



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



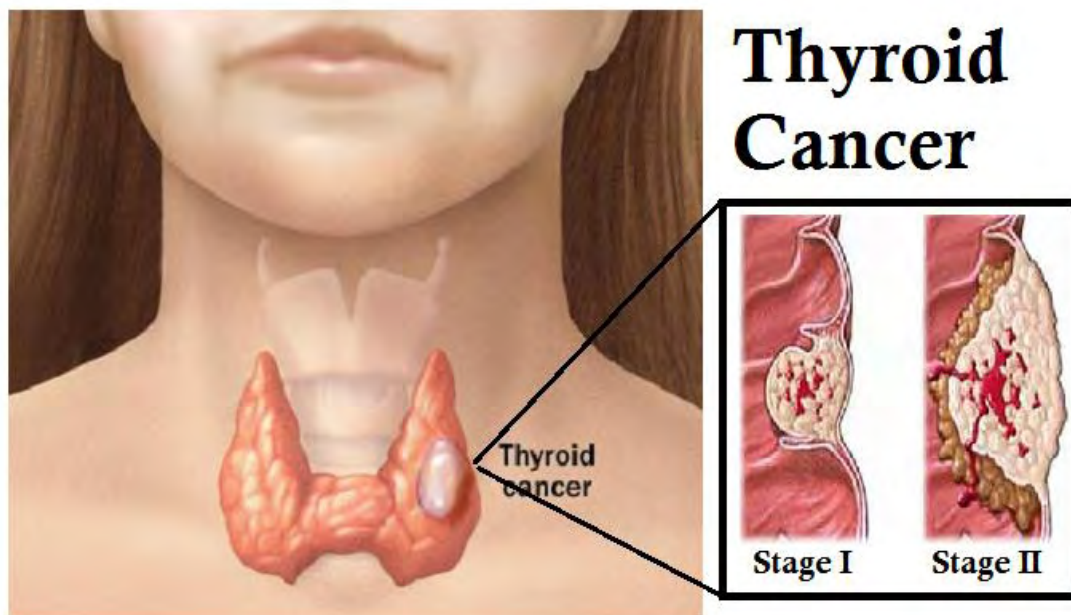
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

---

Θέμα Διπλωματικής Εργασίας:

*Μελέτη των μεταλλάξεων των γονιδίων BRAF και KRAS στον καρκίνο του θυροειδούς στον ελληνικό πληθυσμό.*



Μανωλακέλλη Αικατερίνη

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Λιαδάκη Καλλιόπη**

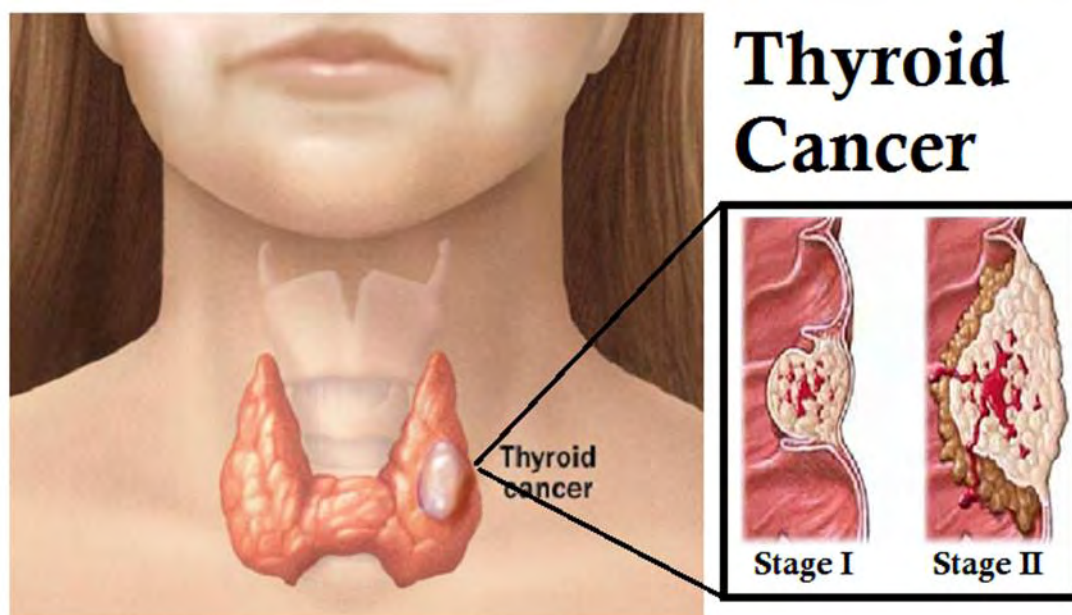
Επίκουρη Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας  
- Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΛΑΡΙΣΑ 2017

Μελέτη των μεταλλάξεων των γονιδίων *BRAF* και *KRAS* στον καρκίνο του θυροειδούς στον ελληνικό πληθυσμό.

*Μελέτη των μεταλλάξεων των γονιδίων *BRAF* και *KRAS* στον καρκίνο του θυροειδούς στον ελληνικό πληθυσμό.*

*Analysis of *BRAF* and *KRAS* mutations in thyroid cancer in the Greek population*



Εικόνα εξωφύλλου: Απεικόνιση του καρκίνου του θυροειδούς αδένος σε αρχικό στάδιο και σε στάδιο εξάπλωσης (Liane Clores, RN, <http://nursingfile.com/nursing-care-plan/nursing-interventions/nursing-interventions-for-thyroid-cancer.html>)

Μελέτη των μεταλλάξεων των γονιδίων *BRAF* και *KRAS* στον καρκίνο του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό.

Υπεύθυνη καθηγήτρια: **Λιαδάκη Καλλιόπη**, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

### **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.

**Μαμούρης Ζήσης**, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

---

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Αντικείμενο μελέτης της είναι η μοριακή ανάλυση των γονιδίων BRAF και KRAS σε διαφορετικούς τύπους καρκινωμάτων του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω πρωτίστως την κυρία Λιαδάκη Καλλιόπη, επίκουρο καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, αρχικά για την ανάθεση της παρούσας εργασίας αλλά κυρίως και για την εμπιστοσύνη και την καθοδήγηση που μου παρείχε για τη καλύτερη βελτίωση του κειμένου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη του εργαστήριου της Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για τη φιλοξενία αλλά και το εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας για τη παροχή απαραίτητου εξοπλισμού για την εργασία.

Μανωλακέλλη Αικατερίνη

Λάρισα, 2017

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>9</b>
<b>1. Εισαγωγή</b>	<b>10</b>
<b>1.1. Θυρεοειδής Αδένας</b>	<b>10</b>
<b>1.1.1. Φυσιολογία Θυρεοειδούς Αδένα</b>	<b>11</b>
<b>1.1.1.1. Θυρεοειδείς ορμόνες</b>	<b>11</b>
<b>1.1.1.2. Παραγωγή θυρεοειδών ορμονών</b>	<b>11</b>
<b>1.1.1.3. Λειτουργίες Θυρεοειδών Ορμονών</b>	<b>12</b>
<b>1.1.1.4. Ρύθμιση του θυρεοειδούς αδένα</b>	<b>13</b>
<b>1.1.2. Διαταραχές του Θυρεοειδούς Αδένα</b>	<b>14</b>
<b>1.2. Καρκίνος Θυρεοειδούς Αδένα</b>	<b>15</b>
<b>1.2.1. Γενικά</b>	<b>15</b>
<b>1.2.2. Ιστολογική Ταξινόμηση</b>	<b>16</b>
<b>1.2.2.1. Θηλώδης Καρκίνος Θυρεοειδούς</b>	<b>17</b>
<b>1.2.2.2. Θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς</b>	<b>18</b>
<b>1.2.2.3. Μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς</b>	<b>20</b>
<b>1.2.2.4. Αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς</b>	<b>21</b>
<b>1.3. Σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP κινασών</b>	<b>22</b>
<b>1.3.1. Πρωτεΐνη BRAF</b>	<b>24</b>
<b>1.3.2. Πρωτεΐνες RAS</b>	<b>25</b>
<b>1.3.3. Διάγνωση και θεραπεία του θυρεοειδούς καρκίνου</b>	<b>26</b>
<b>1.3.4. Μοριακή διάγνωση του θυρεοειδούς καρκίνου</b>	<b>28</b>

<b>1.3.4.1. Γενικά</b>	28
<b>1.3.4.2. Μεταλλάξεις BRAF</b>	29
<b>1.3.4.3. Μεταλλάξεις RAS</b>	30
<b>1.3.4.4. Αναδιατάξεις RET/PTC</b>	31
<b>1.3.4.5. Αναδιατάξεις PAX8/PPARγ</b>	32
<b>Σκοπός Εργασίας</b>	33
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	34
<b>2.1. Υλικά</b>	34
<b>2.1.1. Δείγματα</b>	34
<b>2.1.2. Χημικά Αντιδραστήρια</b>	34
<b>2.2. Μέθοδοι</b>	35
<b>2.2.1. Απομόνωση DNA από βιοψίες ιστών</b>	35
<b>2.2.1.1. Αντιδραστήρια- Διαλύματα</b>	35
<b>2.2.1.2. Πρωτόκολλο Απομόνωσης</b>	36
<b>2.2.2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ</b>	38
<b>2.2.2.1. Αντιδραστήρια - Διαλύματα</b>	38
<b>2.2.2.2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ</b>	39
<b>2.2.3. Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης</b>	40
<b>2.2.4. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR</b>	46
<b>2.2.5. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR</b>	47
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	48
<b>3.1. Ενίσχυση της υπο μελέτη περιοχής των γονιδίων Braf και Kras με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης</b>	48
<b>3.2. Καθαρισμός προϊόντων της PCR</b>	49

Μελέτη των μεταλλάξεων των γονιδίων *BRAF* και *KRAS* στον καρκίνο του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό.

<b>3.3. Αλληλούχιση των προϊόντων της PCR</b>	50
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	55
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	57

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αποτελεί την πιο κοινή ενδοκρινή κακοήθεια και η συχνότητά του αυξάνεται ταχύτατα παγκοσμίως τις τελευταίες δεκαετίες. Οι κύριοι ιστολογικοί τύποι του καρκίνου είναι ο θηλώδης, ο θυλακιώδης, ο μυελοειδής, ο αναπλαστικός τύπος καρκίνου του θυρεοειδούς, οι οποίοι παρουσιάζουν διαφορετική κυτταρική προέλευση, χαρακτηριστικά και πρόγνωση, ενώ έχουν παρατηρηθεί και παραλλαγές αυτών, με την πιο κοινή να είναι ο θυλακιώδης υπότυπος του θηλώδους καρκίνου. Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες σχετικά με την παθογένεση των διαφόρων τύπων καρκίνου του θυρεοειδούς. Τα κυριότερα αποτελέσματα των ερευνών είναι η εύρεση γενετικών μεταλλαγών και ιδίως εκείνων που οδηγούν στην ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης MAP κινασών. Οι μεταλλάξεις αυτές εντοπίστηκαν κυρίως στα γονίδια BRAF και RAS (HRAS, KRAS και NRAS), αλλά παρατηρήθηκαν και οι αναδιατάξεις RET/PTC και RAX8/PPARγ. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί η ύπαρξη σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων BRAF (κωδικόνιο 600) και KRAS (κωδικόνια 12, 13 και 61) σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό. Μελετήθηκαν συνολικά 19 δείγματα ασθενών και η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε την απομόνωση γενωμικού DNA από τις βιοψίες ιστών εγκλεισμένων σε παραφίνη, την ενίσχυση των ειδικών περιοχών του κάθε γονιδίου με την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) και τέλος, την αλληλούχιση των προϊόντων της PCR. Στη συγκεκριμένη εργασία ταυτοποιήθηκαν μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 600 (Val → Glu) του γονιδίου BRAF σε 4 από τα 19 δείγματα, ενώ δεν ταυτοποιήθηκαν μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12, 13 και 61 του γονιδίου KRAS. Εντούτοις, για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, κρίνεται απαραίτητο η μελέτη να επεκταθεί σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και να περιλαμβάνει την ανάλυση επιπρόσθετων μεταλλάξεων στα γονίδια HRAS και NRAS καθώς και χρωμοσωμικών αναδιατάξεων.



## **ABSTRACT**

---

Thyroid cancer is a common endocrine malignancy that has rapidly increased in global incidence in recent decades. The major types of thyroid cancer are the papillary type, the follicular type, the medullary type and the anaplastic one, each with different cellular origins, characteristics and prognoses. Furthermore, there are additional variants among the major types of thyroid cancer, the most common among them being the follicular variant of papillary thyroid cancer. Recent studies into the molecular pathogenesis of thyroid cancer have identified molecular alterations, especially ones which result in the activation of MAP kinase signaling pathway. These mutations include point mutations of the BRAF and RAS (HRAS, KRAS and NRAS) genes, as well as RET/PTC or PAX8/PPAR $\gamma$  rearrangements. The purpose of this study is to investigate the presence of point mutations of the BRAF gene (codon 600) and the KRAS gene (codons 12, 13 and 61) in different thyroid cancer types in the Greek population. Overall, 19 samples derived from patients with thyroid cancer were examined. The experimental procedure included the isolation of genomic DNA from paraffin-embedded tissue biopsies and the amplification of the specific regions of interest using Polymerase Chain Reaction (PCR) followed by sequencing of the PCR products. We identified mutations at codon 600 (Val  $\rightarrow$  Glu) of the BRAF gene at 4 out of 19 samples, but no mutations were identified at codons 12, 13 and 61 of the KRAS gene. However, in order to be able to draw safe conclusions, this study must be extended to include additional mutations of the HRAS and NRAS genes, as well as chromosomal re-arrangements in a larger sample population.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

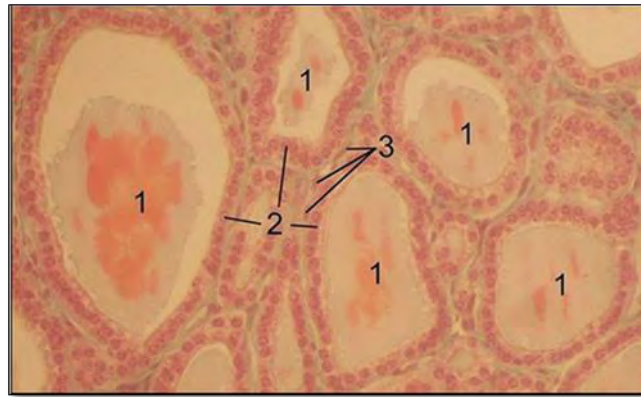
## 1.1. ΘΥΡΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑΣ

Το ενδοκρινικό σύστημα ρυθμίζει πολλές από τις δραστηριότητες του οργανισμού. Συγκροτείται από διάφορους αδένες, οι οποίοι απελευθερώνουν στο αίμα, ουσίες που επηρεάζουν τη λειτουργία ιστών-στόχων που εντοπίζονται σε διάφορα σημεία του σώματος. Στο ενδοκρινικό σύστημα περιλαμβάνονται ο υποθάλαμος, η υπόφυση, ο θυροειδής αδένας, τα επινεφρίδια, οι γονάδες, τα νησίδια του Langerhans στο πάγκρεας και οι παραθυροειδείς αδένες.

Ο θυροειδής αδένας είναι ένας από τους σημαντικότερους αδένες του ενδοκρινικού συστήματος. Στα περισσότερα θηλαστικά, ο θυροειδής αδένας (thyroid gland) βρίσκεται στο κάτω μέρος του τραχήλου, μπροστά και στα πλάγια της αρχής της τραχείας αρτηρίας, σε σχήμα «πεταλούδας». Το βάρος του κυμαίνεται από 25 έως 30 gr. Αποτελείται από δύο πλάγιους λοβούς που συνδέονται με μία λωρίδα θυροειδικού ιστού, που αποκαλείται ισθμός. Σε μερικές περιπτώσεις, υπάρχει και τρίτος λοβός, ο πυραμοειδής, ο οποίος θεωρείται υπόλειμμα του θυροεγλωσσικού πόρου.

Η βασική μορφολογική μονάδα του θυροειδούς αδένος είναι το θυροειδές κυστίδιο ή θυλάκιο (thyroid follicle). Το θυροειδές θυλάκιο περιέχει μία κολλοειδή ουσία, που παράγεται από το επιθήλιο του και είναι απόθεμα θυροειδών ορμονών. Ο χώρος ανάμεσα από τα θυλάκια, καταλαμβάνεται από συνδετικό ιστό, που διαθέτει ένα καλά αναπτυγμένο δίκτυο αιμοφόρων αγγείων. Η ροή του αίματος στον θυροειδή αδένος είναι από τις μεγαλύτερες στον οργανισμό, αναλογικά με το μέγεθος του. Ο θυροειδής αδένος δέχεται νευρικές ίνες από το συμπαθητικό σύστημα. (Khatawkar & Awati, 2015)

Ο θυροειδής αδένος αποτελείται από δύο κύριους τύπους επιθηλιακών κυττάρων με αρκετούς υποτύπους ο καθένας: τα θυλακιώδη κύτταρα (follicular cells) και τα παραθυλακιώδη κύτταρα (parafollicular cells ή C cells) (Εικόνα 1) (Scopa et al, 2004). Από τα παραπάνω προέρχονται οι συχνότεροι όγκοι του θυροειδούς.



**Εικόνα 1:** Ιστολογία του θυρεοειδούς αδένος. 1. Τα θυρεοειδικά θυλάκια, 2. Τα θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς, 3. Τα παραθυλακιώδη κύτταρα (C cells) του θυρεοειδούς (Fawcett & Jensch, 2002).

## 1.1.1. Φυσιολογία του θυρεοειδούς αδένος

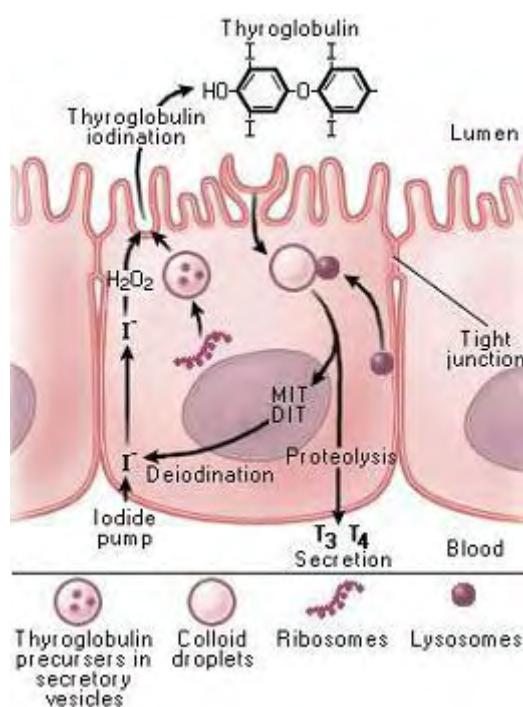
### 1.1.1.1 Θυρεοειδείς ορμόνες

Οι θυρεοειδικές ορμόνες έχουν εξαιρετικά σημαντικές αλλά και διαφορετικές δράσεις. Δρουν σχεδόν σε κάθε κύτταρο του σώματος, ενώ η μειωμένη ή αυξημένη παραγωγή τους έχουν ισχυρές επιδράσεις στον οργανισμό.

### 1.1.1.2 Παραγωγή θυρεοειδών ορμονών

Οι θυρεοειδείς ορμόνες συντίθενται από το αμινοξύ τυροσίνη. Η σύνθεση τους απαιτεί την ιωδίσωση των μορίων τυροσίνης καθώς και τον συνδυασμό ιωδιωμένων καταλοίπων τυροσίνης. Συγκεκριμένα, η πρόσληψη του ιωδίου από τον θυρεοειδή αδένος γίνεται με ενεργό μεταφορά με την δράση της αντλίας  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ΑΤΡάσης. Το ιώδιο εγκαταλείπει το θυλακοειδές κύτταρο και εισέρχεται στον αυλό του θυλακίου, όπου μετατρέπεται σε ενεργό ιώδιο από το υπεροξείδιο του υδρογόνου που παράγεται από τα μιτοχόνδρια. Η παραπάνω αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο θυρεοειδική υπεροξειδάση (thyroid peroxidase - TPO) που περιέχει αίμη. Το θυλάκιο, επίσης, εκκρίνει και μία μεγαλομοριακή γλυκοπρωτεΐνη, τη **θυρεοσφαιρίνη** (Thyroglobulin, Tg). Τα κατάλοιπα τυροσίνης της θυρεοσφαιρίνης αντιδρούν με το ενεργό ιώδιο, σχηματίζοντας μονοιωδιοτυροσίνη (Monoiodotyrosine - MIT) και διιωδοτυροσίνη (Diiiodotyrosine - DIT). Ο συνδυασμός ενός μορίου MIT και ενός μορίου DIT, οδηγεί στον σχηματισμό της **3,5,3-τριιωδοθυρονίνης** (Tri-iodothyronine- T3) ενώ η σύζευξη δύο μορίων DIT οδηγεί στο σχηματισμό της **θυροξίνης** (Tetra-iodothyronine or Thyroxine - T4) (Nussey et al., 2001).

Η ιωδιωμένη θυρεοσφαιρίνη, που περιέχει MIT, DIT, T3 και T4, αποθηκεύεται ως εξωκυτταρικό πολυπεπτίδιο στο κολλοειδές εντός του αυλού των θυλακοειδών κυττάρων. Η έκκριση των θυρεοειδών ορμονών απαιτεί την ενδοκυττάρωση της αποθηκευμένης ιωδιωμένης θυρεοσφαιρίνης η οποία ενσωματώνεται στα φαγολυσοσώματα, υποβάλλεται σε πρωτεολυτική πέψη, και μετά από την ανακατάληψη της μονοιωδιουροσίνης και της διωδοτυροσίνης, απελευθερώνονται οι θυρεοειδείς ορμόνες T3 και T4 στην κυκλοφορία του αίματος μέσω της βασικής επιφάνειας (Εικόνα 2). Η πλειοψηφία των εκκρινόμενων θυρεοειδών ορμονών είναι υπό τη μορφή της T4. Η κύρια οδός παραγωγής της T3 είναι μέσω αποϊωδίωσης του εξωτερικού δακτυλίου της T4 από δειώδινάσες της . Η δειώδινάση τύπου I βρίσκεται σε περιφερικούς ιστούς, όπως το ήπαρ και τους νεφρούς, και είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή της πλειοψηφίας της T4 σε T3 στη κυκλοφορία (Yen et al., 2001).



