



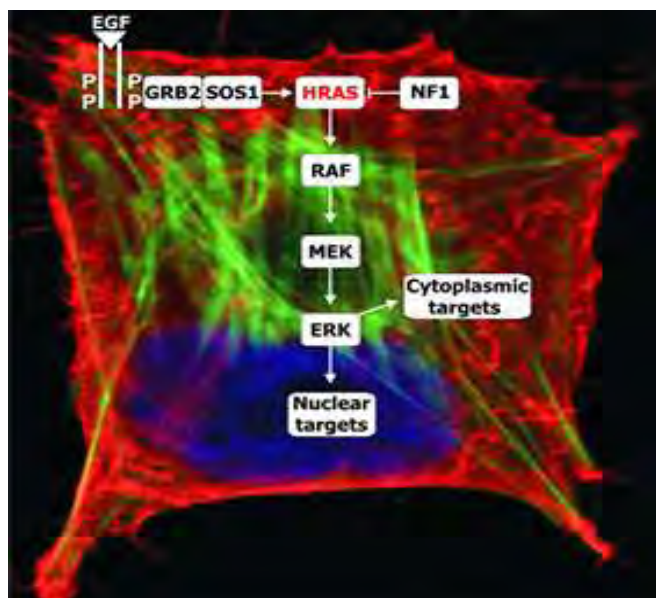
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών:

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ  
ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

**Μοριακή ανάλυση των γονιδίων HRAS και KRAS στον  
καρκίνο του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό**



**ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ**

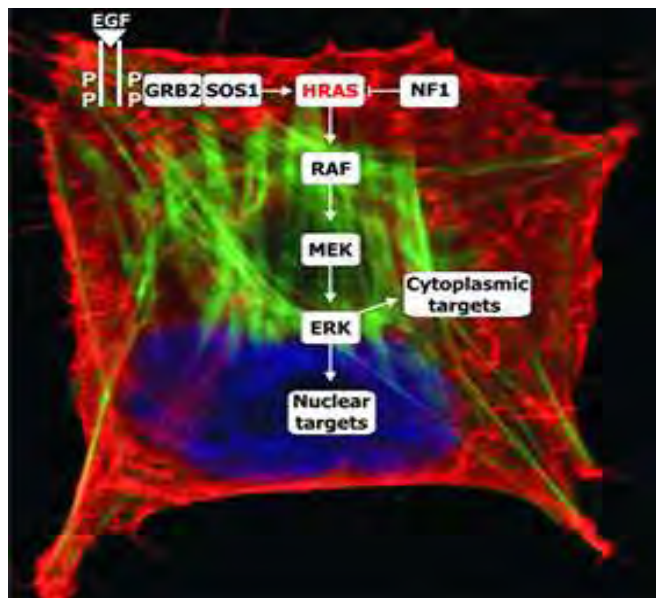
Επιβλέπων: **ΛΙΑΔΑΚΗ ΚΑΛΛΙΟΠΗ**

Επίκουρος Καθηγήτρια Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΛΑΡΙΣΑ 2015

## ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ HRAS ΚΑΙ KRAS ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ

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



Εικόνα εξωφύλλου: Σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP κινασών. (Leibniz Institute For Age Research - Fritz Lipmann Institute, 2014, <http://www.fli-leibniz.de/>)

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

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

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

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

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

# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Πραγματεύεται τη μελέτη μεταλλάξεων στα γονίδια HRAS και KRAS σε διαφορετικούς τύπους καρκινωμάτων του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν τα μέγιστα για την περάτωση της συγκεκριμένης εργασίας. Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Λιαδάκη Καλλιόπη, επίκουρο καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, αρχικά για την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας, αλλά κυρίως για την τεράστια συμβολή της στην πραγματοποίηση της εργασίας αυτής και τη συνεχή καθοδήγηση που μου παρείχε. Επίσης, θα ήθελα να την ευχαριστήσω θερμά για την κριτική μελέτη της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας και τις υποδείξεις της που συνέβαλαν στη βελτίωση του κειμένου.

Τέλος, θα ήθελα να δώσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου της Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για τη φιλοξενία και την πολύτιμη βοήθειά τους, αλλά και το εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας για τη παροχή απαραίτητου εξοπλισμού για την εργασία.

Ωστόσο, η ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας δε θα ήταν δυνατή χωρίς την αμέριστη υποστήριξη της οικογένειάς μου και των φίλων μου. Για το λόγο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βάθους καρδιάς την οικογένειά μου, για την ψυχολογική και υλική στήριξη που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της ενασχόλησής μου με την εργασία αυτή. Η συμπαράσταση και η κατανόησή τους με βοήθησε να πραγματοποιήσω και να ολοκληρώσω τη συγκεκριμένη εργασία.

