα του RNA μπορεί να αποτελέσει ένα πρόβλημα για την απόδοση του γενετικού τεστ, γι αυτό και τα γονιδιακά τεστ ενδέχεται να απαιτούν μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος (Xing et al. , 2013). Ο στόχοι αυτών των τδοκιμασιών είναι να περιοριστούν οι χειρουργικές επεμβάσεις και να χρησιμοποιηθεί η λιγότερο επεμβατική μέθοδος είτε για θεραπευτικό είτε για διαγνωστικό σκοπό.

	Advantages	Disadvantages
Nodule specimens		
Protein (IHC/ICC)	Done on existing material Visualisation of cells of interest (representative) Relatively inexpensive	Semi-quantitative Can be subjective ICC staining can be variable
Genetic	DNA stability High specificity and PPV	30–40% of cancers do not have mutations (lower sensitivity) Additional biopsy required Representative of lesion? Expensive
Gene expression mRNA, microRNA	Simultaneous measure of many mRNAs or microRNAs (expression fingerprint of the nodule)	RNA instability Additional biopsy required Representative of lesion? Expensive
Peripheral blood		
mRNA	No need to sample nodule	Variable RNA recovery from blood
FNAB=fine needle aspiration biopsy. IHC=immunohistochemistry. ICC=immunocytochemistry. PPV=positive predictive value.		

Πίνακας 1. Σύγκριση διαφορετικών προσεγγίσεων μοριακής διαγνωστικής. (Xing et al., 2013)

1.7 Προεγχειρητική χρήση του Braf ως διαγνωστικό μέσο

Η προεγχειρητική εκτίμηση μιας οζώδους βρογχοκήλης βασίζεται στην κυτταρολογία δειγμάτων που έχουν ληφθεί με λεπτή βελόνα, ώστε να επιλεχθούν

οι ασθενείς που προορίζονται για εγχείρηση ή στενή παρακολούθηση (Lee et al. 2002). Ωστόσο επειδή οι μελέτες που έχουν γίνει για τη μετάλλαξη στο BRAF είναι πολλές, τα αποτελέσματα είναι λογικό κάποιες φορές να είναι αντικρουόμενα με χαρακτηριστικό παράδειγμα έρευνες που έχουν ανιχνεύσει τη BRAF^{V600E} σε ποσοστό χαμηλότερο του 50% σε θηλώδη καρκίνο, κάτι που βέβαια δεν αποκλείει την κακοήθεια (Tang & Lee, 2010). Τα περισσότερα από τα ασαφή δείγματα είναι θυλακιώδη νεοπλάσματα ή θυλακιώδεις παραλλαγές θηλώδη καρκίνου στα οποία σπάνια ανιχνεύεται η BRAF^{V600E}. Η λήψη ανεπαρκούς δείγματος από τον όγκο μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή απομόνωση DNA και αυτό σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (Tang & Lee 2010). Άξια αναφοράς είναι μια μελέτη στην οποία πέραν της ανάλυσης για τη μετάλλαξη στο γονίδιο BRAF πραγματοποιήθηκε και ανάλυση για τα γονίδια RAS και PAX8/PPARγ. Αυτό ενίσχυσε τη διαγνωστική ακρίβεια σε δείγματα με ασαφή κυτταρολογία. Στη μελέτη αυτή, το 97% των οζιδίων που ήταν θετικά στις μεταλλάξεις χαρακτηρίστηκαν και ως επιθετικά, υποδεικνύοντας ότι η ανάλυση των RAS και PAX8/PPARγ βελτίωσαν τη διαγνωστική ακρίβεια σε ασαφή κυτταρολογία (Nikiforov et al. 2009). Η προεγχειρητική ανάλυση της BRAF^{V600E} σε δείγματα αντλούμενα μέσω παρακέντησης φαίνεται ότι είναι βοηθητική για τον καθορισμό στρατηγικών αντιμετώπισης του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς, ενώ παράλληλα μπορεί να έχει αξία στη διάγνωση ασθενών με επιθετική κλινική πορεία. Ίσως να είναι πιο ευεργετικό για αυτούς τους ασθενείς να λάβουν μια πρώτη, πιο εντατική θεραπεία, με υψηλότερη δόση ραδιενεργού ιωδίου, και συνεχή παρακολούθηση ώστε να μειωθεί το ρίσκο της μετάστασης και της επανεμφάνισης του καρκίνου (Tang & Lee 2010). Παρόλα αυτά περαιτέρω έρευνα απαιτείται σε μεγάλες, τυχαιοποιημένες και ελεγχόμενες δοκιμές ώστε να καθοριστεί πλήρως ο ρόλος της μετάλλαξης BRAF^{V600E} ως κλινικά χρήσιμου προγνωστικού δείκτη (Tang & Lee, 2010).

1.8 Θεραπευτική χρήση της μετάλλαξης BRAF

Όπως προαναφέρθηκε, η συνεχής ενεργοποίηση της μετάλλαξης BRAF^{V600E} στο μονοπάτι των MAPK φαίνεται να είναι η αιτία της ογκογένεσης και ανάπτυξης του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς (Davies et al. 2002 ; Garnett & Marais 2004 ; Wan et al. 2004). Η χρήση αναστολέων που στοχεύουν στην κινάση BRAF ή τους καθοδικούς τελεστές της θεωρείται η λογική θεραπευτική προσέγγιση για την αναστολή της ανάπτυξης του όγκου (Tang & Lee, 2010). Μη επιλεκτικοί αναστολείς της BRAF, όπως ο AAL-881, έχει δειχθεί ότι αναστέλλουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου από τη φάση S στη G2-M και τη G₀-G₁ οδηγώντας σε αναστολή της ανάπτυξης και απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (Ouyang et al. 2006). Επιπλέον η αποσιώπηση του BRAF^{V600E} με τη τεχνική siRNA, έδειξε ότι προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης κυτταρικών σειρών με αναπλαστικό και θηλώδη καρκίνο (Mitsiades et al. 2007). Η ένωση sorafenib είναι ο πιο μελετημένος αναστολέας για κινάσες που στοχεύει τη BRAF και τους σχετιζόμενους με αγγειογένεση υποδοχείς κινάσης τυροσίνης. Όμως, η επίδραση φαίνεται να λαμβάνει χώρα λόγω της αναστολής της αγγειογένεσης μέσω του VEGFR παράγοντα παρά αυτή της BRAF εκλεκτικά (Kim et al. 2007). Μέχρι σήμερα δεν έχουν αποδειχθεί οι αντικαρκινικές επιδράσεις της sorafenib μέσω αναστολής της BRAF (Tang & Lee 2010). Η sorafenib είναι ένα αναστολέας κινασών που μπορεί επίσης να στοχεύσει άλλα μονοπάτια κινασών όπως αυτό του VEGFR και να αναστέλλει την ογκογένεση. Αντικαρκινικές επιδράσεις εμφάνισαν και άλλες αναστολείς κινασών οι οποίοι στοχεύουν τους παράγοντες VEGFR και PDGFR (Sherman 2008 ; Cohen et al. 2008). Παράγοντες πέραν της μετάλλαξης στη BRAF μπορούν να επηρεάσουν την απόκριση των ασθενών στην ένωση sorafenib και ο συνδυασμός διαφορετικών αναστολέων κινασών ή/και χημειοθεραπείας ίσως να θεωρηθεί μια δυνητική στρατηγική αντιμετώπισης για το μέλλον όσο παράλληλα ανακαλύπτονται και νέοι στόχοι (Tang & Lee 2010).

1.9 Μελλοντικές θεραπευτικές προσεγγίσεις

Στον διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς εντοπίζεται ένα εναρκτήριο γεγονός ογκογένεσης το οποίο λαμβάνει χώρα, τις περισσότερες φορές, λόγω γονιδιακών ανακατατάξεων ή σημειακών μεταλλάξεων, αμοιβαία αποκλειόμενων, σε συγκεκριμένα γονίδια (RAS, BRAF) (Fagin, 2004). Οι μεταλλάξεις

αυτές επηρεάζουν ποικίλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος όπως αυτό των MAPK. Η ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών οδηγεί σε πολλαπλασιασμό του όγκου, αποδιαφοροποίηση, επιθετικότητα και αγγειογένεση. Η αγγειογένεση προκαλείται από την υπερπαραγωγή του παράγοντα VEGF (**Bunone et al., 1999**) από τα καρκινικά κύτταρα και αυτή του υποδοχέα του παράγοντα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η υπερέκφραση του υποδοχέα του VEGF είναι αποτέλεσμα της επίδρασης του καρκίνου στα γονίδια για τον παράγοντα αυτό (**Liu et al., 2008**). Μέχρι τώρα, τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στον ανθεκτικό καρκίνο είναι αντιαγγειογενετικά και κάποια στοχεύουν κινάσες στο μονοπάτι MAPK (Εικόνα 2). Ο σχετικός ρόλος της αναστολής καθενός συστατικού του μονοπατιού είναι άγνωστος έως τώρα (**Xing et al., 2013**). Ένας τρόπος αντιμετώπισης ασθενών με μεταστάσεις είναι η αποκατάσταση πρόσληψης ραδιενεργού ιωδίου από τα καρκινικά κύτταρα, αφού πρώτα πραγματοποιηθεί χορήγηση της ορμόνης TSH. Η διαχείριση αυτή υποστηρίζεται από προηγούμενες έρευνες (**Liu et al. 2007; Hou et al., 2010**) στις οποίες η στόχευση συστατικών των μονοπατιών MAPK και PI3K/AKT μπόρεσαν να αποκαταστήσουν τη γονιδιακή έκφραση του θυρεοειδούς και την πρόσληψη ραδιενεργού ιωδίου στα καρκινικά κύτταρα (**Xing et al., 2013**). Αυτές οι θεραπείες πρέπει να εφαρμόζονται σε ασθενείς με ανεπτυγμένους, προχωρημένης κατάστασης καρκίνους (**Xing et al., 2013**).

