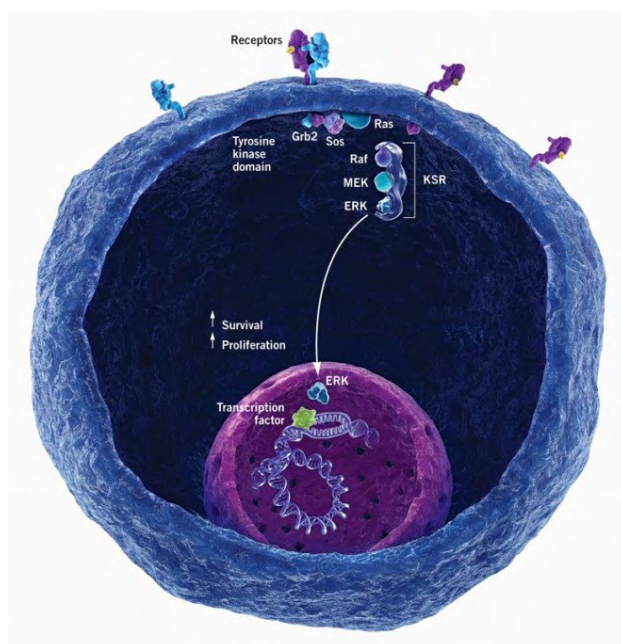




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ HRAS ΚΑΙ NRAS ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ



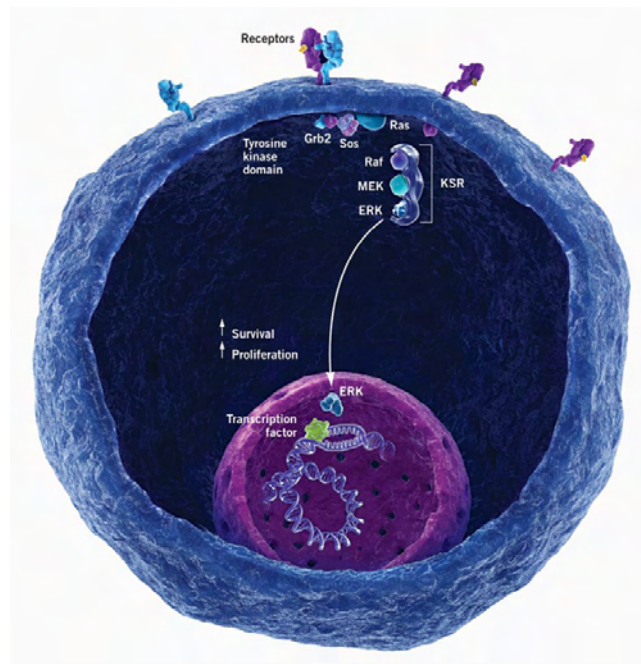
ΣΥΝΑΔΑΚΗ ΕΛΕΝΗ

Επιβλέπων: ΛΙΑΔΑΚΗ ΚΑΛΛΙΟΠΗ
Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2015

ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ HRAS ΚΑΙ NRAS ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ

MOLECULAR ANALYSIS OF HRAS AND NRAS GENES IN THYROID CANCER IN THE GREEK POPULATION



Εικόνα εξωφύλλου: Σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP κινασών (Bio oncology, 2015, Available from: <http://www.biooncology.com/therapeutic-targets/mek>)

Υπεύθυνη καθηγήτρια: **Λιαδάκη Καλλιόπη**, Επίκουρη Καθηγήτρια TBB, Π.Θ.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Σαραφίδου Θεολογία, Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1. ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑΣ.....	7
1.1.1. ΘΥΡΕΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ	8
1.1.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ	8
1.1.3. ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΚΑΙ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΕΙΕΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ.....	10
1.2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ.....	11
1.2.1. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	11
1.2.2. ΜΟΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΩΝ MAP ΚΙΝΑΣΩΝ (Mitogenic activated protein kinases cascade)	16
1.2.3. ΓΟΝΙΔΙΑ RAS.....	17
1.2.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ	19
ΣΚΟΠΟΣ	26
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
2.1. ΥΛΙΚΑ.....	27
2.1.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ	27
2.1.2. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	27
2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	28
2.2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΒΙΟΨΙΕΣ ΙΣΤΩΝ	28
2.2.2. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	30
2.2.3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	39
2.2.4. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR (PCR clean-up)	42
2.2.5. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΤΩΝ ΚΑΘΑΡΙΣΜΕΝΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR.....	44
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
3.1. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ (HRAS 12/13, HRAS 61, NRAS 12/13, NRAS 61) ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	45
3.2. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR.....	48
3.3. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR	50
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	53
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	55
Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία	59

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αποτελεί την πιο κοινή ενδοκρινική κακοήθεια και η συχνότητά του αυξάνεται σταθερά παγκοσμίως τα τελευταία χρόνια. Έχουν πραγματοποιηθεί εκτεταμένες μελέτες πάνω στα διάφορα είδη καρκίνων του θυρεοειδούς, τα χαρακτηριστικά τους αλλά και το μοριακό μονοπάτι που είναι υπεύθυνο για την εμφάνισή τους. Υπάρχουν τέσσερις, κυρίως, τύποι καρκίνου του θυρεοειδή: ο θηλώδης (papillary thyroid cancer), ο θυλακιώδης (follicular thyroid cancer), ο μυελοειδής (medullary thyroid cancer) και ο αναπλαστικός (anaplastic thyroid cancer). Ωστόσο, υπάρχουν και υπότυποι αυτών, όπως ο θυλακιώδης υπότυπος του θηλώδους καρκίνου που συναντάται αρκετά συχνά. Προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει πως η παθογένεια του καρκίνου του θυρεοειδούς οφείλεται σε συγκεκριμένες μεταλλάξεις στα μόρια που συμμετέχουν στο μονοπάτι μετάδοσης σήματος μέσω των MAP κινασών. Οι κύριες μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί είναι η μετάλλαξη BRAF^{V600E} καθώς και οι μεταλλάξεις στα γονίδια RAS (HRAS, KRAS, NRAS) στα κωδικόνια 12, 13 και 61. Επιπροσθέτως, αναδιατάξεις RET/PTC καθώς και αναδιατάξεις PAX8/PPARγ θεωρούνται υπεύθυνες για την εμφάνιση του καρκίνου. Μεταλλάξεις στα παραπάνω γονίδια μπορούν να οδηγήσουν σε ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών η οποία με την σειρά της οδηγεί σε καρκινογένεση. Περαιτέρω μελέτες, έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα πως οι παραπάνω μεταλλάξεις, είναι αμοιβαία αποκλειόμενες. Σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι η μελέτη διάφορων τύπων καρκίνου θυρεοειδούς, σε δείγματα του ελληνικού πληθυσμού, με στόχο τον εντοπισμό μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12, 13 και 61 των γονιδίων HRAS, και NRAS. Η πειραματική διαδικασία περιλάμβανε την απομόνωση του γενωμικού DNA από βιοψίες ιστών εγκλεισμένων σε παραφίνη, την ενίσχυση των ειδικών περιοχών του κάθε γονιδίου μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και την αλληλούχιση των καθαρισμένων προϊόντων της PCR. Τα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης των παραπάνω γονιδίων δεν ταυτοποίησαν καμία μετάλλαξη στα κωδικόνια 12, 13 ή 61 των γονιδίων HRAS και NRAS. Ωστόσο, καθώς ο αριθμός των δειγμάτων που αναλύθηκαν είναι μικρός, για την διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων απαιτείται η μελέτη αυτή να επεκταθεί σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και ταυτόχρονα στην ταυτοποίηση και άλλων μεταλλάξεων που συμμετέχουν στην παθογένεια του καρκίνου του θυρεοειδούς.

ABSTRACT

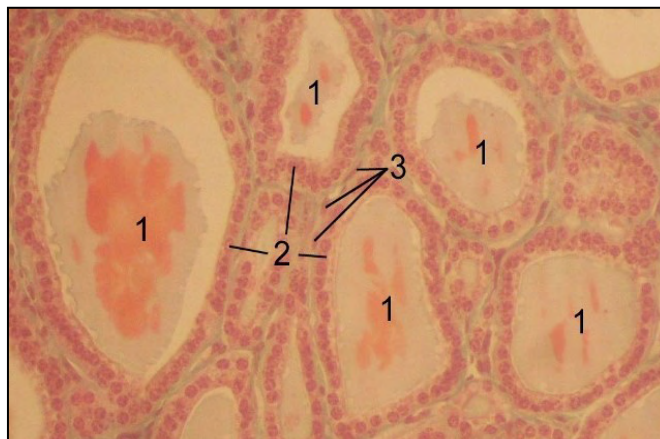
Thyroid cancer is the most common endocrine malignancy and its frequency is increasing steadily worldwide, over the last years. Many surveys have been carried out to investigate the different thyroid cancer types, their characteristics as well as the molecular pathway that is responsible for this malignancy. There are four major types of thyroid cancer: the papillary type, the follicular type, the medullary type and the anaplastic one. Furthermore, there are additional variants among these major types, the most common being the follicular variant of papillary thyroid cancer. Previous studies have shown that specific mutations at genes that play a fundamental role in the MAPK signaling pathway are responsible for the pathogenesis of thyroid cancer. The most common mutations are the BRAF^{V600E} and the point mutations at codons 12, 13 and 61 of HRAS, KRAS and NRAS genes. In addition, RET/PTC as well as PAX8/PPAR γ rearrangements are also responsible for thyroid tumorigenesis. Mutations in these genes can lead to constitutive activation of MAPK signaling pathway which, in turn, can lead to tumorigenesis. Additional studies have shown that these mutations rarely overlap in the same tumor. The purpose of this study was to investigate the correlation of point mutations of the HRAS and NRAS genes (codons 12, 13 and 61) with different types of thyroid cancer in the Greek population. The experimental procedure included the isolation of genomic DNA from paraffin-embedded tissue biopsies, the amplification of the specific regions of the HRAS and NRAS genes by Polymerase Chain Reaction (PCR) and the sequencing of the purified PCR products. The results of the study didn't identify any mutation at codons 12, 13 or 61 of the HRAS and NRAS genes. However, in order to be able to draw firm conclusions, this study must be extended to include additional mutations of the RAS and the BRAF genes, as well as genetic rearrangements, in a larger sample population.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η επικοινωνία και η συνεργασία των διάφορων ιστών και οργάνων επιτυγχάνεται μέσω της δράσης του νευρικού και του ενδοκρινικού συστήματος. Το ενδοκρινικό σύστημα πρόκειται για ένα «ασύρματο» σύστημα. Οι ενδοκρινείς αδένες παράγουν διάφορες ουσίες, οι οποίες ονομάζονται ορμόνες, και στη συνέχεια, εκκρίνονται στο αίμα και μεταφέρονται στα κύτταρα και τα όργανα στόχους. Ένας από τους πιο σημαντικούς ενδοκρινείς αδένες είναι ο θυρεοειδής αδένας (Σμοκοβίτης, 2007). Τόσο ο θυρεοειδής αδένας όσο και οι ορμόνες που εκκρίνει παίζουν κύριο ρόλο στην ανάπτυξη του ανθρώπινου οργανισμού καθώς και στην ανάπτυξη και τη λειτουργία του καρδιαγγειακού, του νευρικού, του ανοσολογικού και του αναπαραγωγικού συστήματος (Choksi et al. 2003).

1.1. ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑΣ

Ο θυρεοειδής αδένας, ένα καφέ-κόκκινο οργανίδιο, βρίσκεται στο λαιμό, ακριβώς κάτω από τον λάρυγγα. Αποτελείται από δύο πλάγιους λοβούς οι οποίοι ενώνονται με τη βοήθεια μιας γέφυρας που ονομάζεται ισθμός. Η βασική του μορφολογική μονάδα ονομάζεται θυλάκιο (follicle) και αποτελείται από μικρά κυβοειδή επιθηλιακά κύτταρα, ενώ στον περιβάλλοντα εξωκυττάριο χώρο βρίσκεται η γλυκοπρωτεΐνη, θυρεοσφαιρίνη. Υπάρχουν δύο είδη κυττάρων στον ιστό του θυρεοειδούς αδένος: α) τα θυλακιώδη (follicular) κύτταρα και β) τα παραθυλακιώδη (parafollicular, C cells) κύτταρα. Η Εικόνα 1 αποτελεί μια χαρακτηριστική ιστολογική απεικόνιση του θυρεοειδούς αδένος.



Εικόνα 1: Ιστολογική απεικόνιση του θυρεοειδούς αδένος: 1) Το θυρεοειδές θυλάκιο (follicle), 2) Τα θυλακιώδη κύτταρα (follicular) και 3) Τα παραθυλακιώδη κύτταρα (parafollicular ή C cells). (Fawcett & Jensch, 2002)

1.1.1. ΘΥΡΕΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ

Στα θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς αδένος παράγονται δύο ορμόνες: η θυροξίνη (thyroxine ή T4) και η τριιωδοθυρονίνη (triiodothyronine ή T3). Για την σύνθεση των ορμονών αυτών είναι απαραίτητη η παρουσία ιωδίου. Οι θυρεοειδείς ορμόνες παίζουν κύριο ρόλο στη διαφοροποίηση, την ανάπτυξη και το μεταβολισμό και είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική λειτουργία όλων σχεδόν των ιστών. Οι ορμόνες αυτές συντίθενται από δύο κατάλοιπα τυροσίνης συνδεδεμένα μέσω ενός αιθερικού δεσμού. Η T3 είναι η βιολογικά ενεργή ορμόνη ενώ η T4 είναι η κύρια ορμόνη που παράγεται από τον θυρεοειδή αδένος (Choksi et al. 2003).

Τα κύτταρα C του θυρεοειδούς αδένος βρίσκονται στο τοίχωμα των θυλακών ή σε μικρές ομάδες ανάμεσα στα θυλάκια και παράγουν ένα πολυπεπτίδιο, την καλσιτονίνη. Η καλσιτονίνη ρυθμίζει τη συγκέντρωση του ασβεστίου και του φωσφόρου στον οργανισμό. Η ορμόνη αυτή δεν περιέχει ιώδιο και δεν συγκαταλέγεται στον όρο «θυρεοειδείς ορμόνες».

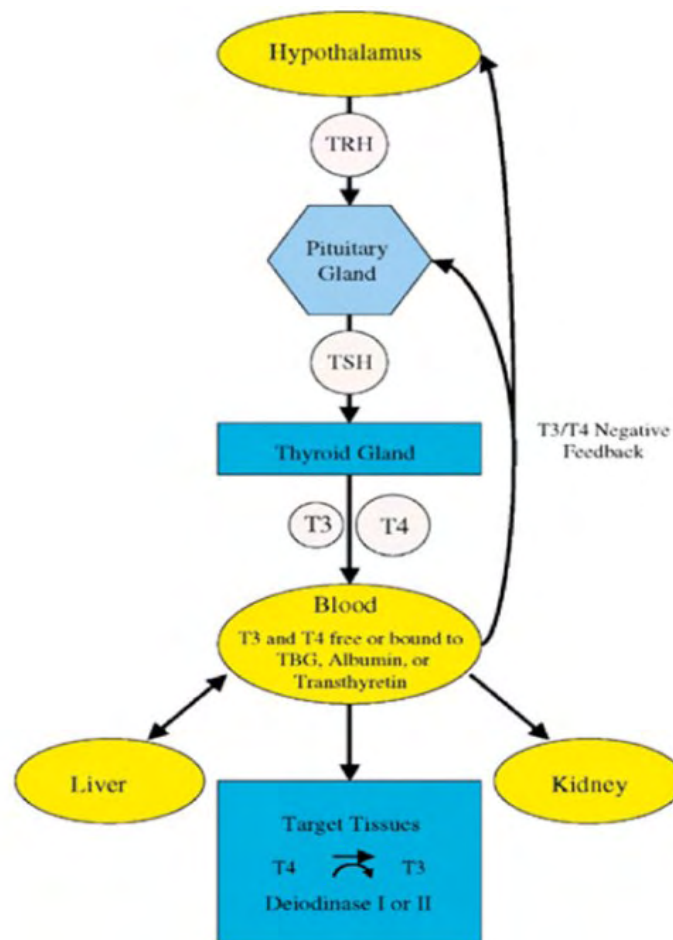
Ο φυσιολογικός ρόλος των ορμονών του θυρεοειδούς αδένος συνίσταται στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων και των λιπιδίων. Μικρές ή φυσιολογικές ποσότητες T4 και T3 αυξάνουν τη σύνθεση πρωτεϊνών ενώ, μεγάλες ποσότητες έχουν καταβολική επίδραση. Ακόμη, η θυροξίνη αυξάνει τον μεταβολισμό του γλυκογόνου σε γλυκόζη στο ήπαρ και προάγει την γλυκονογένεση ενώ, τόσο η T3 όσο και η T4 προάγουν την οξείδωση των λιπιδίων. Επιπροσθέτως, κρίσιμος είναι ο ρόλος των ορμονών του θυρεοειδούς αδένος στην σωματική ανάπτυξη και στη φυσιολογική λειτουργία του κεντρικού νευρικού, του αναπαραγωγικού, του κυκλοφορικού, του γαστρεντερικού και του αναπνευστικού συστήματος.

1.1.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

Το ιώδιο που προσλαμβάνεται μέσω της τροφής μεταφέρεται μέσω ενεργητικής μεταφοράς από το αίμα στον γαστρεντερικό σωλήνα και μετατρέπεται σε ιονισμένη μορφή. Στη συνέχεια, ο θυρεοειδής αδένος προσλαμβάνει τα ιόντα ιωδίου που είναι απαραίτητα για την παραγωγή των θυρεοειδών ορμονών, και αφού τα ιόντα ιωδίου μεταφερθούν στα θυρεοειδή θυλάκια, οξειδώνονται πάλι στην αρχική τους μορφή μέσω της δράσης της υπεροξειδάσης του θυρεοειδούς. Μετά την οξείδωσή τους, τα ιόντα ενώνονται με το αμινοξύ τυροσίνη του μορίου της θυροσφαιρίνης η οποία αποτελεί μέρος της κολλοειδούς ουσίας του θυλακίου. Έτσι, σχηματίζεται η μονοϊωδοτυροσίνη (MIT) και η διωδοτυροσίνη (DIT). Δύο μόρια DIT παράγουν την ορμόνη θυροξίνη ενώ, ένα μόριο DIT και ένα μόριο MIT παράγουν την ορμόνη τριιωδοθυρονίνη (Σμοκοβίτης, 2007). Η ορμόνη T3 μπορεί να παραχθεί και από την ορμόνη T4 μέσω της δράσης του ενζύμου διωδιονάση τύπου I (Type I deiodinase) η οποία απομακρύνει κατάλοιπα ιωδίου από την θέση 5' του μορίου της T4. Περίπου

το 85% της T3 στο αίμα παράγεται με αυτόν τον τρόπο (Choski et al. 2003). Μετά από πρωτεολυτική αποικοδόμηση της θυρεοσφαιρίνης, οι T3 και T4 ελευθερώνονται και εκκρίνονται στο αίμα και εν συνεχεία, δεσμεύονται από τη σφαιρίνη και την αλβουμίνη και μεταφέρονται στα κύτταρα και τα όργανα στόχους.

Η ρύθμιση της έκκρισης των θυρεοειδών ορμονών πραγματοποιείται μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης (negative – feedback) που περιλαμβάνει τον υποθάλαμο, την υπόφυση και τον θυρεοειδή αδένα. Η απελευθερωτική ορμόνη της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης ή θυρεοτροπίνης (TRH) παράγεται και εκκρίνεται από τον υποθάλαμο. Κατόπιν, μεταφέρεται μέσω των αξόνων και διεγείρει την έκκριση της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης ή θυρεοτροπίνης (TSH) από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Η TSH με τη σειρά της, διεγείρει την έκκριση των ορμονών T3 και T4 από τον θυρεοειδή αδένα. Τόσο η έκκριση της TRH όσο και η έκκριση της TSH ρυθμίζονται από τις συγκεντρώσεις των ορμονών T3 και T4 (Yen et al., 2001). Αν οι συγκεντρώσεις των ορμονών T3 και T4 στο αίμα είναι μεγαλύτερες του φυσιολογικού τότε αναστέλλεται η έκκριση των TRH και TSH. Αντίθετα, όταν οι συγκεντρώσεις των T3 και T4 είναι μειωμένες διεγείρεται η έκκριση των TRH και TSH (Choksi et al., 2003).



Εικόνα 2: Ρύθμιση της σύνθεσης των θυρεοειδών ορμονών (Choksi et al., 2003).

1.1.3. ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΚΑΙ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΕΙΕΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ

Όπως έχει ήδη τονιστεί, ο ρόλος των θυρεοειδών ορμονών είναι πολύ σημαντικός και για το λόγο αυτό η δράση τους ελέγχεται μέσω ενός αυστηρού μηχανισμού. Ωστόσο, είναι σχετικά συχνή η εμφάνιση διαταραχών του θυρεοειδούς αδένα, οι οποίες αφορούν στην υπολειτουργία (υποθυρεοειδισμός) ή στην υπερλειτουργία (υπερθυρεοειδισμός) του.