Παπαδοπούλου Αλεξάνδρα

Λάρισα 2015



1.2.2.5. Αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς.....	24
1.3. Γονίδια RAS.....	25
1.3.1. Σηματοδοτικό μονοπάτι MAP κινασών.....	25
1.3.2. Πρωτεΐνες RAS.....	27
1.3.2.1. KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog).....	28
1.3.2.2. HRAS (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog).....	29
1.3.3. Μοριακή διάγνωση στον καρκίνο του θυρεοειδούς.....	30
1.3.3.1. Γενικά.....	30
1.3.3.2. Μεταλλάξεις RAS.....	31
1.3.3.3. Μεταλλάξεις BRAF.....	33
1.3.3.4. Αναδιατάξεις RET/PTC.....	34
1.3.3.5. Αναδιατάξεις PAX8/PPARγ.....	35
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....</b>	<b>36</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>37</b>
2.1. Υλικά.....	37
2.1.1. Δείγματα.....	37
2.1.2. Χημικά αντιδραστήρια.....	38
2.2. Μέθοδοι.....	39
2.2.1. Απομόνωση DNA από βιοψίες ιστών.....	39
2.2.1.1. Αντιδραστήρια – Διαλύματα.....	39
2.2.1.2. Πρωτόκολλο απομόνωσης.....	40

2.2.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης .....	41
2.2.2.1. Αντιδραστήρια – Διαλύματα.....	41
2.2.2.2. Διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης.....	42
2.2.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.....	44
2.2.4. Καθαρισμός προϊόντων PCR (PCR Clean-up).....	50
2.2.5. Αλληλούχιση των καθαρισμένων προϊόντων.....	52
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>53</b>
3.1. Απομόνωση γενωμικού DNA και ενίσχυση της υπό μελέτη περιοχής των γονιδίων RAS με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	53
3.2. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR.....	55
3.3. Αλληλούχιση των προϊόντων της PCR.....	56
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>58</b>
<b>5. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....</b>	<b>60</b>
<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....</b>	<b>61</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>63</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς είναι η πιο κοινή ενδοκρινική κακοήθεια και η συχνότητά του αυξάνεται σταθερά τις τελευταίες δεκαετίες. Σύμφωνα με ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά, κατατάσσεται σε τέσσερις βασικούς τύπους (θηλώδης, θυλακιώδης, μυελοειδής, αναπλαστικός), ενώ έχουν παρατηρηθεί και παραλλαγές αυτών, με την πιο κοινή να είναι ο θυλακιώδης υπότυπος του θηλώδους καρκίνου. Προηγούμενες έρευνες έδειξαν ότι συγκεκριμένα μονοπάτια σηματοδότησης παίζουν θεμελιώδη ρόλο στην παθογένεση του θυρεοειδούς καρκίνου, με αποτέλεσμα αυτά τα μονοπάτια να θεωρούνται δυνητικός στόχος για τη θεραπεία του καρκίνου. Ειδικότερα, ορισμένες μεταλλάξεις που οδηγούν στην ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών συναντώνται σε διαφορετικούς τύπους καρκινώματος του θυρεοειδούς. Αυτές περιλαμβάνουν τη μετάλλαξη BRAF<sup>V600E</sup>, τις μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12, 13 και 61 των γονιδίων RAS (HRAS, KRAS και NRAS), καθώς και τις μετατοπίσεις RET/PTC και PAX8/PPARγ. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον δημιουργεί το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις αυτές όταν υπάρχουν, κατά τεκμήριο αποκλείουν την ύπαρξη άλλων μεταλλάξεων. Στην βιβλιογραφία είναι διαθέσιμα περιορισμένα δεδομένα σχετικά με τη συχνότητα των μεταλλάξεων στον καρκίνο του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η συσχέτιση σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων KRAS (κωδικόνια 12, 13, 61) και HRAS (κωδικόνιο 61) με διάφορους τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό. Συνολικά μελετήθηκαν 33 δείγματα από ασθενείς με διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς, που περιλαμβάνουν 11 θηλώδη, 14 θηλώδη καρκινώματα θυλακιώδους υποτύπου, 7 θυλακιώδη και 2 μυελοειδή καρκινώματα. Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε την απομόνωση γενωμικού DNA από βιοψίες ιστών εγκλεισμένων σε παραφίνη, την ενίσχυση συγκεκριμένων περιοχών των γονιδίων RAS, χρησιμοποιώντας την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, και την απευθείας αλληλούχιση των ενισχυμένων και καθαρισμένων προϊόντων. Στην παρούσα εργασία, δεν ταυτοποιήθηκε καμία μετάλλαξη στα κωδικόνια 12, 13 και 61 του γονιδίου KRAS και στο κωδικόνιο 61 του γονιδίου HRAS σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν. Εντούτοις, για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων είναι απαραίτητο η μελέτη να επεκταθεί, ώστε να περιλαμβάνει την ανάλυση επιπρόσθετων μεταλλάξεων στα γονίδια RAS και BRAF, καθώς και χρωμοσωμικών αναδιατάξεων, σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.