Όπως προαναφέρθηκε, τα μεταλλαγμένα γονίδια RAS ενεργοποιούν ιδιοσυστατικά εκφραζόμενες G-πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα να προκύπτει η χρόνια διέγερση επόμενων συστατικών του μονοπατιού των MAPK και άλλων μονοπατιών που ελέγχουν την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση (**Barbacid, 1990**). Ενώ δεν υπάρχουν άλλα συστατικά που να εξετάζονται σε κλινικές μελέτες τα οποία να στοχεύουν ειδικά τις πρωτεΐνες RAS, οι αναστολές κινασών φαίνεται ότι εμποδίζουν τη μετάδοση σημάτων που ξεκινούν από τις πρωτεΐνες RAS κατά μήκος μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Οι αναστολές κινασών πιθανώς να αποτελέσουν θεραπεία πρώτης γραμμής σε ασθενείς με ανθεκτικό διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς, το οποίο έχει τεκμηριωθεί κυτταρολογικά (**Xing et al., 2013**). Προς το παρόν, δεν υπάρχει έγκριση για κάποιο φάρμακο γι' αυτούς τους ασθενείς αν και μπορούν να είναι υποψήφιοι για κλινικές δοκιμές υποψήφιων φαρμάκων.

Οι διαγνωστικοί βιοδείκτες θα συμβάλλουν ώστε να γίνει η καλύτερη επιλογή ασθενών για διάφορες μεθόδους θεραπείας, ενώ θα επιτρέψουν και μια πρόωμη εκτίμηση της απόκρισης του όγκου σε ένα νέο φάρμακο. Η έρευνα που στοχεύει στην αναγνώριση νέων μοριακών αλλαγών που οδηγούν σε καρκίνο του θυρεοειδούς πραγματοποιείται με απώτερο σκοπό τη θεραπεία ασθενών ή την εύρεση νέων στόχων προς αντιμετώπιση (Liu et al. 2009; Liu et al. 2011). Αυτό προϋποθέτει έναν ικανοποιητικό αριθμό ασθενών ώστε να αξιολογηθεί καταλλήλως η βαρύτητα της όποιας μετάλλαξης. Τέλος, πρέπει να επισημανθεί ότι η κυτταροτοξική θεραπεία με νέα φάρμακα φαίνεται ότι είναι αποτελεσματική σε ένα μεγάλο αριθμό ασθενών (Spano et al. 2012; Crouzeix et al. 2012), αλλά για να υπάρχει αξιοπιστία στην εξαγωγή συμπερασμάτων οι μελέτες θα πρέπει να περιλαμβάνουν ικανοποιητικό αριθμό ασθενών (Xing et al., 2013). Μελλοντικά, η αναγνώριση νέων μοριακών αλλαγών που οδηγούν σε καρκίνο του θυρεοειδούς και η ανάπτυξη πιο συγκεκριμένων και αποτελεσματικών θεραπειών μπορεί να οδηγήσει στην επιλογή κατάλληλων, πιο εξατομικευμένων θεραπειών για τους ασθενείς.

Σκοπός

Το αντικείμενο της παρούσας μελέτης είναι η συσχέτιση των μεταλλάξεων στο γονίδιο HRAS και συγκεκριμένα στα κωδικόνια 12,13 με τον καρκίνο του θυρεοειδούς. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 24 δείγματα ιστού θυρεοειδούς αδένα από ασθενείς διαγνωσμένους με διαφορετικούς τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς από τον ελληνικό πληθυσμό.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Υλικά

A. Χημικά αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής καθαρότητας και αγοράστηκαν από τις εταιρίες **Sigma-Aldrich**(αιθανόλη και ξυλένιο με αριθμούς καταλόγου 32221 και 33817 αντίστοιχα), **AppliChem Panreac** [Agarose low EEO (Agarose standard)], και βρωμιούχο αιθίδιο 10mg/ml με αριθμό καταλόγου A2114 και A1152 αντίστοιχα], και **New England Biolabs** (Low Molecular DNA Ladder, με αριθμό καταλόγου N3233S και Quick-Load 2-Log DNA Ladder 0.1-10.0 kb με αριθμό καταλόγου N0469S).

B. Δείγματα ασθενών

Τα δείγματα των ασθενών προήλθαν από το Παθολογοανατομικό Τμήμα του Στρατιωτικού Νοσοκομείο ΝΙΜΙΤΣ, στην Αθήνα. Στον πίνακα 2 δίνονται ο τύπος των καρκινωμάτων του θυρεοειδούς και τα στοιχεία των ασθενών.

B. Πίνακας 2. Δείγματα

A/A	ΤΥΠΟΣ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ
3	Θηλώδες καρκίνωμα	ΘΗΛΥ	48
6	Μυελοειδές καρκίνωμα(sos)	ΘΗΛΥ	55
8	Θηλώδες μικροκαρκίνωμα	ΘΗΛΥ	48
9	Θηλώδες καρκίνωμα	ΘΗΛΥ	43
10	Θυλακιώδες καρκίνωμα	ΘΗΛΥ	47
11	Πανεστιακό θηλώδες καρκίνωμα	ΘΗΛΥ	45
14	Θηλώδες καρκίνωμα	ΘΗΛΥ	28
15	Θηλώδες καρκίνωμα	ΘΗΛΥ	28
16	Θηλώδες καρκίνωμα θυλακιώδους τύπου(sos)	ΑΡΡΕΝ	50
17	Θηλώδες μικροκαρκίνωμα occult	ΘΗΛΥ	48
18	Πανεστιακό θηλώδες αδenoκαρκίνωμα	ΑΡΡΕΝ	67
19	Νορμοθυλακιώδες αδένωμα	ΑΡΡΕΝ	48
21	Πολυεστιακό θηλώδες καρκίνωμα θυλακιώδους τύπου	ΘΗΛΥ	56
22	Θηλώδες αδenoκαρκίνωμα ενίοτε με ασαφώς θυλακιώδη διαμόρφωση	ΘΗΛΥ	47
24	Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδες πρότυπο ανάπτυξης	ΘΗΛΥ	66

25	Πολλαπλή εντόπιση θηλώδους καρκινώματος(θυλακιώδες πρότυπο ανάπτυξης)	APPEN	26
26	Πολυοζώδες θηλώδες καρκίνωμα(θυλακιώδους και θηλώδους τύπου)	APPEN	56
27	Μυελοειδές καρκίνωμα με πολύμορφο(αναπλαστικό)πρότυπο ανάπτυξης	ΘΗΛΥ	57
28	Θηλώδες καρκίνωμα θυλακιώδους τύπου	ΘΗΛΥ	56
29	Θηλώδες καρκίνωμα εν μέρει θυλακιώδους τύπου	ΘΗΛΥ	61
30	Πολυεστιακό θηλώδες καρκίνωμα θυλακιώδους τύπου	ΘΗΛΥ	58
31	Καρκίνωμα Ηθμοειδούς τύπου	ΘΗΛΥ	74
32	Θηλώδες με θυλακιώδη διαμόρφωση αδenoκαρκίνωμα	ΘΗΛΥ	69
33	Πολυεστιακό θυλακιώδες αδenoκαρκίνωμα	ΘΗΛΥ	76

2.2. Μέθοδοι

A. Απομόνωση DNA από ιστό σε παραφίνη (FFPE)

Για την απομόνωση του DNA από τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό αντιδραστήριο (kit) **QIAamp DNA FFPE Tissue** for purification of genomic DNA from paraffin-embedded tissues με αριθμό καταλόγου 56404.

Το kit περιέχει όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια (κολώνες και διαλύματα) για την απομόνωση DNA από ιστό, και η διαδικασία απομόνωσης βασίστηκε στις οδηγίες του κατασκευαστή με κάποιες λεπτομέρειες που περιγράφονται στη συνέχεια.

Αναλυτικά, πριν την απομόνωση αφαιρέθηκε η περίσσεια παραφίνης από τα δείγματα, με τη βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού. Στη συνέχεια, κόπηκαν 1-2 τομές (ανάλογα με το πάχος του δείγματος σε ιστό) από κάθε δείγμα και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα φυγοκέντρωσης του 1,5 ml τύπου erpendorf και ακολούθησε η προσθήκη 1 ml ξυλένιου με ισχυρή ανάδευση (vortex) για 10 sec. Ακολούθησε φυγοκέντρωση του δείγματος στις 13000 στροφές ανά λεπτό (rpm) (μέγιστη) για 2 min. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε προσεκτικά και στο ίζημα προστέθηκε 1,5ml αιθανόλη (98.5 %) και μετά από ισχυρή ανάδευση για 10 sec, ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 11000 στροφές ανά λεπτό για 2 min. Το

υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και το δείγμα μεταφέρεται , με ανοικτό καπάκι, σε επωαστήρα με θερμοκρασία 37°C για περίπου 10-20 λεπτά (εξαρτάται από τα κατάλοιπα αιθανόλης που έχουν παραμείνει), ώστε να ξηραθεί το ίζημα και να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε πλήρως σε 180 μl ρυθμιστικού διαλύματος ATL(που παρέχεται στο kit) και στη συνέχεια προστέθηκαν 20μl ενζύμου Proteinase K και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση. Μετά, το δείγμα επώαστηκε σε κινούμενο επωαστήρα (rotating incubator) με εσωτερική θερμοκρασία 56°C. Ο βέλτιστος χρόνος επώασης του δείγματος εκεί ήταν 2 ώρες και 20 λεπτά ώστε να λυθεί πλήρως το δείγμα (ανάλογα με την περιεκτικότητα σε ιστό, το κάθε δείγμα μπορεί να παραμείνει λιγότερο ή και περισσότερο χρόνο στον επωαστήρα). Κάποια δείγματα χρειάστηκε να μείνουν όλο το βράδυ στον επωαστήρα (overnight incubation). Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 1 ώρα στους 90°C σε heat block και οι τυχόν σταγόνες από το δείγμα μεταφέρθηκαν από τα τοιχώματα του σωλήνα erpendorf στον πάτο αυτού μετά από σύντομη φυγοκέντρηση (quick spin). Μόλις ολοκληρώθηκε η παραμονή για μια ώρα στους 90°C, πραγματοποιήθηκε quick spin στο erpendorf 1,5 ml και προστέθηκαν 200μl διαλύματος AL στο δείγμα και μετά από ανάδευση με πιπέτα προστέθηκαν 200μl αιθανόλης (98.5%) που αναμείχθηκαν ισχυρά. Στη συνέχεια όλο το δείγμα μεταφέρθηκε με προσοχή στη στήλη έκλουσης (QIAamp MinElute column) που παρέχεται από τον κατασκευαστή και η οποία τοποθετήθηκε σε ένα φιαλίδιο των 2 ml. Όλο το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 8000 στροφές ανά λεπτό για 1 λεπτό και ακολούθως το σωληνάριο των 2 ml αντικαταστάθηκε με καινούργιο. Προστέθηκαν στη στήλη 500μl διαλύματος AW1* και μετά από φυγοκέντρηση 1 λεπτού στις 8000 στροφές ανά λεπτό αντικαταστάθηκε το σωληνάριο των 2ml. Η ανωτέρω διαδικασία επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας 500μl διαλύματος AW2* και πραγματοποιήθηκε μία τελευταία φυγοκέντρηση 3 λεπτών στις 13000 στροφές ανά λεπτό ώστε να στεγνώσει πλήρως το εσωτερικό της στήλης. Τέλος, η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο Erpendorf 1,5ml ,προστέθηκαν 20-30μl διαλύματος ATE(ανάλογα με τις τομές του δείγματος που χρησιμοποιήθηκαν). Πραγματοποιήθηκε επώαση της στήλης για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (με στόχο να αυξηθεί η απόδοση του DNA) και φυγοκέντρηση 1 λεπτού στις 13000 στροφές ανά λεπτό. Το DNA των δειγμάτων διατηρείται στους -20°C.

Τα διαλύματα AW1 και AW2 παρασκευάστηκαν ως εξής:

*AW1= Σε 19ml διαλύματος AW1του kit προστέθηκαν 25ml αιθανόλης(98.5%).

*AW2= Σε 13ml διαλύματος AW1του kit προστέθηκαν 30ml αιθανόλης(98.5%).

B. Ανάλυση-ηλεκτροφόρηση νουκλειικών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης.

Η ηλεκτροφόρηση των νουκλειικών οξέων είναι μια τεχνική διαχωρισμού τμημάτων DNA και RNA βάσει μεγέθους. Τα νουκλειικά οξέα τοποθετούνται σε κολλώδεις μέσο-πήκτωμα, στο οποίο εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο που προκαλεί τη μετακίνηση των νουκλειικών οξέων προς την άνοδο(+) λόγω του αρνητικού φορτίου των φωσφορικών ομάδων του σκελετού τους. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός διαφορετικών μεγεθών νουκλειικών οξέων καθώς αυτά μετακινούνται με διαφορετική κινητικότητα στο πήκτωμα. Με βάση τα παραπάνω, τα μικρότερα κομμάτια πλησιάζουν πιο κοντά στην άνοδο για συγκεκριμένη χρονική περίοδο εφαρμογής του ηλεκτρικού πεδίου. Για καλύτερο διαχωρισμό μεταξύ παρομοίου μεγέθους τμημάτων, μπορεί να αυξηθεί είτε η τάση είτε ο χρόνος εφαρμογής του ηλεκτρικού πεδίου. Η χαμηλή τάση σε συνδυασμό με μεγάλο χρόνο 'εφαρμογής του ηλεκτρικού πεδίου' οδηγούν στο καλύτερο διαχωρισμό. Όσον αφορά στην απεικόνιση των τμημάτων, αυτή γίνεται με τη βοήθεια φθορίζοντων χρωστικών όπως το βρωμιούχο αιθίδιο (EthBr), το οποίο ενσωματώνεται στις βάσεις του DNA και δίνει μπλε χρώμα στο DNA όταν εκτεθεί σε υπεριώδες φως (UV light). Οι διάφορες μπάντες που απεικονίζονται, ανταποκρίνονται στα διαφορετικά νουκλειικά οξέα με διαφορετικά μοριακά βάρη. Αν θέλαμε να δώσουμε και μια "μονάδα μέτρησης" αυτών, το κατάλληλο θα ήταν τα ζεύγη βάσεων (bp) ή κιλοβάσεις (kb). Ο καθορισμός του μεγέθους πραγματοποιείται με σύγκριση με κάποιο εμπορικά διαθέσιμο μοριακό δείκτη (DNA marker), που περιέχει ευθύγραμμα τμήματα DNA γνωστού μεγέθους.

Όπως αναφέρθηκε, το μέγεθος των τμημάτων DNA αποτελεί έναν από τους παράγοντες που καθορίζουν την κινητικότητα των νουκλειικών οξέων σε ένα πήκτωμα αγαρόζης. Άλλοι, παράγοντες που αξίζει να αναφερθούν είναι οι εξής:

- Συγκέντρωση του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης: η ανάλυση του DNA αλλάζει με την ποσοστιαία συγκέντρωση του πηκτώματος. Αυξάνοντας τη συγκέντρωση της αγαρόζης, μειώνεται η ταχύτητα μετανάστευσης των τμημάτων αλλά επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός μικρότερων τμημάτων, ενώ αντίθετα μειώνοντας τη συγκέντρωση της αγαρόζης επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός μεγαλύτερων τμημάτων. Χαρακτηριστικά, ένα gel 2% δίνει πολύ καλή ανάλυση για τμήματα DNA μέχρι 1 kb.
- Διαμόρφωση του DNA: η διαμόρφωση του DNA επηρεάζει σημαντικά τη κινητικότητά του. Έτσι το υπερελικωμένο DNA κινείται πιο γρήγορα συγκριτικά με το “χαλαρό” (relaxed) DNA καθώς το πρώτο είναι πιο πυκνό και συμπαγές.
- Συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου: το κυκλικό DNA επηρεάζεται περισσότερο από το βρωμιούχο αιθίδιο, όταν βρίσκεται στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης, συγκριτικά με το ευθύγραμμο DNA. Το βρωμιούχο αιθίδιο, παρεμβαλλόμενο στο κυκλικό DNA, μπορεί να αλλάξει το φορτίο, το μέγεθος και την περιέλιξη του μορίου και τελικά να επηρεάσει την κινητικότητά του στο πήκτωμα. Η αύξηση της συγκέντρωσης του βρωμιούχου αιθιδίου, μπορεί να μετατρέψει ένα αρνητικά φορτισμένο υπερελικωμένο μόριο DNA σε μια πλήρως χαλαρή μορφή.
- Εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο: σε χαμηλό δυναμικό, ο ρυθμός μετανάστευσης του DNA είναι ανάλογος του δυναμικού που εφαρμόζεται. Συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερο είναι το δυναμικό, τόσο πιο γρήγορα μεταναστεύει το τμήμα DNA. Βέβαια, σε αυξανόμενο δυναμικό ηλεκτρικού πεδίου, η κινητικότητα τμημάτων DNA μεγάλου μοριακού βάρους μπορεί να αυξάνεται διαφορετικά ενώ παράλληλα η διαχωριστική ικανότητα να μειώνεται και τελικά η διακριτική ικανότητα να είναι χαμηλότερη σε υψηλό δυναμικό.

Η διαδικασία δημιουργίας ενός πηκτώματος αγαρόζης, με ποσοστιαία περιεκτικότητα 1% σε αγαρόζη είναι η εξής:

Ζυγίστηκαν 0,6 g αγαρόζης και μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη στην οποία προστεθήκανε 60 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1X, το μείγμα τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Αφού κρύωσε το μείγμα προστέθηκαν 1,8 ml διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου τελικής συγκέντρωσης 0,5 μg/ml και μετά από καλή ανάμειξη το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ειδικό καλούπι ώστε να αποκτήσει το κατάλληλο σχήμα μέχρι να πολυμεριστεί η αγαρόζη και να πήξει. Αξίζει να σημειωθεί πως μετά την απόχυση, στο καλούπι τοποθετήθηκαν και τα χτενάκια ώστε να δημιουργηθούν οι υποδοχές (‘‘πηγαδάκια’’, wells) για την φόρτωση των υπό μελέτη δειγμάτων. Μετά την πήξη του πηκτώματος, αφαιρέθηκαν τα χτενάκια και το πήκτωμα τοποθετήθηκε στην ειδική συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, η οποία ήταν γεμάτη με διάλυμα TAE 1X.

Το επόμενο βήμα ήταν το φόρτωμα των δειγμάτων DNA που είχαν απομονωθεί.