Ο υποθυρεοειδισμός, αποτελεί την πιο κοινή διαταραχή του θυρεοειδούς αδένα. Χαρακτηρίζεται από την υψηλή συγκέντρωση TSH και την μειωμένη συγκέντρωση των ορμονών T3 και T4 στο αίμα. Ανεπαρκή επίπεδα ιωδίου ή μειωμένη πρόσληψη ιωδίου αποτελούν τις κυριότερες αιτίες εμφάνισης του υποθυρεοειδισμού. Ένας τύπος υποθυρεοειδισμού αφορά στην θυρεοειδίτιδα Hashimoto η οποία αποτελεί μία αυτοάνοση πάθηση που προκαλείται λόγω της παραγωγής αυτοαντισωμάτων εναντίον των αυτοαντιγόνων του θυρεοειδούς (Choski et al., 2003).

Ο υπερθυρεοειδισμός χαρακτηρίζεται από την αυξημένη συγκέντρωση των ορμονών T3 και T4. Ο υπερθυρεοειδισμός μπορεί να είναι πρωτογενής, όπου παρατηρείται υπερπαραγωγή θυροξίνης-τριιωδιοθυρονίνης μετά από κάποιο, συνήθως, νεόπλασμα του θυρεοειδούς αδένα ή δευτερογενής με κύριο χαρακτηριστικό την υπερπαραγωγή TSH, από κάποιο συνήθως νεόπλασμα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης. Η πιο κοινή αιτία εμφάνισης του υπερθυρεοειδισμού είναι η ασθένεια Graves' στην οποία παράγονται αντισώματα τα οποία διεγείρουν την έκκριση των ορμονών του θυρεοειδούς αδένα (Choski et al., 2003).

Επιπροσθέτως, τα οζίδια ή οιδήματα (nodules) είναι εξογκώματα που μπορούν να παρεμποδίσουν τη φυσιολογική λειτουργία του θυρεοειδούς αδένα. Αυτά μπορεί να είναι είτε καλοήθη είτε κακοήθη. Στην περίπτωση κάποιας κακοήθειας μιλάμε για καρκίνο του θυρεοειδή. Οι περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου του θυρεοειδούς αδένα είναι ιάσιμες και αντιμετωπίζονται με χειρουργική εκτομή, ραδιενεργό ιώδιο ή το συνδυασμό αυτών. Η διαγνωστική θυρεοειδεκτομή πραγματοποιείται, ώστε να διαπιστωθεί αν ένας όζος είναι καλοήθης ή κακοήθης, ενώ η θεραπευτική επέμβαση πραγματοποιείται με σκοπό να μειωθούν οι πιθανότητες επανεμφάνισης και θνησιμότητας (Xing et al. 2013). Η θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο περιλαμβάνει μία ραδιενεργό μορφή ιωδίου (ιώδιο 131, I-131) το οποίο μεταφέρεται με την κυκλοφορία του αίματος στα κύτταρα του θυρεοειδούς αδένα. Μπορεί να προκαλέσει το θάνατο των κυττάρων του θυρεοειδή αδένα και μεταξύ αυτών και καρκινικών κυττάρων ενώ δεν έχει κάποια επίπτωση στον υπόλοιπο οργανισμό. Τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικής χημειοθεραπείας για όλους τους τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς είναι γενικώς απογοητευτικά γι'αυτό και η χρήση μοριακών δεικτών είναι ύψιστης σημασίας και αναμένεται να βελτιώσει την ακρίβεια της διάγνωσης και της πρόγνωσης του καρκίνου του

θυρεοειδούς καθώς και να επιτρέψει την εξατομικευμένη χειρουργική αντιμετώπιση των ασθενών (Nikiforov, 2011b). Ο καρκίνος του θυρεοειδούς, περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 1.2.

1.2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αποτελεί την πιο κοινή ενδοκρινική κακοήθεια και τα περιστατικά αυτού αυξάνονται σταθερά τα τελευταία χρόνια σε ολόκληρο τον κόσμο (Nikiforov, 2011b). Οι λόγοι που οδηγούν στα αυξημένα περιστατικά καρκίνου του θυρεοειδούς τα τελευταία χρόνια δεν είναι πλήρως κατανοητοί αλλά ο αυξημένος αριθμός δειγμάτων στις μελέτες, ο επιτυχημένος διαγνωστικός έλεγχος καθώς και περιβαλλοντικοί παράγοντες (π.χ ακτινοβολία, πρόσληψη ιωδίου) μπορούν να θεωρηθούν πιθανοί λόγοι για την αυξημένη εμφάνιση τέτοιων περιστατικών (Liebner & Shah, 2011).

Τα ποσοστά επιτυχημένης αντιμετώπισης του καρκίνου του θυρεοειδούς είναι πολύ υψηλά και κατά συνέπεια, τα ποσοστά θνησιμότητας είναι μειωμένα. Σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (National Cancer Institute) των ΗΠΑ, ο καρκίνος του θυρεοειδούς αποτελεί το 3,8% των συνολικών τύπων καρκίνου με ποσοστό θνησιμότητας 0,3%. Περίπου το 1,1% των ανθρώπων θα διαγνωστούν με καρκίνο του θυρεοειδούς κάποια στιγμή στη ζωή τους. Ωστόσο, το 97,9% όλων των περιπτώσεων επιβιώνουν 5 ή και παραπάνω χρόνια μετά τη διάγνωσή του (SEER Cancer Stat Fact Statistics, 2015, <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>). Ωστόσο, το ποσοστό αυτό μειώνεται στο 56% για τους ασθενείς που βρίσκονται σε μεταστατικό στάδιο (Nikiforov et al., 2013). Ο καρκίνος του θυρεοειδούς προσβάλλει όλες τις ηλικίες αν και είναι σπάνιος στα παιδιά. Η μέση ηλικία εμφάνισής του είναι γύρω στα 50 ενώ παρατηρείται πιο συχνά στις γυναίκες απ'ότι στους άντρες.

Παρά το γεγονός ότι ο καρκίνος του θυρεοειδούς είναι σχετικά σπάνιος, εμφανίζει μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών μορφολογικών χαρακτηριστικών και διαφορετικής βιολογικής συμπεριφοράς και γι'αυτό έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Ειδικά τα τελευταία χρόνια παρουσιάζουν ενδιαφέρον οι διαταραχές και οι μεταλλάξεις σε μοριακό επίπεδο που οδηγούν στην εμφάνιση του καρκίνου του θυρεοειδούς (Scora, 2004).

1.2.1. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Έχουν ταυτοποιηθεί διάφοροι ιστολογικοί τύποι και υπότυποι με διαφορετική κυτταρική προέλευση, διαφορετικά χαρακτηριστικά και πρόγνωση (Xing, 2013). Ο καρκίνος του θυρεοειδούς μπορεί να προέρχεται είτε από τους δύο διαφορετικούς τύπους κυττάρων του θυρεοειδούς αδένα είτε από μη επιθηλιακά στοιχεία του στρώματος (Scora, 2004).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο θυρεοειδής αδένας αποτελείται από τα θυλακιώδη κύτταρα (έκκριση των ορμονών T3 και T4) και τα παραθυλακιώδη ή C κύτταρα (έκκριση της καλσιτονίνης). Οι περισσότεροι τύποι καρκίνου προέρχονται από τα θυρεοειδή θυλακιώδη κύτταρα δηλαδή, είναι επιθηλιακοί όγκοι. Αυτοί περιλαμβάνουν: α) τον *Θηλώδη* καρκίνο του θυρεοειδούς (papillary thyroid cancer, PTC), β) τον *Θυλακιώδη* καρκίνο του θυρεοειδούς (follicular thyroid cancer, FTC), γ) τον *χαμηλής διαφοροποίησης* καρκίνο του θυρεοειδούς (poorly differentiated thyroid cancer, PDTC) και δ) τον *αναπλαστικό* καρκίνο του θυρεοειδούς (anaplastic thyroid cancer, ATC). Οι τύποι αυτοί αποτελούν την πλειοψηφία (πάνω από το 95%) όλων των περιπτώσεων θυρεοειδών κακοηθειών. Ο θηλώδης και ο θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς ταξινομούνται ως διαφοροποιημένοι τύποι καρκίνου (differentiated thyroid cancer, DTC).

Από τα παραθυλακιώδη κύτταρα προέρχεται ο *μυελοειδής* καρκίνος του θυρεοειδούς (medullary thyroid cancer, MTC) ο οποίος αποτελεί ένα μικρό ποσοστό (~3%) των συνολικών περιπτώσεων του καρκίνου του θυρεοειδούς (Xing, 2013).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) οι όγκοι του θυρεοειδούς αδένος μπορούν να διαχωριστούν ως πρωτοπαθείς ή μεταστατικοί. Οι πρωτοπαθείς όγκοι μπορεί να είναι επιθηλιακοί ή μη επιθηλιακοί, καλοήθεις ή κακοήθεις. Τα λεμφώματα και τα μη ταξινομημένα νεοπλασμάτα ανήκουν σε ξεχωριστή κατηγορία. Μια μικρή διαφοροποίηση στην ταξινόμηση των όγκων του θυρεοειδούς έχει πραγματοποιηθεί από το Ινστιτούτο Παθολογίας των Ένοπλων Δυνάμεων (Armed Forces Institute of Pathology, AFIP) όπου δίνεται μεγαλύτερη βάση στην κυτταρική προέλευση του όγκου και συγκεκριμένοι τύποι του θυρεοειδούς καρκίνου αναφέρονται ως υπότυποι ή αλλιώς, «παραλλαγές». Στους Πίνακες 1 και 2 παρουσιάζονται οι παραπάνω δύο διαφορετικές ταξινομήσεις σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και με το Ινστιτούτο Παθολογίας των Ένοπλων Δυνάμεων.

Πίνακας 1: Ιστολογική ταξινόμηση σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) (Scora, 2004).

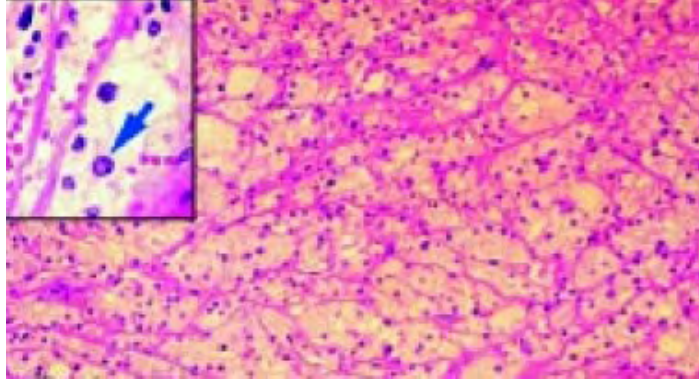
ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΟΓΚΟΙ	ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ
Επιθηλιακοί	A. Καλοήθεις (Θυλακιώδες αδένωμα, άλλοι) B. Κακοήθεις (PTC, FTC, MTC, ATC, άλλοι)
Μη επιθηλιακοί (καλοήθεις ή κακοήθεις)	
Κακοήθη λεμφώματα	
Διάφοροι όγκοι	
Δευτερογενείς όγκοι	
Μη ταξινομημένοι όγκοι	
Βλάβες όμοιες με όγκους (tumor-like lesions)	

Πίνακας 2: Ιστολογική ταξινόμηση σύμφωνα με το Ινστιτούτο Παθολογίας των Ένοπλων Δυνάμεων (AFIP) (Scora, 2004).

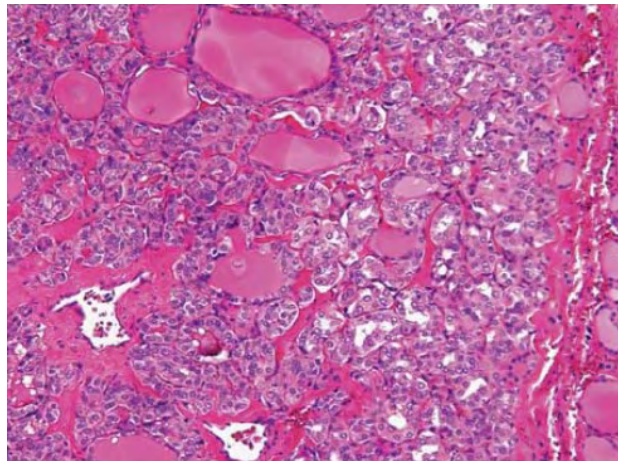
ΤΥΠΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ	
I. Πρωτοπαθείς	
1. <i>Επιθηλιακοί όγκοι</i>	
α) Όγκοι που προέρχονται από θυλακιώδη κύτταρα	Καλοήθη (Θυλακιώδες αδένωμα) Κακοήθη (FTC, PTC, ATC, χαμηλής διαφοροποίησης)
β) Όγκοι που προέρχονται από παραθυλακιώδη κύτταρα	MTC, άλλοι
γ) Όγκοι που προέρχονται τόσο από θυλακιώδη όσο και από παραθυλακιώδη κύτταρα	Μίξη FTC και MTC
2. <i>Σαρκώματα</i>	
3. <i>Κακοήθη λεμφώματα</i>	
4. <i>Διάφορα νεοπλάσματα</i>	
II. Δευτεροπαθείς	
III. Βλάβες όμοιες με όγκους (tumor-like lesions)	

Ο Θηλώδης καρκίνος (PTC) αποτελεί τον πιο κοινό τύπο καρκίνου του θυρεοειδούς. Απαντάται στο 80% των περιπτώσεων και, όπως αναφέρθηκε, προέρχεται από τα θυλακιώδη κύτταρα. Χαρακτηρίζεται από υψηλής διαφοροποίησης κύτταρα με θηλώδη αρχιτεκτονική και χαρακτηριστικά που περιλαμβάνουν το οβάλ, επιμηκυμένο σχήμα του πυρήνα καθώς και αυλακώσεις. Ο θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς περιλαμβάνει πολλούς διαφορετικούς υπότυπους, με διαφορετικά

ιστοπαθολογικά πρότυπα ανάπτυξης το καθένα και με κυριότερο, τον θυλακιώδη υπότυπο του θηλώδους καρκίνου (FVPTC). Η θεραπεία του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς πραγματοποιείται κυρίως με χειρουργική εκτομή, καταστολή της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSH) με λεβοθυροξίνη (levothyroxine), ραδιενεργό ιώδιο, εξωτερική ακτινοβολία ή συνδυασμό των παραπάνω. Σε γενικές γραμμές, ο τύπος αυτός έχει πολύ καλή πρόγνωση και υψηλά ποσοστά επιβίωσης (Xing, 2013).



Εικόνα 3: Θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς (Scora, 2004)

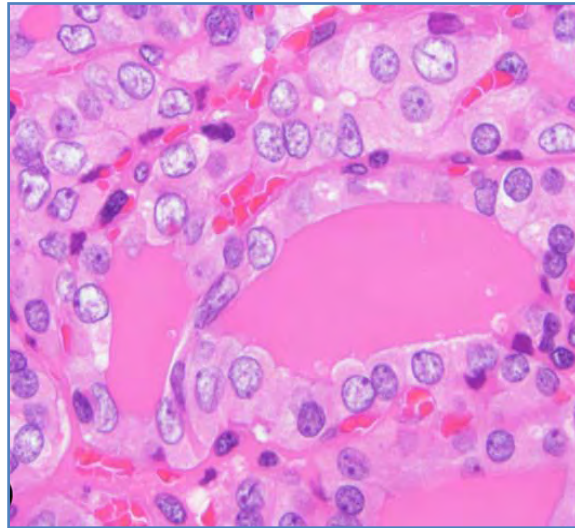


Εικόνα 4: Θυλακιώδης υπότυπος του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς (Nikiforov, 2011a)

Ο Θυλακιώδης καρκίνος (FTC) προέρχεται από τα θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς και αποτελεί το 10-15% των περιπτώσεων καρκίνου. Χαρακτηρίζεται από διαφοροποιημένα κύτταρα όμως στερείται τα διαγνωστικά πυρηνικά χαρακτηριστικά που παρατηρούνται στην θηλώδη τύπο καρκίνου. Η θεραπεία του βασίζεται στην χειρουργική εκτομή, την καταστολή της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSH) με λεβοθυροξίνη (levothyroxine), τη θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο ή την εξωτερική ακτινοβολία όπως και στην περίπτωση του θηλώδους τύπου. Αυτό το είδος καρκίνου εμφανίζει επιθετικό χαρακτήρα καθώς δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις μετάστασης στα αγγεία.

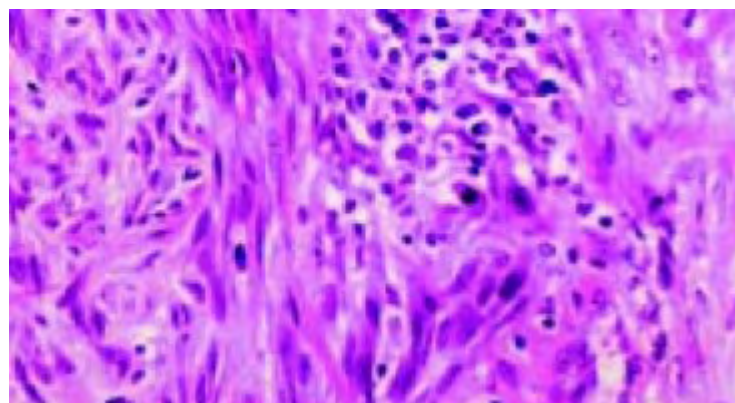
Ο Hürthle cell θυρεοειδής καρκίνος αποτελεί υπότυπο του θυλακιώδους καρκίνου του θυρεοειδούς και εμφανίζεται σε ποσοστό 1-2% των συνολικών τύπων.

Χαρακτηρίζονται από μεγάλα και πλούσια σε μιτοχόνδρια κύτταρα, με υψηλή πιθανότητα μετάστασης και μικρή προγνωστική ικανότητα (Xing, 2013).



Εικόνα 5: Θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς (Radakay et al. 2014).

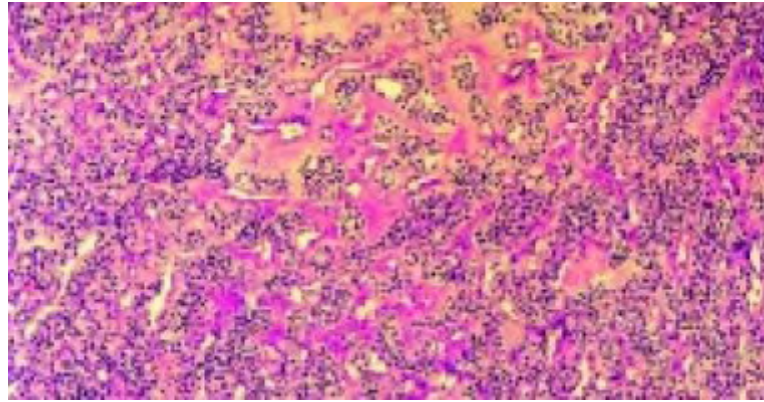
Ο Αναπλαστικός καρκίνος (ATC) αποτελεί το 2-3% των περιπτώσεων και προέρχεται από τα θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς αδένος. Αποτελείται από μη διαφοροποιημένα, πλειομορφικά και μεγάλα σε μέγεθος κύτταρα. Πρόκειται για έναν από τους πιο επιθετικούς και θανάσιμους τύπους καρκίνου. Μπορεί να δημιουργηθεί είτε de novo είτε από κύτταρα PTC, FTC ή PDTC που από-διαφοροποιούνται. Η θεραπεία με χειρουργική εκτομή, χημειοθεραπεία ή ραδιενεργό ιώδιο δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική λόγω της επιθετικής φύσης του καρκίνου και λίγες περιπτώσεις είναι πλήρως θεραπεύσιμες (Xing, 2013).



Εικόνα 6: Αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς (Scopa, 2004).

Ο Μυελοειδής καρκίνος (MTC) αποτελεί το 1-2% των περιπτώσεων καρκίνου του θυρεοειδούς και προέρχεται από τα παραθυλακιώδη κύτταρα ή C cells. Χαρακτηρίζεται από επιθετικότητα και υψηλή πιθανότητα μετάστασης στο λεμφικό

ιστό ενώ ακόμα, εμφανίζει κάποια κληρονομική βάση. Καθώς ο τύπος MTC είναι εγγενώς ιώδιο-ανθεκτικός, η θεραπεία του βασίζεται σε χειρουργική εκτομή με ή χωρίς επικουρική θεραπεία με εξωτερική ακτινοβολία (Liebner & Shah, 2011).



Εικόνα 7: Μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς (Scopa, 2004).