## ABSTRACT

Thyroid cancer is the most common type of endocrine malignancy and its frequency is increasing steadily over the last decades. Based on histopathological characteristics, thyroid tumors are classified into four major types (papillary, follicular, medullary and anaplastic), while additional variants exist between these major types, with the most common being the follicular subtype of papillary carcinoma. Previous studies have shown that certain signaling pathways play a fundamental role in the pathogenesis of thyroid cancer, and thus can be considered as potential targets for therapy. For example, activation of the MAPK signaling pathway, due to genetic mutations, is commonly found in different types of thyroid cancer. These include point mutations of the BRAF gene (BRAF<sup>V600E</sup>), point mutations of the RAS (HRAS, KRAS and NRAS) genes (codons 12, 13 and 61) as well as RET / PTC and PAX8 / PPAR $\gamma$  genetic rearrangements. It should be noted that the above mutations are reported to be mutually exclusive. Limited data are available on the frequency of these mutations in the Greek population. The purpose of this study was to investigate the correlation of point mutations of the KRAS gene (codons 12, 13, 61) and the HRAS gene (codon 61) with different types of thyroid cancer in the Greek population. The study involved 33 patients with differentiated thyroid cancer, including 11 papillary, 14 follicular variants of papillary carcinoma, 7 follicular and 2 medullary carcinomas. The experimental procedure included the isolation of genomic DNA from paraffin-embedded tissue biopsies, the amplification of specific regions of the RAS genes using Polymerase Chain Reaction (PCR), and the direct sequencing of the purified PCR products. The results of the study did not identify any mutation at codons 12, 13 and 61 of the KRAS gene and at codon 61 of the HRAS gene in all the tested samples. However, in order to be able to draw firm conclusions, this study must be extended to include additional mutations of the RAS and the BRAF genes, as well as genetic rearrangements, in a larger sample population.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

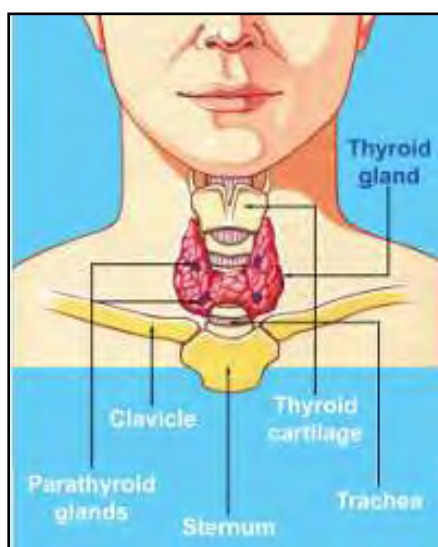
## 1.1. Θυρεοειδής αδένας

Το ενδοκρινικό σύστημα είναι ένα από τα κύρια συστήματα επικοινωνίας του ανθρώπινου σώματος. Το ενδοκρινικό σύστημα αποτελείται από πολλούς αδένες που ονομάζονται ενδοκρινείς και εκκρίνουν ορμόνες. Οι ενδοκρινείς αδένες αποκαλούνται και αδένες άνευ πόρων, ώστε να διακρίνονται από τους εξωκρινείς αδένες. Οι ορμόνες είναι χημικά μηνυματοφόρα μόρια τα οποία μεταφέρονται, μέσω του αίματος, από τους ενδοκρινείς αδένες στα κύτταρα στα οποία δρουν, τα οποία αποτελούν τα κύτταρα-στόχους της ορμόνης. Ένας από τους σημαντικότερους ενδοκρινείς αδένες του ανθρώπινου σώματος είναι ο θυρεοειδής αδένας (Vander et al. 2001a).

### 1.1.1. Ανατομία του θυρεοειδούς αδένος

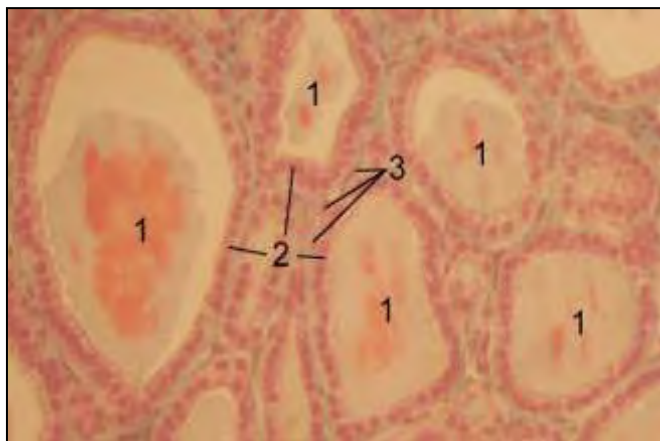
Ο θυρεοειδής αδένας είναι ένας ενδοκρινής αδένας που βρίσκεται στο κάτω και πρόσθιο μέρος του λαιμού, κάτω από το λάρυγγα. Ο μικρός, δύο λοβών αδένας αποτελείται από δύο λοβούς, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με μια μικρή γέφυρα θυρεοειδούς ιστού που ονομάζεται ισθμός. Οι δύο λοβοί βρίσκονται εκατέρωθεν της τραχείας αεραγωγού (Εικόνα 1) (University of Maryland Medical Center for Diabetes and Endocrinology, 2014)