**Εικόνα 2:** Βιοσύνθεση θυρεοειδών ορμονών T3 και T4 ([http://fitsweb.uchc.edu/student/selectives/Luzietti/Thyroid\\_hormones.htm](http://fitsweb.uchc.edu/student/selectives/Luzietti/Thyroid_hormones.htm))

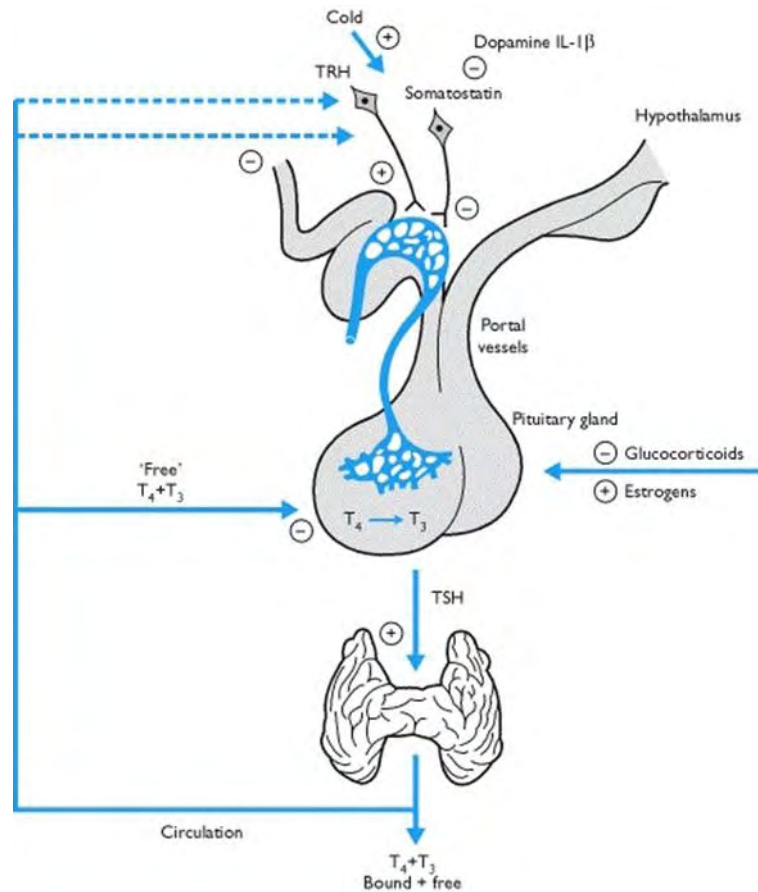
### 1.1.1.3 Λειτουργίες των θυρεοειδών ορμονών

Οι ορμόνες του θυρεοειδούς (Thyroid Hormones - TH) παίζουν κρίσιμους ρόλους στη διαφοροποίηση, την ανάπτυξη, και το μεταβολισμό. Πράγματι, οι θυρεοειδείς ορμόνες απαιτούνται για την φυσιολογική λειτουργία σχεδόν όλων των ιστών, με σημαντικές επιπτώσεις στην κατανάλωση οξυγόνου και μεταβολικό ρυθμό. Ακόμη, ρυθμίζουν τον καρδιακό ρυθμό και την συστατικότητα, την μάζα και τον όγκο των ερυθροκυττάρων, την περιφερική

αγγειοδιαστολή, τον ρυθμό αναδόμησης οστού, ενώ παρουσιάζουν επιπτώσεις και στο δέρμα και τους μαλακούς ιστούς (Page et al., 2000). Οι διαταραχές του θυρεοειδούς αδένα αποτελούν τις πιο κοινές ενδοκρινείς ασθένειες.

#### 1.1.1.4 Ρύθμιση του θυρεοειδούς αδένα

Η σύνθεση και η έκκριση θυρεοειδών ορμονών ρυθμίζεται από ένα σύστημα αρνητικής ανάδρασης που περιλαμβάνει τον υποθάλαμο, την υπόφυση και τον θυρεοειδή αδένα (Shupnik et al., 2008). Η ορμόνη απελευθέρωσης, **θυρεοτροπίνη** (Thyrotropin, TRH) είναι ένα τριπεπτίδιο που συντίθεται στον υποθάλαμο και μεταφέρεται στην πρόσθια υπόφυση όπου δεσμεύεται στους υποδοχείς της σε έναν υποπληθυσμό κυττάρων, τα οποία εκκρίνουν την **θυρεοειδοτρόπο ορμόνη** (thyroid stimulating hormone, TSH). Η θυρεοειδοτρόπος ορμόνη έχει κρίσιμο ρόλο και στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του θυρεοειδούς αδένα (Yen et. al, 2001). Η TSH είναι ο κύριος ρυθμιστής της απελευθέρωσης και της έκκρισης των ορμονών. ορμονών T3 και T4, οι οποίες δρουν σε όλα τα όργανα του σώματος. Τα υψηλά επίπεδα θυρεοειδικών ορμονών, με την σειρά τους, ανατροφοδοτούν στο επίπεδο της υπόφυσης, με αποτέλεσμα να καταστέλλουν την σύνθεση και την έκκριση της TSH (Εικόνα 3). Οι θυρεοειδικές ορμόνες είναι ο πιο σημαντικός φυσιολογικός ρυθμιστής των επιπέδων της TSH ( Shupnik et al., 2008). Η έκκριση της TSH και η ευαισθησία της στη διέγερση της TRH επηρεάζεται από την νεφρική ανεπάρκεια, την πείνα, τη στέρηση ύπνου, την κατάθλιψη και ορμόνες όπως κορτιζόλη, αυξητική ορμόνη και τα φυλετικά στεροειδή (Mullur et. al, 2014).



**Εικόνα 3:** Ρύθμιση της έκκρισης των θυρεοειδικών ορμονών T3 και T4 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28>)

### 1.1.2 Διαταραχές του θυρεοειδούς αδένα

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 την υπολειτουργία (υποθυρεοειδισμός) ή στην υπερλειτουργία (υπερθυρεοειδισμός) του.

Ο υποθυρεοειδισμός είναι η πιο συχνή διαταραχή, και προκύπτει από την ανεπάρκεια των θυρεοειδών ορμονών ή σπανιότερα από διαταραχή της δραστηριότητας τους στους ιστούς (Hallengren, 1998). Ανάλογα με τον χρόνο εμφάνισης της νόσου, διακρίνεται σε εγγενή και επίκτητη, ανάλογα με το επίπεδο ενδοκρινικής δυσλειτουργίας σε πρωτογενή και δευτερογενή, και ανάλογα με την σοβαρότητα του σε σοβαρό/κλινικό και ήπιο/υποκλινικό υποθυρεοειδισμό. Ο πρωτογενής υποθυρεοειδισμός οφείλεται σε δυσλειτουργία του θυρεοειδούς αδένα, ενώ ο δευτερογενής οφείλεται στην αποτυχία έκκρισης επαρκούς ποσότητας TSH από την υπόφυση ή της θυρεοτροπίνης από τον

υποθάλαμο. Η ανεπάρκεια της θυρεοειδής ορμόνης T3 είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση των κλινικών και βιοχημικών εκδηλώσεων του υποθυρεοειδισμού. Τα κύρια συμπτώματα του υποθυρεοειδισμού είναι ο χαμηλός μεταβολικός ρυθμός που οδηγεί στην μείωση του ενεργειακού μεταβολισμού και της παραγωγής θερμότητας συνεπώς και αύξηση του σωματικού βάρους, μειωμένη όρεξη, μη ανοχή στο κρύο και ελαφρώς χαμηλή θερμοκρασία σώματος (Kostoglou-Athanassiou, 2010).

Σε αντίθεση με τον υποθυρεοειδισμό, ο υπερθυρεοειδισμός προκαλείται από την αυξημένη συγκέντρωση θυρεοειδών ορμονών στους ιστούς, που δημιουργείται λόγω της αυξημένης σύνθεσης των ορμονών, της αυξημένης απελευθέρωσης τους ή από μία ενδογενή ή εξωγενή εξωθυρεοειδική πηγή. Οι πιο κοινές αιτίες της υπερβολικής παραγωγής των θυρεοειδών ορμονών είναι η νόσος του Graves, η τοξική βρογχοκήλη και το τοξικό αδένωμα. Ο ασθενής που πάσχει από υπερθυρεοειδισμό εμφανίζει διάφορα συμπτώματα που ποικίλουν ανάλογα την ηλικία του ασθενούς, την διάρκεια εμφάνισης της ασθένειας ή την ποσότητα της περίσσειας θυρεοειδικών ορμονών (Reid et al, 2005).

## 1.2 Καρκίνος του θυρεοειδούς αδένου

### 1.2.1 Γενικά

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αδένου αποτελεί περίπου το 1% των συνολικών περιπτώσεων καρκίνου στις αναπτυγμένες χώρες (Scopa, 2004) και είναι ο πιο κοινός κακοήθης όγκος στο ενδοκρινικό σύστημα (Nikiforov, 2008). Επηρεάζει όλες τις ηλικιακές ομάδες, αν και εμφανίζεται σπάνια σε νεαρές ηλικίες. Οι θυρεοειδείς όγκοι προσβάλλουν συχνότερα τις γυναίκες από τους άνδρες. Πολλοί ειδικοί πιστεύουν ότι η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης του θυρεοειδούς καρκίνου οφείλεται στην βελτίωση της ανίχνευσης μικρών καρκίνων σε προκλινικό στάδιο. Επιπλέον, η έκθεση σε ορισμένα περιβαλλοντικά καρκινογόνα στον βιομηχανοποιημένο τρόπο ζωής, η αυξημένη έκθεση σε ιατρικές ακτινοβολίες, η αύξηση της πρόσληψης ιωδίου καθώς και η αυξημένη επικράτηση της χρόνιας αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας, ίσως είναι μερικοί από τους παράγοντες που οδηγούν σε διαταραχές του θυρεοειδούς. Έχει προταθεί ότι η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης του θυρεοειδούς καρκίνου οφείλεται στο συνδυασμό της φαινομενικής αύξησης εξαιτίας της ανάπτυξης πιο ευαίσθητων διαγνωστικών μέσων και της πραγματικής ανάπτυξης λόγω εκτεταμένης έκθεσης σε ακτινοβολία και σε άλλες μη αναγνωρισμένες καρκινογόνες ουσίες (Pellegriti et al., 2013).

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς συνήθως παρουσιάζεται σαν *όζος θυρεοειδούς*. Ωστόσο, οζίδια θυρεοειδούς συνήθως ανιχνεύονται τυχαία και η ηλικία στο 50% περίπου των ασθενών, είναι άνω των 60 ετών (Guth et al., 2009). Μόνο το 5% των όζων θυρεοειδούς είναι κακοήγη ( Brito et al., 2013). Η διάγνωση του καρκίνου θυρεοειδούς συνήθως πραγματοποιείται μέσω εξέτασης με υπερήχους ή με βιοψία των ύποπτων οζιδίων με παρακέντηση με λεπτή βελόνα (FNA-Fine Needle Aspiration). Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η κυτταρολογική εξέταση των κυττάρων που συλλέγονται από την βιοψία είναι η πιο αξιόπιστη διαγνωστική μέθοδος για την αξιολόγηση των οζιδίων θυρεοειδούς και την κατάταξη τους σε καλοήθεις ή κακοήθεις όζους, (Gharib et al., 2010).

### 1.2.2. Ιστολογική ταξινόμηση

Ο θυρεοειδής αδένας περιέχει δύο κύριους τύπους επιθηλιακών κυττάρων: τα *θυλακιώδη κύτταρα* (follicular cells) στα οποία μετατρέπεται το ιώδιο στις θυρεοειδείς ορμόνες δηλαδή την θυροξίνη και την τριιωδοθυρονίνη, και τα *παραθυλακιώδη* (parafollicular cells) ή C κύτταρα τα οποία εκκρίνουν την καλσιτονίνη.

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).

Ο μυελοειδής καρκίνος θυρεοειδούς (medullary thyroid cancer, MTC) προέρχεται από τα παραθυλακιώδη κύτταρα και αποτελεί περίπου το 3% των περιπτώσεων θυρεοειδών κακοηθειών (Goutas et al., 2008).

Η παραδοσιακή κατάταξη του καρκίνου θυρεοειδούς είναι η εξής: καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα (θυλακιώδη και θηλώδη καρκινώματα) και χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα (θηλοειδή και αναπλαστικά καρκινώματα). Τα πρώτα, χαρακτηρίζονται από σχετικά καλή πρόγνωση ενώ τα δεύτερα σχετίζονται με επιθετική συμπεριφορά, μετάσταση και θάνατο.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization), οι όγκοι του θυρεοειδούς μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε γενικές γραμμές σε



πρωτοπαθείς και σε δευτεροπαθείς ή μεταστατικούς όγκους. Οι μεταστατικοί όγκοι του θυρεοειδούς είναι σπάνιοι. Οι περισσότεροι πρωτοπαθείς όγκοι του θυρεοειδούς είναι επιθηλιακοί όγκοι που προέρχονται από θυλακιώδη κύτταρα θυρεοειδούς (Nikiforov, 2009). Τα λεμφώματα και τα διάφορα νεοπλάσματα κατατάσσονται σε διακριτή ξεχωριστή κατηγορία (Hedinger et al., 1989). Το Ινστιτούτο Παθολογίας Ειδικών Δυνάμεων (Armed Forces Institute of Pathology – AFIP) έχει αναπτύξει ένα ελάχιστα διαφοροποιημένο σύστημα κατάταξης για τους όγκους του θυρεοειδούς, το οποίο επικεντρώνεται στην κυτταρική προέλευση και την ενσωμάτωση του όγκου σε κάθε τύπο κυττάρου και αναφέρονται ως υπότυποι καρκίνου θυρεοειδούς ή «παραλλαγές» (Rosai et al., 1992).

### 1.2.2.1 Θηλώδης Καρκίνος Θυρεοειδούς

Ο θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς είναι ο πιο κοινός τύπος θυρεοειδούς καρκίνου και αποτελεί το 80% περίπου όλων των πρωτογενών κακοηθειών του θυρεοειδούς (Baloch et al., 2002). Ιστολογικά, μπορεί να κατηγοριοποιηθεί περαιτέρω σε θηλώδες μικροκαρκίνωμα (papillary microcarcinoma), σε έγκλειστο υπότυπο (encapsulated variant), σε θυλακιώδη υπότυπο θυλώδους καρκίνου θυρεοειδούς (follicular variant of papillary thyroid cancer - FVPTC), σε υπότυπο με χαρακτηριστικά «υψηλά και κυλινδρικά κύτταρα» (tall and columnar cell variant), σε υπότυπο ο οποίος χαρακτηρίζεται από διάχυση σκληρυντικής ουσίας (diffuse sclerosing variant), και σε άλλους υπότυπους (Εικόνα 4) (Scopa, 2004).

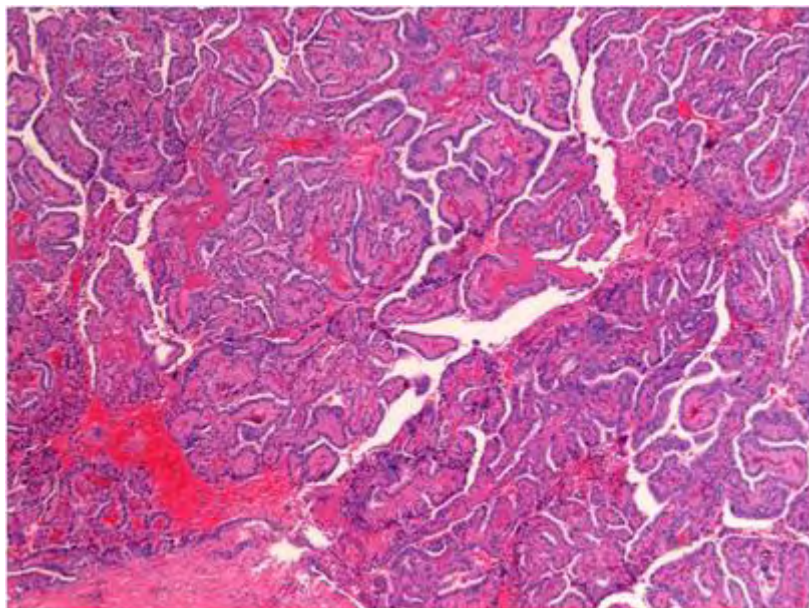
Κύριο χαρακτηριστικό του θηλώδους τύπου καρκίνου θυρεοειδούς είναι η ανάπτυξη θηλών και μιας σειράς χαρακτηριστικών πυρηνικών γνωρισμάτων όπως η ξεκάθαρη οπτικά εμφάνιση, επικαλύψεις και πυρηνικά αυλάκια (Εικόνα 4). Το μέγεθος του θηλώδους καρκινώματος είναι εξαιρετικά μεταβλητό με μέση διάμετρο να κυμαίνεται από 2-3 cm<sup>2</sup>. Οι νεοπλασματικές θηλές περιέχουν έναν κεντρικό πυρήνα ινοαγγειακού (και περιστασιακά μόνο αγγειακού) ιστού επενδεδυμένο με ένα ή περισσότερα κυτταρικά στρώματα με συγκεντρωμένους οβάλ πυρήνες.

Ο τρόπος διάδοσης του συγκεκριμένου είδους καρκινώματος, είναι μέσω λεμφαγγείων εντός του θυρεοειδούς, ο οποίος οδηγεί σε πολυεστιακές βλάβες και στην περιφερειακή μετάσταση όζου. Η διάδοση μέσω των φλεβών είναι πιο σπάνια ενώ και οι μεταστάσεις έξω από τον λαιμό και το μεσοθωράκιο είναι ασυνήθιστες (το 5-7% των περιπτώσεων). Η περιφερειακή μετάσταση λεμφαδένα είναι εξαιρετικά συνήθης (περίπου στο 50% των περιπτώσεων) κατά την αρχική εμφάνιση κλασσικού θηλώδους καρκίνου. Το παραπάνω, δεν φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά την μακροπρόθεσμη πρόγνωση, ειδικά σε

ασθενείς ηλικίας κάτω των 45 ετών (LiVolsi, 2011). Τα χαρακτηριστικά με τη μεγαλύτερη προγνωστική αξία φαίνεται, λοιπόν, ότι είναι η ηλικία εμφάνισης της νόσου στον ασθενή, το μικρό μέγεθος του όγκου, η συνολική ενθυλάκωση, οι πολυεστιακές βλάβες καθώς και η παρουσία εκτεταμένων μεταστάσεων.

Η συμβατική χειρουργική του θυρεοειδούς, με την μορφή της λοβεκτομής, χωρίς τομή λαιμού ή την προληπτική χορήγηση ιωδίου, αποτελεί αποτελεσματική θεραπεία για τις περισσότερες περιπτώσεις θηλώδους καρκινώματος (Carcangiu et al., 1985). Περίπου 4 με 5 εβδομάδες μετά την χειρουργική αφαίρεση του θυρεοειδούς, οι ασθενείς ίσως ακολουθήσουν θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο για την ανίχνευση και την καταστροφή κάθε μετάστασης και πιθανού υπολειμματικού ιστού του θυρεοειδούς. Εξωτερική ακτινοθεραπεία έχει χρησιμοποιηθεί ως επικουρική θεραπεία σε ασθενείς θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς που ήταν άνω των 45 ετών και είχαν τοπική διεισδυτική νόσο (Mazzaferri, 1981) ενώ έχει σημειωθεί και επιτυχής θεραπείας με την καταστολή της θυρεοτρόπου ορμόνης (TSH) με λεβοθυροξίνη (Xing, 2013).

Αξίζει να σημειωθεί, ότι η χρήση κατάλληλων μοριακών δεικτών, έχει τη δυνατότητα να βελτιώσει την επικινδυνότητα και να προβλέψει την πιθανότητα υποτροπιασμού σε ασθενείς με PTC, συμβάλλοντας στη λήψη καλύτερων αποφάσεων για τη μακροχρόνια διαχείρισή του (Xing et al., 2005).



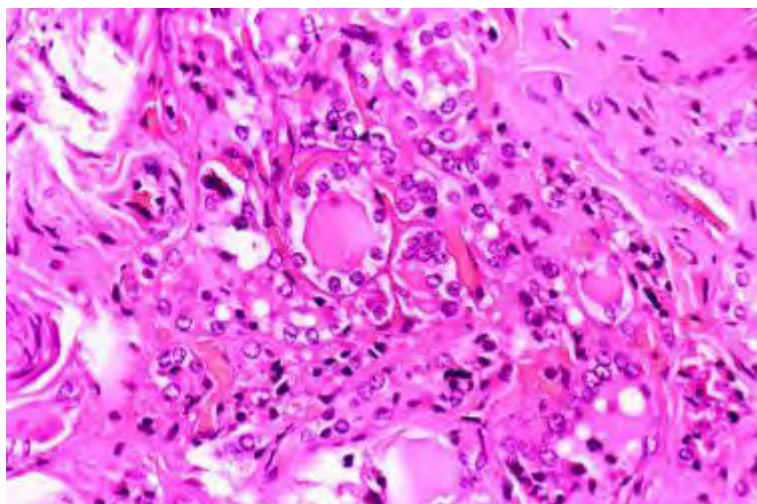
**Εικόνα 4:** Κλασσική απεικόνιση Θηλώδους Καρκινώματος, (Modern Pathology, <http://www.nature.com/modpathol/journal/v24/n2s/images/modpathol2010129f1.jpg>)

### 1.2.2.2. Θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς

Ο θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με τον βαθμό της εξάπλωσης του σε: καρκίνο με *ελάχιστη διήθηση* (minimally invasive) ο οποίος είναι και ο πιο κοινός και σε καρκίνο με *ευρεία διήθηση*. Η συχνότητα του θυλακιώδους καρκινώματος σε περιοχές μη εκτεθειμένες σε ιώδιο κυμαίνεται σε ποσοστό 5-10% των θυρεοειδών κακοηθειών, ενώ αντίθετα σε περιοχές εκτεθειμένες σε ιώδιο, σε ποσοστό 30-40% (Rosai et al., 1992).

Σε πολλές περιπτώσεις, η ιστολογική διάγνωση του θυλακιώδους καρκινώματος βασίζεται στα χαρακτηριστικά πυρηνικά στοιχεία του θηλώδους καρκινώματος και την επεμβατική ανάπτυξη ή στη μετάσταση λεμφαδένα (Zhu et al., 2003) (Εικόνα 5). Αυτού του είδους ο καρκίνος στερείται τα πυρηνικά χαρακτηριστικά του θηλώδους καρκίνου, συνήθως δεν έχει καμία θηλή, παρουσιάζει έλλειψη καλσιτονίνης και αμυλοειδούς ενώ δεν περιέχει τα πολυάριθμα κύτταρα της ατράκτου, τα γιγαντιαία κύτταρα και τα μιτωτικά στοιχεία αδιαφοροποίητου (αναπλαστικού) καρκινώματος (Baloch et al, 2016). Μακροσκοπικά, ο καρκίνος με ελάχιστη διήθηση είναι ένας ενθυλακωμένος όγκος που παρουσιάζει την αγγειακή ή την καψική εισβολή μόνο για μικροσκοπική αξιολόγηση ενώ αντίθετα, ο καρκίνος με ευρεία διήθηση παρουσιάζεται με απουσία πλήρους ενθυλάκωσης, εκτεταμένες περιοχές της εισβολής στον παρακείμενο ιστό του θυρεοειδούς ή/και εκτεταμένη διείσδυση αιμοφόρων αγγείων (Εικόνα 5) (Scora, 2004).