Για τη φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα αγαρόζης, απαιτείται ανάμειξη του δείγματος με το διάλυμα φόρτωσης ή loading buffer. Το loading buffer περιέχει χρωστικές (π.χ. μπλε της βρωμοφαινόλης) οι οποίες σε αντίθεση με το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ορατές με το μάτι και βοηθούν στην παρακολούθηση της φόρτωσης. Εκτός των χρωστικών, το loading buffer περιέχει γλυκερόλη η οποία βοηθάει να καθιζάνει το DNA στο βάθος του πηγαδιού του πηκτώματος κατά τη φόρτωση. Το loading buffer συνήθως φτιάχνεται σε συγκέντρωση 5X ενώ φορτώνεται σε τελική συγκέντρωση 1X. Για τη φόρτωση στο πήκτωμα αναμειγνύεται η κάθε ποσότητα δείγματος με το loading buffer (σε τελική συγκέντρωση 1X) στον τελικό όγκο των 10 ή 20μl (που συμπληρώνεται με νερό) ανάλογα με τη χωρητικότητα του πηγαδιού φόρτωσης. Ταυτόχρονα με τα δείγματα, στο πήκτωμα φορτώθηκε και μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών (της εταιρίας NEW ENGLAND BIOLABS με αριθμό καταλόγου N0469S). Μετά τη φόρτωση των δειγμάτων στις εσοχές του πηκτώματος, η συσκευή φόρτωσης συνδέθηκε με τη κεντρική παροχή εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου, μέσω καλωδίων που τοποθετούνται στις δύο κορυφές της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Το πήκτωμα τοποθετείται έτσι, ώστε τα δείγματα να κινηθούν προς την άνοδο. Με το πέρας της διαδικασίας, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε λάμπα UV ώστε να απεικονιστεί το αποτέλεσμα. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων διήρκησε περίπου 30 λεπτά και η τάση στην οποία πραγματοποιήθηκε ήταν 90V.

Σύσταση διαλυμάτων ηλεκτροφόρησης:

- *TAE 50X*: Tris-base(242g), οξικό οξύ(57.1ml), EDTA(18.6g), ddH₂O μέχρι 1L. pH: 8
- *Βρωμιούχο αιθίδιο*: Υδατικό διάλυμα Βρωμιούχου αιθιδίου 10mg/ml.
- *Loading Buffer(6X)*: Γλυκερόλη (5ml), 50X TAE(200ml), ddH₂O (4.8ml).
Συνολικός όγκος: 10ml.

Γ. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) αποτελεί μια βιοχημική μέθοδο, μέσω της οποίας μπορούμε να ενισχύσουμε ένα ή μερικά αντίγραφα μορίων DNA σε εκατοντάδες αντίγραφα συγκεκριμένης αλληλουχίας. Η τεχνική αυτή συνίσταται στην **θερμική κυκλοποίηση** κατά την οποία πραγματοποιούνται κύκλοι με επαναλαμβανόμενες αυξομειώσεις της θερμοκρασίας ώστε να αποδιαταχθεί το DNA και να επιτευχθεί η ενζυμική αντιγραφή. Οι εκκινητές, μικρές αλληλουχίες DNA συμπληρωματικές προς τη περιοχή-στόχο του DNA, και το ένζυμο DNA πολυμεράση είναι τα δυο βασικά συστατικά μιας αντίδρασης PCR ώστε να επιτευχθεί η εκλεκτική και επαναλαμβανόμενη ενίσχυση. Όσο προχωράει η αντίδραση, το ίδιο το μόριο DNA χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για αντιγραφή προκαλώντας μια αλυσιδωτή αντίδραση όπου το DNA ενισχύεται εκθετικά. Όλες οι αντιδράσεις PCR χρησιμοποιούν μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση, τη Taq πολυμεράση που απομονώνεται από το βακτήριο *Thermus aquaticus*. Αυτή η DNA πολυμεράση, ενζυμικά, συστήνει μία νέα αλυσίδα DNA μέσω των νουκλεοτιδίων χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα μία μονόκλωνη αλυσίδα DNA και DNA ολιγονουκλεοτίδια τα οποία απαιτούνται για την εκκίνηση της σύνθεσης του DNA. Όπως προαναφέρθηκε, η πλειονότητα των μεθόδων PCR

χρησιμοποιεί τη **θερμική κυκλοποίηση**, εναλλακτικά θερμαίνοντας και ψύχοντας το δείγμα της PCR μέσω καθορισμένων βημάτων θερμοκρασιακών αλλαγών. Μία αντίδραση PCR χρησιμοποιείται ώστε να ενισχύσει μία συγκεκριμένη περιοχή του DNA στόχου. Συνήθως, οι περιοχές ενίσχυσης ποικίλουν από 0,1 με 10 kb. Η ποσότητα του ενισχυμένου προϊόντος καθορίζεται από τη διαθεσιμότητα των συστατικών της αντίδρασης, τα οποία περιορίζονται όσο προχωράει η αντίδραση.

Μια αντίδραση PCR περιλαμβάνει τα εξής συστατικά και αντιδραστήρια:

- Το υπόστρωμα DNA, που περιέχει την περιοχή που θα ενισχυθεί.
- Ένα ζεύγος εκκινητών, έμπροσθεν (forward) και ανάστροφος (reverse), οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί ο καθένας στο 3' άκρο της κωδικής και της μη κωδικής αλυσίδας αντίστοιχα του DNA στόχου.
- Ένζυμο Taq πολυμεράση ή οποιαδήποτε άλλη πολυμεράση με ιδεατή θερμοκρασία περίπου στους 70°C.
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) που αποτελούν τους δομικούς λίθους με τους οποίους η πολυμεράση συνθέτει τη νέα αλυσίδα.
- Ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο προσφέρει το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη μέγιστη δραστηριότητα και σταθερότητα του ενζύμου.
- Δισθενή ιόντα, συνήθως Mg^{2+} , τα οποία δρουν ως συμπαραγόντες του ενζύμου, απαραίτητα για την εύρυθμη δραστηριότητά του.

Γ1. Διαδικασία αντίδρασης PCR

Τυπικά μια αντίδραση PCR, αποτελείται από 20-40 επαναλαμβανόμενες θερμοκρασιακές αλλαγές, τους κύκλους, ο καθένας από τους οποίους αποτελείται συνήθως από διακριτά βήματα με ξεχωριστές θερμοκρασίες. Αυτά είναι:

- *Διαδικασία έναρξης*: το βήμα αυτό πραγματοποιείται με σκοπό τη θέρμανση της αντίδρασης σε μια θερμοκρασία ανάμεσα στους 94-96°C

με διάρκεια 1-9 λεπτών και στοχεύει στην ενεργοποίηση του ενζύμου DNA πολυμεράση.

- *Διαδικασία αποδιάταξης:* το βήμα αυτό είναι το πρώτο σε μια κλασική αντίδραση PCR και περιλαμβάνει την αύξηση της θερμοκρασίας στους 94-98°C για 20-30sec. Προκαλεί την αποδιάταξη του DNA σπάζοντας τους δεσμούς υδρογόνου αυτού, ώστε να προκύψουν οι δύο μονόκλωνες αλυσίδες.
- *Διαδικασία υβριδοποίησης:* σε αυτό το στάδιο, η θερμοκρασία της αντίδρασης μεταπίπτει στους 60-65 °C για 20-40 sec επιτρέποντας στους εκκινητές να υβριδοποιηθούν στο μονόκλωνο πλέον υπόστρωμα DNA. Τυπικά η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών (T_a) είναι κατά κανόνα 3-5°C χαμηλότερη από τη θερμοκρασία αποδιάταξής τους (T_m). Ο τύπος υπολογισμού του T_m είναι ο εξής: $[T_m=2 \times (A/T)+3 \times (G/C)]$. Οι σταθεροί δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μόνο εφόσον η αλληλουχία των εκκινητών ταιριάζει σε πολύ μεγάλο βαθμό με αυτή του υποστρώματος (συμπληρωματικότητα). Τότε η πολυμεράση συνδέεται στο υβρίδιο και εκκινεί τον σχηματισμό του νέου δίκλωνου μορίου DNA.
- *Διαδικασία επιμήκυνσης:* η θερμοκρασία σε αυτό το βήμα εξαρτάται από την πολυμεράση που χρησιμοποιείται. Για παράδειγμα, η Taq πολυμεράσης παρουσιάζει μέγιστη δραστηριότητά στους 72°C . Σε αυτό το βήμα η DNA πολυμεράση συνθέτει μια νέα αλυσίδα DNA συμπληρωματική σε αυτή του υποστρώματος, με το να προσθέτει dNTPs που είναι συμπληρωματικά στο υπόστρωμα σε κατεύθυνση 5'→3', έχοντας η νέα αλυσίδα στο 5' άκρο της την 5'-φωσφορική ομάδα του πρώτου νουκλεοτιδίου και στο 3' άκρο της την 3'-ομάδα του υδροξυλίου του τελευταίου νουκλεοτιδίου της προς επιμήκυνση αλυσίδας. Ο χρόνος επιμήκυνσης εξαρτάται τόσο από το ίδιο το ένζυμο όσο και από το μήκος του τμήματος DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε. Κάτω από ιδανικές συνθήκες, μη λαμβάνοντας υπόψη την εξασθένηση των συστατικών της αντίδρασης, η συγκέντρωση του DNA στόχου διπλασιάζεται, οδηγώντας σε γεωμετρική αύξηση το συγκεκριμένο DNA τμήμα.