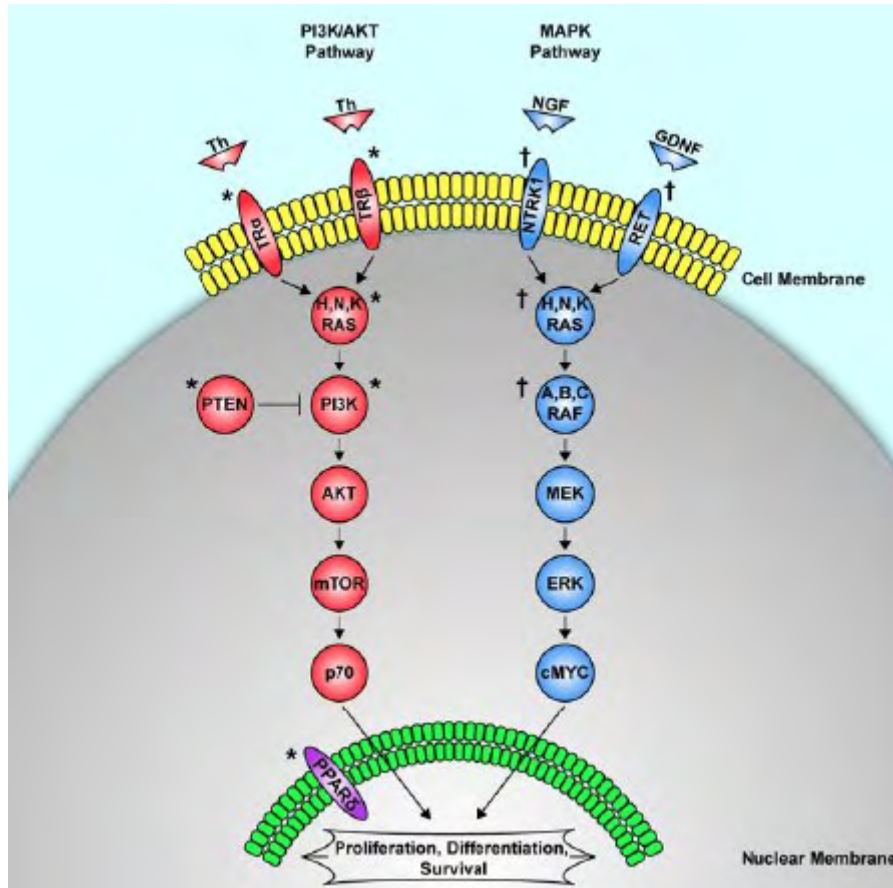
1.2.2. ΜΟΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΩΝ MAP ΚΙΝΑΣΩΝ (Mitogenic activated protein kinases cascade)

Το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP κινασών έχει καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση της λειτουργίας των κυττάρων, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την ογκογένεση. Το συγκεκριμένο μονοπάτι έχει μελετηθεί διεξοδικά και μεταλλάξεις σε κάποια από τα μόρια που συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτό έχουν συνδεθεί με την καρκινογένεση. Το μονοπάτι των MAP κινασών συμπεριλαμβάνει ένα μεγάλο εύρος δεύτερων διαβιβαστών οι οποίοι με τη σειρά τους ρυθμίζουν τις λειτουργίες και τη συμπεριφορά του κυττάρου (Xing, 2013).

Στα φυσιολογικά κύτταρα το σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποιείται με τη δράση μιτογόνων παραγόντων (ως μιτογόνοι παράγοντες ορίζονται αυτοί που προωθούν την κυτταρική διαίρεση) οι οποίοι συνδέονται με έναν ειδικό υποδοχέα EGFR στη μεμβράνη του κυττάρου. Ο μεμβρανικός υποδοχέας, μετά τη σύνδεση του μιτογόνου παράγοντα αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες RAS, αλλάζει διαμόρφωση και ενεργοποιείται με αποτέλεσμα την απομάκρυνση GDP και την ανταλλαγή του με GTP. Ο τερματισμός της δράσης της RAS πρωτεΐνης προϋποθέτει την υδρόλυση του GTP σε GDP. Μεταλλάξεις στους μιτογόνους παράγοντες προκαλούν επιπλοκές στο σηματοδοτικό μονοπάτι (Miller & Miller, 2012).

Αφού ενεργοποιηθούν οι μεμβρανικοί υποδοχείς από τον προσδέτη, μεταδίδουν το μήνυμα στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω πολλαπλών μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Δύο είναι τα κύρια ενδοκυτταρικά μονοπάτια που μπορούν να ενεργοποιηθούν από τον υποδοχέα, αυτό των MAP κινασών και το μονοπάτι PI3K/AKT.

Το κάθε μονοπάτι των MAP κινάσων περιλαμβάνει τουλάχιστον τρεις διαφορετικές πρωτεϊνικές κινάσες οι οποίες φωσφορυλιώνουν η μία την άλλη οδηγώντας τελικά στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την κυτταρική προσκόλληση και την απόπτωση (Miller & Miller, 2012).



Εικόνα 8: Το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP κανασών. Δεξιά απεικονίζεται το κλασσικό μονοπάτι των MAP κινάσων το οποίο ενεργοποιείται από έναν εξωκυττάριο μιτογόνο παράγοντα όταν αυτός προσδεθεί στον υποδοχέα ενώ αριστερά απεικονίζεται το μονοπάτι PI3K/AKT (Grogan et al. 2010).

1.2.3. ΓΟΝΙΔΙΑ RAS

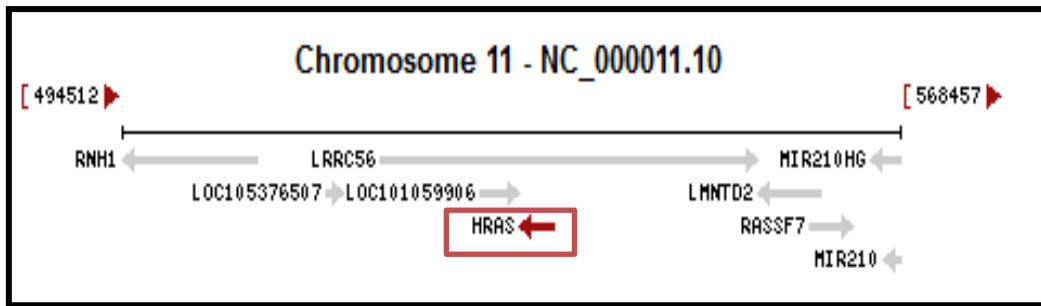
Η οικογένεια των ομόλογων γονιδίων RAS (rat sarcoma viral oncogenes) αποτελείται από τρεις μικρές G πρωτεΐνες (HRAS, KRAS, NRAS) μεγέθους 21-kDa οι οποίες βρίσκονται στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και παίζουν κεντρικό ρόλο στην μετάδοση μηνυμάτων από υποδοχείς κινάσης τυροσίνης και υποδοχείς συνδεδεμένους με G πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη KRAS απαντάται σε δύο ισομορφές (Kras4A και Kras4B) οι οποίες είναι αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου. Μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12, 13 ή 61 των παραπάνω γονιδίων καταλήγουν σε συνεχή ενεργοποίηση του μονοπατιού μεταγωγής σήματος και την

εμφάνιση διάφορων δυσλειτουργιών στο κύτταρο ή καρκίνο (Nikiforova et al., 2003).

Καθώς οι πρωτεΐνες RAS βρίσκονται στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης του κυττάρου, δέχονται τα εξωτερικά ερεθίσματα μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τους υποδοχείς και επάγουν έναν μονοπάτι μεταγωγής σήματος στο οποίο συμμετέχουν πολλοί δεύτεροι διαβιβαστές ενεργοποιώντας έναν καταρράκτη παράλληλων φωσφορυλίσεων που καταλήγει τελικά στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων. Τα μονοπάτια που μπορούν να ενεργοποιηθούν από τη δράση των RAS πρωτεϊνών είναι το μονοπάτι των MAP κινασών, το μονοπάτι PI3K/AKT καθώς και το μονοπάτι RAL-GDS τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην κυτταρική επιβίωση, την κυτταρική προσκόλληση και τον κυτταρικό θάνατο (Miller & Miller, 2012).

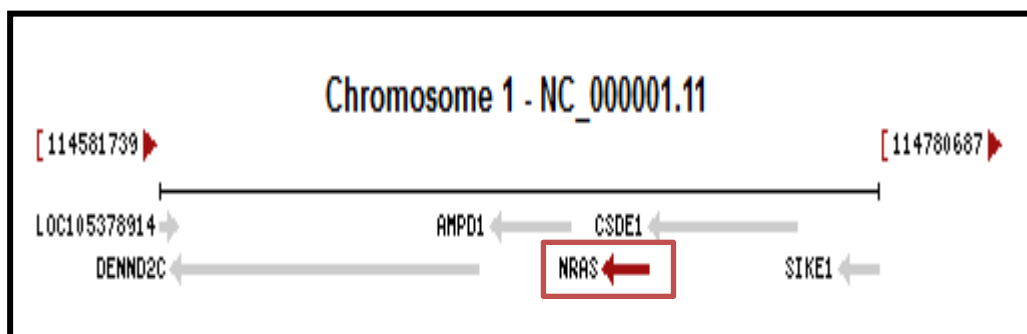
Κάθε μία από τρεις ισομορφές των RAS πρωτεϊνών συμμετέχει με διαφορετικό τρόπο στη ρύθμιση και την ενεργοποίηση των δεύτερων διαβιβαστών. Η διαφορική αυτή δράση μπορεί να οφείλεται στον τρόπο μετακίνησης της κάθε ισομορφής των RAS πρωτεϊνών στην πλασματική μεμβράνη ή στην διαφορετική θέση που κατέχει η κάθε ισομορφή σε αυτήν (Miller & Miller, 2012). Παρόλα αυτά, η κάθε ισομορφή φέρει ομολογία σε αλληλουχίες που είναι υπεύθυνες για την ανταλλαγή GDP/GTP και τη λειτουργία της GTPάσης. Έτσι, επιτυγχάνεται η ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών με τον τρόπο που αναλύθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο.

Το γονίδιο HRAS (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog) ανήκει στην οικογένεια των RAS ογκογονιδίων των οποίων τα μέλη σχετίζονται με τα μετασχηματισμένα γονίδια των ρετροϊών σαρκώματος θηλαστικών. Στον άνθρωπο, το γονίδιο HRAS εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11, στη θέση 11p15.5 και αποτελείται από 7 εξόνια. Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια αυτά μπορούν να δεσμεύσουν GTP και GDP και έχουν μια εγγενή δράση GTPάσης. Η πρωτεΐνη αυτή υπόκειται σε έναν διαρκή κύκλο από- και επανα- παλμιτοϋλίωσης η οποία ρυθμίζει την γρήγορη ανταλλαγή της πρωτεΐνης μεταξύ της πλασματικής μεμβράνης και του συμπλέγματος Golgi. Μεταλλάξεις στο γονίδιο HRAS προκαλούν την εμφάνιση του συνδρόμου Costello, καθώς επίσης μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό είναι συνδεδεμένες με ένα εύρος τύπων καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, του θυλακιώδη καρκίνου του θυρεοειδούς (FTC) και του καρκίνου του στόματος. Έχουν βρεθεί πολλαπλά αντίγραφα του συγκεκριμένου γονιδίου που κωδικοποιούν διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης (NCBI, 2015, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3265>).



Εικόνα 9: Χρωμοσωμική θέση του γονιδίου HRAS (NCBI, 2015, Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3265>).

Το γονίδιο NRAS [neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog] πρόκειται για ένα N-ras ογκογονίδιο που κωδικοποιεί για μία μεμβρανική πρωτεΐνη η οποία μετακινείται μεταξύ της πλασματικής μεμβράνης και του συμπλέγματος Golgi. Η μετακίνηση αυτή ρυθμίζεται μέσω παλμιτουλίωσης και από-παλμιτουλίωσης από το σύμπλοκο ZDHHC9-GOLGA7. Η κωδικοποιούμενη πρωτεΐνη, που έχει εγγενή δράση GTRάσης, ενεργοποιείται από έναν παράγοντα ανταλλαγής G νουκλεοτιδίων και αδρανοποιείται από μία GTPάση. Μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση καρκίνου του ορθού, θυλακιδώδους καρκίνου του θυρεοειδούς (FTC), παιδικής μυελομονοκυτταρικής λευχαιμίας, συνδρόμου Noonan καθώς και κάποιες αυτοάνοσες παθήσεις. Στον άνθρωπο, το γονίδιο NRAS εδράζεται στο χρωμόσωμα 1 στη θέση 1p13.2 και αποτελείται από 7 εξόνια (NCBI, 2015, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4893>).



Εικόνα 10: Χρωμοσωμική θέση του γονιδίου NRAS (NCBI, 2015, Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4893>).

1.2.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

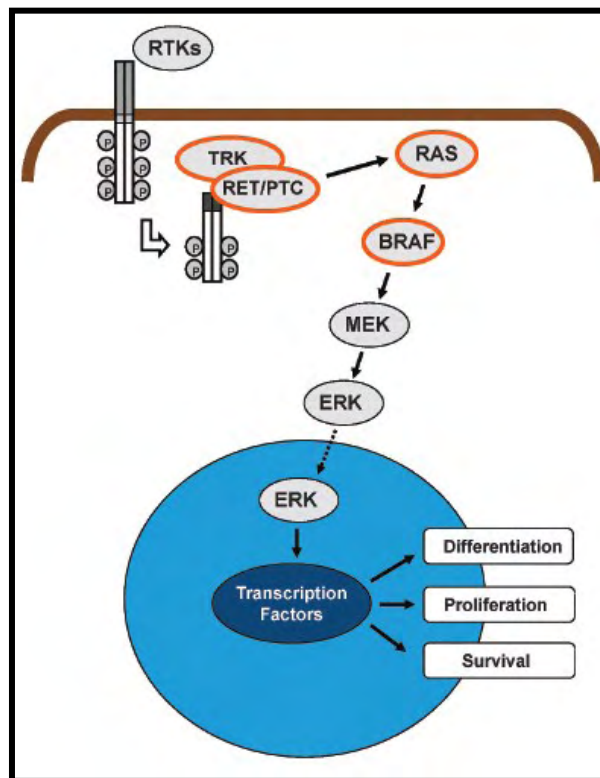
Η μοριακή διάγνωση του καρκίνου του θυρεοειδούς έχει σημειώσει μεγάλη πρόοδο τα τελευταία χρόνια. Παρόλο που ο καρκίνος του θυρεοειδούς έχει γενικά καλή πρόγνωση, τυχόν μεταστάσεις μπορεί να αποβούν μοιραίες για την ζωή. Για τον λόγο αυτό απαιτείται μία έγκαιρη πρόγνωση του καρκίνου του θυρεοειδούς σε ασθενείς που παρουσιάζουν όζους (nodules) (Fallahi et al, 2014).

Η παρουσία των όζων είναι η πρώτη κλινική εικόνα που μπορεί να εμφανίσει ο καρκίνος του θυρεοειδούς παρόλο που ένα μικρό μόνο ποσοστό των όζων αυτών είναι κακοήθη. Η κύρια μέθοδος διάγνωσης του καρκίνου του θυρεοειδούς είναι μέσω της κυτταρολογικής εξέτασης παρακέντησης με λεπτή βελόνη (fine-needle aspiration cytology, FNAC) κατά την οποία συλλέγονται κύτταρα για κυτταρολογική εξέταση. Η FNAC αποτελεί στις μέρες μας το πιο έμπιστο διαγνωστικό εργαλείο για την αξιολόγηση των θυρεοειδών όζων. Στις περισσότερες περιπτώσεις παρέχει μία ξεκάθαρη εικόνα της καλοήθειας ή της κακοήθειας του όγκου. Ωστόσο, στο 20-30% των περιπτώσεων η κυτταρολογική εξέταση παρακέντησης με λεπτή βελόνη δεν μπορεί να διασαφηνίσει την φύση του όγκου και οι περιπτώσεις αυτές χαρακτηρίζονται ως «ακαθόριστες ως προς την κακοήθεια» (Nikiforov & Nikiforova, 2013). Παρά την επιτυχία διάγνωσης του θηλώδους, του μυελοειδούς και του αναπλαστικού τύπου καρκίνου θυρεοειδούς, δεν είναι εύκολη η ταυτοποίηση της καλοήθους ή κακοήθους φύσης του θυλακιδώδους τύπου (Grogan et al. 2010). Λόγω αυτής της αδυναμίας καθορισμού της φύσης του όγκου πολλοί ασθενείς υπόκεινται σε χειρουργική επέμβαση, παρόλο που μόνο ένα 8-17% των χειρουργικά αφαιρούμενων όζων είναι στην πραγματικότητα κακοήθη. Επιπροσθέτως, ασθενείς οι οποίοι διαγνώστηκαν με κακοήθη όγκο δεν θεραπεύονται πλήρως με την χειρουργική αφαίρεση των λοβών του θυρεοειδή αλλά απαιτείται στη συνέχεια θυρεοειδεκτομή για την ολοκλήρωση της θεραπείας (Nikiforov, 2011b).

Η μοριακή διάγνωση του καρκίνου του θυρεοειδούς αυξάνει την ακρίβεια της κυτταρολογικής διάγνωσης των θυρεοειδών όζων. Η μέθοδος αυτή εμφανίζει το πλεονέκτημα πως δεν απαιτείται η χειρουργική επέμβαση σε περιπτώσεις όπου ήταν δύσκολη η διάγνωση του όγκου με τη μέθοδο της κυτταρολογικής εξέτασης παρακέντησης με λεπτή βελόνη ενώ σε περιπτώσεις που έχει διαπιστωθεί η κακοήθης φύση του όγκου μπορεί να προσδιοριστεί εξαρχής η χειρουργική στρατηγική αντιμετώπισής του (Miccoli, 2014).

Η μοριακή διάγνωση βασίζεται σε μοριακούς βιοδείκτες του θυρεοειδούς καρκίνου. Οι βιοδείκτες χρησιμεύουν τόσο στην ανίχνευση του θυρεοειδούς καρκίνου έγκαιρα όσο και στην αξιολόγηση της θεραπείας αυτού έπειτα από χειρουργική εκτομή, θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο ή χημειοθεραπεία (Grogan et al. 2010). Η πιο κοινή μετάλλαξη που λαμβάνει χώρα στις περιπτώσεις καρκίνου του θυρεοειδούς είναι η μετάλλαξη στο γονίδιο BRAF (μετάλλαξη V600E). Ωστόσο, μεταλλάξεις στα γονίδια RAS καθώς και αναδιατάξεις RET/PTC και PAX8/PPAR γ είναι συνήθεις υπαίτιοι για την εμφάνιση του καρκίνου. Το μεγαλύτερο δυνατό αποτέλεσμα δίνεται με την ταυτόχρονη ανίχνευση των παραπάνω μεταλλάξεων σε δείγματα FNA. Η μέθοδος αυτή αποδείχτηκε αποτελεσματική σε περιπτώσεις όπου ήταν αδιευκρίνιστη η φύση του όγκου και μάλιστα εμφάνισε πολύ μεγάλο ποσοστό ακρίβειας και μείωσε τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε σχέση με τη μέθοδο FNAC (Nikiforov, 2011).

Συνοψίζοντας, η ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο BRAF (μετάλλαξη V600E) και στα κωδικόνια 12, 13 και 61 των γονιδίων RAS (HRAS, KRAS, NRAS) καθώς και η ανίχνευση αναδιατάξεων RET/PTC και PAX8/PPAR γ συμπληρώνουν την κυτταρολογική εξέταση και μπορούν να βελτιώσουν αισθητά την πρόγνωση του καρκίνου του θυρεοειδούς. Είναι σημαντικό να τονιστεί πως οι μεταλλάξεις είναι αμοιβαία αποκλειόμενες (Nikiforov, 2011b). Μεταλλάξεις του γονιδίου BRAF εντοπίζονται σε ποσοστό περίπου 40-50% στο θηλώδη τύπο καρκίνου (Miccoli, 2014), μεταλλάξεις στα γονίδια RAS εντοπίζονται κυρίως στο θηλώδη και στον θυλακιώδη τύπο, οι αναδιατάξεις RET/PTC είναι κυρίως υπεύθυνες για την εμφάνιση του μυελοειδούς τύπου (Grogan et al. 2010) ενώ τέλος, οι αναδιατάξεις PAX8/PPAR γ συναντώνται κυρίως στον θυλακιώδη τύπο καρκίνου (Nikiforova et al. 2003).



Εικόνα 11: Όλες οι μεταλλάξεις που μπορούν να οδηγήσουν σε εμφάνιση του καρκίνου του θυρεοειδούς (Nikiforov, 2011b)

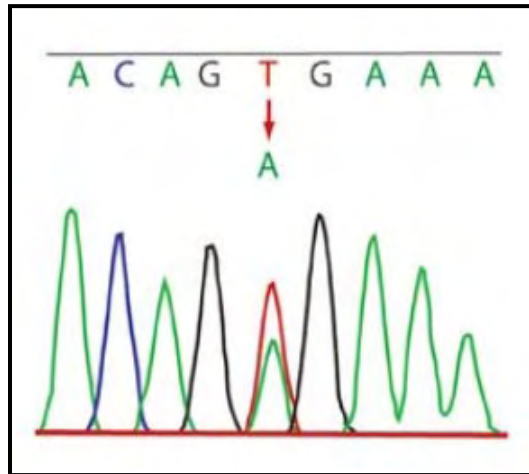
1.2.4.1. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ BRAF

Η πρωτεΐνη BRAF είναι μία κινάση σερίνης/θρεονίνης που ανήκει στην οικογένεια των RAF πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι ενδοκυτταρικοί τελεστές του μονοπατιού των MAP κινάσων. Η ενεργοποίησή τους πραγματοποιείται έπειτα από σύνδεση της RAS πρωτεΐνης και στρατολόγηση της πρωτεΐνης BRAF στην πλασματική μεμβράνη. Αφού ενεργοποιηθεί, η πρωτεΐνη BRAF διεγείρει το

μονοπάτι φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης των MAP κινασών (Εικόνα 11). Με τον τρόπο αυτό ελέγχει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF έχουν σαν αποτέλεσμα την συνεχή φωσφορυλίωση της MEK κινάσης και κατ'επέκταση, την ενεργοποίηση ολόκληρου του καταρράκτη των MAP κινασών (Fallahi et al. 2014). Η πιο κοινή μετάλλαξη που παρατηρείται αφορά το νουκλεοτίδιο 1799 όπου γίνεται αντικατάσταση της θυμίνης από αδενίνη και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση της βαλίνης σε γλουταμινικό οξύ στο κατάλοιπο 600 (V600E) (Nikiforov, 2011a). Η παραπάνω μετάλλαξη αποτελεί την πιο κοινή γενετική αλλαγή που εντοπίζεται σε θηλώδη τύπο καρκίνου του θυρεοειδούς σε ποσοστό 40-45% (Nikiforov, 2011b). Παρόλα αυτά, η μετάλλαξη V600E εντοπίζεται και σε άλλους τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς, κυρίως σε υπότυπους του θηλώδους τύπου (tall-cell variant of papillary thyroid cancer) και σε ελάχιστα διαφοροποιημένα ή μη διαφοροποιημένα καρκινώματα θηλώδους προέλευσης. Ωστόσο, σπάνια έχει εντοπιστεί η παραπάνω μετάλλαξη σε θυλακιώδη τύπο καρκίνου του θυρεοειδούς (Grogan et al. 2010). Λόγω της παραπάνω ιδιότητάς του, το γονίδιο BRAF αποτελεί έναν άριστο δείκτη καθώς εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στον θηλώδη τύπο καρκίνου του θυρεοειδούς και σε σχετικούς υπότυπους. Με τον τρόπο αυτό αυξάνει την αξιοπιστία της κυτταρολογικής διάγνωσης μέσω κυτταρολογικής εξέτασης παρακέντησης με λεπτή βελόνη (Fallahi et al. 2014).