Το θυλακιώδες αδένωμα και το θυλακιώδες καρκίνωμα παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες μεταξύ τους, καθιστώντας αναποτελεσματικούς πολλούς ανοσοϊστοχημικούς, μορφομετρικούς, κυτογενετικούς και ογκογόνους δείκτες. Τα σημερινά διαγνωστικά κριτήρια για τις κακοήθειες αυτές, είναι η ιστολογική εκτίμηση της κάψας (όπου δηλαδή ο όγκος πρέπει να διαπερνά ολόκληρο το πάχος της κάψας) και/ή με την εισβολή των αιμοφόρων αγγείων μέσα ή πέρα από αυτή (Scora, 2004). Είναι φανερό, πως τα καρκινώματα με την ελάχιστη διήθηση δεν μπορούν να διαγνωστούν επακριβώς με τη παρακέντηση βιοψίας με λεπτή βελόνα (fine needle aspiration biopsy), δεδομένου ότι τα κρίσιμα διαγνωστικά κριτήρια απουσιάζουν.



**Εικόνα 5:** Ιστολογική απεικόνιση μέτρια διαφοροποιημένου θυλακιδώδους καρκινώματος. (<http://emedicine.medscape.com/article/278488-workup#c6>)

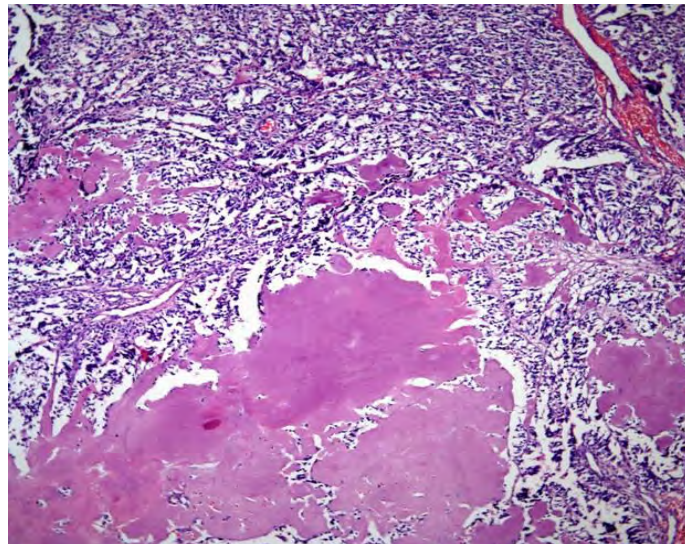
### 1.2.2.3. Μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς

Το μυελώδες καρκίνωμα είναι ένας κακοήθης όγκος του θυρεοειδούς το οποίο προέρχεται από την διαφοροποίηση των παραθυλακιδωδών κυττάρων ή κυττάρων C που συνήθως περιέχουν καλσιτονίνη (Rosai et al., 1992). Στο σύνολο των καρκίνων του θυρεοειδούς, το μυελώδες καρκίνωμα που καταλαμβάνει το 5-10%, είναι κυρίως σποραδικό στη φύση και μόνο το 20-30% των περιπτώσεων είναι κληρονομικές (Mohammadi et al., 2016). Ο μυελώδης καρκίνος εντοπίζεται κυρίως στις περιοχές των θυρεοειδών λοβών όπου η συγκέντρωση των κυττάρων C είναι υψηλότερη. Ιστολογικά, εμφανίζει τις χρωστικές ιδιότητες του αμυλοειδούς, δηλαδή παρουσιάζεται με γκριζωπό χρώμα αλλά και κόκκινο χρώμα. Ένα τυπικό μυελώδες καρκίνωμα αποτελείται από ατρακτοειδή κύτταρα, κυκλικά ή πολυγωνικά κύτταρα διαχωρισμένα από ινώδη στρώμα (Εικόνα 6).

Η καλσιτονίνη είναι ο πιο ευαίσθητος προγνωστικός δείκτης σε μυελώδεις όγκους στην προ-εγχειρητική διάγνωση και τα επίπεδα της είναι ανάλογα του σταδίου της νόσου (Ismailov, et al., 2004). Επίσης, τα αυξημένα επίπεδα της καλσιτονίνης σε μετα-εγχειρητικό στάδιο φανερώνουν την ύπαρξη υπολειπόμενου ή υποτροπιάζοντος μυελώδους καρκινώματος θυρεοειδούς. (Moley et al., 1998). Είναι σημαντικό να αναφερθεί το γεγονός της ύπαρξης περιπτώσεων μυελοειδών καρκινωμάτων προχωρημένων σταδίων, στις οποίες η παραγωγή και η έκκριση καλσιτονίνης είναι μειωμένη. Στους ασθενείς αυτούς, το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA), το οποίο εκκρίνεται από τα παραθυλακιδώδη κύτταρα, μπορεί να εμφανίζεται σημαντικά αυξημένο, αποτελώντας περισσότερο αξιόπιστο καρκινικό δείκτη, παρά το γεγονός ότι δε

διαθέτει την ευαισθησία και την εξειδίκευση της καλσιτονίνης (Heshmati et al., 1997; Busnardo et al., 1984).

Η ολική θυρεοεκτομή είναι προς το παρόν η μοναδική αντιμετώπιση του μυελώδους καρκίνου θυρεοειδούς. Σε αντίθεση με τους διαφοροποιημένους καρκίνους θυρεοειδούς, τα μυελώδη καρκινικά κύτταρα δεν προσλαμβάνουν ιώδιο, συνεπώς η θεραπεία με ιώδιο είναι αναποτελεσματική. Το μυελοειδές καρκίνωμα γενικά δεν ανταποκρίνεται στα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα, αν και σε περιορισμένο αριθμό μελετών, αναφέρεται μερική ανταπόκριση, κυρίως σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία. Παρόλο που το νεόπλασμα θεωρείται ανθεκτικό στην ακτινοθεραπεία, σε περιπτώσεις αντένδειξης της χειρουργικής επέμβασης ή σε περιπτώσεις μη εγχειρήσιμων όγκων, η ακτινοθεραπεία είναι πιθανό να επιφέρει κάποιο ανακουφιστικό αποτέλεσμα ως προς την τοπική επέκταση και τις απομακρυσμένες μεταστάσεις (Gimm et al., 2001).



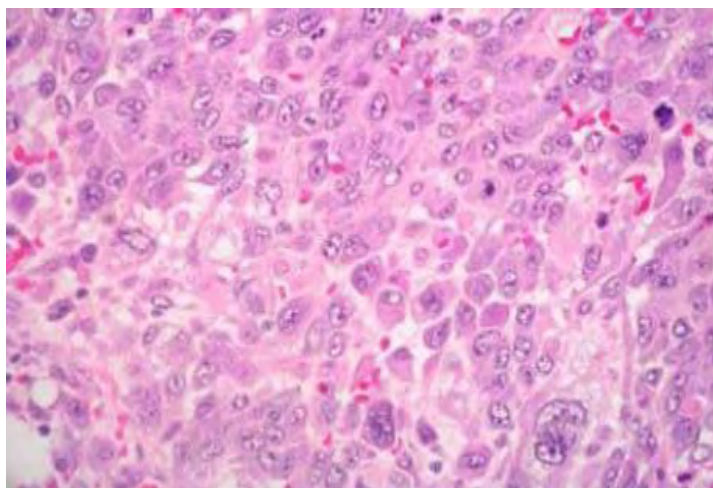
**Εικόνα 6:** Απεικόνιση του Μυελοειδούς Καρκίνου του θυρεοειδούς, με άφθονο αμυλοειδές (Cancernetwork – Home of the Journal Oncology, <http://www.cancernetwork.com/articles/slide-show-medullary-thyroid-carcinoma>)

#### **1.2.2.4. Αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς**

Ο αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς, παρόλο που είναι από τις πιο σπάνιες μορφές καρκίνου, είναι ένας από τους πιο επιθετικούς καρκίνους και σε αυτόν τον τύπο οφείλεται το 40% των θανάτων από καρκίνο του θυρεοειδούς. Υπολογίζεται ότι αποτελεί το 1-2% των περιπτώσεων θυρεοειδών κακοηθειών, με συχνότητα 1-2 ασθενείς ανά ένα εκατομμύριο ανθρώπων το χρόνο (Are et al., 2006; Kebebew et al., 2005). Εμφανίζεται, συνήθως, σε ηλικιωμένους ασθενείς (μέσος όρος ηλικίας 60-65 ετών), αναπτύσσεται ταχέως, με επιθετικότητα ενώ μετέπειτα οδηγεί σε μετάσταση σε μακρινές αποστάσεις κυρίως σε πνεύμονα, επινεφρίδια και κόκκαλα (Rosai et al., 1992; LiVolsi, 1990).

Ο αναπλαστικός καρκίνος παρουσιάζει ένα μεγάλο φάσμα μορφολογικών ειδών, είτε μεμονωμένων είτε συνδυασμό αυτών. Οι τρεις μορφολογικοί τύποι είναι λεπιδωτά, αξονικά και γιγαντιαία κύτταρα. Τα κοινά στοιχεία και των τριών μοτίβων είναι η υψηλή μιτωτική δραστηριότητα, η εκτεταμένη νέκρωση και ένας αξιοσημείωτος βαθμός εισβολής εντός του αδένα καθώς και σε εξωθυρεοειδικές δομές (Εικόνα 7) (Rosai et al., 1992; LiVolsi, 1990).

Ο αναπλαστικός καρκίνος παρουσιάζει πολύ κακή πρόγνωση με μέσο χρόνο επιβίωσης 6 με 8 μήνες από την στιγμή της εμφάνισης του. Η θεραπεία συνδυασμένης χειρουργικής επέμβασης, χημειοθεραπείας και ακτινοβολίας μπορεί να πετύχει καλύτερα αποτελέσματα στην βελτίωση της επιβίωσης σε μερικούς ασθενείς. Ωστόσο, ο αναπλαστικός καρκίνος παρουσιάζει πολύ χαμηλό ποσοστό θεραπείας, ακόμη και με ριζοσπαστικές μεθόδους (Kebebew et al., 2005; Ito et al., 2012).



**Εικόνα 7:** Απεικόνιση του αναπλαστικού καρκίνου του θυρεοειδούς (International Journal of Health Sciences, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3068789/>)

### 1.3. Σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP κινασών

Η ρύθμιση της αύξησης και της διαφοροποίησης, μετά από την ενεργοποίηση διαμεμβρανικών υποδοχέων από εξωκυτταρικό διαβιβαστή, πραγματοποιείται μέσω της μακροπρόθεσμης ενεργοποίησης αλυσιδωτών αντιδράσεων πρωτεϊνικών κινασών. Το μονοπάτι αυτό ενεργοποιείται από μιτογόνους παράγοντες (ως μιτογόνοι παράγοντες ορίζονται εκείνοι που προωθούν την κυτταρική διαίρεση), συνεπώς η αλληλουχία των αντιδράσεων κινασών είναι γνωστή ως **Mitogenic Activated Protein Kinases cascade** ή MAPK cascade. Το κάθε μονοπάτι των MAP κινασών περιλαμβάνει τουλάχιστον τρεις διαφορετικές κινάσες, οι οποίες φωσφορυλιώνουν η μία την άλλη. Οι MAPs επάγουν διάφορες

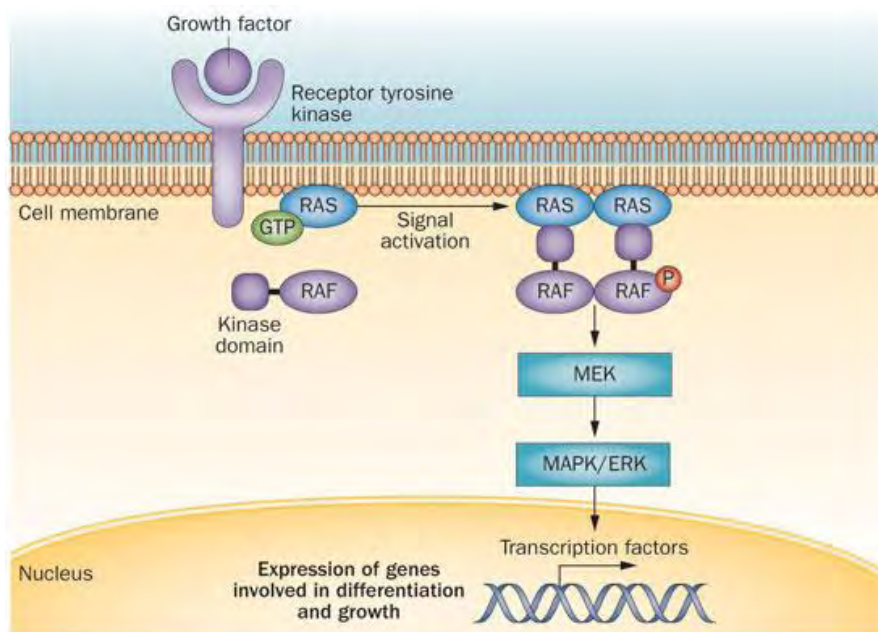
κυτταρικές διαδικασίες όπως: πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση, απάντηση στο στρες, επιβίωση και απόπτωση.

Το κάθε μονοπάτι MAPK είναι οργανωμένο ως πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, με την βοήθεια πρωτεϊνών σκαλωσιάς (scaffold proteins). Η συγκεκριμένη οργάνωση αποσκοπεί στην γρήγορη μετάδοση του μηνύματος και εγγυάται την εξειδίκευση της μεταγωγής του σήματος εμποδίζοντας ανεπιθύμητες διασταυρώσεις με άλλα μονοπάτια MAPK. Οι MAPK μπορούν να ενεργοποιηθούν από ποικίλα ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά ερεθίσματα όπως υποδοχείς αυξητικών παραγόντων (RTKs), από υποδοχείς που συνδέονται με πρωτεΐνες G (GPCRs) με την μεσολάβηση των πρωτεϊνών G ή με μηχανισμούς ανεξάρτητους από τις πρωτεΐνες G.

Η ενεργοποίηση των μονοπατιών MAPK από αυξητικούς παράγοντες περιγράφεται ακολούθως. Οι αυξητικοί παράγοντες, όπως ο αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από αιμοπετάλια PDGF (platelet derived growth factor), και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας EGF (epidermal growth factor), δεσμεύονται στους μονομερείς υποδοχείς τους (**RTKs**). Η δέσμευση αυτή, οδηγεί στον διμερισμό των υποδοχέων και στην αυτοφωσφορυλίωση τους σε κατάλοιπα τυροσίνης (Tyr). Στις φωσφορυλιωμένες Tyr του υποδοχέα συνδέεται μέσω της SH2 περιοχής της, η πρωτεΐνη προσαρμογέας **Grb2** (growth factor receptor binding protein). Στην Grb2, στη συνέχεια, προσδένεται ένας παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης, ο **SOS** ο οποίος με την σειρά του ενεργοποιεί τη μικρή GTPάση **Ras.GDP**, ανταλλάσσοντας το GDP με GTP. Η Ras μέσω του C-τελικού πρενυλιωμένου άκρου της, βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη. Η ενεργοποιημένη Ras.GTP στρατολογεί στη μεμβράνη την πρώτη κινάση του μονοπατίου των MAPK, την **κινάση Ser/Thr Ras** η οποία είναι μια MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK).

Η **κινάση Raf** σε κατάσταση ηρεμίας βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα στην αναδιπλωμένη μορφή της, συνδεδεμένη μέσω φωσφορυλιωμένων καταλοίπων Ser με την πρωτεΐνη 14-3-3. Η διέγερση του αυξητικού παράγοντα, ενεργοποιεί παράλληλα και μία φωσφατάση (φωσφατάση 2A) η οποία αποφωσφορυλιώνει την Raf, οδηγώντας την σε μία ανοιχτή διαμόρφωση που επιτρέπει την σύνδεση της Raf στα λιπίδια της μεμβράνης και στη Ras.

Η ενεργοποιημένη Raf φωσφορυλιώνει σε δύο κατάλοιπα Ser την MEK (MAP/ERK Kinase), ένας τύπος MAP kinase kinase (MAPKK). Στη συνέχεια, η MEK φωσφορυλιώνει την ERK, η οποία είναι μία MAPK κινάση Ser/Thr. Μετά την ενεργοποίηση το σύμπλεγμα διαχωρίζεται, η KSR φωσφορυλιώνεται και επανέρχεται στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 8)(Morrison et. al, 2003; Anderson, 2006).



**Εικόνα 8:** Απεικόνιση της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού MAPK από αυξητικό παράγοντα (G.T. Gibney et al., 2013, [http://www.nature.com/nrclinonc/journal/v10/n7/fig\\_tab/nrclinonc.2013.83\\_F1.html](http://www.nature.com/nrclinonc/journal/v10/n7/fig_tab/nrclinonc.2013.83_F1.html))

Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT, έχει επίσης ένα θεμελιώδη ρόλο στην ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης και μεταβολικών δραστηριοτήτων μέσω ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων. Μαζί με το μονοπάτι MAPK αποτελούν τους κυριότερους ογκογόνους μηχανισμούς που οδηγούν στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου θυρεοειδούς (Xing, 2013).

Η απόκλιση από τον αυστηρό έλεγχο των μονοπατιών της MAPK, έχει εμπλακεί στην ανάπτυξη πολλών ανθρώπινων ασθενειών, όπως η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Parkinson, αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση, και διάφοροι τύποι καρκίνου (Kim et al., 2010).

### 1.3.1. Πρωτεΐνη BRAF

Η ομάδα RAF γονιδίων περιλαμβάνει τρία πρωτο-ογκογονίδια, το ARAF1, το RAF1 και το BRAF. Η πρωτεΐνη BRAF, που κωδικοποιείται από το γονίδιο BRAF, ανήκει σε μία πρωτεϊνική οικογένεια κινάσων σερίνης – θρεονίνης η οποία περιλαμβάνει τις ARAF, BRAF και CRAF. Οι κινάσες RAF είναι οι κεντρικοί ρυθμιστές στο ενδοκυτταρικό μονοπάτι της κινάσης MAP και δρουν κυρίως με φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της MEK. Το παραπάνω συμβαίνει μετά τον διμερισμό των (όμο- ή ετερό-) των RAF πρωτεϊνών. Η ενεργοποίηση της MEK, οδηγεί με την σειρά της στην ενεργοποίηση της ERK και των επακόλουθων τελεστών του μονοπατιού MAPK (Nikiforov, 2008) Από τις τρεις ισομορφές της Raf κινάσης (ARAF, BRAF, και CRAF), η ισομορφή BRAF με το γονίδιο της να

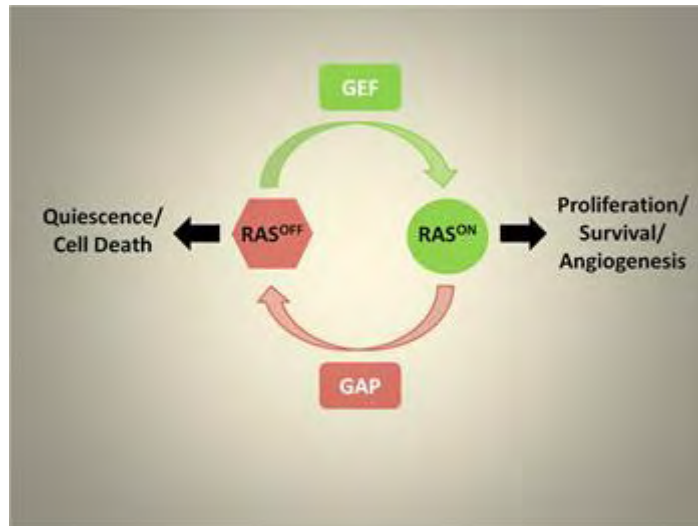


εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7, έχει την υψηλότερη βασική δραστηριότητα κινάσης και είναι ο πιο ισχυρός ενεργοποιητής του σηματοδοτικού μονοπατιού MAP κινασών (Xing, 2005).

Η ανακάλυψη ενεργών μεταλλάξεων του γονιδίου για το BRAF έχει επεκτείνει το εύρος των γνωστών γενετικών αλλοιώσεων που ενεργοποιούν το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP κινασών και υπογραμμίζει την συμβολή αυτού του μονοπατιού στην καρκινογένεση διαφόρων ιστών, όπως το μελάνωμα, τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, τον καρκίνο του παχέος εντέρου, το θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς καθώς και τον καρκίνο των ωοθηκών. (H. Davies et al., 2002) Σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF βρέθηκαν στο 45% των περιπτώσεων θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς. (Kimura et al., 2003; Cohen et al., 2003).

### 1.3.2. Πρωτεΐνες RAS

Η οικογένεια των ανθρώπινων γονιδίων RAS περιλαμβάνει τα εξής γονίδια: HRAS, KRAS και NRAS, τα οποία έχουν ποικίλες λειτουργίες ρυθμίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Τα παραπάνω γονίδια κωδικοποιούν μεγάλης συγγένειας πρωτεΐνες G, οι οποίες βρίσκονται στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ενδοκυτταρική μεταγωγή σημάτων προερχόμενα από μεμβρανικούς υποδοχείς κινάσης τυροσίνης και υποδοχείς που συνδέονται με πρωτεΐνες G. Στην ανενεργή μορφή της, η RAS πρωτεΐνη προσδέεται στην διφωσφορική γουανοσίνη (guanosine diphosphate- GDP) ενώ κατά την ενεργοποίησή της απελευθερώνει την GDP και δεσμεύει τριφωσφορική γουανοσίνη (guanosine triphosphate – GTP) ενεργοποιώντας το MAPK μονοπάτι και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το PI3K/AKT. Σε φυσιολογικά πλαίσια, η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη RAS-GTP, μετατρέπεται γρήγορα σε ανενεργή, εξαιτίας της εγγενούς δραστηριότητας της τριφωσφατάσης γουανοσίνης (guanosine triphosphatase – GTPase) και της δράσης των ενεργοποιούμενων από την GTPάση κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών. Οι παραπάνω δράσεις καταλύουν την μετατροπή της δραστηρικής μορφής GTP στην ανενεργή προσδεσμένη GDP (Εικόνα 9) (Nikiforov, 2008). Επιπλέον, σημαντική είναι η συμβολή του παράγοντα GEF (guanine nucleotide exchange factor), διότι διευκολύνει την ανταλλαγή του GDP από το GTP, την απομάκρυνση δηλαδή του GDP από τη πρωτεΐνη G και τη δέσμευση στη θέση του, του GTP. Από την άλλη πλευρά, ο παράγοντας GAP (GTPase-activating protein), καταλύει την υδρόλυση το GTP, αυξάνοντας με λίγα λόγια το ρυθμό της υδρόλυσης. (Εικόνα 9) (Bos et al., 2007)



**Εικόνα 9:** Απεικόνιση της μετατροπής από ανενεργή Ras πρωτεΐνη σε ενεργή Ras πρωτεΐνη και το αντίστροφο, με την συμβολή του κύκλου GDP/GTP, National Cancer Institute, <https://ccr.cancer.gov/news/inthejournals/calvisi>

Σε πολλές ανθρώπινες νεοπλασίες, σημειακές μεταλλάξεις συμβαίνουν στα διακριτά πεδία του γονιδίου Ras, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα είτε μία αυξημένη συγγένεια για το GTP (μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 και 13) ή την απενεργοποίηση της αυτοκαταλυτικής λειτουργίας της GTPάσης (μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 61). Το αποτέλεσμα τους είναι ότι η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη καθίσταται μόνιμα στην ενεργή της μορφή, καθώς επίσης και λειτουργεί ιδιοστατικά αναστέλλοντας τα μονοπάτια σηματοδότησης (Nikiforov, 2008).