(<http://umm.edu/programs/diabetes/health/endocrinology-health-guide/thyroid-gland>).



**Εικόνα 1.** Θυρεοειδής αδένας. (British Thyroid Foundation, 2014, <http://www.btf-thyroid.org/index.php/thyroid/your-thyroid-gland>).

Αποτελείται από πολλά σφαιρικά δομικά υλικά, τα θυλάκια, καθένα από τα οποία φέρει ένα απλό στρώμα επιθηλιακών κυττάρων περιβαλλόμενο από ένα εξωκυτταρικό κεντρικό χώρο γεμάτο από μια κολλοειδή γλυκοπρωτεΐνη, ονομαζόμενη θυρεοσφαιρίνη. Ο ιστός του θυρεοειδούς αποτελείται από δύο τύπους κυττάρων: τα θυλακιώδη (follicular) κύτταρα και τα παραθυλακιώδη (parafollicular) κύτταρα (Εικόνα 2) (Fallahi et al. 2014).



**Εικόνα 2.** 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).

## 1.1.2. Φυσιολογία του Θυρεοειδούς αδένος

### 1.1.2.1. Θυρεοειδείς ορμόνες

Το μεγαλύτερο μέρος του θυρεοειδούς αδένος αποτελείται από τα θυλακιώδη κύτταρα, τα οποία εκκρίνουν ορμόνες, που περιέχουν ιώδιο και ονομάζονται θυροξίνη (thyroxine, T4) και τριϊωδοθυρονίνη (triiodothyronine, T3). Οι ορμόνες T4 και T3 εκκρίνονται στην κυκλοφορία του αίματος και είναι απαραίτητες για τη σωστή λειτουργία όλων των κυττάρων του σώματος (Vander et al. 2001a).

Τα παραθυλακιώδη κύτταρα αποτελούν αυτούσιες οντότητες, διάσπαρτες ανάμεσα στα κύτταρα των θυρεοειδικών θυλακίων και εκκρίνουν μια τρίτη ορμόνη, ένα πεπτίδιο που ονομάζεται καλσιτονίνη (calcitonin). Η καλσιτονίνη ελαττώνει τη συγκέντρωση του ασβεστίου στο πλάσμα, κυρίως αναστέλλοντας τη δράση των οστεοκλαστών, μειώνοντας έτσι την οστεόλυση (Vander et al. 2001b). Η έκκρισή της διεγείρεται από την αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου στο πλάσμα. Η ορμόνη αυτή δεν περιέχει ιώδιο και δεν εμπεριέχεται στον όρο «θυρεοειδικές ορμόνες», όπως η T4 και η T3 (University of Maryland Medical Center for Diabetes and Endocrinology, 2014, <http://umm.edu/programs/diabetes/health/endocrinology-health-guide/thyroid-gland>).

### 1.1.2.2. Παραγωγή θυρεοειδικών ορμονών

Ο θυρεοειδής αδένας παράγει την ορμόνη θυροξίνη (T4), που περιέχει τέσσερα άτομα ιωδίου, και την τριϊωδοθυρονίνη (T3), η οποία περιέχει τρία άτομα ιωδίου. Το ιώδιο, που καταναλώνεται με την τροφή, απορροφάται με ενεργητική μεταφορά από το αίμα στο γαστρεντερικό σωλήνα και μετατρέπεται σε ιωδιούχο ιονισμένη μορφή. Στη συνέχεια, μεταφέρεται ενεργά από το αίμα προς τα θυλακιάδη κύτταρα του θυρεοειδούς. Με την είσοδο του στα κύτταρα, μετατρέπεται πάλι στην αρχική του μορφή και ως ιώδιο πια ζευγαρώνει με τις πλευρικές αλυσίδες των μορίων της τυροσίνης, που έχουν προηγουμένως ενσωματωθεί σε θυρεοσφαιρική πρόδρομη ουσία. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι ο σχηματισμός θυρεοσφαιρίνης, η οποία αποθηκεύεται στον κεντρικό χώρο των θυλακίων. Κατά τη διάρκεια ορμονικής έκκρισης, η θυρεοσφαιρίνη μετακινείται στα θυλακιάδη κύτταρα με ενδοκυττάρωση, όπου συντήκεται με τα λυσοσώματα, διασπάται και απελευθερώνονται οι θυρεοειδικές ορμόνες. Αυτές διασχίζουν τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες και εισέρχονται στο αίμα. Η T4 εκκρίνεται σε μεγαλύτερη ποσότητα από την T3. Διάφοροι, όμως, ιστοί, όπως το ήπαρ και οι νεφροί, μετατρέπουν σημαντική ποσότητα της T4 στην T3 μέσω ενζυματικής απομάκρυνσης ενός ατόμου ιωδίου. Έτσι, προκύπτει η υψηλή συγκέντρωση της T3, η οποία είναι πιο βιολογικά δραστική, συγκριτικά με την T4, καθώς η T4 έχει μικρή βιολογική δράση. Συνεπώς, η ορμόνη T3 επηρεάζει τη δραστηριότητα όλων των κυττάρων και των ιστών του σώματος (Vander et al. 2001a).