- *Τελική επιμήκυνση:* αυτό το βήμα λαμβάνει χώρα στους 70-74 °C για 5-15 λεπτά και χρειάζεται για να επιβεβαιώσουμε ότι οποιοδήποτε μονόκλωνο τμήμα θα έχει επιμηκυνθεί.
- *Τελικό στάδιο:* το δείγμα διατηρείται στους 4°C για αόριστο χρόνο και έτσι πραγματοποιείται μιας μικρής διάρκειας αποθήκευση του τελικού προϊόντος της αντίδρασης.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε κατά κύριο λόγο μια διαφοροποιημένη μορφή της κλασικής μεθόδου PCR, που καλείται Touchdown PCR (TD-PCR). Η συγκεκριμένη τεχνική στοχεύει στην ελαχιστοποίηση του μη ειδικού background με το να μειώνει σταδιακά , όσο περνάνε οι κύκλοι, τη θερμοκρασία υβριδισμού (T_a). Η T_a είναι στους αρχικούς κύκλους 3-5°C μεγαλύτερη της θερμοκρασίας αποδιάταξης (T_m) των εκκινητών που χρησιμοποιούνται, ενώ στους μετέπειτα κύκλους είναι πάλι 3-5°C βαθμούς χαμηλότερή της. Όσο μεγαλύτερη είναι η θερμοκρασία T_a τόσο πιο ειδική είναι η πρόσδεση των εκκινητών στο μόριο DNA, στην αλληλουχία ενδιαφέροντος ,και άρα έχουμε περαιτέρω ενίσχυση της συγκεκριμένης αλληλουχίας με το πέρασ των κύκλων. Το τελικό αποτέλεσμα θα ήταν τα τμήματα αυτά να υπερκεράσουν σε ενίσχυση τις μη ειδικές αλληλουχίες που μπορεί να ενισχύονταν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Αυτό βελτιώνει κατακόρυφα το τελικό αποτέλεσμα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Οι συνθήκες για τη κλασική αντίδραση PCR:

95° C → 5 λεπτά

95° C → 30 δεύτερα

53° C → 30 δεύτερα } x 40 κύκλους

72° C → 30 δεύτερα

72° C → 5 λεπτά

Παραμονή στους 4° C

Πίνακας 3. Οι συνθήκες για την αντίδραση Touchdown PCR:

Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
95°C	5 λεπτά	-
95°C 68°C 72°C	30 δεύτερα 30 δεύτερα 30 δεύτερα	} 2 κύκλοι
95°C 66°C 72°C	30 δεύτερα 30 δεύτερα 30 δεύτερα	}2 κύκλοι
95°C 64°C 72°C	30 δεύτερα 30 δεύτερα 30 δεύτερα	}2 κύκλοι
95°C 62°C 72°C	30 δεύτερα 30 δεύτερα 30 δεύτερα	}2 κύκλοι
95°C 60°C 72°C	30 δεύτερα 30 δεύτερα 30 δεύτερα	}2 κύκλοι
95°C 58°C 72°C	30 δεύτερα 30 δεύτερα 30 δεύτερα	}2 κύκλοι
72°C	5 λεπτά	-

Παραμονή στους 4°C

Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε αντίδραση PCR αγοράστηκαν από την εταιρία **kapabiosystems (KAPA Taq PCR kit, με αριθμό καταλόγου KK1015)**, και ήταν τα εξής:

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση	Τελικός όγκος
DNA	-	4μl
PCR Buffer (10x) + Mg (15 mM)	1x Buffer + 1,5mM (Mg ²⁺)	5μl
dNTPs (10mM από το καθένα)	0,2 mM (από το καθένα)	1μl
Πρόσθιος εκκινητής (10 pmol/μl)	0,5 pmol/μl	2,5 μl
Ανάστροφος εκκινητής(10 pmol/μl)	0,5 pmol/μl	2,5 μl
ΚΑΡΑ Ταq πολυμεράση (5U/μl)	0,02 U/μl	0,2 μl
dH ₂ O	-	34,8 μl
Τελικός όγκος		50 μl

Πίνακας 4. Οι αναλογίες αντιδραστηρίων στις αντιδράσεις PCR

Επιλογή εκκινητών

Εκκινητές	T _m	Μέγεθος προϊόντος
5' CAGGAGACCCTGTAGGA 3' (πρόσθιος)	58,2°C	225 bps
5' TATCCTGGCTGTGTCCTG 3'(ανάστροφος)	56°C	

Πίνακας 5. Επιλογή των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

Περιοχή ενίσχυσης εκκινητών στην γονιδιωματική αλληλουχία του γονιδίου HRAS:

```

...1141 gcctggcct ggctgagcag ggccctcctt ggcaggtggg gcaggagacc ctgtaggagg

1201 accccgggcc gcaggcccct gaggagcgat gacggaatat aagctggtgg tggtagggcgc

1261 cggcgggtg ggcaagagtg cgctgaccat ccagctgatc cagaaccatt ttgtggacga

1321 atacgacccc actatagagg tgagcctggc gccgccgtcc aggtgccagc agctgctgcg

1381 ggcgagccca ggacacagcc aggatagggc tggctgcagc ccctggtccc ctgcatggtg...

```

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (F Hras 12/13 R Hras 12/13) (σημειώνονται με κίτρινο στην ανωτέρω αλληλουχία) ενισχύουν την περιοχή, που περιλαμβάνει τα κωδικόνια 12/13 του γονιδίου Hras (με κόκκινο σημειώνεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία για τα κωδικόνια 12 και 13). Σε κάθε αντίδραση TD-PCR χρησιμοποιήθηκε και ένα αρνητικό control που περιείχε όλα τα συστατικά μιας αντίδρασης PCR της οποίας το υπόστρωμα είχε αντικατασταθεί από νερό. Το αρνητικό control δεν αναμένεται να δώσει κάποιο προϊόν, καθώς δεν περιέχει DNA για να ενισχυθεί, οπότε αν εμφανιστεί προϊόν στο αρνητικό control αυτό αποτελεί σημάδι επιμόλυνσης στα αντιδραστήρια της.

Στη συνέχεια τα προϊόντα των αντιδράσεων TD-PCR , ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης ώστε να επιβεβαιωθεί ότι έχουν το σωστό μέγεθος (225bps).

Η διαδικασία της απεικόνισης σε πήκτωμα ηλεκτροφόρησης των συγκεκριμένων προϊόντων, είναι ακριβώς ίδια με τη διαδικασία που περιγράφηκε στο βήμα 2. Η μόνη διαφορά βρίσκεται στη σύσταση του πηκτώματος σε αγαρόζη η οποία στη περίπτωση αυτή ήταν 2%, και αυτό για να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός μικρότερων τμημάτων DNA. Στις εσοχές-πηγαδάκια τοποθετήθηκαν 5 μl από το προϊόν της αντίδρασης PCR, 2 μl loading buffer και 3 μl νερό σε τελικό όγκο ηλεκτροφόρησης 10 μl. Ταυτόχρονα με τα δείγματα, στο πήκτωμα φορτώθηκε και μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών (της εταιρίας NEW ENGLAND BIOLABS με αριθμό καταλόγου N3233). Με το πέρας της διαδικασίας, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε λάμπα UV ώστε να απεικονιστεί το αποτέλεσμα.

Δ. Καθαρισμός προϊόντων PCR (PCR-clean-up)

Καθώς ο απώτερος στόχος των προϊόντων PCR είναι η αλληλούχησή τους, είναι απαραίτητο να τα καθαρίσουμε από κάθε επιμόλυνση όπως νουκλεοτίδια εκκινητές, ένζυμα, πρόσθετα PCR (π.χ. DMSO, άλατα) καθώς και χρωστικές. Ο καθαρισμός των προϊόντων έγινε με χρήση του kit **NucleoSpin Gel and PCR clean-**

up, με αριθμό καταλόγου 740609.250, της εταιρίας **Macherey-Nagel** σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Αναλυτικά ο όγκος των δειγμάτων PCR ρυθμίστηκε στα 50μl με τη προσθήκη νερού. Στη συνέχεια κάθε δείγμα αναμείχθηκε με διπλάσιο όγκο(100μl) NTI και ακολούθησε η ανάδυσή τους. Στη συνέχεια, μια στήλη έκλουσης τοποθετήθηκε σε σωληνάριο των 2ml και φορτώθηκε όλο το δείγμα στη στήλη. Μετά από φυγοκέντριση 30sec στις 11.000 στροφές ανά λεπτό, απομακρύνθηκε το έκλουσμα και η στήλη επανατοποθετήθηκε σε νέο σωληνάριο των 2 ml. Ακολούθησε η προσθήκη 700μl διαλύματος NT3 και φυγοκέντριση 30sec στις 11.000 στροφές ανά λεπτό. Το έκλουσμα απορρίφθηκε και η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο των 2ml. Το παραπάνω βήμα επαναλήφθηκε άλλη μια φορά. Τέλος το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό στις 11000 στροφές ανά λεπτό μέχρι να απομακρυνθεί πλήρως το διάλυμα NT3. Στο τελευταίο βήμα της έκλουσης η στήλη τοποθετείται σε σωληνάριο erpendorf του 1,5 ml και προστίθενται 15-30μl διαλύματος NE (ανάλογα με την ποσότητα του προϊόντος PCR στη συγκεκριμένη εργασία 18 μl), ενώ μετά από επώαση ενός 1 λεπτού σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντριση στις 11000 στροφές ανά λεπτό, λήφθηκε το καθαρό προϊόν της PCR.

Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η αλληλούχισή τους.