### 1.3.3. Διάγνωση και θεραπεία του θυρεοειδούς καρκίνου

Οι όγκοι του θυρεοειδούς, συνήθως, παρουσιάζονται ως μονομερή ανώδυνα θυρεοειδικά οζίδια που οφείλονται στην εστιακή υπερτροφία του θυρεοειδούς αδένου. Τα παραπάνω οζίδια μπορούν να εντοπιστούν είτε από τον ίδιο τον ασθενή με ψηλάφιση είτε από τυχαία διαπίστωση σε υπερηχογράφημα του λαιμού. Η συχνότητα εύρεσης των θυρεοειδικών οζιδίων ποικίλει ανάλογα με την διαγνωστική μέθοδο που χρησιμοποιείται. Αναφορικά, το 2-6% των οζιδίων εντοπίζονται με την ψηλάφιση ενώ το 19-35% των οζιδίων εντοπίζονται μέσω υπερήχων. Στη φυσική εξέταση, οι κακοήθεις όζοι είναι πιο σκληροί και σταθεροί, ενώ ένας όζος που είναι ελαστικός ή μαλακός και κινείται εύκολα με την κατάποση, είναι συνήθως καλοήθης. (Udelsman et al., 1999)

Από παθοφυσιολογικής άποψης, ένας όζος θυρεοειδούς αντιπροσωπεύει την ανώμαλη ανάπτυξη κυττάρων, συνήθως αλλά όχι πάντα θυρεοειδών κυττάρων, τα οποία αποτελούν τμήμα του θυρεοειδούς αδένου. Αρκετοί παράγοντες προδιάθεσης έχουν αναφερθεί για την παρουσία καρκινώματος σε οζίδια

θυρεοειδούς και ένας από αυτούς είναι το μέγεθος του οζιδίου. Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι όταν το μέγεθος του οζιδίου υπερβαίνει τα 4 εκατοστά, αυξάνεται ο κίνδυνος κακοήθειας. Συνεπώς το μέγεθος του οζιδίου, θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ανεξάρτητη ένδειξη για την πρόβλεψη του κινδύνου κακοήθειας (McCoy et al., 2007). Η συντριπτική πλειοψηφία των όζων είναι καλοήθης. Άλλοι αναγνωρισμένοι παράγοντες κινδύνου είναι η ηλικία, το φύλο, η έκθεση σε ακτινοβολία, το οικογενειακό ιστορικό εμφάνισης καρκίνου και ιδιαίτερα του θηλώδους καρκινώματος, ενώ πολύ πρόσφατα προσδιορίστηκε ένας ακόμη, το υψηλό σωματικό βάρος. (Wartofsky, 2010; Kitahara et al., 2011)

Η αρχική αξιολόγηση είναι η αναλυτική απεικόνιση του θυρεοειδούς με υπερήχους. Αξιολογείται αν υπάρχει ένας ή περισσότεροι όζοι, το μέγεθος του, αν ο όζος είναι συμπαγής, κυστικός (περιέχει υγρό) ή μεικτός. Στη συνέχεια απαιτούνται αιματολογικές εξετάσεις για το προσδιορισμό των επιπέδων των θυρεοειδικών ορμονών στο αίμα όπως και η μέτρηση θυρεοσφαιρίνης, καλσιτονίνης και αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων.

Το σπινθηρογράφημα του θυρεοειδούς είναι μια εξέταση που προσδιορίζει αν ένας όζος παράγει θυρεοειδικές ορμόνες και είναι λειτουργικός (θερμός) ή μη λειτουργικός (ψυχρός). Η εξέταση αυτή γίνεται με τη λήψη ραδιενεργού ιωδίου ή τεχνιτίου. Το ραδιενεργό υλικό απορροφάται μόνο από τα λειτουργικά κύτταρα του θυρεοειδούς. Στη συνέχεια λαμβάνεται μια εικόνα με τη βοήθεια μιας γ-κάμερας που αποτυπώνει τα λειτουργικά σημεία του θυρεοειδούς. Αν ο όζος είναι θερμός τότε φαίνεται καθαρά η αυξημένη καθήλωση του ραδιοφαρμάκου στο σημείο του όζου, αν είναι ψυχρός φαίνεται ένα έλλειμμα στο σημείο του όζου. Σήμερα, η ακρίβεια στη μέτρηση των θυρεοειδών ορμονών και η ποιότητα του υπερηχογραφήματος έχουν εκτοπίσει τη χρήση του σπινθηρογραφήματος.

Οι πλέον χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την ανίχνευση θυρεοειδικών οζιδίων είναι το υπερηχογράφημα θυρεοειδούς και η αυξημένη διαθεσιμότητα υπερήχων καθοδηγούμενων από την βιοψία λεπτής βελόνης (FNA) και τη συνοδό κυτταρολογική εξέταση είτε ενός όζου είτε ενός διογκωμένου τραχηλικού λεμφαδένα, με την δεύτερη να είναι πιο ακριβής για την αξιολόγηση των θυρεοειδών οζιδίων. (Cooper et al., 2009). Η ολική αφαίρεση του αδένα επιβάλλεται ανεξάρτητα από το κλινικό στάδιο στο οποίο βρίσκεται. Σε όλους τους ασθενείς με καρκίνο του θυρεοειδούς, ο σκοπός της θυρεοειδεκτομής είναι η αφαίρεση πρωτογενούς όγκου, η ελαχιστοποίηση της νοσηρότητας καθώς και του κινδύνου υποτροπής και μετάστασης. Όταν κρίνεται απαραίτητο η θεραπεία περιλαμβάνει τη χορήγηση ραδιενεργού ιωδίου. Το ραδιενεργό ιώδιο χορηγείται 1-3 μήνες μετεγχειρητικά ως <sup>131</sup>I όπως ιωδιούχο νάτριο δια στόματος, του οποίου ο χρόνος ημιζωής είναι 7-8 ημέρες. Κύριος σκοπός της

συγκεκριμένης χορήγησης είναι η καταστροφή πιθανών υπολειμματικών κακοήθων κυττάρων ή/και λεμφαδενικών μικρομεταστάσεων, οδηγώντας στη μείωση υποτροπών και απομακρυσμένων μεταστάσεων (Mazzaferrri et al., 1994; 1981). Εντούτοις, οι επίμονοι, οι υποτροπιάζοντες, οι αναπλαστικοί καθώς επίσης και οι χαμηλής διαφοροποίησης όγκοι θυρεοειδούς, αδυνατούν να προσλάβουν <sup>131</sup>I. Η θεραπεία του αναπλαστικού τύπου καρκίνου θυρεοειδούς περιλαμβάνει σχεδόν πάντα την εξωτερική ακτινοβολία. Η εξωτερική ακτινοβολία συνήθως χρησιμοποιείται σαν έσχατη λύση, μετά από χειρουργική επέμβαση. (Schneider et al., 2013)

Όλα τα θυλακιώδη κύτταρα εξαρτώνται από την ορμόνη TSH για την ανάπτυξη τους. Συνεπώς, καθίσταται λογική η χορήγηση παραπάνω του φυσιολογικού, δόσεων λεβοθυροξίνης (T4) ως σημαντική στρατηγική για την επιβίωση του ασθενούς χωρίς την ασθένεια. (Cady et al., 1976; McGriff et al., 2002). Η καταστολή της TSH ενέχει κινδύνους αρρυθμιών, άγχους και οστεοπόρωσης. Λόγω κινδύνου απώλειας οστού, προτείνεται καθημερινή χορήγηση συμπληρωμάτων ασβεστίου και βιταμίνης D για τους ασθενείς στους οποίους ακολουθείται η παραπάνω στρατηγική. (Tuttle et al, 2010)

Η θεραπευτική προσέγγιση ολοκληρώνεται με τη χορήγηση της κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής. Η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία χρησιμοποιούνται σπανιότατα ως επικουρικά θεραπευτικά μέσα.

Φυσικά, ο ασθενής μετά από την επέμβαση και την οποιαδήποτε συμπληρωματική θεραπεία στην οποία υποβληθεί, τίθεται σε τακτική παρακολούθηση από τη θεράπουσα ενδοκρινολογική ομάδα για την έγκαιρη διαπίστωση πιθανής υποτροπής.

### **1.3.4. Μοριακή διάγνωση του θυρεοειδούς καρκίνου**

#### **1.3.4.1. Γενικά**

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 (Fallahi et al, 2014). Η στρατηγική αυτή, αυξάνει την ακρίβεια της κυτταρολογικής διάγνωσης των θυρεοειδών όζων. Βασικό πλεονέκτημα είναι πως δεν απαιτείται χειρουργική επέμβαση σε περιπτώσεις όπου είναι δύσκολη η διάγνωση του όγκου με την μέθοδο της κυτταρολογικής εξέτασης με την βιοψία λεπτής βελόνης ενώ σε περιπτώσεις που έχει διαπιστωθεί η κακοήθης φύση του όγκου, μπορεί να

προσδιοριστεί εξαρχής η χειρουργική στρατηγική αντιμετώπισής του. (Miccoli, 2014)

Αρκετοί μοριακοί προγνωστικοί δείκτες του καρκίνου του θυρεοειδούς και ιδιαίτερα γενετικοί δείκτες έχουν αναπτυχθεί. Μερικοί από αυτούς απαντώνται μόνο στον χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνο ή στον αναπλαστικό καρκίνο του θυρεοειδούς, όπως οι μεταλλάξεις στο γονίδιο p53 και ALK. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες, ελέγχοντας την επιθετικότητα του θυρεοειδούς καρκινώματος. (Xing et al., 2013)

Η πλειοψηφία των περιπτώσεων του καρκίνου θυρεοειδούς, οφείλεται στην απορύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού MAP κινασών ενώ ενδείξεις υπάρχουν και για την συμμετοχή του σηματοδοτικού μονοπατιού (PI3K)/AKT στην μοριακή παθογένεση. Το μονοπάτι MAPK συχνά ενεργοποιείται από σημειακές μεταλλάξεις των γονιδίων BRAF και KRAS αλλά και από αναδιατάξεις RET/PTC και PAX8/PPARγ. (Kimura et al, 2003; Souares et al, 2003; Adeniran et al., 2006). Το γεγονός ότι τέτοια γενετικά μονοπάτια αποτελούν τους 'οδηγούς' στην ανάπτυξη του καρκίνου του θυρεοειδούς έχει οδηγήσει στην πρόταση χρησιμοποίησής τους με σκοπό την πρόγνωση αυτού (Xing et al., 2013).

#### **1.3.4.2. Μεταλλάξεις BRAF**

Στον καρκίνο του θυρεοειδούς, οι πιο συχνές μεταλλάξεις είναι οι σημειακές μεταλλάξεις που εντοπίζονται στο γονίδιο BRAF. Η υψηλή συχνότητα και ειδικότητα της μετάλλαξης στο BRAF, αποδεικνύει ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην έναρξη της ογκογένεσης στο θηλώδες καρκίνωμα. (M.N. Nikiforova et al, 2003)

Το μεγαλύτερο ποσοστό των σημειακών μεταλλάξεων του γονιδίου BRAF περιλαμβάνουν το νουκλεοτίδιο 1799. Το αποτέλεσμα της συγκεκριμένης μετάλλαξης είναι η αντικατάσταση του αμινοξέος βαλίνη προς γλουταμικό στο κατάλοιπο 600 (V600E). Στην αποφωσφορυλιωμένη, άγριου τύπου πρωτεΐνη BRAF, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του βρόγχου ενεργοποίησης και της θέσης πρόσδεσης ATP, διατηρεί την πρωτεΐνη σε μία ανενεργή κατάσταση. Η αντικατάσταση V600E διαταράσσει αυτές τις αλληλεπιδράσεις και επιτρέπει τον σχηματισμό νέων αλληλεπιδράσεων που διατηρούν την πρωτεΐνη σε ενεργή διαμόρφωση. Η άμεση συνέπεια της ιδιοστατικής ενεργοποίησης της κινάσης BRAF είναι η χρόνια διέγερση του μονοπατιού MAPK καθώς και η έναρξη της ογκογένεσης. (Wan et al., 2004)

Σε μικρά ποσοστά της τάξεως του 1% με 2% των περιστατικών θηλώδους καρκινώματος, έχουν εντοπιστεί διαφορετικές μεταλλάξεις του γονιδίου BRAF. Μερικές από αυτές είναι η σημειακή μετάλλαξη στο K601E, μικρές προσθήκες ή διαγραφές που περιβάλλουν το κωδικόνιο 600 καθώς επίσης η αναδιάταξη

AKAP9/BRAF η οποία εμφανίζεται πιο συχνά σε θηλώδη καρκινώματα που συνδέονται με έκθεση σε ακτινοβολίες. Τέλος, η μετάλλαξη K601E έχει αναφερθεί σε μεμονωμένες περιπτώσεις θυλακιώδους αδενώματος. (Nikiforov, 2011).

Η μοριακή εξέταση για την μετάλλαξη του BRAF γονιδίου σε δείγματα θυρεοειδούς πραγματοποιείται κυρίως με την βιοψία λεπτής βελόνης (FNA) με αποτέλεσμα την αύξηση της ακρίβειας της κυτταρολογικής διάγνωσης των όζων θυρεοειδούς. Ωστόσο παρόμοια υψηλή ευαισθησία παρουσιάζουν και η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time Polymerase Chain Reaction – RT PCR), η απευθείας αλληλούχιση και η χρωματομετρική δοκιμασία. (Jin et al., 2006).

### **1.3.4.3. Μεταλλάξεις RAS**

Η οικογένεια των ανθρώπινων γονιδίων RAS περιλαμβάνει τα γονίδια HRAS, KRAS και NRAS. Μεταλλάξεις στα γονίδια RAS έχουν εντοπιστεί με ποικίλες συχνότητες σε όλους τους τύπους καρκίνου, που προέρχονται από τα καλώς διαφοροποιημένα θηλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς καρκίνου, ενώ στο θηλώδες καρκίνωμα αποτελούν την αιτία για το 10% με 20% των περιπτώσεων. (Namba et al., 1990; Vasko et al, 2004) Σχεδόν όλα τα θηλώδη καρκινώματα όπου εντοπίζονται μεταλλάξεις των γονιδίων RAS εμφανίζουν ιστολογικά θυλακιώδη παραλλαγή. (Adeniran et al., 2006; Zhu et al., 2003) Τέλος, μεταλλάξεις των γονιδίων RAS εντοπίζονται στο 40-50% του συμβατικού θυλακιώδους τύπου (FTC) και στο 20-40% του συμβατικού θυλακιώδους αδενώματος (FTA) (Namba et al., 1990).

Επιπλέον μελέτες υποδεικνύουν ότι οι μεταλλάξεις των γονιδίων RAS σε καρκινώματα θυρεοειδούς σχετίζονται με την αποδιαφοροποίηση του όγκου και την λιγότερο ευνοϊκή πρόγνωση. Πολλές μελέτες έχουν δείξει μία σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις μεταλλάξεις των γονιδίων RAS και τη μεταστατική συμπεριφορά των θηλωδών και των θυλακιδών καρκινωμάτων, ιδίως όσον αφορά τις μεταστάσεις στα οστά. Από την άλλη πλευρά, οι μεταλλάξεις RAS συχνά εντοπίζονται σε ενθυλακωμένους τύπους της θυλακιώδους παραλλαγής του θηλώδους καρκίνου (Zhu et al. 2003; Liu et al. 2006). Επομένως, είναι πιθανόν οι μεταλλάξεις RAS να αποτελούν έναν σημαντικό δείκτη των καλά διαφοροποιημένων καρκίνων του θυρεοειδούς, οι οποίοι έχουν την τάση να προκαλούν μετάσταση και να αποδιαφοροποιούνται. Παρόλο που οι μεταλλάξεις των γονιδίων RAS δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί δείκτες σε όλους τους καρκίνους του θυρεοειδούς είναι σημαντικές στην ταυτοποίηση της θυλακιώδους παραλλαγής του θηλώδους καρκινώματος, που είναι δύσκολο να ταυτοποιηθεί μετά από κυτταρολογική

εξέταση FNA (Fine Needle Aspiration) (Nikiforov, 2010). Οι μεταλλάξεις του RAS αποτελούν τον δεύτερο πιο συχνό τύπο μετάλλαξης που ανιχνεύεται σε διαδοχικά δείγματα FNA από όζους του θυρεοειδούς, και έχουν σημαντική διαγνωστική αξία. (Xing, 2016)

Σημιακές μεταλλάξεις του γονιδίου, παράγουν ογκογόνα αλληλόμορφα του γονιδίου RAS που εμφανίζουν είτε αυξημένη συγγένεια για το GTP (κωδικόνια 12 και 13) ή την αναστολή της αυτοκαταλυτικής λειτουργίας της GTP-άσης (κωδικόνιο 61). Και οι δύο μηχανισμοί, οδηγούν στην ιδιοσυστατική ανώμαλη ενεργοποίηση των μονοπατιών σηματοδότησης MAPK και PI3/AKT τα οποία με την σειρά τους οδηγούν στην ογκογένεση θυρεοειδούς. (Nikiforov, Nikiforova, 2011; Bos, 1989)

#### **1.3.4.4. Αναδιατάξεις RET/PTC**

Το πρωτο-ογκογονίδιο RET κωδικοποιεί έναν υποδοχέα κινάσης - τυροσίνης στην κυτταρική μεμβράνη. Στον θυρεοειδή αδένα, εκφράζεται έντονα στα παραθυλακιώδη κύτταρα, αλλά όχι στα θυλακιώδη κύτταρα. Στα τελευταία, είναι δυνατή η έκφραση του έπειτα από μία χρωμοσωμική αναδιάταξη, γνωστή ως αναδιάταξη RET/PTC. (Fusco et al., 1987; Grieco et al., 1990)

Μία αναδιάταξη RET/PTC προκύπτει μετά από την σύντηξη του 3' τμήματος του γονιδίου RET, το οποίο κωδικοποιεί τον υποδοχέα μίας κινάσης τυροσίνης, με το 5' τμήμα διαφόρων μη συγγενικών γονιδίων. (Nikiforov, 2002) Οι δύο πιο κοινοί τύποι αναδιάταξης, οι RET / PTC1 και RET / PTC3 , αντιπροσωπεύουν τη συντριπτική πλειοψηφία του συνόλου των αναδιατάξεων που βρέθηκαν στο θηλώδες καρκίνωμα. Η αναδιάταξη RET / PTC1 σχηματίζεται με σύντηξη του γονιδίου RET με το γονίδιο H4 (D10S170), ενώ η αναδιάταξη RET / PTC3 με σύντηξη με το γονίδιο NCOA4 (ELE1). (Grieco et al., 1990; Santoro et al, 1994) Όλες οι συντήξεις αφήνουν άθικτη την περιοχή κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα RET και επιτρέπουν στην ογκοπρωτεΐνη RET/PTC να ενεργοποιήσει το σηματοδοτικό μονοπάτι. (Knauf et al., 2003)

Η αναδιάταξη RET/PTC εντοπίζεται κατά μέσο όρο σε 20% περίπου των ενήλικων σποραδικών θηλωδών καρκινωμάτων ενώ τείνουν να εμφανίζονται κυρίως σε νεότερη ηλικία με κύρια χαρακτηριστικά το υψηλό ποσοστό μετάστασης στους λεμφαδένες και την κλασική θηλώδη ιστολογία. (Nikiforov 2002; Adeniran et al., 2006) Τέλος, η ανίχνευση της αναδιάταξης RET/PTC μπορεί να αύξησει την προεγχειρηματική διάγνωση των θυρεοειδών οζιδίων ιδιαίτερα σε δείγματα ασθενών απροσδιόριστης κυτταρολογίας ή σε περιπτώσεις μη επαρκούς ποσότητας κυττάρων για κυτταρολογική αξιολόγηση (Cheung et al., 2001)

#### 1.3.4.5. Αναδιτάξεις PAX8/PPARγ

Η αναδιτάξη PAX8/PPARγ προκύπτει από την μετατόπιση t (2;3)(q13;p25), που οδηγεί στην σύντηξη του γονιδίου PAX8 που κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα, και στο γονίδιο PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor) το οποίο κωδικοποιεί έναν πυρηνικό υποδοχέα. (Kroll et al, 2000) Η αναδιτάξη PAX8/PPARγ εντοπίζεται στο 30-40% του κλασικού τύπου του θυλακιδώδους καρκινώματος και σε χαμηλότερη συχνότητα σε ογκοκυτταρικά καρκινώματα (Nikiforova et al., 2003; French et al., 2003; Dwight et al., 2003) Οι όγκοι που προκύπτουν από την συγκεκριμένη αναδιτάξη τείνουν να εμφανίζονται σε νεαρότερη ηλικία, είναι μικρότεροι σε μέγεθος ενώ παρουσιάζουν και αγγειακή εισβολή. Η μετατόπιση t οδηγεί στην υπερέκφραση της πρωτεΐνης PPARγ η οποία μπορεί να ανιχνευτεί με ανοσοϊστοχημεία. (Kroll et al, 2000; Nikiforova et al, 2002)

Η αναδιτάξη PAX8/PPARγ εντοπίζεται και στο θυλακιδώδη τύπο του θηλώδους καρκινώματος, με συχνότητα συνήθως με μικρή συχνότητα (περίπου 5%) (French et al., 2003; Nikiforova et al., 2002), που μπορεί να φθάσει μέχρι και το ποσοστό του 38% (Castro et al., 2006). Επιπρόσθετα, αυτή η αναδιτάξη μπορεί να εντοπιστεί σε μικρά ποσοστά της τάξεως 2% με 13%, σε θυλακιδώδη αδενώματα. (Nikiforova et al., 2003; Dwight et al., 2003; Marques et al., 2002)

Τέλος, η αναδιτάξη PAX8/PPARγ και οι σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου RAS σπάνια εντοπίζονται στον ίδιο όγκο. Το γεγονός αυτό, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα θυλακιδώδη καρκινώματα μπορούν να αναπτυχθούν μέσω δύο τουλάχιστον διακριτών μονοπατιών σηματοδότησης, όπου το έναυσμα δίνεται είτε από την αναδιτάξη PAX8/PPARγ είτε από σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο RAS. ( Nikiforova et al., 2003)



## **ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

---

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της συσχέτισης των μεταλλάξεων στα γονίδια BRAF (κωδικόνιο 600) και KRAS (κωδικόνια 12,13 και 61) με τους διαφορετικούς τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς αδένος, στον ελληνικό πληθυσμό.