Λιγότερο συχνή είναι η μετάλλαξη K601E στο γονίδιο BRAF και εντοπίζεται κυρίως στον θυλακιώδη υπότυπο του θηλώδους τύπου καρκίνου του θυρεοειδούς (Nikiforov, 2011a) ενώ άλλες μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF αφορούν μικρές προσθήκες ή ελλείψεις γύρω από το κωδικόνιο 600 και την αναδιάταξη AKAP9/BRAF που είναι πιο κοινή σε θηλώδη τύπο καρκίνου που έχει εκτεθεί σε ακτινοβολία (Nikiforov, 2011b).



Εικόνα 12: Μετάλλαξη BRAF V600E. Χρωματογράφημα στο οποίο απεικονίζεται η αντικατάσταση της θυμίνης από αδενίνη στο νουκλεοτίδιο 1799 που οδηγεί στην αντικατάσταση της βαλίνης από το γλουταμινικό οξύ στο κατάλοιπο 600 (Nikiforov, 2011a).

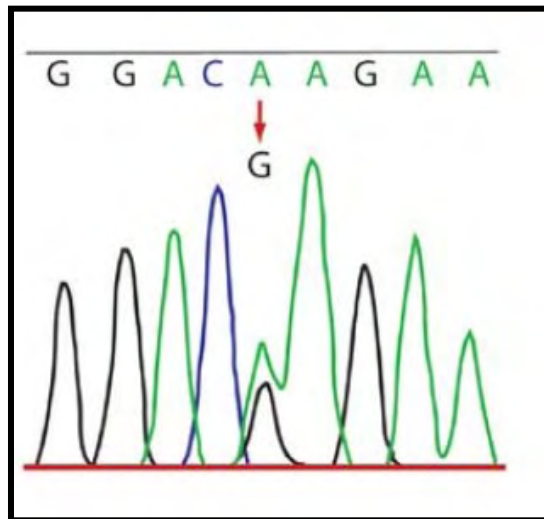
1.2.4.2. ΜΕΤΑΜΟΡΦΩΣΕΙΣ RAS

Η οικογένεια των γονιδίων RAS περιλαμβάνει τα γονίδια HRAS, NRAS και KRAS και η λειτουργία των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από αυτά έχει ήδη αναλυθεί. Μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12, 13 ή 61 των γονιδίων αυτών οδηγούν σε διαταραχή της λειτουργίας του μονοπατιού των MAP κινασών. Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 ή 13 αυξάνουν την συγγένεια των πρωτεϊνών προς το GTP ενώ μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 61 απενεργοποιούν την εγγενή δραστηριότητα GTPάσης (Nikiforov, 2011a).

Περισσότεροι από το 30% των ανθρώπινων καρκίνων θεωρείται πως οφείλονται σε μεταλλάξεις στα γονίδια RAS. Ενώ στους περισσότερους τύπους καρκίνου κυριαρχούν οι μεταλλάξεις KRAS (κωδικόνια 12 και 13), όσον αφορά τον καρκίνο του θυρεοειδούς, οι μεταλλάξεις RAS που εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα είναι οι μεταλλάξεις NRAS και HRAS (και κυρίως οι μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 61) και ακολουθούν τέλος οι μεταλλάξεις KRAS (Nikiforov, 2011a).

Οι μεταλλάξεις στα γονίδια RAS θεωρούνται καλοί δείκτες του θυλακιώδους τύπου καρκίνου του θυρεοειδή καθώς απαντώνται σε ποσοστό 40-50% στον συγκεκριμένο τύπο. Η μεγάλη συχνότητα εμφάνισής τους στον τύπο αυτό βοηθάει στην καλύτερη πρόγνωση σε συνδυασμό βέβαια με την κυτταρολογική εξέταση FNA. Ο θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς είναι ο πιο δύσκολα ανιχνεύσιμος καρκίνος του θυρεοειδούς μέσω της FNAC και συνεπώς, η ανίχνευση RAS μεταλλάξεων βοηθάει στην διάγνυσή του (Fallahi et al. 2014). Μεταλλάξεις RAS εντοπίζονται σε ποσοστό 20-40% σε θυλακιώδη αδενώματα και σε μικρό μόνο ποσοστό σε θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς (Nikiforov, 2011b). Οι περιπτώσεις θηλώδους καρκίνου στις οποίες έχουν ανιχνευτεί μεταλλάξεις RAS αφορούν κυρίως τον θυλακιώδη υπότυπο του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς (Nikiforov, 2011a).

Πολλές μελέτες (Karga et al. 1991, Hara et al. 1994, Basolo et al. 2000) έχουν δείξει ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της μετάλλαξης RAS και του μεταστατικού χαρακτήρα του όγκου. Είναι πιθανό, οι μεταλλάξεις RAS να σηματοδοτούν ένα σύνολο άκρως επιθετικών και καλά διαφοροποιημένων καρκινωμάτων τα οποία έχουν την τάση να προκαλούν μετάσταση και να απο-διαφοροποιούνται (Nikiforov, 2011b). Αυτό εξηγεί το γεγονός πως έχουν ανιχνευτεί μεταλλάξεις RAS σε χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα καθώς και σε αναπλαστικά καρκινώματα (Xing, 2013). Παρόλο που οι μεταλλάξεις των γονιδίων RAS δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί δείκτες σε όλους τους τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς, είναι σημαντικές στην ταυτοποίηση του θυλακιδώδους υπότυπου του θηλώδους καρκινώματος, που είναι δύσκολο να ταυτοποιηθεί μετά από την κυτταρολογική εξέταση FNA (Nikiforov, 2011b).



Εικόνα 13: Μετάλλαξη NRAS στο κωδικόνιο 61. Χρωματογράφημα στο οποίο απεικονίζεται η αντικατάσταση της αδενίνης από γουανίνη που οδηγεί στη μετάλλαξη CAA → CGA (Nikiforov, 2011a).

1.2.4.3. ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΕΙΣ RET/PTC

Το πρωτο-ογκογονίδιο RET κωδικοποιεί έναν μεμβρανικό υποδοχέα κινάσης τυροσίνης και εκφράζεται στα παραθυλακιδώδη κύτταρα του θυρεοειδούς αδένος ενώ απουσιάζει από τα θυλακιδώδη. Ωστόσο, είναι πιθανό να εμφανίσει δράση στα θυλακιδώδη κύτταρα έπειτα από μία χρωμοσωμική αναδιάταξη, γνωστή ως αναδιάταξη RET/PTC (Nikiforov., 2011b). Η αναδιάταξη είναι αποτέλεσμα της ένωσης του τμήματος του γονιδίου RET που κωδικοποιεί τον υποδοχέα κινάσης τυροσίνης και διάφορων μη συγγενικών γονιδίων. Υπάρχουν έντεκα τύποι αναδιατάξεων RET/PTC όμως οι πιο κοινοί είναι οι τύποι RET/PTC1 και RET/PTC3. Όλες οι χρωμοσωμικές αναδιατάξεις αυτού του τύπου περιλαμβάνουν την περιοχή ενεργότητας κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα RET και επιτρέπουν έτσι στη

χμιαρική πρωτεΐνη να ενεργοποιήσει το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP κινασών (Nikiforov, 2011a). Οι αναδιατάξεις RET/PTC εμφανίζονται σχεδόν αποκλειστικά στον θηλώδη τύπο καρκίνου του θυρεοειδούς και η συχνότητα εμφάνισής τους αυξάνεται ύστερα από έκθεση σε ραδιενέργεια (Grogan et al. 2010).

1.2.4.4. ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΕΙΣ PAX8/PPAR γ

Ο PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) είναι ένας πυρηνικός υποδοχέας ο οποίος εμπλέκεται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης ενώ το γονίδιο PAX8 κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα που παίζει ρόλο στην καρκινογένεση. Η μετάθεση t(2;3)(q13;p25) έχει σαν αποτέλεσμα την αναδιάταξη PAX8/PPAR γ η οποία οδηγεί στην υπερέκφραση της πρωτεΐνης PPAR γ . Η αναδιάταξη PAX8/PPAR γ εμφανίζεται με ποσοστό 30-40% στον θυλακιώδη καρκίνου του θυρεοειδούς και σε μικρότερα ποσοστά (2-13%) σε θυλακιώδη αδενώματα. Επίσης, αυτή η αναδιάταξη εντοπίζεται, στον θυλακιώδη υπότυπο του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς με μία αναφερόμενη συχνότητα του 5% (French et al. 2003, Nikiforova et al. 2002), παρόλο που έχει αναφερθεί και μια μελέτη με συχνότητα που ανέρχεται στο 38% (Castro et al. 2006). Τέλος, είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι οι αναδιατάξεις PAX8/PPAR γ και οι μεταλλάξεις των γονιδίων RAS, σπάνια συνυπάρχουν στον ίδιο τύπο καρκίνου, υποδηλώνοντας ότι τα θυλακιώδη καρκινώματα ίσως αναπτύσσονται μέσω τουλάχιστον δύο διακριτών μοριακών μονοπατιών, όπου το έναυσμα δίνεται είτε από την αναδιάταξη PAX8/PPAR γ είτε από τη μετάλλαξη RAS (Nikiforova et al. 2003).

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της συσχέτισης των μεταλλάξεων στα γονίδια HRAS και NRAS και συγκεκριμένα στα κωδικόνια 12, 13 και 61 με τους διαφορετικούς τύπου καρκίνου του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΥΛΙΚΑ

2.1.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν 18 δείγματα ασθενών, οι οποίοι είχαν διαγνωσθεί με καρκίνο του θυρεοειδούς. Τα δείγματα αυτά προέρχονται από το Παθολογοανατομικό τμήμα του Στρατιωτικού Νοσοκομείου ΝΙΜΙΤΣ, στην Αθήνα.

Τα 18 δείγματα είναι βιοψίες ιστού, μετά από θυρεοειδεκτομή και προέρχονται από γυναίκες ασθενείς, ηλικίας 27-75 χρόνων. Έπειτα από την μελέτη της ιστοπαθολογίας τους και την κυτταρολογική τους ανάλυση, τα δείγματα χωρίστηκαν ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου του θυρεοειδούς. Οι τύποι των ιστών που εξετάστηκαν ήταν οι ακόλουθοι: 10 ιστοί με θηλώδες καρκίνωμα (papillary thyroid carcinoma, PTC), 7 ιστοί με θηλώδες καρκίνωμα θυλακιδώδους προτύπου ανάπτυξης (follicular variant of papillary thyroid carcinoma, FVPTC), και 1 ιστός με θυλακιδώδες καρκίνωμα (follicular thyroid carcinoma, FTC). Συγκεκριμένα, για το κάθε δείγμα, ήταν διαθέσιμη η βιοψία του ιστού σταθεροποιημένου σε φορμαλίνη και εγκλεισμένου σε παραφίνη.

Πίνακας 3: Στοιχεία των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Τύπος Καρκίνου	Αριθμός Δειγμάτων	Φύλο	
		ΘΥΛΗ	ΑΡΡΕΝ
Θηλώδες καρκίνωμα	10	10	0
Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιδώδες πρότυπο ανάπτυξης	7	7	0
Θυλακιδώδες καρκίνωμα	1	1	0

2.1.2. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα χημικά αντιδραστήρια και τα kit που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής καθαρότητας και αγοράστηκαν από τις ακόλουθες εταιρίες: **Sigma-Aldrich**, **AppliChem Panreac ITW Companies**, **NEW ENGLAND Biolabs[®]inc**, **Kapa Biosystems**, **QIAGEN**, **Macherey-Nagel**.

- **Sigma-Aldrich**

Αιθανόλη (≥99.8%, αριθμός καταλόγου 32221)

Ξυλένιο (αριθμός καταλόγου 33817)

- **AppliChem Paureac ITW Companies**

Αγαρόζη (Agarose Low EEO –Agarose standard, αριθμός καταλόγου A2114)

Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml - αριθμός καταλόγου A1152)

- **NEW ENGLAND Biolabs inc**

Low Molecular DNA Ladder (αριθμός καταλόγου N3233)

Quick – Load 2-log DNA Ladder (0.1-10.0 kb) (αριθμός καταλόγου NO469S)

- **Kapa Biosystems**

Πολυμεράση Kapa Taq (5U/μl) (αριθμός καταλόγου KE1000)

Ρυθμιστικό διάλυμα Πολυμεράσης (10X Taq Buffer B, 1.5mM Mg στο 1X) (αριθμός καταλόγου KB1002)

- **QIAGEN**

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (αριθμός καταλόγου 56404)

- **MACHEREY-NAGEL**

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (αριθμός καταλόγου REF 740609.250)

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΒΙΟΨΙΕΣ ΙΣΤΩΝ

2.2.1.1. ΑΝΤΙΡΑΣΤΗΡΙΑ - ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Τα αντιδραστήρια αλλά και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της απομόνωσης του DNA από τα δείγματα ιστών των ασθενών εγκλεισμένα σε παραφίνη, ήταν τα εξής:

- Ξυλένιο (Sigma-Aldrich)
- Αιθανόλη (Sigma-Aldrich, ≥99.8%)
- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (for purification of genomic DNA from paraffin-embedded tissues) (εταιρία QIAGEN)

Το kit QIAamp DNA FFPE Tissue περιείχε τα κάτωθι αντιδραστήρια:

- Τα ρυθμιστικά διαλύματα: Buffer ATL, Buffer AL (Lysis Buffer), Buffer AW1 (Wash Buffer 1), Buffer AW2 (Wash Buffer 2), Buffer ATE (Elution Buffer)
- Διάλυμα Πρωτεϊνάσης K (Proteinase K solution) (20 mg/ml)
- Σωληνάρια συλλογής (collection tubes), χωρητικότητας 2ml
- Στήλες συλλογής (QIAamp MinElute Column)

Τα διαλύματα AW1 και AW2 παρασκευάστηκαν ως εξής:

- **AW1:** Σε 19ml διαλύματος AW1 του kit προστέθηκαν 25ml αιθανόλης ($\geq 99.8\%$), με τελικό όγκο του διαλύματος AW1 στα 44ml.
- **AW2:** Σε 13ml διαλύματος AW2 του kit προστέθηκαν 30ml αιθανόλης ($\geq 99.8\%$) με τελικό όγκο του διαλύματος AW1 στα 43ml.

2.2.1.2. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση του DNA από τα δείγματα ιστών εγκλεισμένα σε παραφίνη, ήταν η ακόλουθη: Αρχικά, με ένα μικρό αποστειρωμένο χειρουργικό νυστέρι πραγματοποιήθηκε η απομάκρυνση της παραφίνης από τα δείγματα των ιστών. Έπειτα, τα δείγματα τεμαχίστηκαν με το ίδιο αποστειρωμένο νυστέρι και χρησιμοποιήθηκαν 1-2 τομές του ιστού, πάχους 5-10μm για την απομόνωση του DNA. Τα τεμαχισμένα δείγματα του ιστού τοποθετήθηκαν σε ένα eppendorf χωρητικότητας 1,5ml (microcentrifuge tube) και μετά την προσθήκη 1ml ξυλενίου (xylene) αναδεύτηκαν έντονα για 10sec με τη χρήση vortex. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (Thermo ELECTRON CORPORATION, HERAEUS PICO17 Centrifuge) σε πλήρη ταχύτητα (16.600 xg) για 2 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, αφαιρέθηκε, με τη βοήθεια πιπέτας GILSON, το υπερκείμενο με πάρα πολλή προσοχή έτσι ώστε το ίζημα να παραμείνει αναλλοίωτο. Να σημειωθεί πως το ξυλένιο βοηθάει στη διάλυση της παραφίνης και έτσι αυτή μπορεί να απομακρυνθεί από το δείγμα. Στη συνέχεια, προστέθηκε στο ίζημα 1ml αιθανόλης ($\geq 99,8\%$) και ακολούθησε έντονη ανάδευση στο vortex για 10sec. Μετά το τέλος της ανάδευσης, τα δείγματα υποβλήθηκαν και πάλι σε φυγοκέντρηση σε πλήρη ταχύτητα (16.600 xg) για 2 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο με τη χρήση πιπέτας με πολλή προσοχή για να μείνει αναλλοίωτο το ίζημα. Η προσθήκη της αιθανόλης συμβάλει στην απομάκρυνση του ξυλενίου που μπορεί να έχει απομείνει στα δείγματα από το προηγούμενο βήμα της διαδικασίας. Έπειτα, τα δείγματα επώαστηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37° C για 10-15 λεπτά, με ανοιχτό καπάκι, έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα αιθανόλης.

Τα δείγματα επαναιωρήθηκαν σε 180μl Buffer ATL, αναδεύτηκαν έντονα για 10 sec με τη βοήθεια vortex και μετά από προσθήκη 20μl πρωτεϊνάσης K πραγματοποιήθηκε ισχυρή ανάδευση στο vortex για 10sec. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων σε θερμικό περιστρεφόμενο επωαστήρα, στους 56° C μέχρι να πραγματοποιηθεί η πλήρης λύση του κάθε δείγματος κάτω από συνθήκες μετουσίωσης από την πρωτεϊνάση K. Τα δείγματα χρειάστηκε να παραμείνουν στον θερμικό περιστρεφόμενο επωαστήρα όλο το βράδυ (overnight) μέχρι την πραγματοποίηση της πλήρης λύσης τους. Σε ορισμένες περιπτώσεις όπου τα δείγματα δεν είχαν λυθεί πλήρως μέχρι το επόμενο πρωί, προστέθηκαν επιπλέον

10μl έως 20 μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K και ακολούθησε η επώαση των δειγμάτων στον επωαστήρα για 2 ώρες επιπλέον. Μετά την πλήρη λύση τους, τα δείγματα επώαστηκαν σε ένα μπλοκ θέρμανσης (heating block) για 1 ώρα.

Έπειτα από μία σύντομη φυγοκέντρηση (quick spin) για την συλλογή του δείγματος στον πάτο του erpendorf, ακολούθησε η προσθήκη 200μl ρυθμιστικού διαλύματος AL (Buffer AL), έντονη ανάδευση με vortex και έπειτα προσθήκη 200μl αιθανόλης ($\geq 99,8\%$) και έντονη ανάδευση στο vortex για 10sec για την ανάμειξη του δείγματος. Ύστερα από μία σύντομη φυγοκέντρηση, ολόκληρο το κυτταρόλυμα μεταφέρθηκε με προσοχή στην ειδική στήλη QIAamp MinElute, η οποία ήταν τοποθετημένη σε ειδικό σωλήνα συλλογής των 2ml (collection tube). Η στήλη φυγοκεντρήθηκε στα 6.000xg για 1 λεπτό και έπειτα μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα συλλογής των 2ml. Η φυγοκέντρηση συμβάλλει στη δέσμευση του DNA στη μεμβράνη της στήλης καθώς όλες οι προσμίξεις διαπερνούν τη μεμβράνη και απομακρύνονται στο σωλήνα διαλογής.

Ακολούθως, προστέθηκαν στη στήλη 500μl ρυθμιστικού διαλύματος AW1 (Buffer AW1 και μετά από φυγοκέντρηση στα 6,000xg για 1 λεπτό η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα διαλογής. Στη συνέχεια, ακολουθείται η ίδια διαδικασία για το ρυθμιστικό διάλυμα AW2 (Buffer AW2). Τέλος, η στήλη φυγοκεντρήθηκε στα 16.600xg για 3 λεπτά προκειμένου να στεγνώσει πλήρως η μεμβράνη και να απομακρυνθεί τελείως η αιθανόλη.

Η στήλη μεταφέρθηκε σε σωληνάριο erpendorf του 1,5ml (microcentrifuge tube) και για την ολοκλήρωση της έκλουσης του DNA, προστέθηκαν 25μl ρυθμιστικού διαλύματος ATE (buffer ATE). Η στήλη επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου αποσκοπώντας έτσι στην αύξηση της απόδοσης της έκλουσης. Μετά το πέρας των 5 λεπτών, η στήλη φυγοκεντρήθηκε στα 16.600xg για 1 λεπτό και έτσι πραγματοποιήθηκε η πλήρης έκλουση του DNA. Το γενωμικό DNA αποθηκεύεται στους -20°C μέχρι την μελλοντική του χρήση.