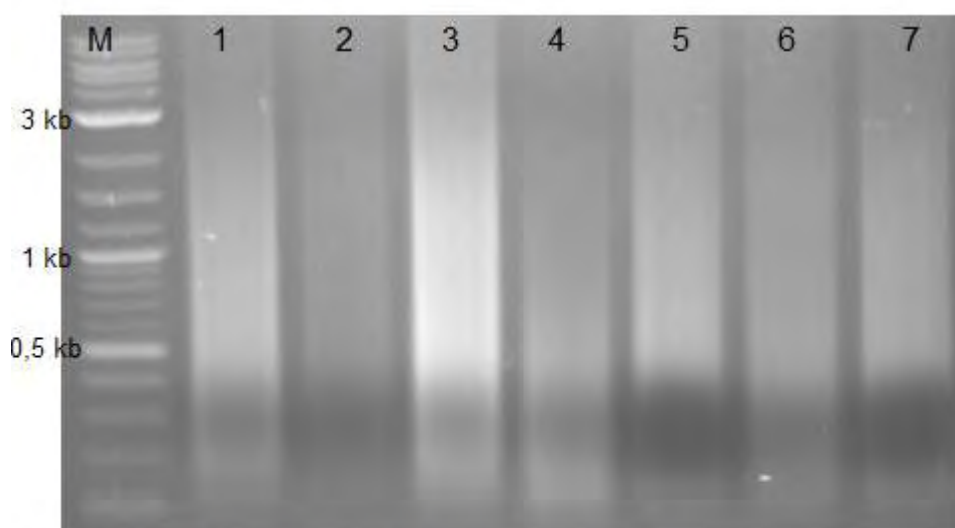
E. Αλληλούχιση των προϊόντων PCR

Η αλληλούχιση των προϊόντων PCR πραγματοποιήθηκε από την εταιρία CEMIA CA (Cellular and Molecular Immunological Applications) (Λάρισα). Για όλα τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε ο πρόσθιος εκκινητής (HRAS 12/13 F), αλλά για κάποια δείγματα για τα οποία δεν προέκυψε ξεκάθαρη αλληλουχία με τον πρόσθιο εκκινητή, η αλληλούχιση επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας και τον ανάστροφο εκκινητή (HRAS 12/13 R).

3. Αποτελέσματα

1. Απομόνωση DNA από βιοψίες ασθενών

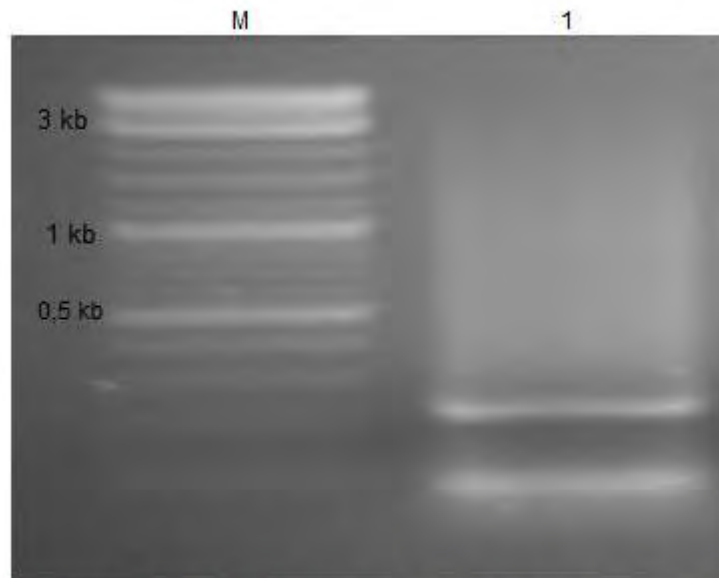
Για την απομόνωση του γενωμικού DNA από τα δείγματα των ασθενών (βιοψίες εγκλεισμένες σε παραφίνη) χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό αντιδραστήριο (kit) QIAamp DNA FFPE Tissue της εταιρείας QIAGEN. Η απομόνωση έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (βλ. Υλικά/Μέθοδοι-απομόνωση DNA από ιστό σε παραφίνη). Η επιτυχής απομόνωση του DNA εξακριβώθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ποσοστιαίας περιεκτικότητας 1%. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ποιότητα του γονιδιωματικού DNA σε αρκετά δείγματα δεν ήταν καλή, πιθανώς λόγω παλαιότητας.



Εικόνα 5. M: 2-log DNA Ladder 1-7: Γονιδιωματικά DNA

2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

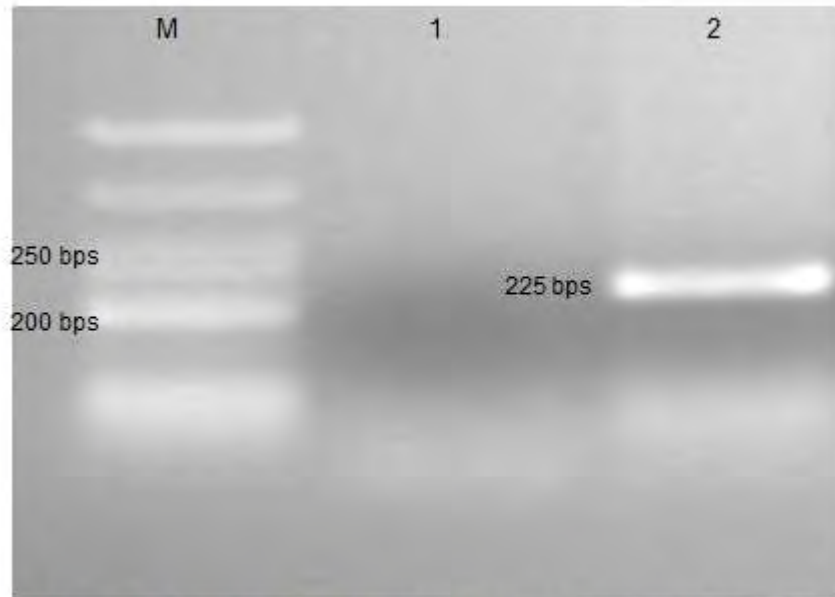
Για την ενίσχυση του γονιδιωματικού DNA χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit KAPA Taq PCR της εταιρείας karabiosystems, που περιείχε όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια (βλ. Υλικά/Μέθοδοι-Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) για την εκτέλεση της αντίδρασης αλυσιδωτής πολυμεράσης.



Εικόνα 6. M: 2- Log DNA Ladder 1: Προϊόν κλασικής PCR με εκκινητές HRAS 12/13

Η παραπάνω εικόνα προέκυψε μετά από την κλασική PCR, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν οι 53° C ως θερμοκρασία υβριδοποίησης για τους εκκινητές. Είναι εμφανές από την **Εικόνα 6** ότι η αντίδραση της κλασικής PCR με τις ανωτέρω συνθήκες δεν μπόρεσε να δώσει ειδικό προϊόν (λόγω της ύπαρξης δύο ζωνών). Η κλασική PCR εφαρμόστηκε και με ένα εύρος θερμοκρασιών υβριδοποίησης (51-55°C) χωρίς να μπορέσει να προκύψει ένα ειδικό προϊόν. Για το λόγο αυτό εφαρμόστηκε μια παραλλαγή της κλασικής PCR, η touchdown PCR (βλ. Υλικά/Μέθοδοι) μέσω της οποίας προέκυψε ειδικό προϊόν.

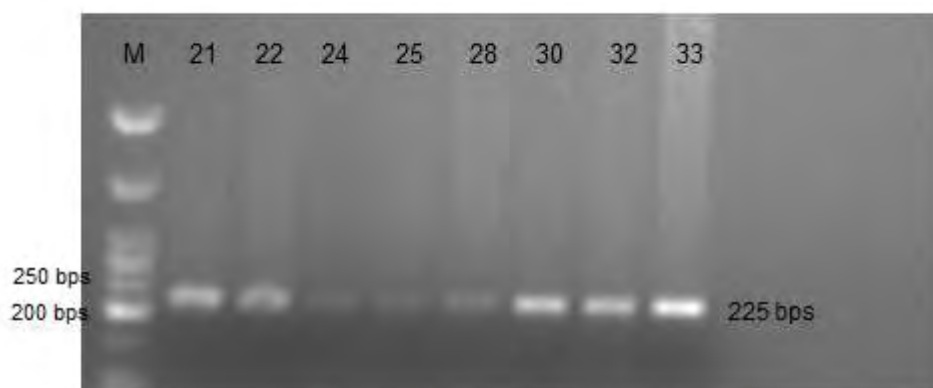
Στην **εικόνα 7** απεικονίζεται το προϊόν που δίνει η συγκεκριμένη παραλλαγή της κλασικής PCR.



Εικόνα 7. M: Low Molecular Weight Ladder 1: Αρνητικό control HRAS 12/13
2: Προϊόν με TDPCR HRAS 12/13

3. Καθαρισμός των προϊόντων PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR έγινε με χρήση του kit NucleoSpin Gel and PCR clean-up της εταιρίας Macherey-Nagel σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (βλ. Υλικά/Μέθοδοι- Καθαρισμός προϊόντων PCR).



Εικόνα 8. M: Low Molecular Weight Ladder 21-33: Καθαρισμένα προϊόντα PCR από δείγματα ασθενών.

4. Αλληλούχηση καθαρισμένων PCR products

Η αλληλούχηση των προϊόντων PCR έδωσε 97-100% ομολογία με την περιοχή του γονιδίου HRAS, αλλά έδειξε ότι δεν υπάρχει καμιά μετάλλαξη στα κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου HRAS. Ενδεικτικά δίνεται το χρωματογράφημα για το δείγμα 1 (ασθενής με θηλώδες καρκίνωμα).



Εικόνα 9. Χρωματογράφημα

Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συσχέτιση μεταλλάξεων στο γονίδιο HRAS και συγκεκριμένα στα κωδικόνια 12/13, με την εκδήλωση καρκίνου του θυρεοειδούς αδένος. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε γονιδιωματικό DNA από δείγματα ιστού ασθενών διαγνωσμένων με διάφορες μορφές καρκίνου του θυρεοειδούς, από τον ελληνικό πληθυσμό. Στη συνέχεια με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), ενισχύθηκε με τους κατάλληλους εκκινήτες η περιοχή του γονιδίου που περιλαμβάνει τα κωδικόνια 12/13 του H-RAS. Τέλος, τα προϊόντα της PCR στη συνέχεια αλληλουχήθηκαν για τον εντοπισμό της συγκεκριμένης μετάλλαξης.