## 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Υλικά

#### 2.1.1. Δείγματα

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν συνολικά 19 ασθενείς που διαγνώστηκαν με καρκίνο του θυροειδούς. Τα δείγματα προήλθαν από το Παθολογοανατομικό Τμήμα του Στρατιωτικού Νοσοκομείου ΝΙΜΙΤΣ στην Αθήνα. (Πίνακας 1) Τα δείγματα είναι βιοψίες ιστού και περιλαμβάνουν διαφορετικούς τύπους καρκίνου του θυροειδούς. Οι τύποι των ιστών με καρκίνο του θυροειδούς που εξετάστηκαν ήταν οι ακόλουθοι: 13 ιστοί με θυλώδες καρκίνωμα (papillary thyroid carcinoma, PTC), 4 ιστοί με θυλώδες καρκίνωμα θυλακιώδους προτύπου ανάπτυξης (follicular variant of papillary thyroid carcinoma, FVPTC), 1 ιστός με θυλακιώδες καρκίνωμα (follicular thyroid carcinoma, FTC) και 1 ιστός πολυεστιακού μυελοειδούς καρκινώματος (medullary thyroid carcinoma, MTC).

Τύπος Καρκίνου	Αριθμός Δειγμάτων	Γένος	Μέσος όρος ηλικίας
Θυλώδες Καρκίνωμα	13	5 Άρρενες 8 Θηλυκά	Από 25 – 81 ετών ΜΟ: +/- 42,36
Θυλώδες Καρκίνωμα Θυλακιώδους Προτύπου	4	Θηλυκά	
Θυλακιώδες Καρκίνωμα	1	Θηλυκό	
Μυελοειδές Καρκίνωμα	1	Θηλυκό	

**Πίνακας 1:** Στοιχεία δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πειραματική διαδικασία.

#### 2.1.2. Χημικά Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη διάρκεια της εργαστηριακής διαδικασίας ήταν υψηλής καθαρότητας και προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες **Sigma-Aldrich**, **AppliChem Panreac ITW Companies**, **NEW ENGLAND Biolabs®inc**, **QIAGEN**, **Macherey-Nagel**, **Kapa Biosystems**. Πιο συγκεκριμένα :

- **Sigma-Aldrich**  
Αιθανόλη (καθαρότητας  $\geq 99.8\%$ , αριθμός καταλόγου 32221)  
Ευλένιο (αριθμός καταλόγου 33817)
- **AppliChem Panreac ITW Companies**  
Αγαρόζη (Agarose Low EEO –Agarose standard, αριθμός καταλόγου A2114)  
Βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/ml - αριθμός καταλόγου A1152)
- **NEW ENGLAND Biolabs®inc**  
Low Molecular DNA Ladder (αριθμός καταλόγου N3233S)
- **QIAGEN**  
QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (αριθμός καταλόγου 56404)
- **Macherey-Nagel**  
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (αριθμός καταλόγου REF 740609.250)
- **Kapa Biosystems**  
Πολυμεράση Kapa Taq (5 U/μl) (αριθμός καταλόγου KE1000)

## 2.2. Μέθοδοι

### 2.2.1 Απομόνωση DNA από βιοψίες ιστών

#### 2.2.1.1. Αντιδραστήρια- Διαλύματα

Για την απομόνωση γενωμικού DNA, από βιοψία ιστού σταθεροποιημένου με φορμαλίνη και εγκλεισμένου σε παραφίνη (Formalin-Fixed Paraffin Empted, FFPE), χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια και διαλύματα:

- ✓ Ευλένιο (Sigma-Aldrich)
- ✓ Αιθανόλη (Sigma-Aldrich, καθαρότητας  $\geq 99.8\%$ )
- ✓ Kit **QIAamp DNA FFPE Tissue** (for purification of genomic DNA from paraffin-embedded tissues) (εταιρεία **QIAGEN**)

Το kit **QIAamp DNA FFPE Tissue** περιείχε τα εξής αντιδραστήρια:

- Διάλυμα Πρωτεΐνάσης K (20 mg/ml)

- Ρυθμιστικά διαλύματα Buffer ATL, Buffer AL (Lysis Buffer), Wash Buffer AW1 (Wash Buffer 1), Wash Buffer AW2 (Wash Buffer 2), Elution Buffer ATE (Elution Buffer)
- QIAamp MinElute κολώνες και σωληνάρια συλλογής χωρητικότητας 2 ml

Τα διαλύματα AW1 και AW2 παρασκευάστηκαν ως εξής:

- AW1= Σε 19 ml διαλύματος AW1 του kit προστέθηκαν 25 ml αιθανόλης (καθαρότητας  $\geq 99.8\%$ ).
- AW2= Σε 13 ml διαλύματος AW1 του kit προστέθηκαν 30 ml αιθανόλης (καθαρότητας  $\geq 99.8\%$ ).

### 2.2.1.2. Πρωτόκολλο Απομόνωσης

Η απομόνωση του γενωμικού DNA από βιοψίες ιστών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την ακόλουθη διαδοχή γεγονότων. Αρχικά, αφαιρέθηκε η περίσσεια παραφίνης από τους ιστούς του κάθε δείγματος, με την χρήση αποστειρωμένου νυστεριού. Έπειτα, τεμαχίστηκε ο ιστός σε τομές πάχους 5-10  $\mu\text{m}$ , προκειμένου να επιτευχθεί η αποτελεσματικότερη απομόνωση του DNA. Οι τομές αυτές, τοποθετήθηκαν σε σωλήνα Eppendorf του 1,5 ml, ακολούθησε η προσθήκη 1 ml **ξυλενίου** και έπειτα ισχυρή ανάδευση, με τη χρήση Vortex, για 10 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (**Thermo ELECTRON CORPORATION, HERAEUS PICO17 Centrifuge**) σε πλήρη ταχύτητα (**16.600 x g**) για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να διαλυθεί πλήρως η παραφίνη στο ξυλένιο και να καταστεί ευκολότερη η απομάκρυνση της από τον ιστό του δείγματος. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο αφαιρέθηκε πολύ προσεκτικά με τη χρήση πιπέτας, για να αποφευχθεί η διατάραξη του ιζήματος. Ακολούθως, προστέθηκε 1 ml αιθανόλης (καθαρότητας  $\geq 99.8\%$ ) με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση του ξυλενίου. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε έντονη ανάδευση με τη χρήση vortex για 10 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρωση των δειγμάτων σε πλήρη ταχύτητα (**16600 x g**) για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Όπως περιεγράφηκε και παραπάνω, απομακρύνθηκε με πολύ προσοχή το υπερκείμενο και το κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε επωαστικό κλίβανο 37° C για 15-20 λεπτά, με ανοιχτό καπάκι, μέχρι να εξατμιστεί πλήρως η περίσσεια αιθανόλης. Η επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος επιτεύχθηκε με την προσθήκη 180  $\mu\text{l}$  κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος ATL (**Buffer ATL**) και 20  $\mu\text{l}$  **πρωτεΐνάσης K** (20 mg/ml) και έπειτα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ισχυρή ανάδευση με τη χρήση vortex για 10 δευτερόλεπτα. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων, σε ένα θερμικό περιστρεφόμενο επωαστήριο (**rotating incubator**) με εσωτερική θερμοκρασία 56 °C για τουλάχιστον 2 ½ ώρες ή για περισσότερο χρονικό διάστημα, μέχρι να επέλθει η πλήρης λύση του κάθε δείγματος. Συγκεκριμένα, κάποια δείγματα χρειάστηκε να παραμείνουν στο στάδιο της επώασης καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας (24 ώρες, overnight) ενώ σε όλα τα δείγματα χρειάστηκε επιπλέον προσθήκη 10 έως

20 μl πρωτεΐνάσης K, εφόσον το περιεχόμενο δεν είχε λυθεί πλήρως μετά από μία overnight επώαση (24 ώρες) στους 56 °C. Μετά την πλήρη λύση τους, τα δείγματα επώασθηκαν στους 90 °C για χρονικό διάστημα 1 ώρας σε μπλοκ θέρμανσης (**heating block**). Μία σύντομη φυγοκέντρηση, κρίθηκε απαραίτητη, ώστε να συλλεχθούν όλα τα σταγονίδια που είχαν παραμείνει στα τοιχώματα του Eppendorf στον πάτο του σωλήνα και ύστερα προστέθηκαν 200 μl ρυθμιστικό διάλυμα AL (**Buffer AL**) και 200 μl **αιθανόλης**. Να σημειωθεί πως πριν και μετά από την κάθε προσθήκη, τα δείγματα αναδεύονταν ισχυρά με τη χρήση vortex. Μία ξεχωριστή **ειδική στήλη έκλουσης QIAamp MinElute**, η οποία φυλάσσεται στο ψυγείο (4° C), τοποθετήθηκε για το κάθε δείγμα σε ειδικό σωλήνα συλλογής των 2 ml (**collection tube**). Εκεί μεταφέρθηκε προσεκτικά ολόκληρο το κυτταρόλυμα ύστερα από μία σύντομη φυγοκέντρηση. Η δέσμευση του γενωμικού DNA στη μεμβράνη της στήλης και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προσμίξεων διαμέσου της μεμβράνης που συλλέγονταν στο σωλήνα συλλογής, επιτεύχθηκε με τη φυγοκέντρηση της ειδικής στήλης, σε ταχύτητα **6,000 x g** για 1 λεπτό. Στη συνέχεια, η ειδική στήλη έκλουσης μεταφέρθηκε σε νέο ειδικό σωλήνα συλλογής των 2 ml, όπου προστίθενται 500 μl από τα ρυθμιστικά διαλύματα έκλουσης AW\*1 και AW\*2 (**Buffer AW\*1 και Buffer AW\*2**) και ακολούθως φυγοκέντρηση των παραπάνω σε ταχύτητα **6,000 x g** για 1 λεπτό. Η παραπάνω διαδικασία αποσκοπούσε στον περαιτέρω καθαρισμό του γενωμικού DNA, το οποίο δεσμεύεται στην μεμβράνη και μεταφέρεται εκ νέου σε νέο σωλήνα συλλογής. Ακολούθησε η φυγοκέντρηση της στήλης σε πλήρη ταχύτητα (**16.600 x g**), για 3 λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη και η μεταφορά της στήλης σε νέο eppendorf των 1,5 ml. Το τελευταίο στάδιο της έκλουσης περιελάμβανε την προσθήκη, στο κέντρο της στήλης, 25 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης ATE (**Buffer ATE**). Τέλος, διεξήχθη επώαση της στήλης για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να αυξηθεί η απόδοση έκλουσης του DNA, και φυγοκέντρηση σε πλήρη ταχύτητα (**16,600 x g**) για 1 λεπτό. Η ειδική στήλη απομακρύνθηκε και το γενωμικό DNA αποθηκεύεται και διατηρείται στους -20° C. Θα ήταν σημαντικό να επισημανθεί, πως η όλη διαδικασία της απομόνωσης γενωμικού DNA, πραγματοποιήθηκε σε αποστειρωμένο χώρο και με την χρήση ειδικών αποστειρωμένων εργαλείων.

## 2.2.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

### 2.2.2.1. Αντιδραστήρια - Διαλύματα

Για την ηλεκτροφόρηση των νουκλεϊνικών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- ✓ **TAE 50X (stock):** Tris-base (242 gr), οξικό οξύ (57.1 ml), EDTA (18.6 gr), ddH<sub>2</sub>O μέχρι 1 L. pH: 8.
- ✓ **Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr):** Υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/ml, αριθμός καταλόγου A1152.
- ✓ **Χρωστική φόρτωσης διαλύματος (Loading Buffer, 6X):** 0.25% Μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromofenol blue) (25 mg), 30% w/v Γλυκερόλη (3 ml), ddH<sub>2</sub>O (7 ml). Συνολικός όγκος: 10 ml.
- ✓ **Αγαρόζη:** (Agarose Low EEO - Agarose standard, 500 gr, αριθμός καταλόγου A2114).

Μάρτυρας Low Molecular DNA Ladder (500 µg/ml, αριθμός καταλόγου N3233S).

### 2.2.2.2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

#### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μία πρότυπη μέθοδος για τον διαχωρισμό μορίων DNA διαφορετικού μήκους. Έχει πολλές εφαρμογές στην ανάλυση μεγέθους κλασμάτων DNA, ενώ, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον διαχωρισμό μορίων RNA.

Ηλεκτροφόρηση είναι η κίνηση φορτισμένων μορίων σε ένα ηλεκτρικό πεδίο: τα αρνητικά φορτισμένα μόρια κινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο, ενώ, τα θετικά φορτισμένα μόρια προς το αρνητικό ηλεκτρόδιο. Η τεχνική αυτή, όταν διεξάγεται σε υδάτινα διαλύματα, κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα μετανάστευσης είναι το σχήμα του μορίου και το ηλεκτρικό του φορτίο. Αντίθετα, όταν πραγματοποιείται σε πήκτωμα αγαρόζης, καθοριστικός παράγοντας είναι το μήκος των μορίων. Αυτό συμβαίνει, διότι η πήκτωμα είναι ένα δίκτυο από πόρους διαμέσου των οποίων πρέπει να διέλθουν τα μόρια DNA προκειμένου να προσεγγίσουν το θετικό ηλεκτρόδιο. Τα βραχύτερα μόρια εμποδίζονται λιγότερο κατά την δίοδο τους συγκριτικά με τα μακρύτερα μόρια και έτσι μετακινούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα μέσα στην πήκτωμα. Επομένως, μόρια διαφορετικού μήκους σχηματίζουν ζώνες στην πήκτωμα (Brown, 2010).

Η αγαρόζη εξάγεται με τη μορφή άγαρ, ένα προϊόν που λαμβάνεται από ορισμένα θαλάσσια φύκη και διατίθενται με μορφή σκόνης. Το κύριο συστατικό του είναι ένας πολυσακχαρίτης που παράγεται από διάφορα είδη του είδους Rhodophyceae (*Geldium amansii*, *G. Cartilagineum*), αποτελείται από επαναλαμβανόμενες υπομονάδες D-γαλακτοπυρανόζης και μπορεί να προστεθεί σε οποιοδήποτε θρεπτικό μέσο, σε συγκέντρωση 1 - 2%.

Τα τμήματα του DNA καθίστανται ορατά με την προσθήκη μίας χρωστικής, του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), στο πήκτωμα αγαρόζης και την έκθεση του σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται ανάμεσα στις άυλακες του DNA και να φθορίζει κατά την έκθεση σε UV. Η ποσοτικοποίηση βασίζεται στην εκτίμηση του φθορισμού που εκπέμπεται από τα μόρια του βρωμιούχου αιθιδίου κάτω από την υπεριώδη ακτινοβολία. Τα τμήματα του DNA εμφανίζονται σαν μία σειρά από φωτεινές ζώνες, καθεμία από τις οποίες αντιστοιχεί σε τμήμα συγκεκριμένου μεγέθους. Τα μεγέθη αυτά μπορούν να προσδιοριστούν μετά από σύγκριση με μόρια DNA γνωστού μεγέθους (**Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών, DNA Ladder**).

Με την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης επιτυγχάνεται τόσο ο έλεγχος της απόδοσης της PCR, όσο και η πιθανότητα επιμόλυνσης (προσμίξεις των δειγμάτων με ξένο DNA), μέσω των τυφλών δειγμάτων (αρνητικοί μάρτυρες). Η απουσία φωτεινής ζώνης από τους αρνητικούς μάρτυρες υποδεικνύει την απουσία επιμόλυνσης και πιστοποιεί ότι προηγήθηκε ένα επιτυχημένο πείραμα.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε όλες τις ηλεκτροφορήσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της παρούσας πειραματικής διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης με ποσοστιαία περιεκτικότητα 2% σε αγαρόζη. Για την δημιουργία αυτών των πηκτωμάτων, η διαδικασία ήταν η εξής: Αρχικά, ζυγίστηκαν 1,2 gr σκόνη αγαρόζης με την βοήθεια ζυγού ακριβείας και μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη των 100 ml, όπου προστέθηκε και 60 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE (**Tris/Acetate/EDTA**) 1X. Με κυκλικές κινήσεις της κωνικής φιάλης επιτεύχθηκε μερική διαλυτοποίηση της αγαρόζης και, έπειτα, τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων στους 40° C για 2 λεπτά. Στη συνέχεια, ακολούθησε ήπια ανάδευση αυτής κάτω από τρεχούμενο, δροσερό νερό έως ότου κρυώσει λίγο το μείγμα και προστέθηκε 1.8 ml διαλύματος **βρωμιούχου αιθιδίου** 10 mg/ml (ώστε η τελική συγκέντρωση του EtBr να είναι 0,5 µg/ml). Η καλή ανάδευση συνεχίστηκε μέχρι ως ότου να διαλυθεί η υπολειπόμενη ποσότητα του βρωμιούχου αιθιδίου και το μείγμα μεταφέρθηκε σε ειδικό καλούπι. Το συγκεκριμένο καλούπι περιελάμβανε ειδικά χτενάκια, ώστε να δημιουργούνται οι εσοχές ή αλλιώς τα «πηγαδάκια» όπου φορτώνονται ο μάρτυρας και τα

δείγματα. Μετά την πήξη του πηκτώματος, αφαιρέθηκαν τα χτενάκια και το πήκτωμα τοποθετήθηκε στην ειδική συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, η οποία ήταν γεμάτη με **TAE 1X** (παρέχει τα απαραίτητα ιόντα για να πραγματοποιείται η μεταφορά ρεύματος και να διατηρεί το pH σε μια σχετικά σταθερή τιμή).

Πριν την τοποθέτηση των υπό ανάλυση δειγμάτων στα ειδικά «πηγαδάκια» του πηκτώματος αγαρόζης, απαιτείται η ανάμειξή τους με ένα **διάλυμα φόρτωσης - χρωστική ή Loading Buffer**. Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει μπλε της βρωμοφαινόλης και γλυκερόλη. Το μπλε της βρωμοφαινόλης είναι μία χρωστική ιχνηλασιμότητας χαμηλού μοριακού βάρους με αρνητικό φορτίο, η οποία είναι ορατή με φυσικό φως, καθιστώντας τα δείγματα ορατά, γεγονός που διευκολύνει τη τοποθέτησή τους (φόρτωσή τους) στο πήκτωμα ενώ παράλληλα επιτρέπει τον έλεγχο της προόδου της ηλεκτροφόρησης. Η γλυκερόλη με τη σειρά της, αυξάνει τη πυκνότητα του δείγματος ώστε να διευκολυνθεί η εισαγωγή του στο “πηγαδάκι” και να μη διαχυθεί στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Watson et al., 2007). Τέλος, μαζί με τα δείγματα είναι απαραίτητη και η φόρτωση ενός δείκτη γνωστού μοριακού βάρους (**Low Molecular DNA Ladder**). Τα μεγέθη των ζωνών που περιέχει είναι γνωστά και σύμφωνα με αυτά και ανάλογα με τη θέση κάθε ζώνης υπολογίζεται το μοριακό βάρος των τμημάτων DNA (Lee et al., 2012).

### 2.2.3. Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η παραγωγή μεγάλου αριθμού πανομοιότυπων αντιγράφων DNA, μέσω κλωνοποίησης, κατέστη δυνατή κατά την δεκαετία του 1970. Ωστόσο, η διαδικασία αυτή είναι χρονοβόρα. Στα μέσα της δεκαετίας του 1980, αναπτύχθηκε από τον Kary Mullis η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (**PCR, Polymerase Chain Reaction**), η οποία έφερε μία νέα επανάσταση στον τομέα της γονιδιακής ανάλυσης.

Η PCR είναι πλέον από τα σημαντικότερα εργαλεία τη σύγχρονης μοριακής βιολογίας. Μέσω μια διαδικασίας που ονομάζεται *πολλαπλασιασμός* (amplification), η PCR επιτρέπει την παραγωγή *in vitro*, από κάποιο μείγμα DNA, ενός εξαιρετικά μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Η αλληλουχία αυτή βρίσκεται μεταξύ δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων μήκους περίπου 20 νουκλεοτιδίων και συντίθενται σε κατάλληλα μηχανήματα. Οι εκκινήτες αυτοί είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε ο ένας να είναι συμπληρωματικός με την μία άκρη της αλληλουχίας-στόχου στη μία αλυσίδα



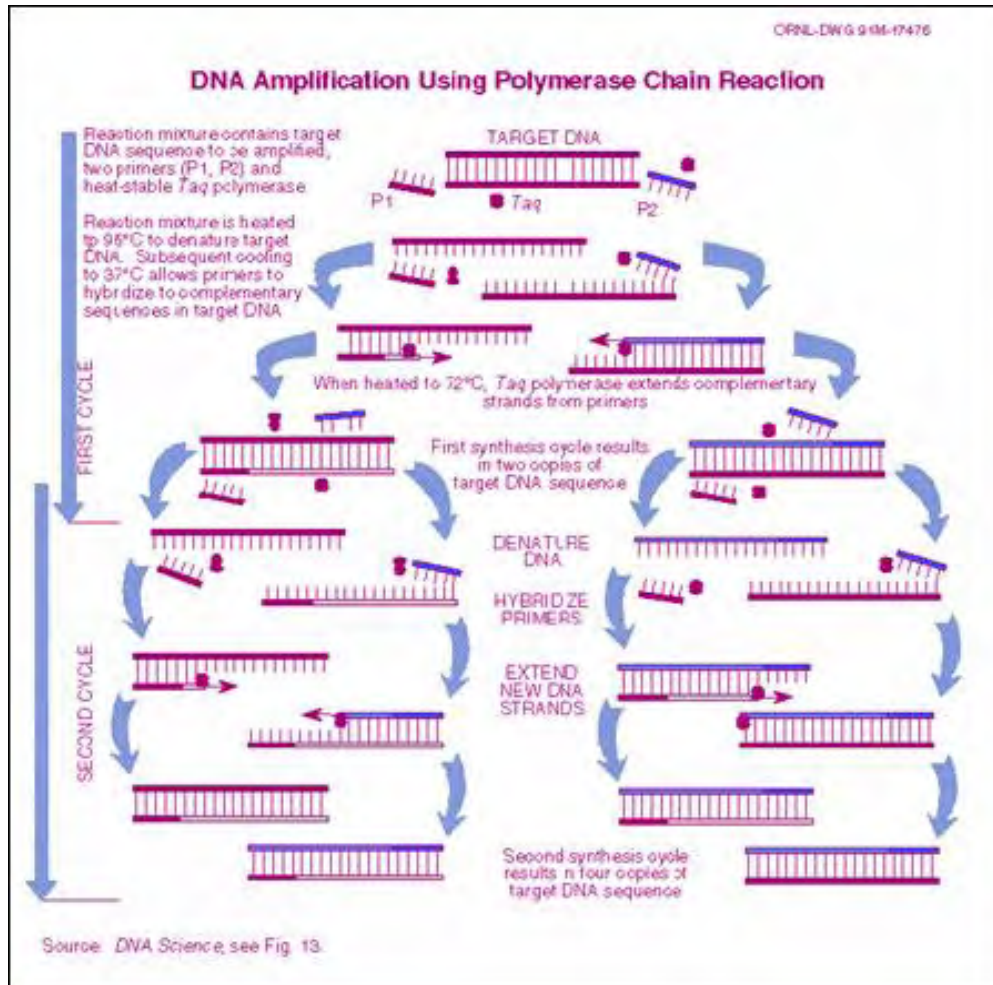
του DNA και ο άλλος με την άλλη άκρη της αλληλουχίας-στόχου στη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA.

Σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της PCR έχει μία ειδική DNA πολυμεράση, η **Taq DNA πολυμεράση**, που έχει απομονωθεί από το βακτήριο ***Thermus aquaticus (Taq)***, το οποίο έχει ως φυσικό περιβάλλον τις θερμές πηγές. Η Taq πολυμεράση έχει τη βασική ιδιότητα να παραμένει δραστική σε υψηλές θερμοκρασίες. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της είναι 72°C και καθώς καταστρέφεται με θέρμανση επιτρέπει την χρήση υψηλών θερμοκρασιών στα στάδια του υβριδισμού και της επιμήκυνσης.

### **Τα στάδια της PCR**

Η διαδικασία της PCR πραγματοποιείται σε 3 κύρια στάδια τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά για 25 με 35 περίπου φορές (κύκλοι). Τα στάδια αυτά συνοψίζονται ως εξής (Εικόνα 11):

1. Στάδιο αποδιάταξης του DNA- στόχου με θέρμανση στους 94-95ο C.
2. Υβριδοποίηση των εκκινητών στα μονόκλιωνα μόρια DNA σε θερμοκρασίες, που εξαρτώνται από το μήκος της αλληλουχίας και των εκκινητών.
3. Επιμήκυνση εκκινητών από μία θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, όπως η DNA πολυμεράση Taq, στους 72ο C. Η πολυμεράση επιμηκώνει και τους δύο εκκινητές προς το μέρος του στόχου, διότι η κατεύθυνση της σύνθεσης του DNA ακολουθεί την πορεία από το 5' προς το 3' άκρο. Η σύνθεση του DNA πραγματοποιείται και στις δύο αλυσίδες αλλά προεκτείνεται και πέρα από την αλληλουχία-στόχο.



**Εικόνα 11:** Διαδικασία της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) ([https://history.nih.gov/nihownwords/docs/page\\_39g.html](https://history.nih.gov/nihownwords/docs/page_39g.html))

Τα παραπάνω βήματα αναλύονται ακολούθως:

1. Στάδιο μετουσίωσης δίκλωνου DNA-προτύπου. Το μείγμα θερμαίνεται στους 94-96°C για 20 δευτερόλεπτα, ώστε να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου που συνδέουν τις δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Έτσι, προκύπτουν δύο μονόκλωνες αλυσίδες που θα χρησιμεύσουν ως μήτρα για την σύνθεση δύο νέων συμπληρωματικών αλυσίδων. Σε αυτό το στάδιο ενεργοποιείται η Taq DNA πολυμεράση.
2. Στάδιο μετουσίωσης εκκινητών στην μήτρα. Η θερμοκρασία του μείγματος μειώνεται στους 55°C για 30 δευτερόλεπτα. Με αυτό τον τρόπο, επιτυγχάνεται η ένωση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές προς αυτές μονόκλωνες DNA αλυσίδες-μήτρα, που προέκυψαν από το πρώτο στάδιο. Οι εκκινητές εντοπίζουν το προς αντιγραφή τμήμα του DNA στόχου και προσανατολίζονται με τέτοιο τρόπο ώστε το 5' άκρο του καθενός να ενώνεται με το 3' άκρο της συμπληρωματικής αλυσίδας μήτρας. Η θερμοκρασία σε αυτό το στάδιο κυμαίνεται μεταξύ 40°C και 60°C. Η άριστη

Θερμοκρασία εξαρτάται από το μήκος των εκκινητών, την συγκέντρωσή τους στο μείγμα και από την  $T_m$  (η θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών) και επιλέγεται να είναι  $5^\circ\text{C}$  έως  $10^\circ\text{C}$  μικρότερη της  $T_m$ .

3. Στάδιο σύνθεσης αντιγράφων DNA. Η θερμοκρασία αυξάνεται στους  $72^\circ\text{C}$  για 1 λεπτό όπου είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για την Taq πολυμεράση. Σε αυτό το στάδιο, η Taq πολυμεράση, παρουσία ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος και ιόντων  $\text{Mg}^+$ , χρησιμοποιεί ως μήτρα τις μονόκλωνες αλυσίδες, επιμηκύνοντας τους εκκινητές προσθέτοντας 35-100 δεοξυριβοζονουκλεοτίδια (dNTPs), ανά δευτερόλεπτο, με προσανατολισμό  $5' \rightarrow 3'$ , τα οποία είναι συμπληρωματικά στο υπόστρωμα. Αφού οι εκκινητές επεκταθούν μερικές βάσεις, τότε κατέχουν μια ισχυρότερη ιονική έλξη προς την ακολουθία-στόχο, με αποτέλεσμα να μειώνεται η πιθανότητα αποδέσμευσης των εκκινητών από την ακολουθία-στόχο. Μετά από κάθε κύκλο, οι πρόσφατα συντιθέμενοι κλώνοι του DNA μπορεί να χρησιμεύσουν ως εκμαγείο στον επόμενο κύκλο. Το κύριο προϊόν αυτής της εκθετικής αντίδρασης είναι ένα τμήμα του δίκλωνου DNA, του οποίου τα άκρα ορίζονται από τους εκκινητές και το μήκος του από την απόσταση μεταξύ των εκκινητών.

Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας επιτυγχάνονται με τη χρήση ειδικών αυτοματοποιημένων συσκευών, **των θερμικών ανακυκλωτών ή θερμοκυκλοποιητών** και είναι ταχύτατες, ώστε αυξομειώσεις της τάξεως των  $40^\circ\text{C}$  να λαμβάνουν χώρα σε λιγότερο από ένα λεπτό.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Με την διαδικασία της PCR, ενισχύθηκαν η περιοχή που περιέχει το κατάλοιπο 600 του γονιδίου BRAF και οι περιοχές που περιέχουν τα κωδικόνια 12, 13 και 61 του γονιδίου KRAS. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των παραπάνω περιοχών, καθώς και το μέγεθος των ενισχυμένων προϊόντων και οι υπό μελέτη σημειακές μεταλλάξεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 2:** Αλληλουχίες εκκινητών, μέγεθος ενισχυμένων προϊόντων και οι υπό μελέτη σημειακές μεταλλάξεις για τα γονίδια BRAF και KRAS

Γονίδιο	Αλληλουχία Εκκινητή 5'→3	Μετάλλαξη	Αμινοξέα
<b>BRAF</b>	For: CATAATGCTTGCTCTGATAGGAA Rev: AGTAACTCAGCAGCATCTCAG	<b>Κατάλοιπο 600</b> (GTG)	Βαλίνη
<b>KRAS</b>	For: AACCTTATGTGTGACATGTTTC Rev: TCCTGCACCAGTAATATGC	<b>κωδικόνια 12-13</b> (GGT-GGC)	Γλυκίνη - Γλυκίνη
<b>KRAS</b>	For: AATCCAGACTGTGTTTCTCC Rev: TTAAACCCACCTATAATGGTG	<b>κωδικόνιο 61</b> (CAA)	Γλουταμίνη

For: (forward primer, Πρόσθιος εκκινητής), Rev: (reverse primer, ανάστροφος εκκινητής).

Οι θερμοκρασιακές εναλλαγές διεξήχθησαν στην ειδική συσκευή Thermo cycling (**SENSQUEST lab cycler**) και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του κάθε γονιδίου δίνονται στον Πίνακα 3:

Στάδιο	BRAF		KRAS 12/13		KRAS 61	
	Θερμοκρασία	Χρόνος	Θερμοκρασία	Χρόνος	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	95° C	5 min	95	5 min	95° C	5 min
Αποδιάταξη	95° C	30 sec	95° C	30 sec	95° C	30 sec
Υβριδοποίηση	53° C	30 sec	51° C	30 sec	51° C	30 sec
Επέκταση	72° C	5 min	72° C	30 sec	72° C	30 sec
Τελική Επέκταση	72° C	5 min	72° C	10 min	72° C	10 min

**Πίνακας 3:** Συνθήκες για την αντίδραση PCR για τους εκκινητές BRAF, KRAS 12/13, KRAS 61.

Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν 40 κύκλοι αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επέκτασης.

Στην παρούσα εργαστηριακή μελέτη, όλα τα αντιδραστήρια προμηθεύτηκαν από την εταιρεία **Kapa Biosystems (KAPA Taq PCR kit)**. Η αντίδραση πολυμερισμού πραγματοποιούνταν σε τελικό όγκο 20-50 μl σε ειδικό σωληνάριο erpendorf τελικού όγκου 0,2 ml. Συνεπώς, οι τελικές ποσότητες του κάθε αντιδραστήριου που χρησιμοποιήθηκαν σε καθεμία αντίδραση PCR, προσαρμόζονταν κάθε φορά αναλόγως και παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

**Πίνακας 4:** Ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR.

Αντιδραστήρια	Τελική Συγκέντρωση	Όγκος (μl)
10X PCR Buffer (+ 15 mM Mg <sup>2+</sup> )	1X Buffer + 1,5 mM (Mg <sup>2+</sup> )	5
Μείγμα dNTPs (10 mM το καθένα)	0,2 mM (το καθένα)	1
10 pmol/μl Εκκινητής Forward	0,5 pmol/μl	2,5
10 pmol/μl Εκκινητής Reverse	0,5 pmol/μl	2,5
Κατα Taq Πολυμεράση (5 U/μl)	0,02 U/μl	0,2
Template DNA	-	4
H <sub>2</sub> O	-	34,8
<b>ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ</b>		<b>50</b>

Είναι σημαντικό να τονιστεί, ότι σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε και ένα **αρνητικό δείγμα ελέγχου**, το οποίο περιέχει όλα τα συστατικά μιας αντίδρασης PCR, με την μόνη διαφορά ότι το γενωμικό DNA αντικαταστάθηκε με νερό. Το αρνητικό δείγμα ελέγχου δεν αναμένεται να δώσει κάποια ζώνη, αφού δεν περιέχει γενωμικό DNA για να ενισχυθεί. Σε αντίθεση περίπτωση, η εμφάνιση προϊόντος αποτελεί σημάδι ύπαρξης επιμόλυνσης και απαιτείται επανάληψη της αντίδρασης.

### Ενίσχυση του γονιδίου BRAF

**Πρόσθιος Εκκινητής (Forward)** → CATAATGCTTGCTCTGATAGGAA

**Ανάστροφος Εκκινητής (Reverse)** → AGTAACTCAGCAGCATCTCAG

Στη συνέχεια δίνεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου BRAF, όπου σημειώνονται οι περιοχές των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν (με κόκκινο χρώμα) και με μπλε χρώμα η περιοχή του κωδικονίου 600. Το μέγεθος του προϊόντος που ενισχύεται με την PCR είναι 244 bps.

```
CTCTTACCTAAACTCTTCATAATGCTTGCTCTGATAGGAAAATGAGATCTACTGTTTTCTTTACTTAC  
TACACCTCAGATATATTTCTTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTGA  
ATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAG  
GCTATTTTTCCACTGATTAATTTTTGGCCCTGAGATTGCTTGCTCTTACTAGAAAAGTCATTGAAGGTC
```

### Ενίσχυση του γονιδίου KRAS 12/13

**Πρόσθιος Εκκινητής (Forward)** → AACCTTATGTGTGACATGTTC

**Ανάστροφος Εκκινητής (Reverse)** → TCCTGCACCAGTAATATGC

Πιο συγκεκριμένα, η νουκλεοτιδική αλληλουχία, οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (με πράσινο χρώμα) και με κόκκινο το ζητούμενο κωδικόνιο για το γονίδιο KRAS 12/13, παραθέτονται παρακάτω. Το μέγεθος του προϊόντος που ενισχύεται με την PCR είναι 216 bps.

```
TTGATAGTGTATTAACTTATGTGTGACATGTTCTAATATAGTCACATTTTCATTATTTTTATTATAAG  
GCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTG  
ACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAATCTTGTTTT  
AATATGCATATTACTGGTGCAGGACCATTCT
```

### Ενίσχυση του γονιδίου KRAS 61

**Πρόσθιος εκκινητής (Forward) → AATCCAGACTGTGTTTCTCC**

**Ανάστροφος Εκκινητής (Reverse) → TTAAACCCACCTATAATGGTG**

**ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ:** 217 bps

Πιο συγκεκριμένα, η νουκλεοτιδική αλληλουχία, οι εκκινητές και το ζητούμενο κωδικόνιο για το γονίδιο KRAS 61, παραθέτονται παρακάτω ενώ το μέγεθος του προϊόντος που ενισχύθηκε είναι 217 bps:

```
CTGTAAT AATCCAGACTGTGTTTCTCCCTTCTCAGGATTCCTACAGGAAGCAAGTAGTAATTGATGGAGAAACCT  
GTCTCTTGGATATTCTCGACACAGCAGGTCAAAGAGGAGTACAGTGCAATGAGGGACCAGTACATGAGGACTGG  
GGAGGGCTTTCTTTGTGTATTTGCCATAAATAATACTAAATCATTTGAAGATATT CACCATTATAGGTG  
GGTTTAAATTGAAT
```

Ακολούθως, τα προϊόντα των αντιδράσεων της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης σύστασης 2%. Στόχος αυτής της διεργασίας, ήταν να διαπιστωθεί αν τα προϊόντα της PCR είχαν το σωστό μέγεθος, σύμφωνα με τα παραπάνω στοιχεία. Για την ηλεκτροφόρηση, αναμείχθηκαν 5 μl από το προϊόν της αντίδρασης PCR με 1 μl **χρωστικής-διαλύματος φόρτωσης (6X)** και φορτώθηκαν στα πηγαδάκια. Στο πήκτωμα φορτώθηκε και μάρτυρας μοριακού βάρους (**Low MW DNA Ladder**). Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετήθηκε κάτω από ειδική λάμπα UV, ώστε να εμφανιστεί το αντίστοιχο αποτέλεσμα.

## 2.2.4. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

### ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR έχει σαν στόχο την απομάκρυνση των υπολειμάτων δεοξυνουκλεοτιδίων, διμερή εκκινητών, μη ειδικών προϊόντων PCR και ρυθμιστικού διαλύματος που έχουν παραμείνει από τις ενζυμικές αντιδράσεις. Ο καθαρισμός του ενισχυμένου προϊόντος της PCR έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, όπως αυτές αναφέρονται στο πρωτόκολλο του **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (for DNA, RNA and protein purification)** της εταιρίας **MACHEREY – NAGEL**.

Αρχικά, σε όλα τα δείγματα προστέθηκε απεσταγμένο νερό μέχρι να φτάσει ο όγκος του κάθε δείγματος στα 50 μl. Στη συνέχεια, αφού μεταφέρθηκαν τα δείγματα σε καθαρά tubes, προστέθηκε η διπλάσια ποσότητα (100μl) από αυτή του δείγματος, ρυθμιστικού διαλύματος NTI (**Buffer NTI**). Σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου, η ανάμειξη αναφέρεται σε 2 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος NTI για κάθε 1 όγκο του δείγματος. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση με την χρήση vortex και μεταφορά του διαλύματος σε ειδική στήλη έκλουσης που είχε τοποθετηθεί στον κάθε σωλήνα διαλογής των 2 ml (**collection tube**). Η προσεκτική τοποθέτηση του διαλύματος στο κέντρο της ειδικής στήλης, είχε σαν αποτέλεσμα την δέσμευση του DNA στη μεμβράνη της και έπειτα από φυγοκέντρηση με ταχύτητα **11,000 x g** για 30 δευτερόλεπτα, αφαιρέθηκε το απορρέον υγρό και η στήλη επανατοποθετήθηκε στον ίδιο, αλλά καθαρισμένο σωλήνα συλλογής. Έπειτα, προστέθηκαν στη στήλη 700 μl ρυθμιστικού διαλύματος NT3 (**Buffer NT3**) και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε ταχύτητα **11,000 x g** για 30 δευτερόλεπτα. Στο σημείο αυτό, αφαιρέθηκε και πάλι το απορρέον υγρό ενώ η διαδικασία έκλουσης της μεμβράνης επαναλήφθηκε ομοίως. Μετά από φυγοκέντρηση σε ταχύτητα **11,000 x g** για 1 λεπτό, αφαιρέθηκε πλήρως η αιθανόλη του ρυθμιστικού διαλύματος NT3, η οποία μπορεί να παρεμποδίσει τις ενζυμικές αντιδράσεις. Η στήλη έκλουσης τοποθετήθηκε σε νέο erpendorf των 1,5 ml, και προστέθηκε σε αυτή κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος NE (**Buffer NE**). Η ποσότητα που προστίθεντο κάθε φορά από το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα, καθοριζόταν από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης που είχαν προηγηθεί. Συγκεκριμένα, ανάλογα με την ένταση της ζώνης κάθε προϊόντος της PCR οι όγκοι έκλουσης κυμαίνονταν μεταξύ 15 και 30 μl. Αμέσως μετά, πραγματοποιήθηκε επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου (18°-25° C) και φυγοκέντρηση σε ταχύτητα **11,000 x g** για 1 λεπτό. Το υγρό που παρέμεινε στον πάτο του erpendorf είναι το καθαρό πλέον προϊόν της PCR και τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 2%. Τέλος, στα δείγματα διατηρήθηκαν στον καταψύκτη (-20° C) μέχρι την αλληλούχιση τους.

## 2.2.5. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

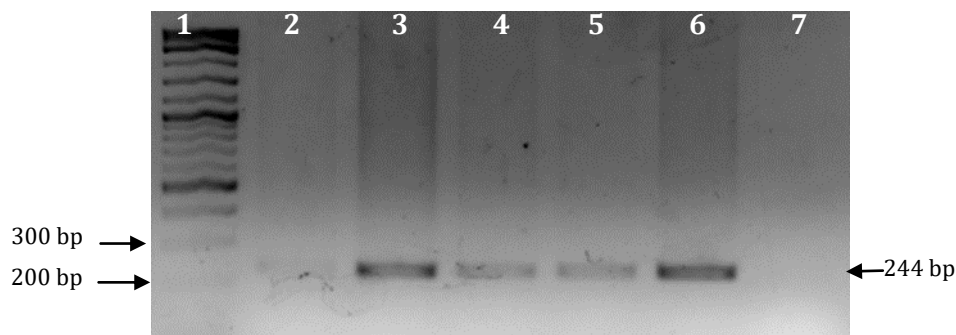
Η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR εκτελέστηκε από μία εξειδικευμένη εταιρεία βιοτεχνολογικών και μοριακών τεχνικών με την επωνυμία **CEMIACA (Cellular and Molecular Immunological Applications) (Λάρισα)**. Τα αποτελέσματα των αλληλουχίσεων στάλθηκαν υπό τη μορφή χρωματογραφημάτων, τα οποία αναλύθηκαν στο εργαστήριο με τη βοήθεια του εξειδικευμένου λογισμικού προγράμματος **BioEdit v7.2.5 (developer Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad CA 92008, Last update 12/11/2013, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html> )**.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι για την αλληλούχιση των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκαν τόσο οι πρόσθιοι όσο και οι ανάστροφοι εκκινητές των γονιδίων BRAF και KRAS (KRAS 12/13 και KRAS 61) που δίνονται στον Πίνακα 2.

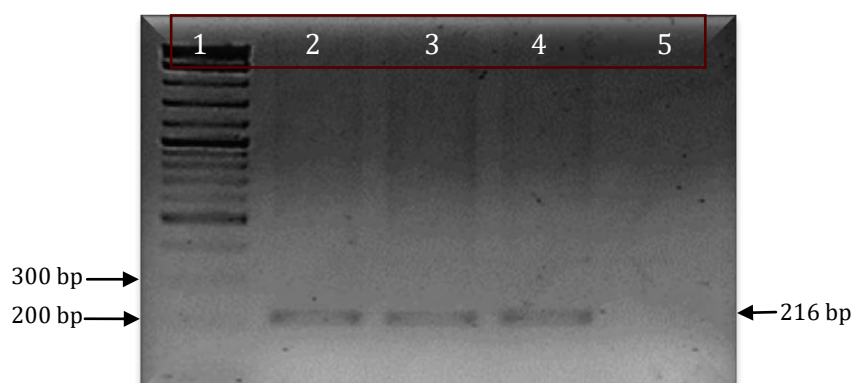
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Ενίσχυση της υπό μελέτη περιοχής των γονιδίων *BRAF* και *KRAS* με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Το γενωμικό DNA που απομονώθηκε από βιοψίες ιστών και ενισχύθηκε με την χρήση κατάλληλων εκκινητών στις περιοχές των γονιδίων *BRAF* (κατάλοιπο 600) και *KRAS* (κωδικόνια 12, 13 και 61) με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Ενδεικτικά, στις Εικόνες 12-14 απεικονίζονται τα προϊόντα ενίσχυσης με PCR της επιθυμητής περιοχής διαφορετικών δειγμάτων για τις μεταλλάξεις *BRAF*600, *KRAS* 12,13 και 61, αντίστοιχα.