### 1.1.2.3. Λειτουργίες του θυρεοειδούς αδένου

Οι ορμόνες T3 και T4 είναι βασικοί ρυθμιστές του μεταβολισμού των κυττάρων και είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική ανάπτυξη και ωρίμανση, διατηρώντας στους ιστούς το άριστο επίπεδο μεταβολισμού για τη φυσιολογική τους λειτουργία. Επίσης, οι ορμόνες αυτές ρυθμίζουν το μεταβολισμό πρωτεϊνών, λιπιδίων και υδατανθράκων και με τον τρόπο αυτό καθορίζουν ποια πηγή ενέργειας θα χρησιμοποιήσει το κύτταρο. Εκτός από την παραπάνω δράση, οι θυρεοειδείς ορμόνες επιτρέπουν τη φυσιολογική ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος κατά την εμβρυϊκή ηλικία. Η ανεπαρκής παραγωγή μητρικών και εμβρυϊκών θυρεοειδικών ορμονών, λόγω έντονης έλλειψης ιωδίου κατά την εγκυμοσύνη, είναι μία από τις κύριες αιτίες πνευματικής καθυστέρησης, που ονομάζεται ενδημικός κρετινισμός (Vander et al. 2001b).

Ο θυρεοειδής αδένας παίζει σημαντικό ρόλο και στη ρύθμιση του μεταβολισμού του σώματος, την αύξηση, λειτουργία και ανάπτυξη του εγκεφάλου και την ισορροπία του ασβεστίου. Οι ορμόνες T4 και T3 διεγείρουν, σε κάθε ιστό του σώματος, την παραγωγή πρωτεϊνών και την αύξηση της ποσότητας του οξυγόνου που χρησιμοποιείται από τα κύτταρα. Η ορμόνη καλσιτονίνη δρα σε συνεργασία με την παραθυρεοειδή ορμόνη ή παραθορμόνη (parathyroid hormone) για τη ρύθμιση των επιπέδων του ασβεστίου στο σώμα (University of Maryland Medical Center for Diabetes and Endocrinology, 2014, <http://umm.edu/programs/diabetes/health/endocrinology-health-guide/thyroid-gland>).

#### 1.1.2.4. Ρύθμιση της λειτουργίας του θυρεοειδούς αδένου

Ο έλεγχος της φυσιολογικής λειτουργίας του θυρεοειδούς αδένου βασίζεται σε έναν μηχανισμό που ρυθμίζει πολύ προσεκτικά το ποσό των ορμονών T4 και T3. Συγκεκριμένα, ο μηχανισμός αυτός αποτελείται από ένα μικρό αδένου, την υπόφυση που βρίσκεται στη βάση του εγκεφάλου. Η πρόσθια υπόφυση ανιχνεύει το επίπεδο των θυρεοειδικών ορμονών T4 και T3 στο αίμα και, υπό κανονικές συνθήκες, εάν το επίπεδο είναι μικρότερο του φυσιολογικού, αντιδρά εκκρίνοντας μια ορμόνη που ονομάζεται θυρεοειδοτροπίνη ή θυρεοειδοτρόπος ορμόνη (thyroid stimulating hormone, TSH), η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τον θυρεοειδή αδένου για την παραγωγή των T4 και T3. Αντιστρόφως, όταν τα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών αυξάνονται πάνω από το κανονικό, η πρόσθια υπόφυση σταματά την έκκριση της TSH, και συνεπώς, μειώνεται η παραγωγή των T4 και T3 ορμονών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η θυρεοειδοτροπίνη διεγείρεται με τη σειρά της από την υποφυσιοτροπική ορμόνη θυρεοειδοεκλυτίνη (TRH), η οποία παράγεται από τον υποθάλαμο (Vander et al. 2001a).