Το γονίδιο H-RAS ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των γονιδίων RAS που κωδικοποιούν μικρές GTPασες. Αυτές εντοπίζονται στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και προσδένοντας GTP μεταδίδουν σήματα προερχόμενα από υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης κατά μήκος του μονοπατιού των MAPK κινασών (Nikiforov 2011). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι σημειακές μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα κωδικόνια (12/13 και 61) των γονιδίων RAS εμπλέκονται σε διαφορετικούς τύπους καρκίνων. Αν και στους περισσότερους καρκινικούς τύπους φαίνεται ότι η μετάλλαξη στα κωδικόνια 12/13 του γονιδίου K-RAS υπερσχύουν, στον καρκίνο του θυρεοειδούς οι πιο συχνές μεταλλάξεις αφορούν τα κωδικόνια 61 των γονιδίων KRAS και NRAS (Nikiforov 2011).

Οι μεταλλάξεις των γονιδίων RAS έχουν ταυτοποιηθεί κατά κύριο λόγο στο θυλακιδώδες καρκίνωμα και αδένωμα του θυρεοειδούς και έχει δειχθεί ότι οι μεταλλάξεις αυτές είναι αμοιβαία αποκλειόμενες τόσο μεταξύ τους όσο και με άλλες μεταλλάξεις. Γενικότερα, οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις εντοπίζονται σε όλους τους καρκίνους οι οποίοι προέρχονται από τα επιθηλιακά κύτταρα του θυρεοειδή αδένος (Nikiforova et al., 2003). Η ύπαρξή τους όμως ανιχνεύεται και σε άλλους τύπους καρκίνου του θυρεοειδή, μεταξύ αυτών και στον θηλώδη καρκίνο, την πιο συχνή μορφή καρκίνου του θυρεοειδή, σε ένα ποσοστό 10-20% (Nikiforov 2011). Σχεδόν όλα τα θηλώδη καρκινώματα που φέρουν τις μεταλλάξεις στα γονίδια RAS παρουσιάζουν το ιστολογικό πρότυπο της θυλακιδώδους παραλλαγής (Nikiforov 2011). Από την άλλη έχει προταθεί ότι οι μεταλλάξεις των γονιδίων RAS δεν ικανές

να προκαλέσουν κακοήθη ανάπτυξη πέραν του θυλακιδώδους αδενώματος, υποδηλώνοντας ότι πιθανώς άλλες, ακόμα άγνωστες, γενετικές μεταλλάξεις διαδραματίζουν μείζονα ρόλο στην ανάπτυξη του κακοήθους φαινοτύπου (Nikiforova et al., 2003).

Στη συγκεκριμένη εργασία δεν ταυτοποιήθηκε καμία μετάλλαξη στα κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου HRAS σε κανένα από τα 24 δείγματα που μελετήθηκαν. Το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης δεν επιτρέπει να επιβεβαιώσουμε την αναφερόμενη συσχέτιση των μεταλλάξεων ras με το θυλακιδώδες καρκίνωμα που υπάρχει στη βιβλιογραφία. Η μοναδική μελέτη στον ελληνικό πληθυσμό που έχει πραγματοποιηθεί είχε ως αντικείμενο την συσχέτιση μεταλλάξεων B-RAF και KRAS σε δείγματα θηλώδους και μυελοειδούς καρκίνου του θυρεοειδή (Goutas et al., 2008). Στη μελέτη αυτή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του KRAS βρέθηκε σε υψηλό ποσοστό, τόσο σε θηλώδη (54,5%), όσο και σε μυελοειδή (40,9%) καρκινώματα. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη η μετάλλαξη BRAF V600E ανιχνεύτηκε σε μικρότερο ποσοστό σε σύγκριση με την μετάλλαξη του KRAS σε θηλώδη καρκινώματα (27,3%). Η μελέτη αυτή είναι η μοναδική στον ελληνικό πληθυσμό, αλλά τα αποτελέσματά της δεν συμφωνούν με την διεθνή βιβλιογραφία, σύμφωνα με την οποία οι μεταλλάξεις του γονιδίου BRAF απαντώνται με την μεγαλύτερη συχνότητα (ποσοστό τουλάχιστον 50-55%) στα θηλώδη καρκινώματα σε σχέση ότι όλες τις άλλες μεταλλάξεις.

Αν και στη παρούσα μελέτη φαίνεται ότι δεν υπάρχει συσχέτιση της μετάλλαξης HRAS 12/13 με τους διαφορετικούς τύπους καρκινωμάτων του θυρεοειδούς, πρέπει να επισημάνουμε τα εξής: α) ο ολικός αριθμός των δειγμάτων που αναλύθηκαν είναι μικρός, συνεπώς δεν μπορεί να επιτρέψει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων και β) λόγω του γεγονότος ότι οι μεταλλάξεις σε καρκινώματα θυρεοειδούς είναι αμοιβαία αποκλειόμενες είναι απαραίτητο να διερευνηθούν περαιτέρω τα γονίδια της οικογένειας RAS. Σε μελλοντικό στάδιο πρέπει να μελετηθούν οι μεταλλάξεις και στα υπόλοιπα γονίδια της οικογένειας RAS (HRAS 61, KRAS 12/13 και 61, NRAS 12/13 και 61) καθώς και οι ανακατατάξεις των RET/PTC και PAX/PPARγ. Επιπλέον είναι ενδιαφέρον να μελετηθούν και κυτταρικές σειρές που φέρουν τις παραπάνω μεταλλάξεις

Βιβλιογραφία

- Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:180–6.
- MacCorkle RA, Tan TH. Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control. *Cell Biochem Biophys* 2005;43:451–61
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949–54.
- Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004;6:313–9.
- Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endoc Rev* 2007;28:742–62.
- Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004;116:855–67.
- Döbert N, Menzel C, Oeschger S, Grünwald F. Differentiated thyroid carcinoma: the new UICC 6th edition TNM classification system in a retrospective analysis of 169 patients. *Thyroid* 2004;14:65–70.
- Zhang BH, Guan KL. Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *EMBO J* 2001;19:5429–39
- Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000;351:289–305.
- Morrison DK, Cutler RE. The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:174–9.
- Leicht DT, Balan V, Kaplun A, Singh-Gupta V, Kaplun L, Dobson M, Tzivion G. Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773: 1196–212.
- Daum G, Eisenmann-Tappe I, Fries HW, Troppmair J, Rapp UR. The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci* 1994;19:474–80.
- Kondo T, Nakazawa T, Murata S, Kurebayashi J, Ezzat S, Asa SL, Katoh R. Enhanced B-Raf protein expression is independent of V600E mutant status in thyroid carcinomas. *Hum Pathol* 2007;38:1810–8.

- Lupi C, Giannini R, Ugolini C, Proietti A, Berti P, Minuto M, Materazzi G, et al. Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4085–90.
- Trovisco V, Soares P, Preto A, de Castro IV, Lima J, Castro P, Máximo V, et al. Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness. *Virchows Arch* 2005;446:589–95.
- Salvatore G, Falco V, Salerno P, Nappi T, Pepe S, Troncone G, Carlomagno F, et al. BRAF is a therapeutic target in aggressive thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12:1623–9.
- Liu D, Liu Z, Condouris S, Xing M. BRAF V600E maintains proliferation, transformation, and tumorigenicity of BRAFmutant papillary thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2264–71.
- Frasca F, Nucera C, Pellegriti G, Gangemi P, Attard M, Stella M, Loda M, et al. BRAF(V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2008;15: 191–205.
- Kebebew E, Weng J, Bauer J, Ranvier G, Clark OH, Duh QY, Shibru D, et al. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Ann Surg* 2007;246:466–71.
- Elisei R, Ugolini C, Viola D, Lupi C, Biagini A, Giannini R, Romei C, et al. BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3943–9.
- Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, Carson KA, et al. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:6373–9.
- Ouyang B, Knauf JA, Smith EP, Zhang L, Ramsey T, Yusuff N, Batt D, et al. Inhibitors of Raf kinase activity block growth of thyroid cancer cells with RET/PTC or BRAF mutations in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2006;12:1785–93.

- Lee TI, Yang HJ, Lin SY, Lee MT, Lin HD, Braverman LE, Tang KT. The accuracy of fine-needle aspiration biopsy and frozen section in patients with thyroid cancer. *Thyroid* 2002; 12:619–26.
- Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, Haugen BR, Klopper JP, Zhu Z, Fagin JA, et al. Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:2092–8.
- Kim S, Yazici YD, Calzada G, Wang ZY, Younes MN, Jasser SA, El-Naggar AK, et al. Sorafenib inhibits the angiogenesis and growth of orthotopic anaplastic thyroid carcinoma xenografts in nude mice. *Mol Cancer Ther* 2007;6:1785–92.
- Sherman SI, Wirth LJ, Droz JP, Hofmann M, Bastholt L, Martins RG, Licitra L, et al. Motesanib diphosphate in progressive differentiated thyroid cancer. *N Engl J Med* 2008; 359:31–42.
- Cohen EE, Rosen LS, Vokes EE, Kies MS, Forastiere AA, Worden FP, Kane MA, et al. Axitinib is an active treatment for all histologic subtypes of advanced thyroid cancer: results from a phase II study. *J Clin Oncol* 2008;26:4708–13.
- Tang Kam-Tsun, Lee Chen-Hsen. Braf mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications *J Chin Med Assoc* 2010;73(3):113–128
- Goutas N, Vlachodimitropoulos D. et al. BRAF and K-RAS mutation in a Greek papillary and medullary thyroid carcinoma cohort. *Anticancer Research* 28: 305-308 (2008)
- Bongarzone I and Pierotti MA: The molecular basis of thyroid epithelial tumorigenesis. *Tumori* 89: 514-516, 2003.
- Tallini G: Molecular pathobiology of thyroid neoplasms. *Endocr Pathol* 13: 271-288, 2002.
- McIver B, Grebe SK and Eberhardt NL: The PAX8/PPARgamma fusion oncogene as a potential therapeutic target in follicular thyroid carcinoma. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 4: 221-234, 2004.

- Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, Beller U, Westra WH, Ladenson PW and Sidransky D: BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 95: 625-627, 2003.
- Nikiforov YE : Molecular Diagnostics for thyroid tumors *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135:569–577
- Namba H, Rubin SA, Fagin JA. Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol.* 1990;4(10):1474–1479.
- Karga H, Lee JK, Vickery AL Jr, Thor A, Gaz RD, Jameson JL. Ras oncogene mutations in benign and malignant thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;73(4):832–836.
- Hara H, Fulton N, Yashiro T, Ito K, DeGroot LJ, Kaplan EL. N-ras mutation: an independent prognostic factor for aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Surgery.* 1994;116(6):1010–1016.
- Basolo F, Pisaturo F, Pollina LE, et al. N-ras mutation in poorly differentiated thyroid carcinomas: correlation with bone metastases and inverse correlation to thyroglobulin expression. *Thyroid.* 2000;10(1):19–23.
- Ezzat S, Zheng L, Kolenda J, Safarian A, Freeman JL, Asa SL. Prevalence of activating ras mutations in morphologically characterized thyroid nodules. 1996;6(5):409–416.
- Vasko VV, Gaudart J, Allasia C, et al. Thyroid follicular adenomas may display features of follicular carcinoma and follicular variant of papillary carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2004;151(6):779–786.
- Xing M., Bryan R Haugen, Martin Schlumberger : Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer. *Lancet* 2013; 381: 1058–69
- Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2009; 19: 1167–214.
- Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, et al. Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 2092–98.

- Nikiforov YE, Ohori NP, Hodak SP, et al. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 3390–97.
- Ferraz C, Eszlinger M, Paschke R. Current state and future perspective of molecular diagnosis of fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 2016–26.
- de la Chapelle A, Jazdzewski K. MicroRNAs in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 3326–36.
- Kouniavsky G, Zeiger MA. The quest for diagnostic molecular markers for thyroid nodules with indeterminate or suspicious cytology. *J Surg Oncol* 2012; 105: 438–43.
- Milas M, Shin J, Gupta M, et al. Circulating thyrotropin receptor mRNA as a novel marker of thyroid cancer: clinical applications learned from 1758 samples. *Ann Surg* 2010; 252: 643–51.
- Liu Z, Hou P, Ji M, et al. Highly prevalent genetic alterations in receptor tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/akt and mitogen-activated protein kinase pathways in anaplastic and follicular thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 3106–16.
- Liu D, Hu S, Hou P, et al. Suppression of BRAF/MEK/MAP kinase pathway restores expression of iodide-metabolizing genes in thyroid cells expressing the V600E BRAF mutant. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1341–49.
- Fagin JA. How thyroid tumors start and why it matters: kinase mutants as targets for solid cancer pharmacotherapy. *J Endocrinol* 2004; 183: 249–56.
- Bunone G, Vigneri P, Mariani L, et al. Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *Am J Pathol* 1999; 155: 1967–76
- Hou P, Bojdani E, Xing M. Induction of thyroid gene expression and radioiodine uptake in thyroid cancer cells by targeting major signaling pathways. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 820–28.
- Liu D, Hou P, Liu Z, et al. Genetic alterations in the

phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway confer sensitivity of thyroid cancer cells to therapeutic targeting of Akt and mammalian target of rapamycin. *Cancer Res* 2009; 69: 7311–19.

- Liu R, Liu D, Trink E, et al. The Akt-specific inhibitor MK2206 selectively inhibits thyroid cancer cells harboring mutations that can activate the PI3K/Akt pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 2011 96: E577–85.
- Spano JP, Vano Y, Vignot S, et al. GEMOX regimen in the treatment of metastatic differentiated refractory thyroid carcinoma. *Med Oncol* 2012; 29: 1421–28.
- Crouzeix G, Michels JJ, Sevin E, et al. Unusual short-term complete response to two regimens of cytotoxic chemotherapy in a patient with poorly differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 3046–50.
- Nikiforova MN. et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR γ rearrangement in thyroid tumors: Evidence of distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, May 2003, 88(5):2318–2326.
- Noriko Motoi, et al. Role of ras mutation in the progression of thyroid carcinoma of follicular epithelial origin. *Pathol. Res. Pract.* ,96: 1-7 (2000)
- Bos JL Ras oncogenes in human cancer: A review: *Cancer Res*(1989) 49: 4682-4689
- Lowy DR, Willumsen BM Function and regulation of cas. *Annu Rev Biochem* (1993) 62: 851-891
- Gianoukakis AG et al. Well differentiated follicular thyroid neoplasia: Impact of molecular and technological advances on detection, monitoring and treatment. *Molecular and Cellular Endocrinology* 332 (2011) 9–20
- Barbacid, M., 1990. Ras oncogenes: their role in neoplasia. *Eur. J. Clin. Invest.* 20, 225–235.
- Bounacer, A., Wicker, R., Caillou, B., Cailleux, A.F., Sarasin, A., Schlumberger, M., Suarez, H.G., 1997. High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumors from patients who had received external radiation. *Oncogene* 15, 1263–1273.

- Castro, P., Rebocho, A.P., Soares, R.J., Magalhaes, J., Roque, L., Trovisco Vieira, D.C.I., Cardoso-de-Oliveira, M., Fonseca, E., Soares, P., Sobrinho-Simoes, M., 2006. PAX8-PPAR γ rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 213–220.
- Cheung, L., Messina, M., Gill, A., Clarkson, A., Learoyd, D., Delbridge, L., Wentworth, J., Philips, J., Clifton-Bligh, R., Robinson, B.G., 2003. Detection of the PAX8-PPAR γ fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 354–357
- Esapa, C.T., Johnson, S.J., Kendall-Taylor, P., Lennard, T.W., Harris, P.E., 1999. Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 50, 529–535.
- Freitas, B.C., Cerutti, J.M., 2010. Genetic markers differentiating follicular thyroid carcinoma from benign lesions. *Mol. Cell Endocrinol.* 321, 77–85.
- Fusco, A., Santoro, M., Grieco, M., Carlomagno, F., Dathan, N., Fabien, N., Berlingieri, M.T., Li, Z., De, F.V., Salvatore, D., 1995. RET/PTC activation in human thyroid carcinomas. *J. Endocrinol. Invest.* 18, 127–129.
- Dwight, T., Thoppe, S.R., Foukakis, T., Lui, W.O., Wallin, G., Hoog, A., Frisk, T., Larsson, C., Zedenius, J., 2003. Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor γ rearrangement in follicular thyroid tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 4440–4445
- Grieco, M., Santoro, M., Berlingieri, M.T., Melillo, R.M., Donghi, R., Bongarzone, I., Pierotti, M.A., Della, P.G., Fusco, A., Vecchio, G., 1990. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 60, 557–563.
- Nikiforov, Y.E., 2002. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocr. Pathol.* 13, 3–16.
- Xing, M., 2005. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 12, 245–262.
- Fawcett, Don; Jensch, Ronald (2002). *Bloom & Fawcett's Concise Histology*. New York: Arnold Publishers. pp. 257–258.

- Wittinghofer A, Nassar N. How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends Biochem Sci* 1996;21:488–91.
- Hancock JF. Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:373–84.
- Christian Posch, Susana Ortiz-Urda. NRAS mutant melanoma- udrugable? *Oncotarget*. Apr 2013; 4(4): 494–495
- Dal Maso L , Bosetti C, La Vecchia C, Franceschi S. Risk factors for thyroid cancer: an epidemiological review focused on nutritional factors. *Cancer Causes Control*. 2009 Feb;20(1):75-86
- Xu X, Quiros RM, Gattuso P, Ain KB, Prinz RA. High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. *Cancer Res*. 2003 Aug 1;63(15):4561-7.
- Zhu, Z., Gandhi, M., Nikiforova, M.N., Fischer, A.H., Nikiforov, Y.E., 2003. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am. J. Clin. Pathol.* 120, 71–77.
- Di, C.J., Marcy, M., Vasko, V., Sebag, F., Fakhry, N., Wynford-Thomas, D., de, M.C., 2006. Molecular genetic study comparing follicular variant versus classic papillary thyroid carcinomas: association of N-ras mutation in codon 61 with follicular variant. *Hum. Pathol.* 37, 824–830.
- Santoro, M., Grieco, M., Melillo, R.M., Fusco, A., Vecchio, G., 1995. Molecular defects in thyroid carcinomas: role of the RET oncogene in thyroid neoplastic transformation. *Eur. J. Endocrinol.* 133, 513–522.
- Kroll, T.G., Sarraf, P., Pecciarini, L., Chen, C.J., Mueller, E., Spiegelman, B.M., Fletcher, J.A., 2000. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science* 289, 1357–1360.
- Au, A.Y., McBride, C., Wilhelm Jr., K.G., Koenig, R.J., Speller, B., Cheung, L., Messina, M., Wentworth, J., Tasevski, V., Learoyd, D., Robinson, B.G., Clifton-Bligh, R.J., 2006. PAX8-peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) disrupts normal PAX8 or PPARgamma transcriptional function and stimulates follicular thyroid cell growth. *Endocrinology* 147, 367–376.

- Berger J and , David E. Moller DE. The machanisms of action of HE
MECHANISMS OF ACTION OF PPARS. Annual Review of Medicine. 2002. Vol.
53: 409-435
- Mitsiades CS1, Negri J, McMullan C, McMillin DW, Sozopoulos E, Fanourakis
G, Voutsinas G, Tseleni-Balafouta S, Poulaki V, Batt D, Mitsiades N. Targeting
BRAFV600E in thyroid carcinoma: therapeutic implications. Mol Cancer Ther.
2007 Mar;6(3):1070-8.