2.2.2. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Αρχή της μεθόδου:

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) πρόκειται για μια *in vitro* τεχνολογία βιοχημείας και μοριακής βιολογίας η οποία αναπτύχθηκε από τον, βραβευμένο με νόμπελ Χημείας, Kary Mullis το 1983 (Mullis et al. 1986). Πλέον, η αντίδραση PCR χρησιμοποιείται ευρύτατα στην ιατρική και τις βιολογικές επιστήμες και παρουσιάζει πλήθος εφαρμογών (όπως η λειτουργική ανάλυση των γονιδίων, η ανίχνευση και διάγνωση ασθενειών, η ανίχνευση κληρονομικών νόσων και η φυλογένεση που βασίζεται στο DNA).

Μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματοποιείται η ενίσχυση ενός ή λίγων αντιγράφων DNA δημιουργώντας τελικά χιλιάδες αντίγραφα του αρχικού μορίου, δεδομένου ότι η αρχική αλληλουχία είναι γνωστή. Αυτό, δίνει τη δυνατότητα εντοπισμού μεταλλάξεων σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στον εκθετικό πολλαπλασιασμό μεγάλου αριθμού αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, με τη συμμετοχή μιας θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης. Το DNA-στόχος μπορεί να προέρχεται από ποικιλία δειγμάτων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμη και όταν δεν είναι εξαιρετικής καθαρότητας. Στο τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης οι κλώνοι του DNA-στόχου είναι πλέον 4 και αυτοί θα χρησιμοποιηθούν σαν καλούπι για τη σύνθεση νέων κλώνων στο δεύτερο κύκλο της αντίδρασης. Στο τέλος του δεύτερου κύκλου οι κλώνοι θα είναι 8 κ.ο.κ. Αν η απόδοση του συστήματος είναι 100% τότε στο τέλος της αντίδρασης θα έχουμε 2^n αντίγραφα, όπου n ο αριθμός των κύκλων. Πρόκειται λοιπόν, για μια ενζυμική αντίδραση η οποία έχει βελτιστοποιηθεί με τη χρήση της θερμοσταθερής Taq DNA πολυμεράσης που προέρχεται από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Saiki et al. 1988). Η θερμοσταθερή Taq DNA πολυμεράση μπορεί να διατηρεί την ενεργότητά της ακόμη και στους $+95^\circ \text{C}$, θερμοκρασία η οποία απαιτείται για την αποδιάταξη του DNA.

Για να πραγματοποιηθεί ο πολλαπλασιασμός του τμήματος DNA, απαιτούνται ειδικές αλληλουχίες, οι εκκινητές (primers). Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, μήκους 18-22 βάσεων, οι οποίοι έχουν δομή συμπληρωματική ως προς τις αλληλουχίες του DNA στόχου και συνδέονται ειδικά πάνω στο προς ενίσχυση τμήμα DNA. Η αλληλουχία του DNA στόχου μπορεί να είναι άγνωστη όμως θα πρέπει η αλληλουχία των πλευρικών τμημάτων να είναι γνωστή για να είναι δυνατή η κατασκευή των ειδικών για το DNA στόχο εκκινητών.

Τα συστατικά που απαιτούνται για μια αντίδραση PCR είναι τα εξής:

- ✓ Το DNA – στόχος που θα ενισχυθεί
- ✓ Θερμοσταθερή Taq DNA πολυμεράση
- ✓ Εκκινητής πρόσθιος (Forward) και ανάστροφος (Reverse)
- ✓ Δεοξυριβονουκλεοτιδικές βάσεις, για να γίνει η επιμήκυνση των νέων τμημάτων
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα για τη βελτιστοποίηση της δράσης της Taq πολυμεράσης
- ✓ Ιόντα Mg^{2+} , απαραίτητα για την ενζυμική δράση

Η αντίδραση περιλαμβάνει 3 διακριτά στάδια:

- 1) Αποδιάταξη του DNA – στόχου (το οποίο μετατρέπεται από δίκλωνο σε μονόκλωνο μόριο) σε θερμοκρασία 94-95° C.
- 2) Υβριδισμός των εκκινητών στα μονόκλινα τμήματα του DNA-στόχου. Η θερμοκρασία στην οποία λαμβάνει χώρα το βήμα αυτό εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά των εκκινητών (τη σύνθεσή τους σε βάσεις A/Tα και G/C).
- 3) Επιμήκυνση των εκκινητών μέσω της δράσης της Taq πολυμεράσης και την προσθήκη συμπληρωματικών δεοξυριβονουκλεοτιδικών βάσεων στο 3' άκρο του κάθε εκκινητή, σε θερμοκρασία 72-74° C.

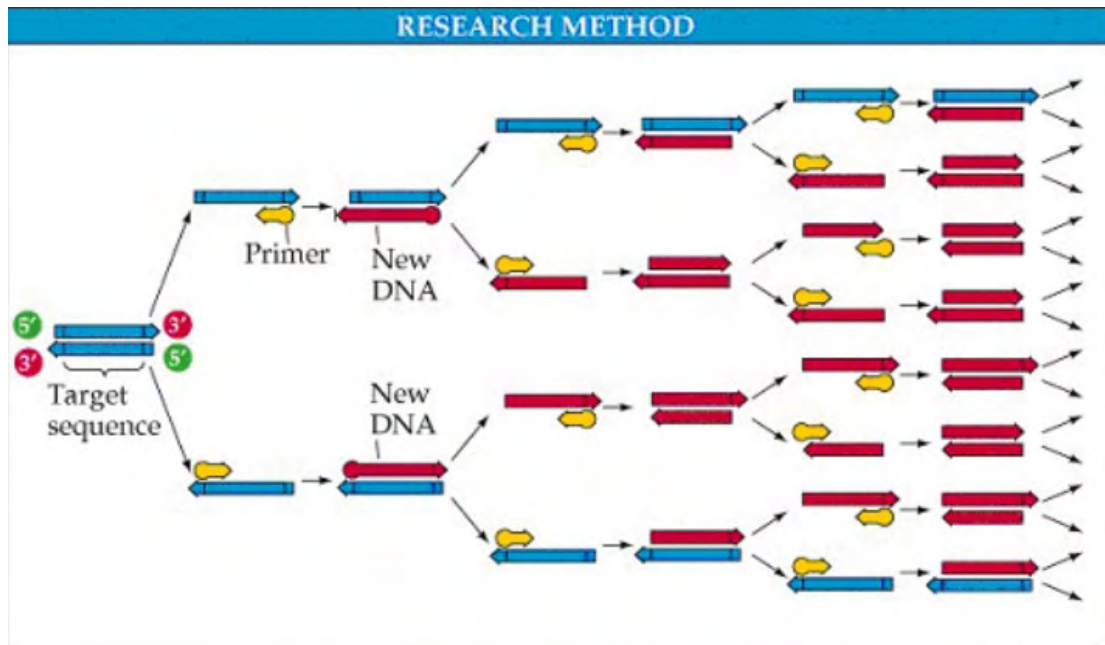
Τα παραπάνω βήματα αποτελούν έναν κύκλο PCR. Συνήθως, η αντίδραση πραγματοποιείται σε 25-40 κύκλους. Ο αριθμός των κύκλων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του DNA στόχου και από την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο. Υπερβολικός αριθμός κύκλων οδηγεί σε αύξηση μη ειδικών προϊόντων ενώ μικρότερος αριθμός κύκλων από τον απαιτούμενο οδηγεί σε μη ανίχνευση του DNA στόχου.

Πιο αναλυτικά:

- 1) Στο πρώτο στάδιο της αντίδρασης, πραγματοποιείται η αποδιάταξη του DNA ώστε να μετατραπεί από δίκλωνο μόριο σε μονόκλωνο. Για να πραγματοποιηθεί η αποδιάταξη απαιτείται η αύξηση της θερμοκρασίας στους 94-95° C έτσι ώστε να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων του DNA. Η θερμοκρασία στην οποία συμβαίνει η αποδιάταξη ονομάζεται θερμοκρασία αποδιατάξεως ή τήξεως (T_m , melting temperature). Η θερμοκρασία τήξεως επηρεάζεται από την συγκέντρωση του άλατος, τον τύπο του διαλύτη, το pH και την συγκέντρωση των βάσεων A/T, G/C. Οι περιοχές DNA πλούσιες σε G/C έχουν υψηλότερες τιμές T_m σε σύγκριση με εκείνες που είναι πλούσιες σε A/T.
- 2) Στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης λαμβάνει χώρα η υβριδοποίηση των εκκινητών στους αποδιαταγμένους κλώνους του DNA. Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται το βήμα αυτό κυμαίνεται μεταξύ 52-56° C και ονομάζεται θερμοκρασία υβριδισμού (T_a , annealing temperature). Συνήθως επιλέγεται να είναι κατά 5° C χαμηλότερη από την T_m και ευθύνεται σε ένα μέρος για την ειδικότητα της αντίδρασης. Όσο πιο κοντά είναι η T_a στην T_m , τόσο πιο πολύ αυξάνει η ειδικότητα της αντίδρασης. Το προϊόν της αντίδρασης καθορίζεται από τους δύο εκκινητές οι οποίοι αποτελούν και τα άκρα του. Οι εκκινητές θα πρέπει να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως, να απέχουν μεταξύ τους πάνω από 100 βάσεις, να έχουν παραπλήσιο αριθμό βάσεων A/T, G/C και να μην παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα στα 3' και 5' άκρα για να αποτρέπεται ο σχηματισμός

διμερών. Οι εκκινητές υβριδοποιούνται ο καθένας σε έναν κλώνο του δίκλωνου μορίου DNA και λειτουργούν ως υπόστρωμα για την DNA πολυμεράση με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένας συμπληρωματικός κλώνος DNA μέσω διαδοχικής προσθήκης δεοξυριβονουκλεοτιδίων.

- 3) Στο τρίτο στάδιο πραγματοποιείται η επέκταση των εκκινητών που έχουν υβριδοποιηθεί στο DNA στόχο στο προηγούμενο βήμα. Η Taq DNA πολυμεράση δρα με κατεύθυνση 5' → 3' και προσθέτει dNTPs από το 5' προς το 3' άκρο. Στο βήμα αυτό είναι απαραίτητη η ύπαρξη του ενζύμου, των dNTPs και του ρυθμιστικού διαλύματος MgCl₂. Μετά από κάθε κύκλο οι νεοσυντιθέμενοι κλώνοι του DNA χρησιμοποιούνται ως εκμαγείο για τη σύνθεση νέων κλώνων στον επόμενο κύκλο της PCR.



Εικόνα 14: Η διαδικασία της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Metropolitan State University of Denver, 2015, http://bonhamchemistry.com/wp-content/uploads/2012/01/CHE4350_Lab_Manual_S15.pdf)

Η αντίδραση PCR λαμβάνει χώρα σε αυτοματοποιημένες συσκευές που ονομάζονται θερμικοί κυκλοποιητές (Thermal cyclers). Οι συσκευές αυτές έχουν αυτοματοποιήσει πλήρως την αντίδραση της PCR και μέσω ενός ειδικού λογισμικού προγράμματος ελέγχουν το σύστημα ψύξης και θέρμανσης, ανάλογα με το εκάστοτε βήμα της αντίδρασης. Μετά το πέρας της αντίδρασης, τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν για κάποια ώρα στους 4° C μέσα στους θερμικούς κυκλοποιητές μέχρι την επικείμενη χρήση τους.



Εικόνα 15: Θερμικός Κυκλοποιητής (Labplan, Available from: http://www.labplan.ie/News_Item.asp?News_ID=65)

Πειραματική Διαδικασία

Στην αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές για την ενίσχυση συγκεκριμένων περιοχών των γονιδίων HRAS και NRAS. Οι περιοχές που ενισχύθηκαν ήταν αυτές που περιείχαν τα κωδικόνια 12, 13 και 61 τόσο στο γονίδιο HRAS όσο και στο γονίδιο NRAS. Στον πίνακα 4 εμφανίζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών, το μέγεθος των ενισχυόμενων αλληλουχιών καθώς και τα κωδικόνια που μελετώνται και ελέγχονται για τυχόν μετάλλαξη.

Πίνακας 4. Αλληλουχίες εκκινητών, μέγεθος ενισχυμένων προϊόντων και οι υπό μελέτη σημειακές μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12, 13 και 61 για τα γονίδια HRAS και NRAS.

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ	ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΑΜΙΝΟΞΥ
HRAS	F: → CAGGAGACCCTGTAGGAG	225bps	Κωδικόνια 12-13	Γλυκίνη -
	R: → TATCCTGGCTGTGCCTG		GGC-GGT	Γλυκίνη
HRAS	F: → TGTCCCTCCTGCAGGATTC	189 bps	Κωδικόνιο 61	Γλουταμίνη
	R: → GTACTGGTGGATGTCCTC		CAG	
NRAS	F: → AAAGTACTGTAGATGTGGCTC	224 bps	Κωδικόνια 12-13	Γλυκίνη - Γλυκίνη
	R: → GTGAGAGACAGGATCAGG		GGTGTT	
NRAS	F: → GATTCTTACAGAAAACAAGTG	157 bps	Κωδικόνιο 61	Γλουταμίνη
	R: → ATGACTTGCTATTATTGATGG		CAA	

Οι εκκινητές σε κάθε περίπτωση επιλέχθηκαν έτσι ώστε να καθίσταται δυνατή η ενίσχυση του προϊόντος. Παρακάτω παραθέτονται οι αλληλουχίες του κάθε εκκινητή καθώς ακόμα, σημειώνεται η αλληλουχία του κάθε εκκινητή μέσα στην αλληλουχία του γονιδίου και η σχετική του θέση με το κωδικόνιο που μελετάται σε κάθε περίπτωση.

Γονίδιο HRAS [Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog (*Homo sapiens*)]

➤ HRAS 12/13

Πρόσθιος εκκινητής (forward) → **CAGGAGACCCTGTAGGAG** (5' → 3', 18 nt)

Ανάστροφος εκκινητής (reverse) → **TATCCTGGCTGTGTCCTG** (5' → 3', 18 nt)

Οι θέσεις των εκκινητών καθώς και του υπό μελέτη κωδικονίου φαίνονται παρακάτω. Με κίτρινο σημειώνονται οι περιοχές τις οποίες αναγνωρίζουν και υβριδοποιούνται οι εκκινητές ενώ με κόκκινο σημειώνονται τα κωδικόνια 12 και 13.

GTGGGG **CAGGAGACCCTGTAGGAG** GACCCCGGGCCGCAGGCCCTGAGGAGCGATGACG
 GAATATAAGCTGGTGGTGGTGGCGCC **GCGGGT** GTGGGCAAGAGTGCCTGACCATCCAG
 CTGATCCAGAACCATTTGTGGACGAATACGACCCCACTATAGAGGTGAGCCTGGCGCCGC
 CGTCCAGGTGCCAGCAGCTGCTGCGGGCGAGCC **CAGGACACAGCCAGGATA** GGGCTGG

➤ HRAS 61

Πρόσθιος εκκινητής (forward) → **TGTCCTCCTGCAGGATTC** (5' → 3', 18 nt)

Ανάστροφος εκκινητής (reverse) → **GTA CTGGTGGATGTCCTC** (5' → 3', 18 nt)

Οι θέσεις των εκκινητών καθώς και του υπό μελέτη κωδικονίου φαίνονται παρακάτω. Με πράσινο σημειώνονται οι περιοχές τις οποίες αναγνωρίζουν και υβριδοποιούνται οι εκκινητές ενώ με κόκκινο σημειώνονται το κωδικόνιο 61.

TGAGCCCT **TGTCCTCCTGCAGGATTC** CTACCGGAAGCAGGTGGTCATTGATGGGGAGACGTG
 CCTGTTGGACATCCTGGATACCGCCGGC **CAG** GAGGAGTACAGCGCCATGCGGGACCAGTA
 CATGCGCACCGGGGAGGGCTTCCTGTGTGTGTTGCCATCAACAACACCAAGTCTTTT **GAG**
GACATCCACCAGTAC AGGTGA

Γονίδιο NRAS [neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog (*Homo sapiens*)]

➤ NRAS 12/13

Πρόσθιος εκκινητής (forward) → **AAAGTACTGTAGATGTGGCTC** (5' → 3', 21 nt)

Ανάστροφος εκκινητής (reverse) → **GTGAGAGACAGGATCAGG** (5' → 3', 18 nt)

Οι θέσεις των εκκινητών καθώς και του υπό μελέτη κωδικονίου φαίνονται παρακάτω. Με κίτρινο σημειώνονται οι περιοχές τις οποίες αναγνωρίζουν και υβριδοποιούνται οι εκκινητές ενώ με κόκκινο σημειώνονται τα κωδικόνια 12 και 13.

CTTTAAAGTACTGTAGATGTGGCTCGCCAATTAACCCTGATTACTGGTTTCCAACAGGTTCTT
GCTGGTGTGAAATGACTGAGTACAACTGGTGGTGGTTGGAGCA**GGTGGT**GTTGGGAAAA
GCGCACTGACAATCCAGCTAATCCAGAACCACCTTTGTAGATGAATATGATCCCACCATAGAG
GTGAGGCCAGTGGTAGCCCGCTGAC**CTGATCCTGTCTCTCAC**TT

➤ NRAS 61

Πρόσθιος εκκινητής (forward) → **GATTCTTACAGAAAACAAGTG** (5' → 3', 21 nt)

Ανάστροφος εκκινητής (reverse) → **ATGACTTGCTATTATTGATGG** (5' → 3', 21 nt)

Οι θέσεις των εκκινητών καθώς και του υπό μελέτη κωδικονίου φαίνονται παρακάτω. Με πράσινο σημειώνονται οι περιοχές τις οποίες αναγνωρίζουν και υβριδοποιούνται οι εκκινητές ενώ με κόκκινο σημειώνονται το κωδικόνιο 61.

CCCCAG**GATTCTTACAGAAAACAAGTG**GTTATAGATGGTGAAACCTGTTTGGTGGACATACT
GGATACAGCTGGGA**CAA**GAAGAGTACAGTGCCATGAGAGACCAATACATGAGGACAGGCGA
AGGCTTCTCTGTGTATTG**CCATCAATAATAGCAAGTCAT**TTGC

Προκειμένου να ενισχυθούν οι αλληλουχίες των παραπάνω γονιδίων θα πρέπει αρχικά να ρυθμιστεί το πρόγραμμα της PCR για το εκάστοτε γονίδιο. Αυτό, περιλαμβάνει τις διάφορες θερμοκρασίες κατά τα 3 βήματα της αντίδρασης αλλά και τον χρόνο διάρκειας του κάθε βήματος. Να σημειωθεί εδώ πως, η αντίδραση PCR έλαβε χώρα στον θερμικό κυκλοποιητή Thermo cycling, SENSQUEST lab cycler. Για τα γονίδια HRAS (κωδικόνιο 61) και NRAS (κωδικόνια 12, 13 και 61) πραγματοποιήθηκαν απλές αντιδράσεις PCR ενώ για το γονίδιο HRAS (κωδικόνια 12 και 13) πραγματοποιήθηκε touch down PCR.

Η Touch-down PCR (TDP) αποτελεί έναν απλό και γρήγορο τρόπο προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η τεχνική της PCR. Με τη μέθοδο αυτή, αυξάνεται η ειδικότητα, η ευαισθησία και η απόδοση της αντίδρασης χωρίς να απαιτείται ο επανασχεδιασμός των εκκινητών (Korbie et al., 2008). Η TDP περιλαμβάνει μια αρχική θερμοκρασία υβριδισμού (T_h) υψηλότερη από την θερμοκρασία T_m των εκκινητών και σταδιακά μειώνεται κατά τη διάρκεια των διαδοχικών κύκλων ώσπου τελικά φτάνει στην T_m ή χαμηλότερα από αυτήν. Η αυξημένη αρχική θερμοκρασία συμβάλει στην υβριδοποίηση των εκκινητών στην αλληλουχία στόχο ενώ η μειωμένη T_h θερμοκρασία στο τέλος της διαδικασίας, όπου ο αριθμός των αντιγράφων είναι ψηλός, αυξάνει την απόδοση της αντίδρασης (Zumarraga et al., 2005).

Στους Πίνακες 5 και 6 δίνονται οι συνθήκες της PCR για την ενίσχυση του κάθε γονιδίου.

Πίνακας 5. Συνθήκες για την αντίδραση PCR για τους εκκινητές HRAS 61, NRAS 12/13 και NRAS 61.

Στάδιο	HRAS 61		NRAS 12/13		NRAS 61	
	Θερμοκρασία	Χρόνος	Θερμοκρασία	Χρόνος	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95° C	5 min	95° C	5 min	95° C	5 min
Αποδιάταξη	95° C	30 sec	95° C	30 sec	95° C	30 sec
Υβριδοποίηση	54° C	30 sec	53° C	30 sec	49° C	30 sec
Επέκταση	72° C	30 sec	72° C	30 sec	72° C	30 sec
Τελική Επέκταση	72° C	10 min	72° C	10 min	72° C	10 min

X 40
κύκλοι

Πίνακας 6. Συνθήκες για την αντίδραση PCR για τους εκκινητές HRAS 12/13.