#### 1.1.3. Συχνότερες διαταραχές του θυρεοειδούς αδένου

Οι διαταραχές του θυρεοειδούς είναι πολύ συχνές και τείνουν να εμφανίζονται στις γυναίκες, ενώ επηρεάζουν και άνδρες, έφηβους, παιδιά και βρέφη. Περίπου ένα στα 20 άτομα έχει κάποιου είδους διαταραχή του θυρεοειδούς, η οποία μπορεί να είναι προσωρινή ή μόνιμη.

Οι ορμόνες T3 και T4 επηρεάζουν το μεταβολισμό όλων των κυττάρων του σώματος. Συγκεκριμένα, ρυθμίζουν την ταχύτητα με την οποία λειτουργούν τα κύτταρα του σώματος. Εάν εκκριθεί υπερβολική ποσότητα των θυρεοειδικών ορμονών από το θυρεοειδή αδένου, τα κύτταρα ή τα όργανα του σώματος λειτουργούν ταχύτερα από το κανονικό με αποτέλεσμα να προκύπτει υπερθυρεοειδισμός (Hyperthyroidism), ο οποίος μπορεί να οδηγήσει, για παράδειγμα, σε μια επιτάχυνση του καρδιακού ρυθμού ή σε αυξημένη δραστηριότητα του εντέρου που περιλαμβάνει συχνές κινήσεις του εντέρου ή ακόμα και διάρροια. Ο υπερθυρεοειδισμός (υπερδραστήριος θυρεοειδής) παράγει υπέρμετρη θυροξίνη για τις ανάγκες του σώματος. Η διαταραχή του υπερθυρεοειδισμού χαρακτηρίζεται από συμπτώματα, όπως η απώλεια βάρους, η δυσανεξία στη ζέστη, το άγχος, και μερικές φορές πόνο στα μάτια.

Από την άλλη πλευρά, εάν παραχθεί μειωμένη ποσότητα των θυρεοειδικών ορμονών, τα κύτταρα και τα όργανα του σώματος παρουσιάζουν ελαττωμένη δραστηριότητα. Η κατάσταση αυτή αποτελεί τον υποθυρεοειδισμό (Hypothyroidism), ο οποίος μπορεί τελικά να οδηγήσει σε έναν επιβραδυνόμενο καρδιακό ρυθμό και σε αργή λειτουργία του εντέρου. Ο υποθυρεοειδισμός (υπολειτουργία του θυρεοειδούς) δεν παράγει αρκετή θυροξίνη για τις ανάγκες του σώματος. Τα πιο κοινά συμπτώματα που εμφανίζονται στην περίπτωση του υποθυρεοειδισμού είναι η κόπωση, το αίσθημα κρύου, η αύξηση του σωματικού βάρους, η κακή συγκέντρωση, καθώς και η κατάθλιψη. Ο υποθυρεοειδισμός είναι η πιο κοινή διαταραχή (Vander et al. 2001b).

### 1.1.3.1. Άλλες διαταραχές του θυρεοειδούς

Τα οζίδια ή οιδήματα (Nodules or swellings) αποτελούν εξογκώματα που μπορούν να επηρεάσουν ή ακόμη και να εμποδίσουν τη φυσιολογική λειτουργία του θυρεοειδούς αδένου. Τα περισσότερα είναι αβλαβή, ωστόσο πρέπει να παρακολουθούνται τακτικά. Μία διόγκωση στο λαιμό, λόγω διευρυμένου θυρεοειδούς αδένου, ονομάζεται βρογγοκήλη (goitre). Τέλος, ο καρκίνος του θυρεοειδούς αδένου (Thyroid cancer) είναι σπάνιος και τα περισσότερα οζίδια στο θυρεοειδή αποδεικνύονται καλοήθη. Η πλειονότητα των καρκίνων του θυρεοειδούς μπορούν συνήθως να αντιμετωπίζονται πολύ επιτυχώς με χειρουργική επέμβαση, ραδιενεργό ιώδιο ή ένα συνδυασμό και των δύο. Συγκεκριμένα, η διαγνωστική θυρεοειδεκτομή πραγματοποιείται, ώστε να διαπιστωθεί αν ένα οζίδιο είναι καλόηθες ή κακόηθες, ενώ η θεραπευτική επέμβαση πραγματοποιείται με σκοπό να μειωθούν οι πιθανότητες επανεμφάνισης και θνησιμότητας (Xing et al. 2013). Ωστόσο, η αναμονή μπορεί να αποδειχθεί ιδιαίτερα επικίνδυνη για την πλειοψηφία των ασθενών. Είναι, επομένως, σημαντικό να αναπτυχθούν διαγνωστικά προεγχειρητικά εργαλεία, για τις περιπτώσεις που δεν απαιτείται η χειρουργική επέμβαση (Xing et al. 2013).