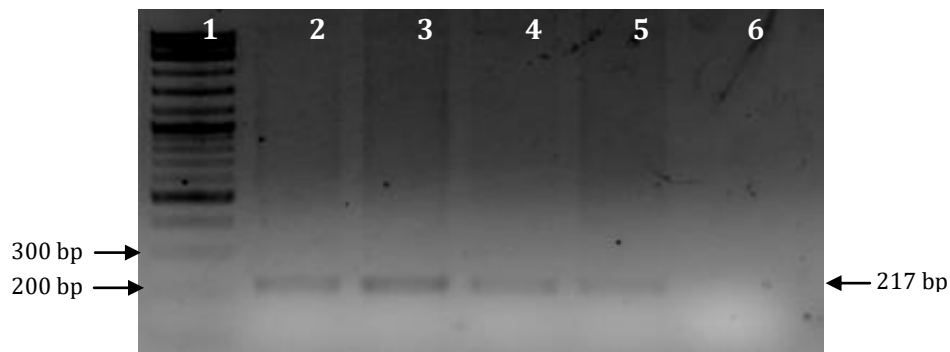


**Εικόνα 12:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% της περιοχής που περιλαμβάνει το κωδικόνιο **600** του γονιδίου *BRAF* μετά από την ενίσχυση διαφορετικών DNA με αντίδραση PCR. Διαδρομή 1: δείκτης μοριακών βαρών, 2-Log DNA Ladder (100-1000 bp). Διαδρομές 2-6: Ενίσχυση γενωμικού DNA των δειγμάτων 56, 57, 58, 59 και 60. Διαδρομή 7: Δείγμα αρνητικού ελέγχου της αντίδρασης PCR.



**Εικόνα 13:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% της περιοχής που περιλαμβάνει τα κωδικόνια **12** και **13** του γονιδίου *KRAS* μετά από την ενίσχυση διαφορετικών DNA με αντίδραση PCR. Διαδρομή 1: δείκτης μοριακών βαρών, 2-Log DNA Ladder (100-1000 bp). Διαδρομές 2-4: Ενίσχυση γενωμικού DNA των δειγμάτων 60, 62 και 63. Διαδρομή 5: Δείγμα αρνητικού ελέγχου της αντίδρασης PCR.

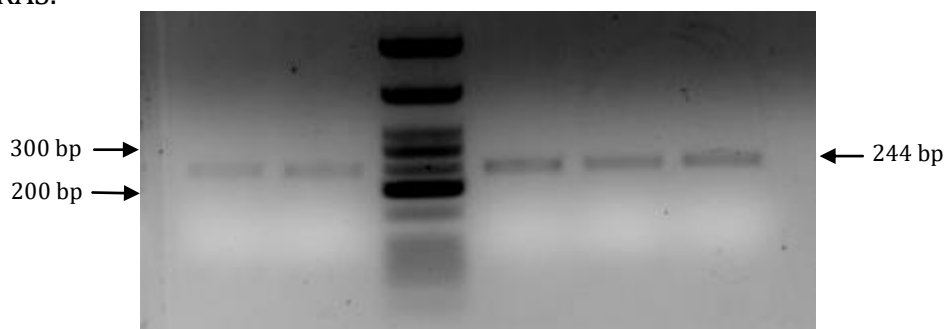




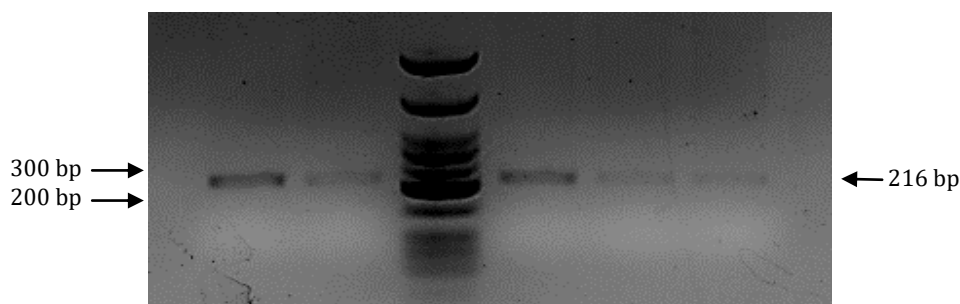
**Εικόνα 14:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% της περιοχής που περιλαμβάνει το κωδικόνιο **61** του γονιδίου *KRAS* μετά από την ενίσχυση διαφορετικών DNA με αντίδραση PCR. Διαδρομή 1: δείκτης μοριακών βαρών, 2-Log DNA Ladder (100-1000 bp). Διαδρομές 2-5: Ενίσχυση γενωμικού DNA των δειγμάτων 55, 57, 58 και 59. Διαδρομή 6: Δείγμα αρνητικού ελέγχου της αντίδρασης PCR.

### 3.2 Καθαρισμός προϊόντων της PCR

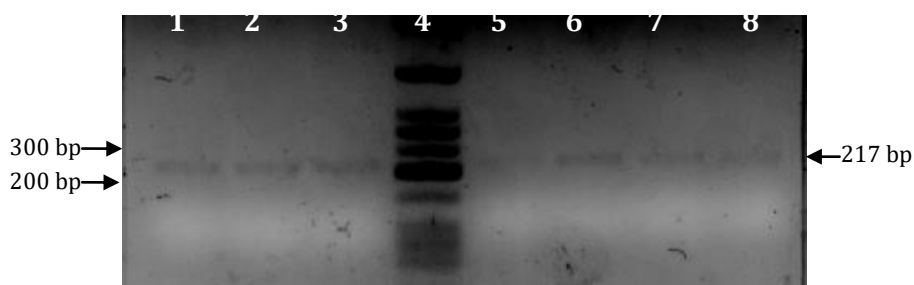
Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR πραγματοποιείται με σκοπό την βέλτιστη αλληλούχιση για την ανάλυση των μεταλλάξεων των γονιδίων *BRAF* και *KRAS*. Με την διαδικασία αυτή, απομακρύνονται υπολείμματα εκκινητών, δεοξυνουκλεοτιδίων και μη ειδικά προϊόντα της PCR. Στις Εικόνες 15-17 παραθέτονται ορισμένα από τα καθαρισμένα προϊόντα PCR των γονιδίων *BRAF* και *KRAS*.



**Εικόνα 15:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των προϊόντων ενίσχυσης της περιοχής που περιλαμβάνει το κωδικόνιο **600** του γονιδίου *BRAF* μετά από τον καθαρισμό τους. Διαδρομή 3: δείκτης μοριακών βαρών, 2-Log DNA Ladder (100-1000 bp). Διαδρομές 1-2-4-5-6: Καθαρισμένα προϊόντα ενίσχυσης του γενωμικού DNA των δειγμάτων 66, 67, 68, 69 και 70.



**Εικόνα 16:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των προϊόντων ενίσχυσης της περιοχής που περιλαμβάνει τα κωδικόνια **12** και **13** του γονιδίου **KRAS** μετά από τον καθαρισμό τους. Διαδρομή 3: δείκτης μοριακών βαρών, 2-Log DNA Ladder (100-1000 bp). Διαδρομές 1-2-4-5-6: Καθαρισμένα προϊόντα ενίσχυσης του γενωμικού DNA των δειγμάτων 52, 53, 54, 56 και 57.



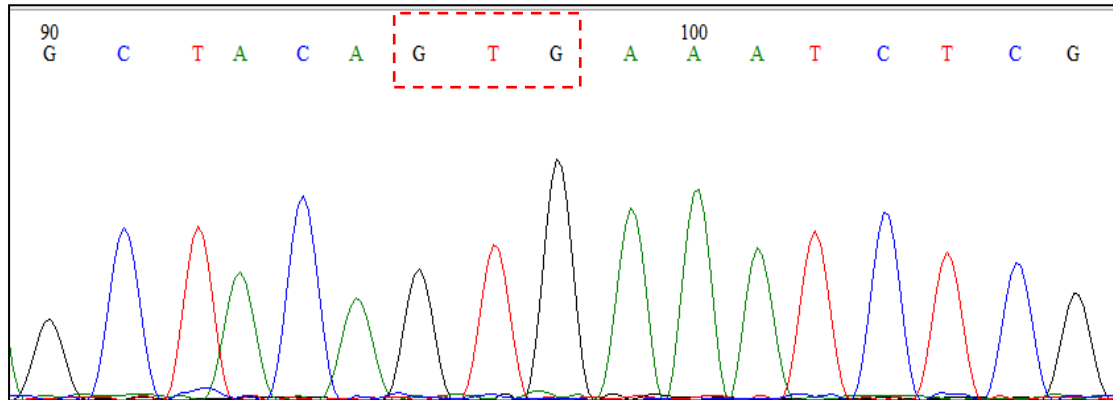
**Εικόνα 17:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των προϊόντων ενίσχυσης της περιοχής που περιλαμβάνει το κωδικόνιο **61** του γονιδίου **KRAS** μετά από τον καθαρισμό τους. Διαδρομή 4: δείκτης μοριακών βαρών, 2-Log DNA Ladder (100-1000 bp). Διαδρομές 1-2-3-5-6-7-8: Καθαρισμένα προϊόντα ενίσχυσης του γενωμικού DNA των δειγμάτων 52, 54, 55, 56, 57, 58 και 59.

### 3.3 Αλληλούχιση των προϊόντων της PCR

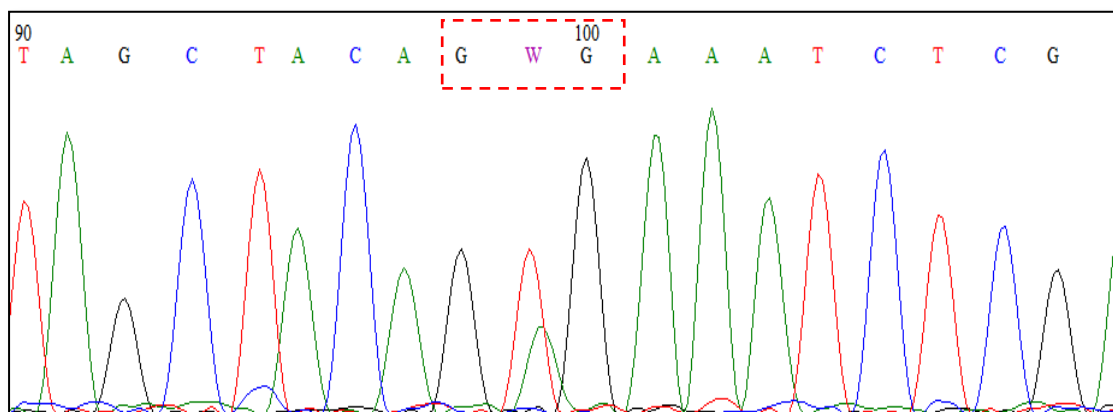
Τα προϊόντα της PCR αλληλούχηθηκαν και τα αποτελέσματα αυτών εμφανίζονται σε μορφή χρωματογραφήματος. Η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR έδωσε 97-100% ομολογία με τις υπό μελέτη περιοχές των γονιδίων *BRAF* και *KRAS*, μετά από ευθυγράμμιση με το πρόγραμμα BLAST του NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Στη συνέχεια, απεικονίζονται ορισμένα από τα χρωματογραφήματα τα οποία εστιάζονται κυρίως στις περιοχές του γονιδίου *BRAF* που περιλαμβάνει το κωδικόνιο 600 (αλληλουχία CTG) και στις περιοχές του γονιδίου *KRAS* που περιλαμβάνουν τα κωδικόνια 12 (αλληλουχία GGT), 13 (αλληλουχία GGC) και 61 αντίστοιχα.

Μελέτη των μεταλλάξεων των γονιδίων *BRAF* και *KRAS* στον καρκίνο του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό.

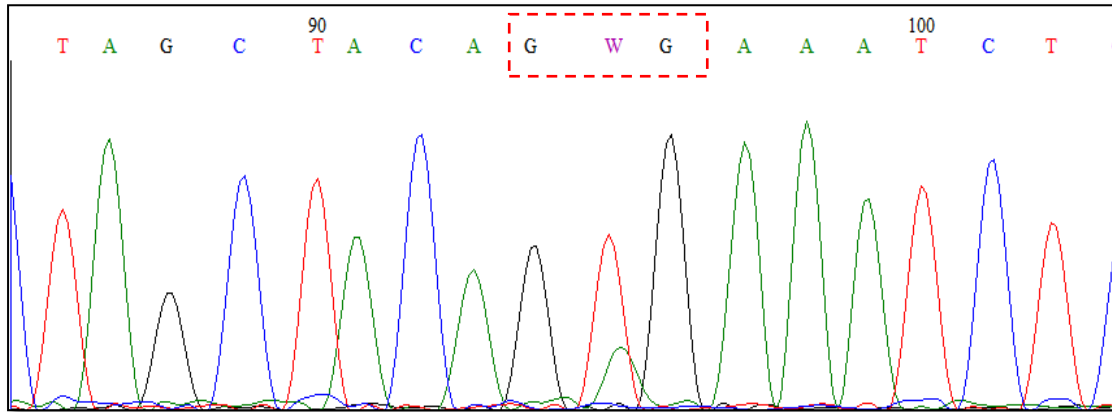


**Εικόνα 18:** Χρωματογράφημα περιοχής του γονιδίου *BRAF* για το δείγμα 53. Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση του κωδικονίου **600** (Η αλληλουχία GTG δηλώνει την απουσία μετάλλαξης).

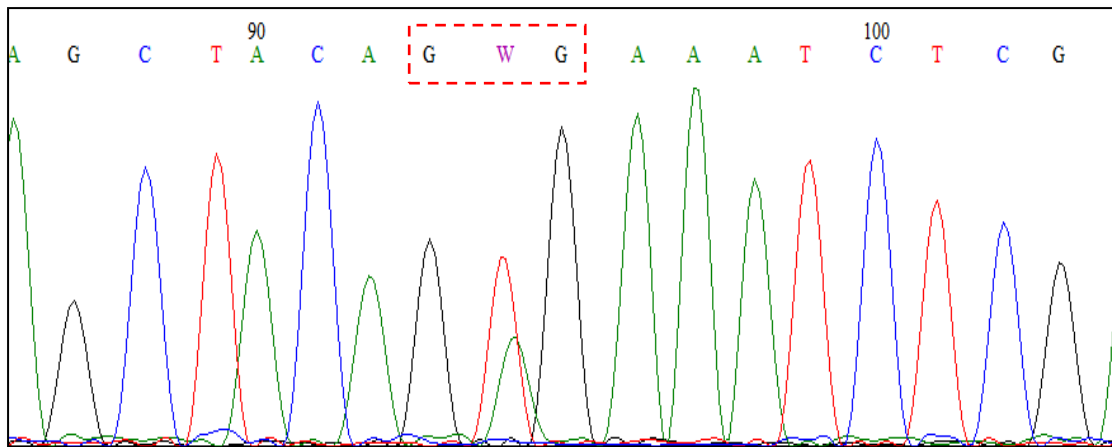


**Εικόνα 19:** Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *BRAF* για το δείγμα 54. Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση του κωδικονίου **600** (Η συνύπαρξη GTG και GAG υποδηλώνουν την παρουσία μετάλλαξης σε ετεροζυγωτία).

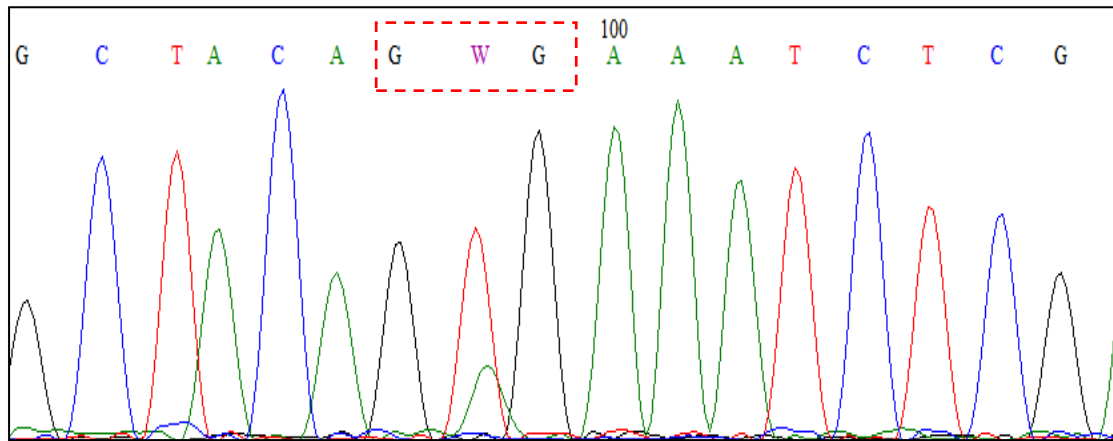
Μελέτη των μεταλλάξεων των γονιδίων *BRAF* και *KRAS* στον καρκίνο του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό.



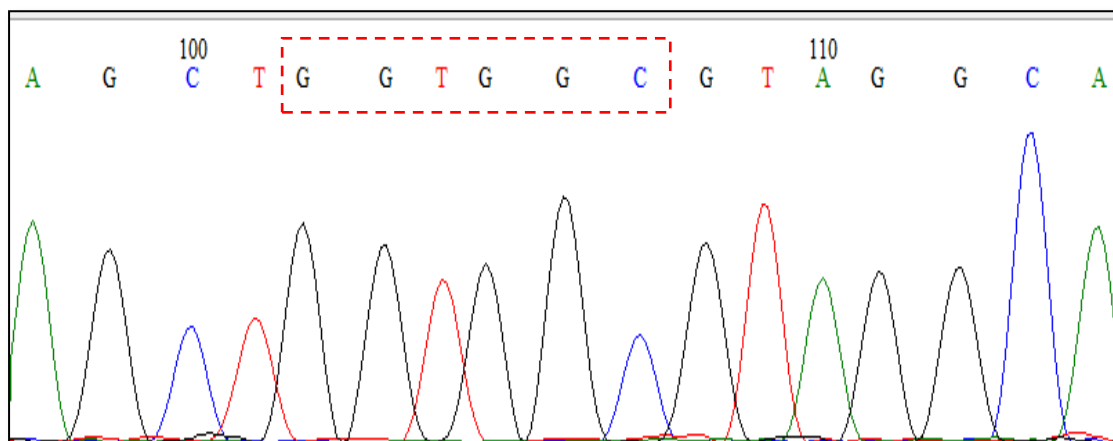
**Εικόνα 20:** Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *BRAF* για το δείγμα 57. Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση του κωδικονίου **600** (Η συνύπαρξη GTG και GAG υποδηλώνουν την παρουσία μετάλλαξης σε ετεροζυγωτία).



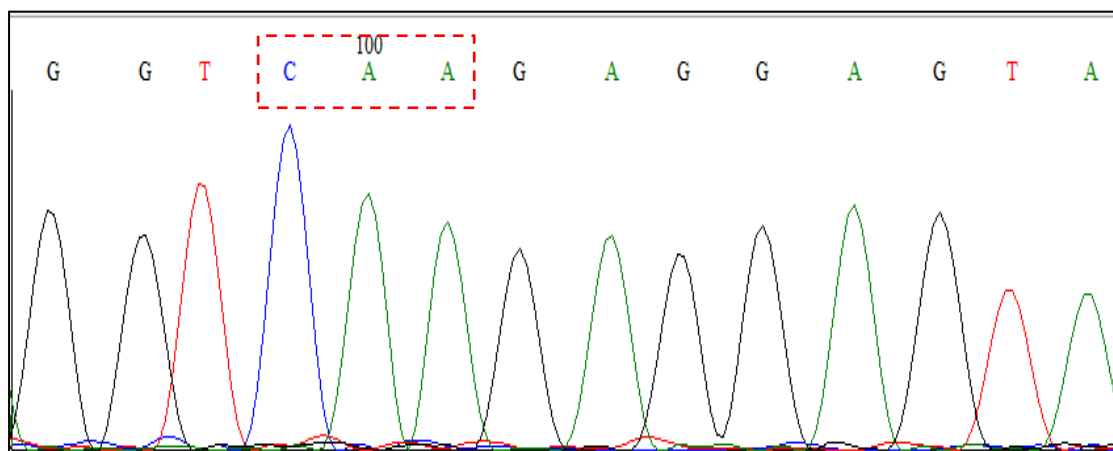
**Εικόνα 21:** Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *BRAF* για το δείγμα 68. Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση του κωδικονίου **600** (Η συνύπαρξη GTG και GAG υποδηλώνουν την παρουσία μετάλλαξης σε ετεροζυγωτία).



**Εικόνα 22:** Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *BRAF* για το δείγμα 69. Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση του κωδικονίου **600** (Η συνύπαρξη GTG και GAG υποδηλώνουν την παρουσία μετάλλαξης σε ετεροζυγωτία).



**Εικόνα 23:** Χρωματογράφημα μιας περιοχής του γονιδίου *KRAS* για το δείγμα 63. Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση των κωδικονίων **12** (η αλληλουχία GGT δηλώνει την απουσία μετάλλαξης) και **13** (Η αλληλουχία GGC δηλώνει την απουσία μετάλλαξης).



Μελέτη των μεταλλάξεων των γονιδίων *BRAF* και *KRAS* στον καρκίνο του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό.

**Εικόνα 24:** Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *KRAS* για το δείγμα 61. Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση του κωδικονίου **61** (Η αλληλουχία CAA δηλώνει την απουσία μετάλλαξης).

Στην παρούσα εργασία, ταυτοποιήθηκαν μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 600 του γονιδίου *BRAF* σε 4 από τα 19 δείγματα που μελετήθηκαν. Οι μεταλλάξεις αυτές βρίσκονται σε ετεροζυγωτία και αφορούν την αλλαγή του κωδικονίου GTG σε GAG, που συνεπάγεται την αλλαγή του αμινοξέος βαλίνη (Val, V) σε γλουταμικό (Glu, E). Όσον αφορά το γονίδιο *KRAS* δεν ταυτοποιήθηκε καμία μετάλλαξη στα κωδικόνια 12, 13 και 61 σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν.

## 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αποτελεί τον πιο κοινό τύπο κακοήθειας του ενδοκρινικού συστήματος και η συχνότητα εμφάνισής του αυξάνεται με σταθερό ρυθμό σε πολλές χώρες (Nikiforov, 2011). Οι όγκοι του καρκίνου του θυρεοειδούς προέρχονται από τα θυλακιώδη επιθηλιακά κύτταρα, από τα παραθυλακιώδη κύτταρα και από μη επιθηλιακά κύτταρα (Scopa, 2004). Σύμφωνα με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά οι διαφορετικοί τύποι ταξινομούνται σε θηλώδη, θυλακιώδη, μυελοειδή και αναπλαστικά καρκινώματα ενώ έχουν παρατηρηθεί και παραλλαγές με την πιο κοινή να είναι ο θυλακιώδης υπότυπος του θηλώδους καρκίνου, που περιέχει χαρακτηριστικά τόσο του θηλώδους όσο και του θυλακιώδους καρκίνου.

Κατά τα τελευταία αρκετά χρόνια, σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί στην κατανόηση των γενετικών μηχανισμών του καρκίνου του θυρεοειδούς και στην ανάπτυξη μοριακών δοκιμών για τη διάγνωση του καρκίνου σε όζους του θυρεοειδούς. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα κατά κύριο λόγο την ταυτοποίηση των μοριακών αλλαγών, συμπεριλαμβανομένων των γενετικών και επιγενετικών αλλαγών των οδών σηματοδότησης - όπως το μονοπάτι MAPK και την PI3K-AKT οδό. Αυτές οι μοριακές αλλαγές περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF και στα γονίδια RAS, καθώς και τις γενετικές αναδιατάξεις μεταξύ των RET/PTC και PAX8/PPAR $\gamma$  (Nikiforova et al., 2003; Nikiforov et al., 2013).