Στάδιο	HRAS 12/13		
	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95° C	5 min	
Αποδιάταξη – Υβριδοποίηση - Επέκταση	95° C	68° C	72° C
	95° C	66° C	72° C
	95° C	64° C	72° C
	95° C	62° C	72° C
	95° C	60° C	72° C
	95° C	58° C	72° C
Τελική επέκταση	72° C	10min	

Τόσο τα αντιδραστήρια όσο και οι ποσότητες αυτών ήταν ίδια σε κάθε αντίδραση PCR με τη διαφορά πως στο κάθε γονίδιο χρησιμοποιούνταν οι αντίστοιχοι εκκινητές. Όλα τα αντιδραστήρια της PCR που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία προήλθαν από την εταιρία Kapa Biosystems (KAPA Taq PCR kit). Οι

αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50μl ενώ παράλληλα, κάθε αντίδραση περιλάμβανε και ένα αρνητικό δείγμα ελέγχου (negative control) με τελικό όγκο 25μl. Το negative control περιείχε όλα τα αντιδραστήρια που περιέχονταν και στα δείγματα που ενισχύονταν με PCR με τη διαφορά πως απουσίαζε το γενωμικό DNA το οποίο είχε αντικατασταθεί από νερό. Το δείγμα αυτό χρησιμοποιείται για να βεβαιωθούμε πως δεν υπάρχει κάποια επιμόλυνση στους εκκινητές ή στα υπόλοιπα αντιδραστήρια καθώς δεν αναμένεται να δώσει κάποιο προϊόν.

Η κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε σωληνάρια των 0,2ml και περιείχε τα αντιδραστήρια που αναγράφονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR.

Αντιδραστήρια	Δείγμα	Δείγμα ελέγχου (Negative control)
Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer)	5 μl	2,5 μl
dNTPS	1 μl	0,5 μl
Primer Forward	2,5 μl	1,25 μl
Primer Reverse	2,5 μl	1,25 μl
Κατα Taq πολυμεράση	0,2 μl	0,1 μl
DNA	2 μl	-
ddH₂O	36,8 μl	19,4 μl
Τελικός όγκος	50 μl	25 μl

Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) εμπεριέχει MgCl₂ και επομένως δεν απαιτείται επιπλέον προσθήκη των ιόντων αυτών. Τα dNTPs (δεοξυριβονουκλεοτίδια) περιέχουν ίσες ποσότητες από το κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο (dATP, dTTP, dGTP, dCTP).

Οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις του κάθε αντιδραστηρίου αναγράφονται παρακάτω (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων.

Αντιδραστήρια	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση
Buffer	10X + 15mM MgCl ₂	1X + 15mM MgCl ₂
dNTPS	10mM (το καθένα)	0,2mM (το καθένα)
Primer Forward	10pm/μl	0,5pm/μl
Primer Reverse	10pm/μl	0,5pm/μl
Κατα Ταq πολυμεράση	5units/μl	0,02units/μl

Μετά το τέλος της PCR, τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για να επιβεβαιωθεί ότι έχει πραγματοποιηθεί η ενίσχυση του γονιδιακού προϊόντος και ότι τα γονιδιακά προϊόντα έχουν το σωστό μέγεθος. Παράλληλα με την ηλεκτροφόρηση του δείγματος, πραγματοποιείται και η ηλεκτροφόρηση του δείγματος ελέγχου (negative control) για να διαπιστωθεί αν υπάρχει επιμόλυνση στην συγκεκριμένη αντίδραση PCR. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης αναλύεται στο κεφάλαιο 2.2.3 .

2.2.3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

2.2.3.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Τα αντιδραστήρια και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι τα ακόλουθα:

- Αγαρόζη: (Agarose Low EEO - Agarose standard, 500gr, αριθμός καταλόγου A2114).
- Διάλυμα TAE 50X (stock), με σύσταση: Tris-base (242gr), οξικό οξύ (57,1ml), EDTA (18,6gr), ddH₂O μέχρι 1L. pH: 8.
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr): Υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 10mg/ml, αριθμός καταλόγου A1152.
- Διάλυμα φόρτωσης (Loading Buffer, 6X) με σύσταση: 0.25% Μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromofenol blue) (25mg), 30% w/v Γλυκερόλη (3ml), ddH₂O (7ml). Συνολικός όγκος: 10ml
- Μάρτυρας Low Molecular DNA Ladder (500μg/ml, αριθμός καταλόγου N3233S).
- Μάρτυρας Quick – Load 2-log DNA Ladder (0.1-10.0 kb) 100μg/ml (αριθμός καταλόγου NO469S)

2.2.3.2. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση πρόκειται για μια μέθοδο διαχωρισμού, οπτικοποίησης και απομόνωσης οποιουδήποτε μορίου που φέρει φορτίο (πρωτεΐνες, πεπτίδια, νουκλεϊκά οξέα, αμινοξέα). Πρόκειται για μια τεχνική γρήγορη και απλή και συνήθως χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μεγέθους και της καθαρότητας ενός δείγματος αλλά βρίσκει και εφαρμογή στο διαχωρισμό μιγμάτων.

Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή της μετανάστευσης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου καθώς η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα φορτισμένα μόρια προς το ηλεκτρόδιο του αντίθετου φορτίου. Καθώς τα μόρια διαφέρουν ως προς το μέγεθος, το σχήμα και το ηλεκτρικό τους φορτίο θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες όταν βρεθούν μέσα σε ηλεκτρικό φορτίο. Η ταχύτητα με την οποία κινούνται τα μόρια του DNA μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από α) το μέγεθός τους (γενικά, μικρά τμήματα κινούνται γρηγορότερα από μεγαλύτερα), β) τη συγκέντρωση της αγαρόζης, γ) τη στερεοδιάταξη του DNA (η υπερελικωμένη κυκλική μορφή, η ανοιχτή κυκλική μορφή και η γραμμική μορφή παρουσιάζουν διαφορετική κινητικότητα), δ) την τάση του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται, ε) την παρουσία χρωστικών (π.χ βρωμιούχο αιθύδιο) και στ) τη σύσταση και την ιοντική ισχύ του διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Buffer).

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πηκτώματα (gels) αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου. Το υλικό του πηκτώματος χρησιμοποιείται ανάλογα με τα απόλυτα μεγέθη των τμημάτων που πρόκειται να διαχωριστούν καθώς και από τις σχετικές διαφορές μεγέθους μεταξύ τους (Watson et al. 2007). Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μορίων όταν απαιτείται μεγάλη διακριτική ικανότητα, ακόμη και μεταξύ μορίων που διαφέρουν σε μέγεθος μόνο κατά 0,1%. Αντίθετα, τα πηκτώματα αγαρόζης παρουσιάζουν μεγαλύτερο εύρος διαχωρισμού μεταξύ των μορίων (από 50bp έως Mb) (Sambrook et al. 1991).

Η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται κυρίως για το διαχωρισμό δίκλωνων μορίων DNA σε ουδέτερο pH (για παράδειγμα, ύστερα από κατάτμηση με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών ή για την ανάλυση των προϊόντων της PCR). Υπό συνθήκες ουδέτερου pH το DNA φέρει αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών του ομάδων και έτσι, όταν βρεθεί μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο κινείται από την κάθοδο (-) προς την άνοδο (+).

Η αγαρόζη είναι ένας φυτικός πολυσακχαρίτης που παράγεται από διάφορα φύκη του είδους Rhodophyceae και το πήκτωμα που σχηματίζει δεν είναι συμπαγές αλλά εμφανίζει πόρους, το μέγεθος των οποίων είναι αντιστρόφως ανάλογο προς τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Λόγω της μικρής μηχανικής αντοχής της αγαρόζης, τα πηκτώματα ηλεκτροφορούνται σε οριζόντιες συσκευές. Ο ρόλος του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) είναι να διατηρεί σταθερή την κατανομή του ηλεκτρικού πεδίου, η οποία μετρείται σε volts/cm. Τα ρυθμιστικά διαλύματα περιέχουν Tris, οξικό οξύ και EDTA. Η προσθήκη του EDTA εξασφαλίζει τη δέσμευση των δισθενών κατιόντων έτσι ώστε να παρεμποδιστεί η δράση των νουκλεασών. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια φθορίζουσα χρωστική που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και με τον τρόπο αυτό, επιταχύνουν τη χρώση των μορίων όσο αυτά βρίσκονται στο πήκτωμα. Εν συνεχεία, εκθέτοντας το πήκτωμα σε UV ακτινοβολία τα τμήματα του DNA εμφανίζονται σαν μια σειρά από φωτεινές ζώνες, καθεμιά από τις οποίες αντιστοιχεί σε ένα τμήμα συγκεκριμένου μεγέθους (Watson et al. 2007). Η ένταση χρώσης είναι ανάλογη του μεγέθους του τμήματος DNA.

Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει μπλε της βρωμοφαινόλης και γλυκερόλη. Το μπλε της βρωμοφαινόλης είναι μία χρωστική μικρού μοριακού βάρους, με αρνητικό φορτίο και έτσι κινείται προς την ίδια κατεύθυνση με το DNA, επιτρέποντας τον έλεγχο της προόδου της ηλεκτροφόρησης. Η γλυκερόλη αυξάνει την πυκνότητα των δειγμάτων ώστε να διευκολυνθεί η εισαγωγή τους στα «πηγαδάκια» του πηκτώματος. Τέλος, ο μάρτυρας που χρησιμοποιείται περιέχει ζώνες γνωστού μοριακού βάρους και σύμφωνα με αυτόν αλλά και ανάλογα με τη θέση της κάθε ζώνης εκτιμάται το μοριακό βάρος των τμημάτων DNA.

Αξίζει να αναφερθούν δύο σημαντικά πλεονεκτήματα της μεθόδου της ηλεκτροφόρησης. Παρέχει τη δυνατότητα στον ερευνητή να επιλέξει το είδος και τη συγκέντρωση του πηκτώματος ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματός του και να επιτύχει ποσοτικό διαχωρισμό μακρομορίων. Επιπλέον, τα μόρια του DNA που κινούνται μέσα στο πήκτωμα διατηρούνται άθικτα και μπορούν να ανακτηθούν (εκλουστούν) και κατόπιν να χρησιμοποιηθούν σε άλλα πειράματα (Clark et al., 1977).

Πειραματική διαδικασία

Το πήκτωμα της αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των προϊόντων της PCR είχε περιεκτικότητα 2% για να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των ενισχυμένων προϊόντων. Για την κατασκευή του εν λόγω πηκτώματος αρχικά ζυγίστηκαν 1,2 gr αγαρόζης και μεταφέρθηκαν σε μία κωνική φιάλη στην οποία προστέθηκαν 60ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1X. Το ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X

παρασκευάζεται έπειτα από αραιώση του stock διαλύματος TAE 50X. Η αραιώση πραγματοποιείται ύστερα από ανάμειξη 20ml του διαλύματος TAE 50X και συμπλήρωσης νερού μέχρι το 1L.

Η αгарόζη θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 2 λεπτά και αφού διαλυτοποιηθεί πλήρως το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει υπό τρεχούμενο νερό. Ακολούθως, προστίθενται 1,8ml διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου 10mg/ml (ώστε η τελική συγκέντρωση του EtBr να είναι 0,5μg/ml). Έπειτα από καλή ανάμειξη, το διάλυμα μεταφέρεται σ' ένα ειδικό καλούπι, στο οποίο έχουν τοποθετηθεί ειδικά χτενάκια, που οδηγούν στην δημιουργία των θέσεων φόρτωσης («wells» ή «πηγαδάκια»). Το διάλυμα παραμένει μέσα στο ειδικό καλούπι, μέχρι η αгарόζη να πολυμεριστεί και να πήξει (περίπου 40-45 λεπτά). Όταν πήξει η αгарόζη, αφαιρούνται τα χτενάκια με προσοχή και το πήκτωμα μεταφέρεται σε ειδική οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία περιέχει διάλυμα TAE 1X.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα δείγματα πριν τοποθετηθούν στο πήκτωμα είναι απαραίτητα να αναμειχθούν με το διάλυμα φόρτωσης (loading buffer). Αυτό βοηθάει αφενός στον έλεγχο της πορείας της ηλεκτροφόρησης και αφετέρου βοηθάει το δείγμα να καθιζήσει στο πηγαδάκι. Αναλυτικά, στα «πηγαδάκια» του πηκτώματος φορτώθηκαν 5 μl από το προϊόν της αντίδρασης PCR μετά από ανάμειξη με 1 μl χρωστικής-διαλύματος φόρτωσης (6X). Τέλος, απαραίτητη είναι και η φόρτωση ενός δείκτη γνωστού μοριακού βάρους, για να προσδιοριστεί το μέγεθος του δείγματος που «τρέχει» στο πήκτωμα. Μετά από εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σταθερής τάσης (90 volt) το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε ειδική λάμπα UV και φωτογραφήθηκε. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των νουκλεοτιδικών βάσεων του DNA και φθορίζει παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας καθιστώντας δυνατό τον εντοπισμό του προϊόντος της PCR.

2.2.4. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR (PCR clean-up)

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του **NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit** (for DNA, RNA and protein purification) της εταιρίας Macherey – Nagel.

Το πρωτόκολλο το οποίο περιγράφεται στη συνέχεια είναι κατάλληλο για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR, καθώς και της συγκέντρωσης του DNA αφαιρώντας άλατα, ένζυμα, διμερή εκκινητών από τις ενζυμικές αντιδράσεις. Η διαδικασία καθαρισμού, περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια.

1. Ρύθμιση της κατάστασης δέσμευσης του DNA.

Κατά το πρώτο βήμα του πρωτοκόλλου, λαμβάνει χώρα η προσαρμογή της ποσότητας του DNA, έτσι ώστε να μπορέσει αυτό να δεσμευτεί στην μεμβράνη

ειδικής στήλης στα επόμενα στάδια. Όπως περιγράφηκε κατά την πειραματική διαδικασία της PCR, οι αντιδράσεις λάμβαναν χώρα σε τελικό όγκο 50μl ενώ, 5μl από αυτά, χρησιμοποιήθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, για να ελεγχθεί η επιτυχία ενίσχυσης του προϊόντος. Έτσι, ρυθμίζουμε τον τελικό όγκο του κάθε δείγματος στα 50μl με προσθήκη απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναμείχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα NT1 (Buffer NT1) σε αναλογία ½. Επομένως, προστέθηκαν 100μl Buffer NT1 στα 50μl του προϊόντος της PCR και αναμείχθηκαν με την βοήθεια vortex.

2. Δέσμευση του DNA.

Στο δεύτερο στάδιο καθαρισμού της PCR, ακολούθησε η δέσμευση του DNA στην μεμβράνη της ειδικής στήλης. Για κάθε δείγμα, τοποθετήθηκε μία στήλη PCR-clean up σ' ένα καθαρό σωλήνα συλλογής, χωρητικότητας 2ml. Στο κέντρο της μεμβράνης της παραπάνω στήλης, φορτώθηκαν προσεκτικά 150μl από το κάθε δείγμα που προέκυψε από το βήμα 1. Στη συνέχεια, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα σε ταχύτητα 11.000 xg. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο από τον σωλήνα συλλογής και η στήλη τοποθετήθηκε και πάλι πίσω σε αυτόν.

3. Πλύση της μεμβράνης πυριτίου (silica membrane).

Στο βήμα αυτό, λαμβάνει χώρα η πλύση της μεμβράνης πυριτίου (silica membrane), στην οποία βρίσκεται δεσμευμένο το DNA. Για την πλύση της μεμβράνης, τοποθετήθηκαν 700μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης NT3 (Buffer NT3) στο κέντρο της στήλης PCR Clean up. Έπειτα από φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα σε ταχύτητα 11.000 xg, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε από τον σωλήνα συλλογής και η στήλη τοποθετήθηκε πάλι πίσω σε αυτόν. Το παραπάνω βήμα, πραγματοποιήθηκε και δεύτερη φορά, έπειτα από εκ νέου προσθήκη 700μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης NT3 (Buffer NT3) και φυγοκέντρηση στις ίδιες με παραπάνω συνθήκες.

4. Στέγνωμα της μεμβράνης πυριτίου (silica membrane).

Η στήλη φυγοκεντρήθηκε για ένα λεπτό σε ταχύτητα 11.000 xg έτσι ώστε να απομακρυνθεί τελείως το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης, Buffer NT3. Το βήμα αυτό, ήταν απαραίτητο να πραγματοποιηθεί πριν από την έκλυση του DNA, διότι η εναπομείνουσα από το ρυθμιστικό διάλυμα NT3 αιθανόλη μπορεί να παρεμποδίσει τις ενζυμικές αντιδράσεις.

5. Έκλυση του DNA.

Στο τελικό στάδιο καθαρισμού των προϊόντων της PCR, λαμβάνει χώρα η έκλυση του DNA. Κατά το στάδιο αυτό, η στήλη PCR Clean up τοποθετείται σε ένα νέο σωλήνα διαλογής, χωρητικότητας 1,5ml. Στη συνέχεια, προστίθενται 15-40μl

ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης NE (buffer NE). Η ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης NE που προστέθηκε στα δείγματα σε κάθε περίπτωση, ήταν ανάλογη με την ένταση της ζώνης που έδωσε το κάθε προϊόν της PCR, μετά την ηλεκτροφόρησή του στο πήκτωμα αγαρόζης. Όσο πιο έντονη ήταν η ζώνη του προϊόντος της PCR, τόσο μεγαλύτερος ήταν ο όγκος στον οποίο πραγματοποιήθηκε η έκλουση. Μετά το πέρας του παραπάνω βήματος, τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (18-25° C) για ένα λεπτό. Τέλος ακολούθησε φυγοκέντρηση για ένα λεπτό, σε ταχύτητα 11.000 xg.

Τα καθαρισμένα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 2% για να εκτιμηθεί η συγκέντρωσή τους και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους -20° C μέχρι να σταλούν για αλληλούχιση.

Σε ορισμένα δείγματα προκειμένου να μειωθεί το background που εμφανιζόταν κατά την αλληλούχιση των προϊόντων, η μέθοδος καθαρισμού που ακολουθήθηκε ήταν η ακόλουθη: Αρχικά, ηλεκτροφορήθηκαν τα 50μl του προϊόντος της PCR και μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα εκτέθηκε σε ακτινοβολία UV για να προσδιοριστεί η θέση του προϊόντος μέσα στο πήκτωμα. Έπειτα, με τη χρήση ενός αποστειρωμένου νυστεριού έγινε η κοπή του πηκτώματος στο σημείο που περιείχε την ζώνη του ηλεκτοφορημένου προϊόντος της PCR. Στη συνέχεια, η ζώνη ζυγίστηκε, τεμαχίστηκε και τοποθετήθηκε σε erpendorf χωρητικότητας 1,5ml. Σε αυτά προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα, Buffer NT1, σε ποσότητα ανάλογη με το μέγεθος της ζώνης και σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου καθαρισμού. Τα erpendorf τοποθετήθηκαν ακολούθως σε μπλοκ θέρμανσης (heating block) μέχρι να λιώσει το πήκτωμα (περίπου 10 λεπτά). Μετά από το στάδιο αυτό ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως από το βήμα 2 και έπειτα.

2.2.5. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΤΩΝ ΚΑΘΑΡΙΣΜΕΝΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Η αλληλούχιση των καθαρισμένων προϊόντων της PCR, ανατέθηκε σε μία εταιρία βιοτεχνολογικών και μοριακών τεχνικών, την **CEMIA** (Cellular and Molecular Immunological Applications) (Λάρισα). Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης, στάλθηκαν πάλι πίσω στο εργαστήριο, με την μορφή χρωματογραφημάτων, και ακολούθησε η περαιτέρω ανάλυσή τους, με την βοήθεια ενός εξειδικευμένου λογισμικού προγράμματος, το **BioEdit** (version 7.2.5, Last update 12/11/2013, BioEdit Sequence Alignment Editor Copyright: 1997-2013 Tom Hall).

Οι εκκινήτες οι οποίοι στάλθηκαν για αλληλούχιση σε κάθε μία από τις περιπτώσεις, αναγράφονται στον Πίνακα 9. Μέσω της αλληλούχισης είναι δυνατή η εύρεση της ύπαρξης ή όχι, σημειακών μεταλλάξεων στα κωδικόνια που μελετούνται για κάθε γονίδιο, αλλά και την ταυτοποίηση αυτών.