Οι πιο κοινοί τύποι καρκίνου του θυρεοειδούς είναι ο θηλώδης (papillary) και ο θυλακιώδης (follicular), ενώ οι λιγότερο συχνές μορφές καρκίνου του θυρεοειδούς είναι ο τύπος Hürthle cell (μια παραλλαγή του θυλακιώδους τύπου στον καρκίνο του θυρεοειδούς) και ο μυελώδης τύπος (medullary). Ακόμα πιο σπάνιοι τύποι καρκίνου του θυρεοειδούς είναι ο αναπλαστικός (anaplastic) και το λέμφωμα του θυρεοειδούς (lymphoma of the thyroid), τα οποία εμφανίζονται συνήθως σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. (British Thyroid Foundation, 2014, <http://www.btf-thyroid.org/index.php/thyroid/your-thyroid-gland>).

## 1.2. Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ

### 1.2.1. Γενικά

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αποτελεί το 93% των καρκίνων του ενδοκρινικού συστήματος (Ries et al. 2007), και η συχνότητα εμφάνισής του έχει αυξηθεί ταχύτατα σε παγκόσμιο επίπεδο τις τελευταίες δεκαετίες (Xing, 2013). Οι λόγοι για την αύξηση αυτής της συχνότητας είναι ασαφείς, με πιθανές εξηγήσεις να συμπεριλαμβάνουν τον αυξημένο αριθμό δειγμάτων στις μελέτες, τον πλέον διαδεδομένο διαγνωστικό έλεγχο των ασυμπτωματικών όζων του θυρεοειδούς, τις δημογραφικές αλλαγές και τις αλλαγές στους περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου (Liebner & Shah, 2011). Σε φυσική ψηλάφηση του θυρεοειδούς αδένου, η συχνότητα των θυρεοειδικών όζων είναι περίπου 5-10% στους ενήλικες, ενώ σε υπερηχογράφημα του θυρεοειδούς, η συχνότητα είναι πολύ υψηλότερη και ανέρχεται σε άτομα ηλικίας άνω των 60 ετών στο 50-70% (Guth et al. 2009).

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αντιπροσωπεύει περίπου το 1% του συνόλου των περιπτώσεων καρκίνου στις ανεπτυγμένες χώρες (Jemal et al. 2011). Επηρεάζει όλες τις ηλικιακές ομάδες, αν και εμφανίζεται σπάνια σε παιδιά. Οι θυρεοειδείς όγκοι είναι συχνότεροι στις γυναίκες παρά στους άνδρες. Παρά τη σχετική σπανιότητα τους σε σχέση με άλλους καρκίνους, παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα μορφολογικών τύπων και βιολογικής συμπεριφοράς, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει το μεγάλο ενδιαφέρον των παθολόγων σε αυτά τα νεοπλάσματα (Scopa, 2004).

Ο κύριος στόχος της εκτίμησης των ασθενών με όζους του θυρεοειδούς είναι η διάκριση του καρκίνου του θυρεοειδούς από τα καλοήγη οζίδια. Αν και ο στόχος αυτός μπορεί να επιτευχθεί στους περισσότερους ασθενείς μέσω των συμβατικών διαγνωστικών τεχνικών, συμπεριλαμβανομένων του υπερηχογραφήματος και της παρακέντησης βιοψίας με λεπτή βελόνα (fine needle aspiration biopsy - FNAB), οι συμβατικές μέθοδοι διάγνωσης δε μπορούν να δώσουν οριστική διάγνωση σε πολλές περιπτώσεις (Cooper et al. 2009).