Σκοπός της παρούσας εργαστηριακής μελέτης ήταν να μελετηθεί η συσχέτιση μεταξύ σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων BRAF και KRAS και των διαφορετικών τύπων καρκινωμάτων του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό. Συνολικά μελετήθηκαν 19 δείγματα από ασθενείς με καρκίνο του θυρεοειδούς, που περιλαμβάνουν 13 δείγματα Θηλώδους Καρκινώματος, 4 Θηλώδους Καρκινώματος Θυλακιώδους Προτύπου, 1 Θυλακιώδους Καρκινώματος και 1 Μυελοειδούς Καρκινώματος. Η πειραματική διεργασία περιλάμβανε την απομόνωση γενωμικού DNA από βιοψίες ιστών, την ενίσχυση συγκεκριμένων περιοχών με ειδικούς εκκινητές χρησιμοποιώντας την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης και τέλος τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των ενισχυμένων και μετέπειτα καθαρισμένων προϊόντων της PCR. Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας ταυτοποιήθηκαν συνολικά σε 4 από τα 19 δείγματα, με σημειακή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 600 του γονιδίου BRAF. Όλες οι μεταλλάξεις αφορούν την αλλαγή του κωδικονίου GTG σε GAG, που συνεπάγεται την αλλαγή του αμινοξέος βαλίνη (Val, V) σε γλουταμικό (Glu, E). Αυτή η μετάλλαξη οδηγεί σε μία συνεχή δραστηριοποίηση της κινάσης BRAF και σε μία χρόνια διέγερση του μονοπατιού των MAP κινασών, δίνοντας γένεση στην ανάπτυξη θυρεοειδικών όγκων (Wan et al., 2004). Και τα 4 δείγματα όπου εντοπίστηκαν οι μεταλλάξεις, ανήκουν στο θηλώδες τύπο καρκινώματος, γεγονός που συμφωνεί με την διεθνή

βιβλιογραφία όσον αφορά την συχνότητα μετάλλαξης στο γονίδιο BRAF σε θηλώδη τύπο καρκίνου και τους υπότυπους του.

Η μετάλλαξη BRAF V600E τυπικά εντοπίζεται κυρίως στον κλασικό θηλώδη καρκίνο (με μια υψηλή συχνότητα περίπου του 50%) και σπανιότερα στο θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδες πρότυπο ανάπτυξης (ποσοστό περίπου 14%) (Adeniran et al., 2006; Xing, 2013). Επιπλέον, η μετάλλαξη BRAF V600E είναι δυνατόν να ανιχνευθεί στα χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα και στα αναπλαστικά καρκινώματα του θυρεοειδούς. Όσον αφορά στην ανάλυση του γονιδίου KRAS δεν ταυτοποιήθηκε καμία μετάλλαξη στα κωδικόνια 12, 13 και 61 σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν. Η εργασία αυτή περιλαμβάνει θηλώδη καρκινώματα με θυλακιώδη υπότυπο για τα οποία έχει αναφερθεί ποσοστό μεταλλάξεων στα γονίδια RAS (HRAS, KRAS, NRAS) μέχρι και 20% (Nikiforova et al., 2003). Τέλος, περιλάμβανε και ένα δείγμα μυελοειδούς καρκινώματος για το οποίο έχει αναφερθεί ποσοστό μεταλλάξεων 5-10% στο σύνολο των περιπτώσεων καρκίνου του θυρεοειδούς (Mohammadi et al., 2016), στο οποίο δεν εντοπίστηκε κάποια μετάλλαξη. Εντούτοις, τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δεν επιτρέπουν την διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων λόγω του μικρού μεγέθους των δειγμάτων που αναλύθηκαν.

Στην βιβλιογραφία υπάρχει μόνο μία μελέτη πάνω στον καρκίνο του θυρεοειδούς σε δείγματα του ελληνικού πληθυσμού (Goutas et al. 2008). Η μελέτη αυτή εστίασε στη μετάλλαξη BRAFV600E και στη μετάλλαξη KRAS (κωδικόνιο 12) σε δείγματα θηλώδους και μυελοειδούς τύπου καρκίνου του θυρεοειδούς. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του KRAS βρέθηκε σε υψηλό ποσοστό, τόσο σε θηλώδη (54,5%), όσο και σε μυελοειδή (40,9%) καρκινώματα. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη, η μετάλλαξη BRAF V600E ανιχνεύτηκε σε μικρότερο ποσοστό σε σύγκριση με την μετάλλαξη του KRAS σε θηλώδη καρκινώματα (27,3%). Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι η παρούσα μελέτη αποτελεί ένα τμήμα μιας ευρύτερης μελέτης που αφορά στην ταυτοποίηση μεταλλάξεων που σχετίζονται με όλους τους διαφορετικούς τύπους του καρκίνου του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό.



## 5. Βιβλιογραφία

Adeniran, Zhu, Gandhi, et al., "Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas.", *Am J Surg Pathol*, 30 (2): 216 – 222, 2006

Adeniran, Zhu, Gandhi, Steward, Fidler, Giordano, Biddinger, Nikiforov, "Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas", *Am J Surg Pathol*. 30(2):216-22, 2006

Adeniran, Zhu, Gandhi, Steward, Fidler, Giordano, Biddinger, Nikiforov, "Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas." *American Journal of Surgical Pathology* 30 216–222. (doi:10.1097/01.pas.0000176432.73455.1b, 2006)

Anderson. "Role of lipids in the MAPK signaling pathway", *Progress in Lipid Res* 45, 102-119, 2006

Are, Shaha, "Anaplastic thyroid carcinoma: biology, pathogenesis, prognostic factors, and treatment approaches.", *Annals of surgical oncology*. 13(4):453–464. doi: 10.1245/ASO.2006.05.042, 2006

Baloch, LiVolsi, "Pathology of thyroid gland In: VA LiVolsi, SL Asa (eds)", *Endocrine Pathology*, Churchill Livingstone, New York, pp, 61-101, 2002

Baloch, LiVolsi, Wartofsky, Van Nostrand, "Pathology of follicular cancer", *Thyroid Cancer - A Comprehensive Guide to Clinical Management*, Springer New York, Part VIII, pp 781-786, Online ISBN: 978-1-4939-3314-3, 2016

Belfiore, La Rosa, La Porta et al., "Cancer risk in patients with cold thyroid nodules: relevance of iodine intake, sex, age, and multinodularity.", *Am J Med*; 93: 363–9, 1992

Bos, "RAS Oncogenes in Human Cancer: A Review", *CANCER RESEARCH* 49. 4682-4689, 1989

Bos, Rehmann, Wittinghofer, "GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins", *Cell Press*, Volume 129, Issue 5, Pages 865–877, 2007

Brander, Viikinkoski, Nickels, Kivisaari, "Thyroid gland: US screening in a random adult population.", *Radiology*; 181: 683–7, 1991

Brito, Yarur, Prokop, McIver, Murad, Montori, "Prevalence of Thyroid Cancer in Multinodular Goiter Versus Single Nodule: A Systematic Review and Meta-Analysis", *Thyroid*, Mary Ann Liebert Inc. Publishers, 2013

Busnardo, Girelli, Simioni, Nacamulli, Busetto, "Nonparallel patterns of calcitonin and carcinoembryonic antigen levels in the follow -up of medullary thyroid carcinoma.", *Cancer* (1984); 53: 278-285, 1984

Cady, Sedgwick, Meissner, Bookwalter, Romagosa, Werber, "Changing clinical, pathologic, therapeutic, and survival patterns in differentiated thyroid carcinoma.", *Ann Surg.* 184(5):541-53. PMID: 1345475, 1976

Carcangiu, Bianchi, Savino, Voynick, Rosai, "Follicular Hürthle cell tumors of the thyroid", *Cancer*: 68: 1944-1953, 1991

Carcangiu, Zampi, Pupi, Castagnoli, Rosai, "Papillary carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 241 cases treated at the University of Florence, Italy", *American Cancer Society, Wiley Online Library*, DOI: 10.1002/1097-0142(19850215)55:4<805::AID-CNCR2820550419>3.0.CO;2-Z, 1985

Castro, Rebocho, Soares et al, "PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma.", *J Clin Endocrinol Metab.* 91 (1): 213 - 220, 2006

Cheung, Carydis, Ezzat, Bedard, Asa, "Analysis of ret/PTC gene rearrangements refines the fine needle aspiration diagnosis of thyroid cancer", *J Clin Endocrinol Metab.* 86(5):2187-90, 2001

Cohen, Xing, Mambo et al., "BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma.", *J Natl Cancer Inst.* 95:625-627, 2003

Cooper, Doherty, Haugen, Kloos, Lee, Mandel, Mazzaferri, McIver, Pacini, Schlumberger, Sherman, Steward, Tuttle, "Revised American Thyroid Association Management Guidelines for Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer", *Thyroid.* 19(11): 1167-1214. doi:10.1089/thy.2009.0110, 2009

Davies, Bignell, Cox, Stephens, Edkins, Clegg, Teague, Woffendin, Garnett et al., "Mutations of the BRAF gene in human cancer", *Nature* 417, 949-954, doi:10.1038/nature00766, 2002

Dwight, Thoppe, Foukakis et al., "Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors", *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 88 : 4440 to 4445, 2003

Fallahi, Giannini, Miccoli, Antonelli, Basolo, "Molecular diagnosis of fine needle aspiration for the presurgical screening of thyroid nodules." *Current Genomics*, 15: 171-177, 2014

Fawcett, D., Jensch, R. (2002). *Bloom & Fawcett's Concise Histology*. Arnold Publishers, New York, pp. 257-258.

French, Alexander, Cibas et al., "Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer.", *Am J Pathol.* 162 : 1053-1060, 2003

Fusco, Grieco, Santoro, Berlingieri, Pilotti, Pierotti, Della Porta, Vecchio, "A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases.", *Nature*;328(6126):170-2, 1989

Gharib, Papini, Paschke, Duick, Valcavi, Hegedus, Vitti, "American Association of Clinical Endocrinologists, Associazione Medici Endocrinologi, and European Thyroid Association medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules: executive summary of recommendations." *Journal of Endocrinological Investigation* 33 51-56. (doi:10.1007/BF03346587), 2010

Gibney, Messina, Fedorenko, Sondak, Smalley, "Paradoxical oncogenesis—the long-term effects of BRAF inhibition in melanoma", *Nature Reviews Clinical Oncology* 10, 390-399, doi:10.1038/nrclinonc.2013.83, 2013

Gimm, Sutter, Dralle, "Diagnosis and therapy of sporadic and familial medullary thyroid carcinoma", *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127: 156-165, 2001

Goutas, Vlachodimitropoulos, Bouka, Lazaris, Nasioulas, Gazouli, "BRAF and K-RAS Mutation in a Greek Papillary and Medullary Thyroid Carcinoma Cohort", *Anticancer Research* 28: 305-308, 2008

Grieco, Santoro, Berlingieri, Melillo, Donghi, Bongarzone, Pierotti, Della Porta, Fusco, Vecchio, "PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas.", *Cell*;60(4):557-63, 1990

Guth, Theune, Aberle, Galach, Bamberger, "Very high prevalence of thyroid nodules detected by high frequency (13 MHz) ultrasound examination", *European Journal of Clinical Investigation*, DOI: 10.1111/j.1365-2362.2009.02162.x, 2009

Hallengren, "Hypothyroidism--clinical findings, diagnosis, therapy. Thyroid tests should be performed on broad indications", *Lakartidningen*, Sep;95(38):4091-6, 1998

Hedinger, Williams, Sobin, "The WHO histological classification of thyroid tumors: A commentary on the second edition", *Cancer* 63: 908-911, 1989

Heshmati, Gharib, Heerden et al, "Advances and controversies in the diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma." *Am. J. Med.* 103: 60-69, 1997

Ito, Hanamura, Murayama, Okada, Watanabe, Harada et al. "Multimodality therapeutic outcomes in anaplastic thyroid carcinoma: improved survival in subgroups of patients with localized primary tumors", 34 (2): 230-237. doi: 10.1002 / hed.21721, 2012

Jin, Sebo, Nakamura, Qian, Oliveira, Majerus, Johnson, Lloyd, "BRAF mutation analysis in fine needle aspiration (FNA) cytology of the thyroid.", *Diagn Mol Pathol.*, Sep;15(3):136-43, 2006

Kebebew, Greenspan, Clark, Woeber, McMillan, "Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors.", *Cancer* 103(7):1330-1335. doi: 10.1002/cncr.20936, 2005

Khatawkar & Awati, "Thyroid gland - Historical aspects, Embryology, Anatomy and Physiology", International Archives of Integrated Medicine, Vol 2, Issue 9, 2015

Kim, Choi, "Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases", Biochimica et Biophysica Acta, Volume 1802, Issue 4, Pages 396–405, 2010

Kimura, Nikiforova, Zhu et al. "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. 63:1454–1457, 2003

Kitahara, Platz, Freeman, Hsing, Linet, Park, Schairer, Schatzkin, Shikany, Berrington de González, "Obesity and thyroid cancer risk among U.S. men and women: a pooled analysis of five prospective studies.", Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 20:464–472 , 2011

Knauf, Kuroda, Basu, Fagin, "RET/PTC-induced dedifferentiation of thyroid cells is mediated through Y1062 signaling through SHC-RAS-MAP kinase", Oncogene 22 (28): 4406-12, 2003

Kostoglou-Athanassiou and Ntalles, "Hypothyroidism - new aspects of an old disease", Hippokratia, Quarterly Medical Journal, Apr-Jun; 14(2): 82–87, 2010.

Kroll, Sarraf, Pecciarini, Chen, Mueller, Spiegelman, Fletcher, "PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma", Science, 25;289(5483):1357-60, 2000

Kwon, Kim, Eszlinger, Paschke, Song, Kim, Park, Jeon, Kim, Shong, Kim, "Molecular Diagnosis Using Residual Liquid-Based Cytology Materials for Patients with Nondiagnostic or Indeterminate Thyroid Nodules", Endocrinol Metab (Seoul), 31(4): 586–591, doi: 10.3803/EnM.2016.31.4.586, 2016

Leboulleux, Baudin, Travagli, Schlumberger, "Medullary Thyroid Carcinoma" Clinical Endocrinology 61, 299–310, 2004

Lee, Costumbrado, C.Y Hsu, Y.H. Kim, "Agarose Gel Electrophoresis for the separation of DNA fragments.", J Vis Exp, 2012.

Liu, Singh, Tallini, et al., "Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a clinicopathologic study of a problematic entity", Cancer 107 (6): 1255 – 1264, 2006

LiVolsi, "Papillary thyroid carcinoma: an update", Modern Pathology, USCAP, Modern Pathology: 24, S1–S9. doi:10.1038/modpathol.2010.129, 2011

LiVolsi, 1990) "Surgical pathology of the thyroid. Major problems in pathology", W. B. Saunders Company, Philadelphia, vol 22, 1990

Marques, Espadinha, Catarino et al., "Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas.", J Clin Endocrinol Metab 87 (8): 3947 – 3952, 2002

Mazzaferri, Jhiang, “Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer.” *Am J Med*.97:418–28, 1994

Mazzaferri, Young, “Papillary thyroid carcinoma: A 10 year follow-up report of the impact of therapy in 576 patients”, *The American Journal of Medicine*, DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343\(81\)90573-8](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343(81)90573-8), 1981

Mazzaferri, Young, “Papillary thyroid carcinoma: a 10-year follow-up report of the impact of therapy in 576 patients.”, *Am J Med*, 70:511–8, 1981

McCoy, Jabbour, Ogilvie, Otori, Carty, Yim, “The incidence of cancer and rate of false-negative cytology in thyroid nodules greater than or equal to 4 cm in size.”, *Surgery*;142(6):837–44. e3, 2007

McGriff, Csako, Gourgiotis, Lori, Pucino, Sarlis, “Effects of thyroid hormone suppression therapy on adverse clinical outcomes in thyroid cancer.”, *Ann Med*. 34(7–8):554–64, 2002

Miccoli, “Application of Molecular Diagnostics to the Evaluation of the Surgical Approach to Thyroid Cancer.”, *Current Genomics*, 15: 184-189, 2014

Mohammadi, Hedayati, “A Brief Review on The Molecular Basis of Medullary Thyroid Carcinoma”, *Cell Journal (Yakhtek)*, PMID: PMC5086327, 2016

Moley, Debenedetti, Dilley, Tisell, Wells, “Surgical management of patients with persistent or recurrent medullarythyroid cancer”, *Journal of Internal Medicine*, DOI: 10.1046/j.1365-2796.1998.00333.x, Volume 243, Issue 6, Pages 521–526, 1998

Morrison, Davis, “Regulation of MAP Kinase Signaling Modules by Scaffold Proteins in Mammals”, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol.19:1-731, DOI: 10.1146/annurev.cellbio.19.111401.091942, 2003

Mullur, Liu, Brent, “Thyroid Hormone Regulation of Metabolism”, *Physiological Reviews*, American Physiological Society, Vol. 94 no. 2, 355-382 DOI: 10.1152/physrev.00030.2013, 2014

Namba, Rubin, Fagin, “Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis”, *Mol Endocrinol*, 4 (10): 1474 – 1479, 1990

Nikiforov, “Molecular Diagnostics of Thyroid Tumors”, *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*: May 2011, Vol. 135, No. 5, pp. 569-577, 2011

Nikiforov, “RET/PTC rearrangement in thyroid tumors.”, *Endocr Pathol*. 13 (1): 3-16, 2002

Nikiforov, “Thyroid Carcinoma: Molecular Pathways and Therapeutic Targets”, *National Institutes of Health – Public Access Author Manuscript*, 2008

Nikiforov, "Thyroid tumors: Classification and general considerations", Y.E Nikiforov, P.W. Biddinger, L. D. R. Thompson, eds Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid. Baltimore, MD: Lippincott Williams and Wilkins; 94-102, 2009

Nikiforov, Nikiforova, "Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer.", Nat Rev Endocrinol. 7 (10): 569-80. doi: 10.1038 / nrendo.2011.142, 2011

Nikiforova, Kimura, Gandhi, Biddinger, Knauf, Basolo, Zhu, Giannini, Salvatore, Fusco et al., "BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 88 5399–5404, 2003

Nikiforova, Lynch, Biddinger et al, "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 : 2318-2326, 2003

Nussey, S.A. Whitehead, "Endocrinology – An integrated approach", Oxford, BIOS Scientific Publishers, 2001

Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman, "Integrated Pharmacology", Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης, 2000.

Pappoti, Torchio, Grassi, Favero, Bussolati, "Poorly differentiated oxyphilic (Hürthle cell) carcinomas of the thyroid", Am J Surg Pathol: 20: 686-694, 1996

Pellegriti, Frasca, Regalbuto, Squatrito, Vigneri, "Worldwide Increasing Incidence of Thyroid Cancer: Update on Epidemiology and Risk Factors", Journal of Cancer Epidemiology, Article ID 965212, 2013

Reid, Wheller, "Hyperthyroidism: Diagnosis and Treatment", American Family Physician, Aug 15;72(4):623-630, 2005

Rosai, Carcangiu, DeLellis, "Atlas of Tumor Pathology: Tumors of the Thyroid Gland", Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C, 1992

Santoro, Dathan, Berlingieri, Bongarzone, Paulin, Grieco, Pierotti, Vecchio, Fusco, "Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma", Oncogene 9(2):509-16, 1994

Schark, Fulton, Jacoby, Westbrook, Straus II, Kaplan, "N-ras 61 oncogene mutations in Hürthle cell tumors [discussion in: Surgery;108(6):999–1000], 1990

Schmid, Sheu, Görges, Ensinger, Tötsch, "Tumoren der Schilddrüse.", Pathologe 24:357–372, 2003

Schneider, H. Chen, "New developments in the diagnosis and treatment of thyroid cancer", CA Cancer J Clin, 63(6): 373–394., 2013

Scopa, "Histopathology of Thyroid Tumors. An Overview", Hormones 3(2): 100-110, 2004

Shupnik, Ridgway, Chin, "Molecular Biology of Thyrotropin", Endocrine Reviews, Endocrine Society, Volume 10, Issue 4, 2008

Soares, Trovisco, Rocha, Lima, Castro, Preto, Maximo, Botelho, Seruca, Sobrinho-Simoes, "BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC", *Oncogene* 22 4578–4580. (doi:10.1038/sj.onc.1206706), 2003

Tallini, Hsueh, Liu, Garcia-Rostan, Speicher, Ward, "Frequent chromosomal DNA unbalance in thyroid oncocytic (Hürthle cell) neoplasms detected by comparative genomic hybridization.", *Lab Invest* 79 (5): 547 – 555, 1999

Tuttle, Ball, Byrd, Dilawari, Doherty, Duh, "Thyroid carcinoma", *J Natl Compr Canc Netw*, 8 (11): 1228-1274, 2010

Udelsman, Chen, "The current management of thyroid cancer.", *Adv Surg*, 33 : 1-27, 1999

Vasko, Gaudart, Allasia et al., "Thyroid follicular adenomas may display features of follicular carcinoma and follicular variant of papillary carcinoma.", *Eur J Endocrinol*, 151 (6): 779 – 786, 2004

Wan, Garnett, Roe, Lee, Niculescu-Duvaz, Good, Cancer Genome Project, Michael Jones, Marshall, Springer, Barford, Marais, "Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF", *Cell*. 116:855–867, 2004

Wartofsky, "Increasing world incidence of thyroid cancer: increased detection or higher radiation exposure?", *Hormones (Athens)* 9:103–108, 2010

Watson, Myers, Caudy, Witkowski, "Recombinant DNA, Third Edition, Genes and Genomes – A Short Course", Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε, 2007.

Xing, "BRAF mutation in thyroid cancer", *Endocrine-Related Cancer* 12 245–262, 2005

Xing, "Clinical utility of RAS mutations in thyroid cancer: a blurred picture now emerging clearer", *BMC Medicine* doi: 10.1186 / s12916-016-0559-9, 2016

Xing, "Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer", *Nat Rev Cancer* (3): 184–199, doi: 10.1038/nrc3431, 2013

Yen et al. "Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action", American Physiological Society, *Physiological Reviews*, USA, 2001, Vol. 81 no. 3

Zhu, Gandhi, Nikiforova, Fischer, Nikiforov, "Molecular Profile and Clinical-Pathologic Features of the Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma - An Unusually High Prevalence of ras Mutations", *American Journal of Medicine*, DOI: 10.1309/ND8D-9LAJ-TRCT-G6QD, 2003

Zhu, Gandhi, Nikiforova, Fischer, Nikiforov, "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, 2003