Πίνακας 9: Χαρακτηριστικά των εκκινητών που στάλθηκαν για αλληλούχιση

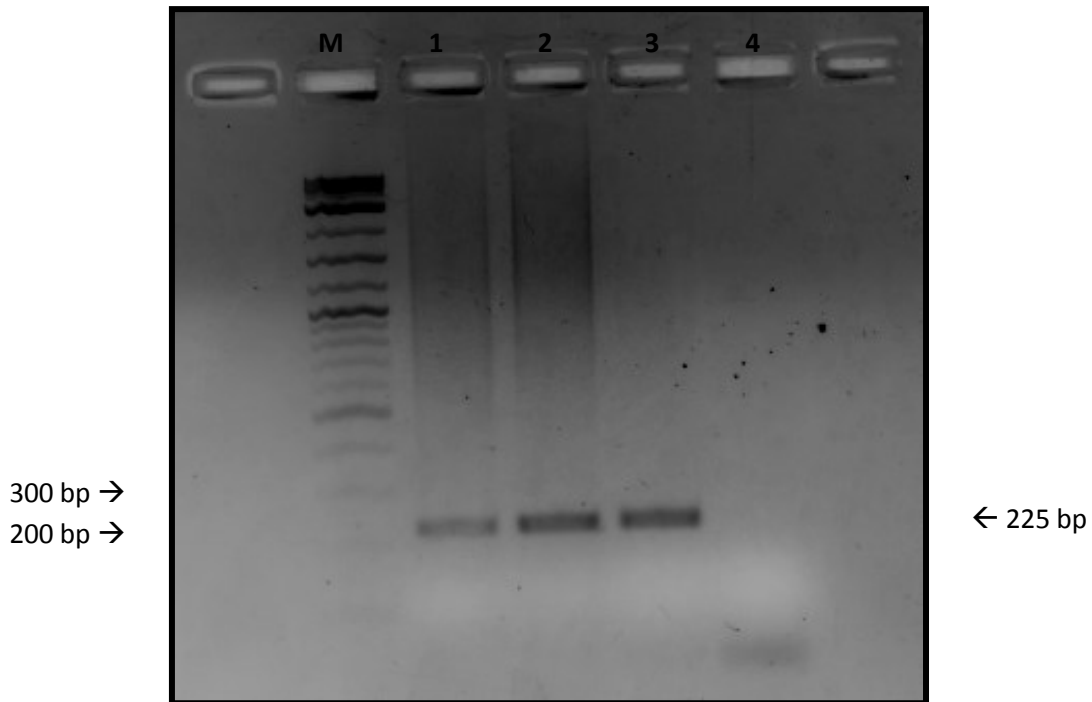
Γονίδιο	Αλληλουχία Εκκινητή	Tm
HRAS 12/13	F: → CAGGAGACCCTGTAGGAG	58,2
HRAS 61	R: → GTACTGGTGGATGTCCTC	55,6
NRAS 12/13	R: → GTGAGAGACAGGATCAGG	56
NRAS 61	R: → ATGACTTGCTATTATTGATGG	52

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

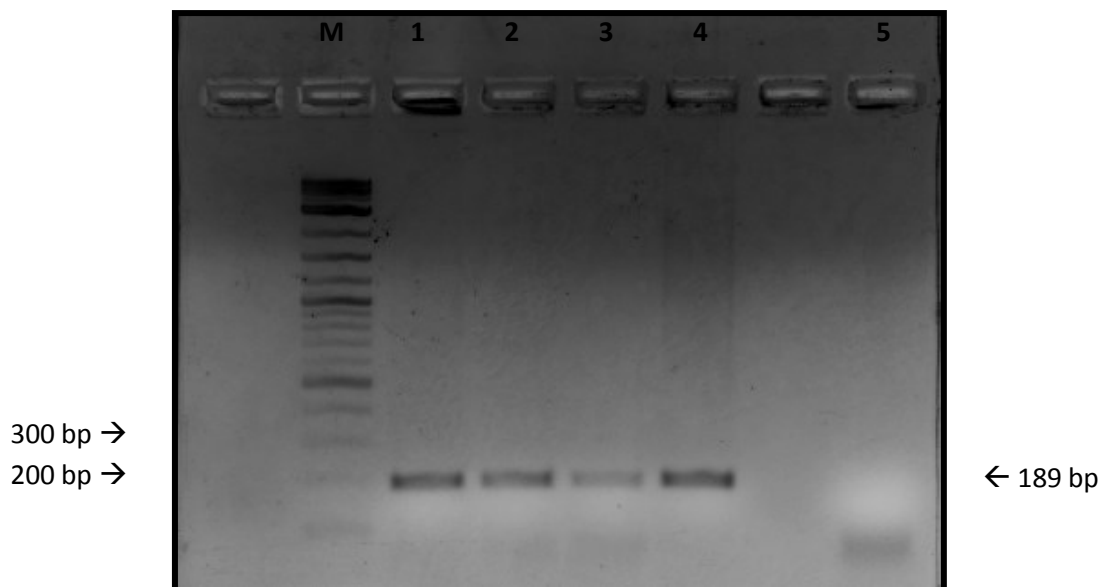
3.1. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ (HRAS 12/13, HRAS 61, NRAS 12/13, NRAS 61) ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).

Το γενωμικό DNA που απομονώθηκε από τις βιοψίες ιστού των ασθενών ενισχύθηκε μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι εκκινητές με σκοπό την ενίσχυση των υπό μελέτη περιοχών (κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου HRAS, κωδικόνιο 61 του γονιδίου HRAS, κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου NRAS και κωδικόνιο 61 του γονιδίου NRAS).

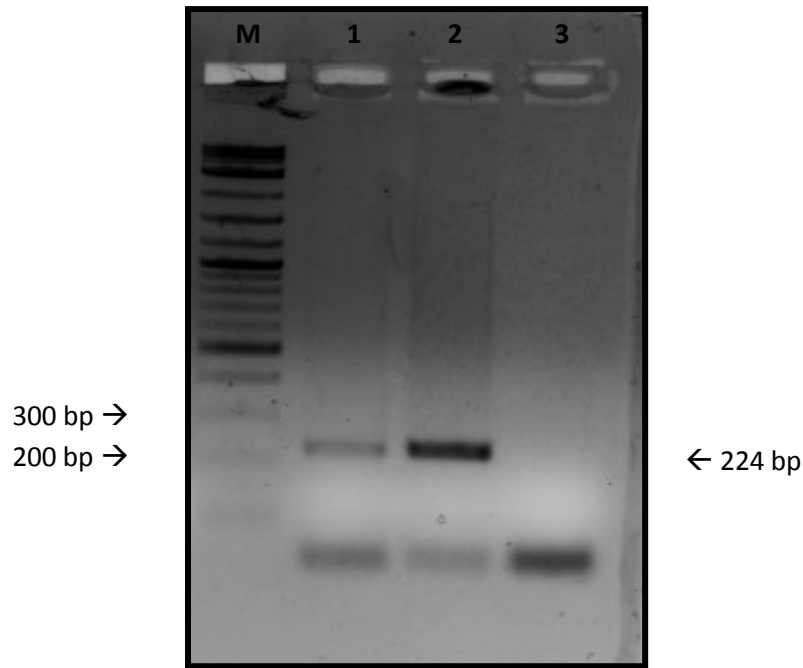
Στις εικόνες 16-19 εμφανίζονται ενδεικτικά τα προϊόντα ενίσχυσης για κάθε ένα από τα παραπάνω γονίδια, ύστερα από την ανάλυσή τους με PCR.



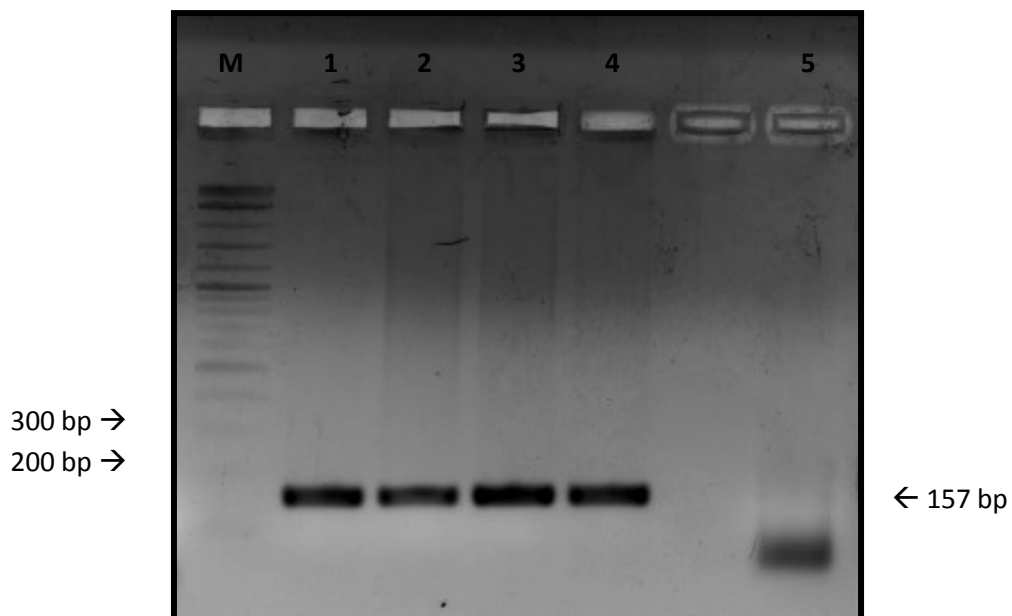
Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των προϊόντων που ενισχύθηκαν μέσω PCR για την περιοχή που περιλαμβάνει τα κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου HRAS. **Διαδρομή M:** δείκτης μοριακών βαρών, 2- log DNA Ladder. **Διαδρομές 1-3:** PCR προϊόντα των δειγμάτων 49,50 και 51. **Διαδρομή 4:** Αρνητικός μάρτυρας ελέγχου της PCR.



Εικόνα 17. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των προϊόντων που ενισχύθηκαν μέσω PCR για την περιοχή που περιλαμβάνει το κωδικόνιο 61 του γονιδίου HRAS. **Διαδρομή M:** δείκτης μοριακών βαρών, 2- log DNA Ladder. **Διαδρομές 1-4:** PCR προϊόντα των δειγμάτων 40,41,42 και 46. **Διαδρομή 4:** Αρνητικός μάρτυρας ελέγχου της PCR.



Εικόνα 18. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των προϊόντων που ενισχύθηκαν μέσω PCR για την περιοχή που περιλαμβάνει τα κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου NRAS. **Διαδρομή M:** δείκτης μοριακών βαρών, 2- log DNA Ladder. **Διαδρομές 1,2:** PCR προϊόντα των δειγμάτων 40 και 44. **Διαδρομή 3:** Αρνητικός μάρτυρας ελέγχου της PCR.

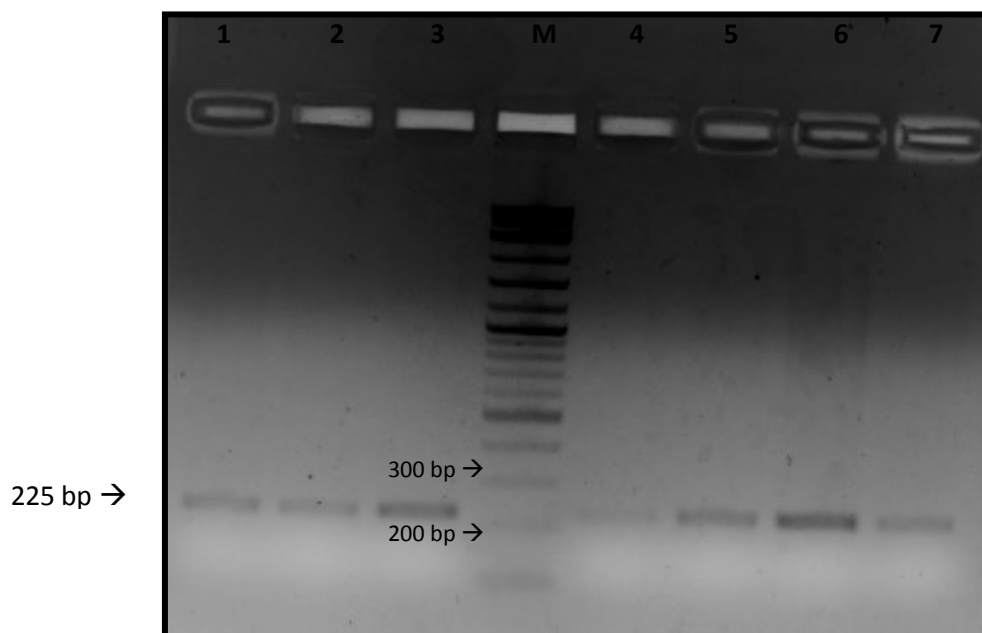


Εικόνα 19. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των προϊόντων που ενισχύθηκαν μέσω PCR για την περιοχή που περιλαμβάνει το κωδικόνιο 61 του γονιδίου NRAS. **Διαδρομή M:** δείκτης μοριακών βαρών, 2- log DNA Ladder. **Διαδρομές 1-4:** PCR προϊόντα των δειγμάτων 44,49,50 και 51. **Διαδρομή 5:** Αρνητικός μάρτυρας ελέγχου της PCR.

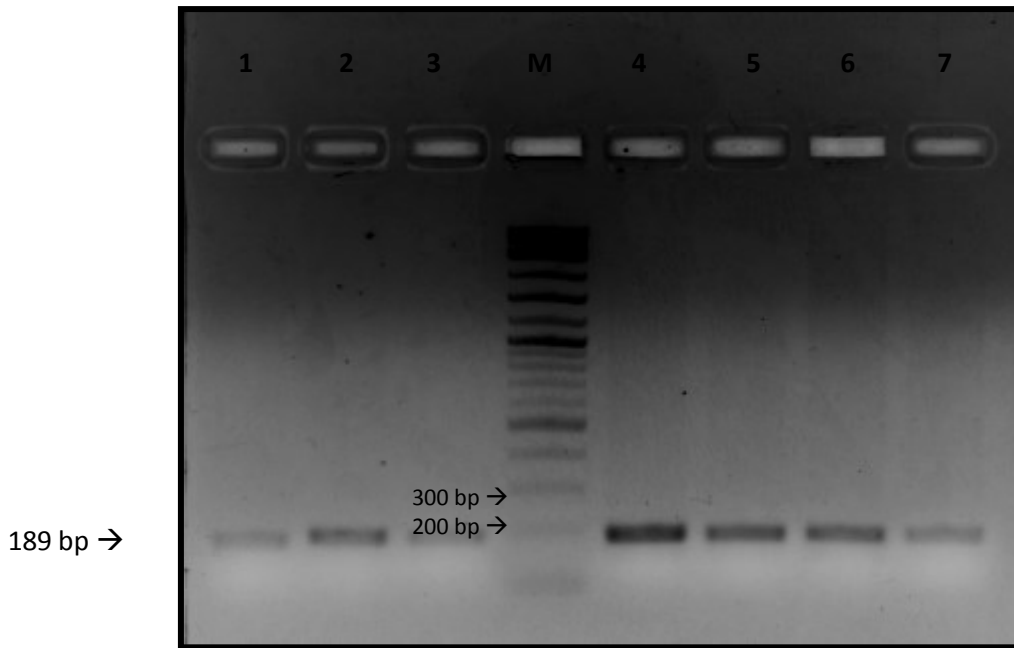
3.2. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR είναι απαραίτητος για να διαχωριστεί το ενισχυμένο προϊόν που μας ενδιαφέρει από όλα τα υπόλοιπα συστατικά της PCR, και κυρίως από τους εκκινητές και τα διμερή αυτών. Τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν για να πραγματοποιηθεί η ποσοτικοποίησή τους πριν σταλούν για αλληλούχιση.

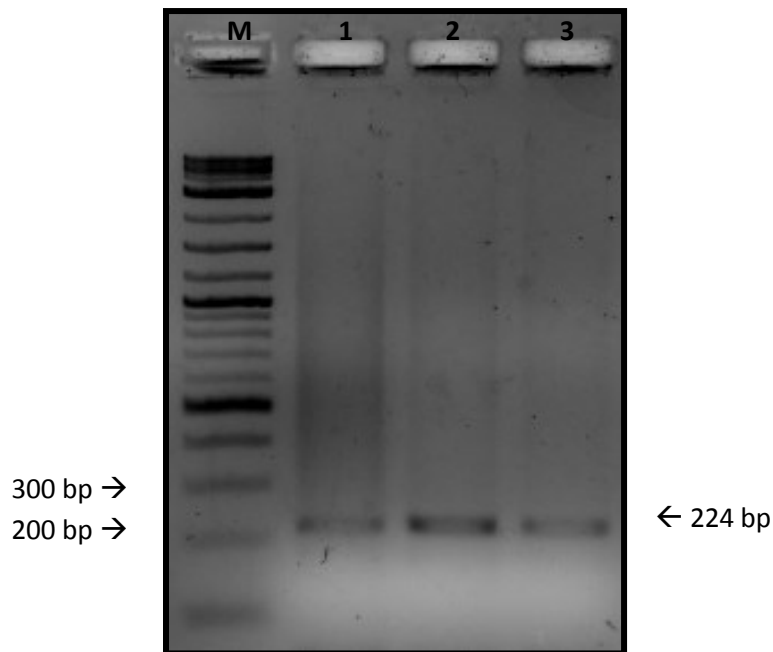
Στις εικόνες 20-23 εμφανίζονται ενδεικτικά τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR, για τα υπό μελέτη γονίδια.



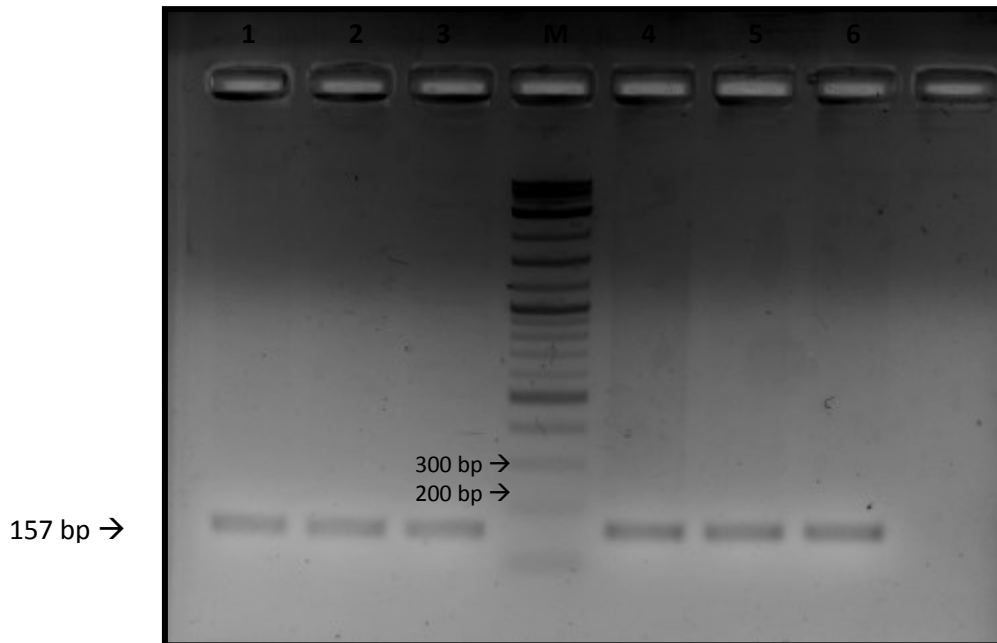
Εικόνα 20: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των καθαρισμένων προϊόντων που ενισχύθηκαν μέσω PCR για την περιοχή που περιλαμβάνει τα κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου HRAS. **Διαδρομή M:** δείκτης μοριακών βαρών, 2- log DNA Ladder. **Διαδρομές 1-7:** Καθαρισμένα προϊόντα ενίσχυσης του γενωμικού DNA των δειγμάτων 34-40.



Εικόνα 21: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 2% των καθαρισμένων προϊόντων που ενισχύθηκαν μέσω PCR για την περιοχή που περιλαμβάνει το κωδικόνιο 61 του γονιδίου HRAS. **Διαδρομή M:** δείκτης μοριακών βαρών, 2- log DNA Ladder. **Διαδρομές 1-7:** Καθαρισμένα προϊόντα ενίσχυσης του γενωμικού DNA των δειγμάτων 34-39 και 43.



Εικόνα 22: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 2% των καθαρισμένων προϊόντων που ενισχύθηκαν μέσω PCR για την περιοχή που περιλαμβάνει τα κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου NRAS. **Διαδρομή M:** δείκτης μοριακών βαρών, 2- log DNA Ladder. **Διαδρομές 1-3:** Καθαρισμένα προϊόντα ενίσχυσης του γενωμικού DNA των δειγμάτων 43,45 και 46.

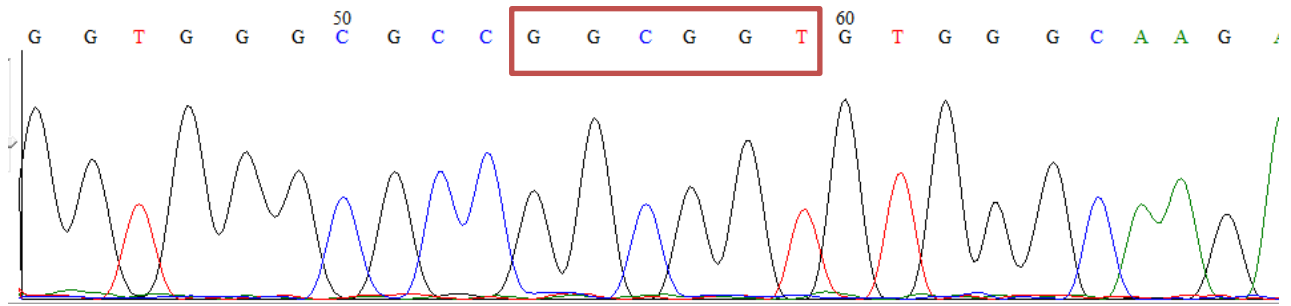


Εικόνα 23: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 2% των καθαρισμένων προϊόντων που ενισχύθηκαν μέσω PCR για την περιοχή που περιλαμβάνει το κωδικόνιο 61 του γονιδίου NRAS. **Διαδρομή M:** δείκτης μοριακών βαρών, 2- log DNA Ladder. **Διαδρομές 1-6:** Καθαρισμένα προϊόντα ενίσχυσης του γενωμικού DNA των δειγμάτων 34-39.

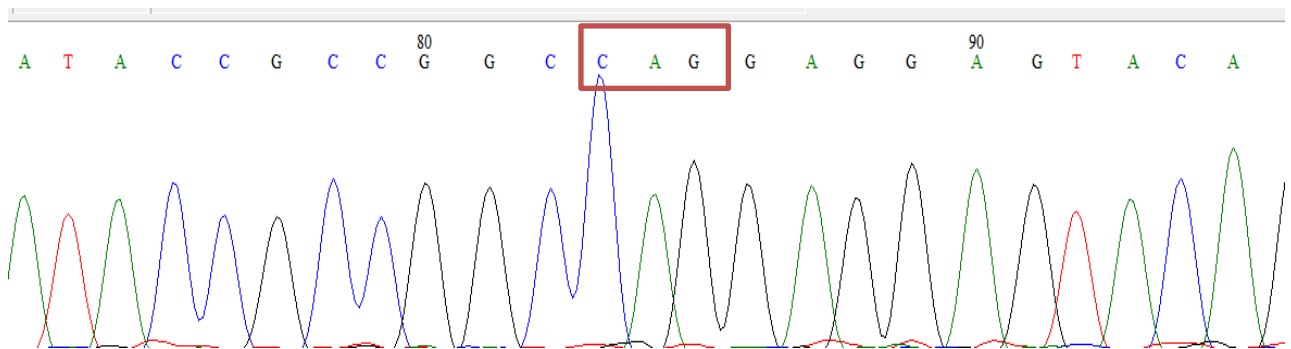
3.3. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Τα αποτελέσματα των αλληλουχίσεων αναλύθηκαν με τη βοήθεια του εξειδικευμένου λογισμικού προγράμματος BioEdit και απεικονίζονται υπό τη μορφή χρωματογραφημάτων. Η αλληλούχιση των δειγμάτων έδειξε 97-100% ομολογία με τις υπό μελέτη περιοχές μετά από ευθυγράμμιση με το πρόγραμμα BLAST του NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Η αλληλούχιση κάποιων δειγμάτων χρειάστηκε να επαναληφθεί περισσότερο από δύο φορές για να διαπιστωθεί με βεβαιότητα η ύπαρξη ή απουσία μετάλλαξης στα υπό μελέτη κωδικόνια.

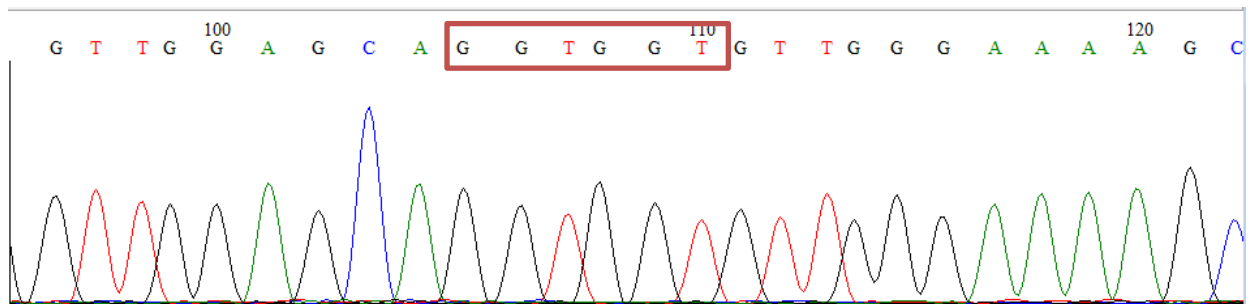
Οι εικόνες 24-27 εστιάζονται στις περιοχές του γονιδίου HRAS που περιλαμβάνουν τα κωδικόνια 12 (αλληλουχία GGC), 13 (αλληλουχία GGT) και 61 (αλληλουχία CAG) και στις περιοχές του γονιδίου NRAS που περιλαμβάνουν τα κωδικόνια 12 (αλληλουχία GGT), 13 (αλληλουχία GGT) και 61 (αλληλουχία CAA).



Εικόνα 24: Χρωματογράφημα μιας περιοχής του γονιδίου HRAS για το δείγμα 47. Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση των κωδικονίων 12 (η αλληλουχία GGC δηλώνει την απουσία μετάλλαξης) και 13 (η αλληλουχία GGT δηλώνει την απουσία μετάλλαξης).



Εικόνα 25: Χρωματογράφημα μιας περιοχής του γονιδίου HRAS για το δείγμα 34. Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση του κωδικονίου 61 (η αλληλουχία CAG δηλώνει την απουσία μετάλλαξης).



Εικόνα 26: Χρωματογράφημα μιας περιοχής του γονιδίου NRAS για το δείγμα 42. Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση των κωδικονίων 12 (η αλληλουχία GGT δηλώνει την απουσία μετάλλαξης) και 13 (η αλληλουχία GGT δηλώνει την απουσία μετάλλαξης).



Εικόνα 27: Χρωματογράφημα μιας περιοχής του γονιδίου NRAS για το δείγμα 40 Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση του κωδικονίου 61 (η αλληλουχία CAA δηλώνει την απουσία μετάλλαξης).

Η εξέταση των χρωματογραφημάτων έδειξε ότι δεν υπήρξε καμία μετάλλαξη στα κωδικόνια 12, 13 και 61 των γονιδίων HRAS και NRAS σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς είναι η πιο κοινή ενδοκρινική κακοήθεια και η συχνότητά του αυξάνεται καθημερινά παγκοσμίως. Πολλές είναι οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί γύρω από τον καρκίνο του θυρεοειδούς με σκοπό την αποσαφήνιση των χαρακτηριστικών του και των μοριακών μονοπατιών που είναι υπεύθυνα για την εμφάνισή του. Μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF (μετάλλαξη V600E) καθώς και στα κωδικόνια 12, 13 και 61 των γονιδίων RAS (HRAS, KRAS, NRAS) προκαλούν ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAP κινασών η οποία, με τη σειρά της, οδηγεί σε καρκινογένεση. Επιπροσθέτως, αναδιατάξεις RET/PTC καθώς και αναδιατάξεις PAX8/PPARγ είναι γενετικές αλλαγές που μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση καρκίνου του θυρεοειδούς.

Τέσσερα είναι τα κύρια είδη καρκίνου του θυρεοειδούς: θηλώδης, θυλακιώδης, μυελοειδής και αναπλαστικός. Ωστόσο, υπάρχουν και υπότυποι αυτών με τον θυλακιώδη υπότυπο του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς να εμφανίζεται με τη μεγαλύτερη συχνότητα. Η διεθνής βιβλιογραφία έχει συσχετίσει σε κάποιο βαθμό, τον τύπο του καρκίνου με την μετάλλαξη που προκαλεί την εμφάνισή του. Σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια HRAS, KRAS και NRAS έχουν περιγραφεί σε διάφορες μελέτες (Karga et al. 1991) με συχνότητα γύρω στο 20-30% σε θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς (PTC) και κυρίως σε καρκινώματα που φέρουν τον θυλακιώδη υπότυπο. Αντίθετα, οι λίγες μελέτες που έχουν διεξαχθεί στο μυελοειδή τύπο καρκίνου του θυρεοειδούς (MTC) δεν έχουν ανιχνεύσει μεγάλα ποσοστά μεταλλάξεων των RAS γονιδίων (Bockhorn et al. 2000, Moley et al. 1991). Ενώ στους περισσότερους τύπους καρκίνου κυριαρχούν οι μεταλλάξεις KRAS (κωδικόνια 12 και 13) όσον αφορά τον καρκίνο του θυρεοειδούς, οι μεταλλάξεις RAS που εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα είναι οι μεταλλάξεις NRAS και HRAS (και κυρίως οι μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 61) και ακολουθούν τέλος οι μεταλλάξεις KRAS (Nikiforov, 2011a).

Η μετάλλαξη στο κωδικόνιο 600 του γονιδίου BRAF αποτελεί την πιο κοινή γενετική αλλαγή που εντοπίζεται σε θηλώδη τύπο καρκίνου του θυρεοειδούς, σε ποσοστό 40-45% (Nikiforov, 2011b). Παρόλα αυτά, η μετάλλαξη V600E εντοπίζεται και σε άλλους τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς, κυρίως σε υπότυπους του θηλώδους τύπου και σε ελάχιστα διαφοροποιημένα ή μη διαφοροποιημένα καρκινώματα θηλώδους προέλευσης. Ωστόσο, σπάνια έχει εντοπιστεί η παραπάνω μετάλλαξη σε θυλακιώδη τύπο καρκίνου του θυρεοειδούς (Grogan et al. 2010).

Στην βιβλιογραφία υπάρχει μόνο μία μελέτη πάνω στον καρκίνο του θυρεοειδούς σε δείγματα του ελληνικού πληθυσμού (Goutas et al. 2008). Η μελέτη αυτή εστιάστηκε στη μετάλλαξη BRAF^{V600E} και στη μετάλλαξη KRAS (κωδικόνιο 12) σε δείγματα θηλώδους και μυελοειδούς τύπου καρκίνου του θυρεοειδούς. Τα

αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν πως η μετάλλαξη BRAF^{V600E} εντοπίστηκε με συχνότητα 27,3% στο θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς και σε συχνότητα 68,2% στον μυελοειδή τύπο. Όσον αφορά τη μετάλλαξη KRAS στο κωδικόνιο 12, αυτή εμφανίστηκε σε ποσοστό 54,5% στο θηλώδη τύπο και σε ποσοστό 40,9% στο μυελοειδή καρκίνο του θυρεοειδούς. Τα αποτελέσματα σχετικά με το θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς συμφωνούν με διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς και σε πληθυσμούς της Βόρειας Αμερικής (Zhu et al. 2003, Kimura et al. 2003) όμως έρχονται σε αντίθεση με μία μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί σε Ιταλικούς πληθυσμούς (Carta et al. 2006). Ωστόσο, τα αποτελέσματα σχετικά με το μυελοειδή καρκίνο του θυρεοειδούς έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες (Bockhorn et al. 2000, Moley et al. 1991) στις οποίες η συχνότητα της μετάλλαξης KRAS ήταν πολύ μικρότερη. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και με τη μετάλλαξη V600E στο γονίδιο BRAF καθώς έχει σημειωθεί μεγάλη συχνότητα εμφάνισής του σε θηλώδη καρκινώματα, γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα της μελέτης των Goutas et al., ενώ δεν έχουν σημειωθεί σημαντικές συχνότητες της μετάλλαξης V600E σε μυελοειδή καρκινώματα. Οι αποκλίσεις αυτές οφείλονται πιθανόν, σύμφωνα με τον συγγραφέα, σε γενετικούς και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της συσχέτισης των μεταλλάξεων στα γονίδια HRAS και NRAS και συγκεκριμένα στα κωδικόνια 12, 13 και 61 με τους διαφορετικούς τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό. Η έρευνα πραγματοποιήθηκε σε 18 δείγματα ασθενών που προήλθαν από το Στρατιωτικό Νοσοκομείο ΝΙΜΙΤΣ, της Αθήνας. Τα αποτελέσματα της έρευνας δεν ταυτοποίησαν καμία μετάλλαξη στα παραπάνω δείγματα. Η απόκλιση αυτή από τα ευρήματα της παγκόσμιας βιβλιογραφίας οφείλεται κυρίως στον πολύ μικρό αριθμό δειγμάτων που αναλύθηκαν, γεγονός που δεν επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι η παρούσα μελέτη αποτελεί ένα τμήμα μιας ευρύτερης έρευνας που αφορά στην ταυτοποίηση μεταλλάξεων που σχετίζονται με όλους τους διαφορετικούς τύπους του καρκίνου του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό. Με βάση το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις που έχουν παρατηρηθεί στον καρκίνο του θυρεοειδούς είναι αμοιβαία αποκλειόμενες, είναι απαραίτητο η μελέτη αυτή να επεκταθεί σε μεγαλύτερο αριθμό με όλους τους τύπους καρκινωμάτων του θυρεοειδούς, και να περιλαμβάνει την ανάλυση επιπρόσθετων μεταλλάξεων στα γονίδια BRAF και RAS (κωδικόνια 12, 13 και 61 των γονιδίων HRAS και NRAS), καθώς και πιθανών χρωμοσωμικών αναδιατάξεων (RET/PTC και PAX8/PPARγ αντίστοιχα).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bae, J. S., Chai, K.S., Jeon, S., Kim, Y., Lee, S., Lee, Y. S., Jung, C. K., (2014). Impact of NRAS mutations on the diagnosis of follicular neoplasm of the thyroid. *Hindawi publishing corporation*, **2014**: 1-7.
- Basolo, F., Pisaturo, F., Pollina, L. E., et al, (2000). N-ras mutation in poorly differentiated thyroid carcinomas: correlation with bone metastases and inverse correlation to thyroglobulin expression. *Thyroid*, **10**(1): 19-23.
- Bockhorn, M., Frilling, A., Kalinin, V., Schrader, S., Broelsch, C. E. (2000). Absence of H- and K-ras oncogene mutations in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **108**: 49-53.
- Bonham, J. A., Ragan, E., Drotar, A. M., Elkins, M. K., (2015). Biochemistry laboratory manual. *Metropolitan State University of Denver*, 26-30.
- Carta, C., Moretti, S., Passeri, L., Barbi, F., Avenia, N., Cavaliere, A., Monacelli, M., Macchiarulo, A., Santeusano, F., Tartaglia, M., Puxeddu, E. (2006). Genotyping of an Italian papillary thyroid carcinoma cohort revealed high prevalence of BRAF mutations, absence of RAS mutations and allowed the detection of a new mutation of BRAF oncoprotein (BRAFFV599Ins). *Clin Endocrinol*, **64**: 105-109.
- Chen, R., Li, C., Pei, X., Wang, Q., Yin, X., Xie, T., (2014). Isolation an aldehyde dehydrogenase gene from metagenomics based on semi-nest touch-down RCR. *Indian J Microbiol*, **54**(1): 74-79.
- Choski, Y. N., Jahnke, D. G., Hilaire, St. C., Shelby, M., (2003). Role of thyroid hormones in human and laboratory animal reproductive health. *Birth Defects Research (Part B)*, **68**: 479-491.
- Clark, M. J., Switzer, L. R., (1977). Experimental Biochemistry. *W. H. Freeman and Company*, 2nd edition: 40-41, 44-45.
- Hara, H., Fulton, N., Yashiro, T., Ito, K., DeGroot, L.J., Kaplan, EL., (1994). N-ras mutation: an independent prognostic factor for aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Surgery*, **116**(6):1010-1016.
- Hecker, H. K., Roux, H.K., (1996). High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *BioTechniques*, **20**: 478-485.
- Fawcett, D., Jensch, R. (2002). Bloom & Fawcett's Concise Histology. *Arnold Publishers*: 257-258.
- Fallahi, P., Giannini, R., Miccoli, P., Antonelli, A., Basolo, F., (2014). Molecular diagnosis of fine needle aspiration for the presurgical screening of thyroid nodules. *Current Genomics*, **15**: 171-177.

- Goutas, N., Vlachodimitropoulos, D., Bouka, M., Lazaris, A. C., Nasioulas, G., Gazouli, M. (2008). BRAF and K-RAS Mutation in a Greek Papillary and Medullary Thyroid Carcinoma Cohort. *Anticancer Research*, **28**: 305-308.
- Grogan, H. R., Mitmaker, J. E., Clark, H. O. (2010). The Evolution of Biomarkers in Thyroid Cancer-From Mass Screening to a Personalized Biosignature. *Cancers*, **2**: 885-912.
- Guerra, A., Carrano, M., Angrisani, E., Puzziello, A., Izzo, G., Di Crescenzo, V., Vatrella, A., Vitale, M. (2014). Detection of RAS mutation by pyrosequencing in thyroid cytology samples. *International Journal of Surgery*, **12**: S91-S94.
- Jang, E. K., Song, D. E., Sim, S. Y., Kwan, H., Choi, Y. M., Jeon, M. J., Han, J. M., Kim, W. G., Kim, T. Y., Shong, Y. K., Kim, W. B., (2014). NRAS codon 61 mutation is associated with distant metastasis in patients with follicular thyroid carcinoma. *Thyroid*, **24**: 1275-1281.
- Karga, H., Lee, J. K., Vickery Jr, A. L., Thor, A., Gaz, R. D., Jameson, J. L. (1991). Ras oncogene mutations in benign and malignant thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab*, **73**(4): 832-836.
- Kimura, E. T., Nikiforova, M. N., Zhu, Z., Knauf, J. A., Nikiforov, Y. E., Fagin, J. A. (2003). High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res*, **63**(7): 1454-1457.
- Korbie, J. D., Mattick S. J., (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature protocols*, **3**: 1452-1456.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*, **62**: 1-5.
- Liebner, A. D., Shah, H. M. (2011). Thyroid cancer: pathogenesis and targeted therapy. *Ther Adv Endocrinol Metab*, **2**(5): 173-195.
- Lloyd, R. V., Buehler, D., Khanafshar, E. (2011). Papillary Thyroid Carcinoma Variants. *Head and Neck Pathol*, **5**: 51-56.
- Miccoli, P. (2014). Application of Molecular Diagnostics to the Evaluation of the Surgical Approach to Thyroid Cancer. *Current Genomics*, **15**: 184-189.
- Miller, M. S., Miller, L. D. (2012). RAS Mutations and oncogenesis: Not all RAS mutations are created equally. *Front Genet*, **2**: 100.
- Moley, J. F., Brother, M. B., Wells, S. A., Spengler, B.A., Biedler, J. L., Brodeur, G. M., (1991). Low frequency of ras gene mutations in neuroblastomas, pheochromocytomas, and medullary thyroid cancers. *Cancer Res*, **51**: 1596-1599.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51**(1): 263-273.

- Nikiforov, E. Y., (2011a). Molecular analysis of thyroid tumors. *Modern Pathology*, **24**: S34-S43.
- Nikiforov, E. Y., (2011b). Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Arch Pathol Lab Med*, **135**: 569-577.
- Nikiforov, Y. E., Yip, L., Nikiforova, M. N. (2013). New strategies in diagnosing cancer in thyroid nodules: impact of molecular markers. *Clin Cancer Res*, **19**(9): 2283-2288.
- Nikiforova, M. N., Lynch, R. A., Biddinger, P. W., Alexander, E. K., Dorn 2nd, G. W., Tallini, G., Kroll, T. G., Nikiforov, Y. E., (2003). RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, **88**(5): 2318-2326.
- Nikiforova, M. N., Nikiforov, Y. E. (2008). Molecular genetics of thyroid cancer: implications for diagnosis, treatment and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn*, **8**(1): 83-95.
- Nikiforova, M. N., Nikiforov, Y. E. (2009). Molecular diagnostics and predictors in thyroid cancer. *Thyroid*, **19**: 1351-1361.
- Radkay, L. A., Chiosea, S. I., Seethala, R. R., Hodak, S. P., LeBeau, S. O., Yip, L., McCoy, K. L., Carty, S. E., Schoedel, K. E., Nikiforova, M. N., Nikiforov, Y. E., Otori, N. P. (2014). Thyroid Nodules With KRAS Mutations Are Different From Nodules With NRAS and HRAS Mutations With Regard to Cytopathologic and Histopathologic Outcome Characteristics. *Cancer Cytopathol*, **122**(12): 873-882.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K., Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**(4839): 487-491.
- Samnbrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory press*.
- Schneider, F. D., Chen, H., (2013). New developments in the diagnosis and treatment of thyroid cancer. *CA Cancer J Clin*, **63**(6): 373-394.
- Schulten, H. J., Al-Maghrabi, J., Al-Ghamdi, K., Salama, S., Al-Muhayawi, S., Chaudhary, A., Hamouri, O., Abuzenadah, A., Gari, M., Al-Qahtani, M., (2011). Mutational screening of RET, HRAS, KRAS, NRAS, BRAF, AKT1 and CTNNB1 in medullary thyroid carcinoma. *Anticancer Research*, **31**: 4179-4184.
- Scopa, D. C. (2004). Histopathology of thyroid tumors. An Overview. *Hormones*, **3**(2): 100-110.
- Sensi, M., Nicolini, G., Petti, C., Bersani, I., Lozupone, F., Molla, A., Vegetti, C., Nonaka, D., Mortarini, R., Parmiani, G., Fais S., Anichini A., (2006). Mutually exclusive NRAS^{Q61R} and BRAF^{V600E} mutations at the single-cell level in the same human melanoma. *Oncogene*, **25**: 3357-3364.
- Watson, J. D., Caudy, A. A., Myers, R. M., Witkowski, J. A. (2007). Recombinant DNA (Genes and Genomes – a short course). *W. H. Freeman and Company*, New York and Basingstoke, 3rd edition: 103.

Xing, M. (2013). Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer*, **13**(3): 184-199.

Yen, M. P., (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological reviews*,**81**(3): 1097-1142.

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**(1): 71-77.

Zumarraga, J. M., Meikle, V., Bernardelli, A., Abdala, A., Tarabla, H., Romano, J. M., Cataldi, A., (2005) Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of Mycobacterium bovis detection. *J Vet Diagn Invest*, **17**:232–238.

Ελληνική Βιβλιογραφία

Σμοκοβίτης, Α., (2007). Φυσιολογία. *Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη α.ε.*, 5^η έκδοση: 342, 348-350, 376-387, 394-395

Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία

[National Center for Biotechnology Information](#), NCBI. (2015). HRAS Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog [*Homo sapiens* (human)]. [U.S. National Library of Medicine](#) 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. (Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3265>).

[National Center for Biotechnology Information](#), NCBI. (2015). NRAS neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog [*Homo sapiens* (human)]. [U.S. National Library of Medicine](#) 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. (Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4893>).

[National Center for Biotechnology Information](#), NCBI. Polymerase chain reaction (PCR). [U.S. National Library of Medicine](#) 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. (Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>)

SEER - Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. (2015). SEER Stat Fact Statistics: Thyroid Cancer, Review 1975-2009. National Cancer Institute. Bethesda (MD). (Available from: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>)

Society of Mucosal Immunology. (2014). (Available from: <http://www.socmucimm.org/pcr-polymerase-chain-reaction>)