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, η συχνότητα του θυρεοειδούς καρκίνου έχει χαρακτηριστεί ως η ταχύτερα αυξανόμενη περίπτωση καρκίνου στις Ηνωμένες Πολιτείες (American Cancer Society, 2014). Υπολογίζεται ότι 1,690 άτομα μεταξύ 300,000 ασθενών με τη συγκεκριμένη ασθένεια πέθαναν από καρκίνο του θυρεοειδούς το 2010 στις Ηνωμένες Πολιτείες (Altekruse et al. 2010). Ειδικότερα, ο καρκίνος του θυρεοειδούς στις γυναίκες έχει διπλασιαστεί τις τρεις τελευταίες δεκαετίες (Burgess & Tucker, 2006). Οι εκτιμήσεις την τελευταία δεκαετία τοποθετούν το ετήσιο ποσοστό αύξησης στο 3%, με αποτέλεσμα το διπλασιασμό της συχνότητας εμφάνισης καρκίνου του θυρεοειδούς σε 30 χρόνια (Davies & Welch, 2006; Morris & Myssiorek, 2010). Παρόμοια πρότυπα αύξησης έχουν αναφερθεί στον Καναδά, την Αυστραλία, τη Νότια Αμερική, την Ασία, καθώς και τη δυτική Ευρώπη (Burgess, 2002; Kilfoy et al. 2009). Μάλιστα μόνο σε λίγες χώρες έχει αναφερθεί μείωση στη συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του θυρεοειδούς: στη Σουηδία (18% μείωση τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες), στη Νορβηγία (5.8% μείωση στις γυναίκες) και στην Ισπανία (25.9% μείωση στις γυναίκες). Η συχνότητα της ασθένειας αυξάνεται σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες, όπως η Ελβετία (5.3%) και η Γαλλία (155.6%) (Kilfoy et al. 2009). Οι αιτίες αυτής της λεγόμενης «επιδημίας του θυρεοειδούς καρκίνου» δεν είναι πλήρως κατανοητές (Leenhardt et al. 2004). Μία κοινή αναφορά που επικρατεί σε πολλές επιδημιολογικές μελέτες είναι ότι αυτός ο υψηλός ρυθμός αύξησης αφορά τους μικρούς και πιο εντοπισμένους καρκίνους του θυρεοειδούς, γεγονός που πιθανώς συμβάλλει στη σταθερή και σχετικά χαμηλή θνησιμότητα που παρατηρείται (Cunha et al. 2011). Ωστόσο, υπάρχουν αρκετά στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η αυξανόμενη συχνότητα του θυρεοειδούς καρκίνου σχετίζεται, επίσης, και με άλλους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων του αυξημένου ποσού των μεγάλων όγκων, που μπορούν σίγουρα να ανιχνευθούν χωρίς την ανάγκη για πιο εξελιγμένες ή ευαίσθητες μεθόδους απεικόνισης, και της παράλληλης αύξησης της έκθεσης σε μια σειρά περιβαλλοντικών παραγόντων, που σχετίζονται με τον καρκίνο, όπως είναι η έκθεση σε ακτινοβολία (Nikiforov, 2010b; Wartofsky, 2010), η διαμονή σε ηφαιστειογενείς περιοχές (Pellegriti et al. 2009), η πρόσληψη ιωδίου (Liu et al. 2009), το γυναικείο φύλο που θα μπορούσε να συσχετιστεί με τα οιστρογόνα (Chen et al. 2009), η παχυσαρκία (Renehan et al. 2010), καθώς και γενετικοί παράγοντες που συνδέονται με την ευαισθησία στον καρκίνο του θυρεοειδούς (Bufalo et al. 2006).



## 1.2.2. Ιστολογική Ταξινόμηση

Υπάρχουν αρκετοί ιστολογικοί τύποι και υπότυποι του καρκίνου του θυρεοειδούς με διαφορετική κυτταρική προέλευση, χαρακτηριστικά και πρόγνωση. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ο θυρεοειδής αδένας περιέχει δύο κύριους τύπους επιθηλιακών κύτταρων: τα θυλακιώδη κύτταρα, τα οποία εκκρίνουν τις ορμόνες T3 και T4, και τα παραθυλακιώδη κύτταρα ή C κύτταρα, τα οποία εκκρίνουν την ορμόνη καλσιτονίνη (Xing, 2013). Οι θυρεοειδείς όγκοι μπορεί να προέρχονται από αυτά τα πολύ διαφορετικά είδη κυττάρων ή από μη επιθηλιακά στοιχεία του στρώματος, και τα αρχιτεκτονικά, κυτταρολογικά και ιστογενετικά χαρακτηριστικά τους λαμβάνονται υπόψη για την κατάταξη των θυρεοειδικών νεοπλασμάτων (Scopa, 2004).

Μία ιστολογική ταξινόμηση των όγκων του θυρεοειδούς παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Ενσωματώνει τις βασικές αρχές της τρέχουσας ταξινόμησης του καρκίνου του θυρεοειδούς του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO) (Hedinger et al. 1989). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, οι όγκοι του θυρεοειδούς μπορούν να διαχωριστούν κυρίως ανάμεσα σε πρωτοπαθείς και δευτεροπαθείς ή μεταστατικούς όγκους. Οι πρωτοπαθείς όγκοι του θυρεοειδούς ταξινομούνται ως επιθηλιακοί ή μη επιθηλιακοί, καλοήθεις ή κακοήθεις, τοποθετώντας σε μία ξεχωριστή κατηγορία τα λεμφώματα και τα μη ταξινομούμενα νεοπλάσματα (Πίνακας 1) (Scopa, 2004). Αντίθετα, οι μεταστατικοί όγκοι του θυρεοειδούς είναι σπάνιοι (Hedinger et al. 1989). Τέλος, για συγκεκριμένους τύπους του θυρεοειδούς, γίνεται αναφορά σε διαφορετικούς ιστολογικούς υποτύπους, που καλούνται επίσης παραλλαγές (Rosai et al. 1992).

**Πίνακας 1.** Ιστολογική Ταξινόμηση Θυρεοειδικών Όγκων (WHO) (Hedinger et al. 1989).

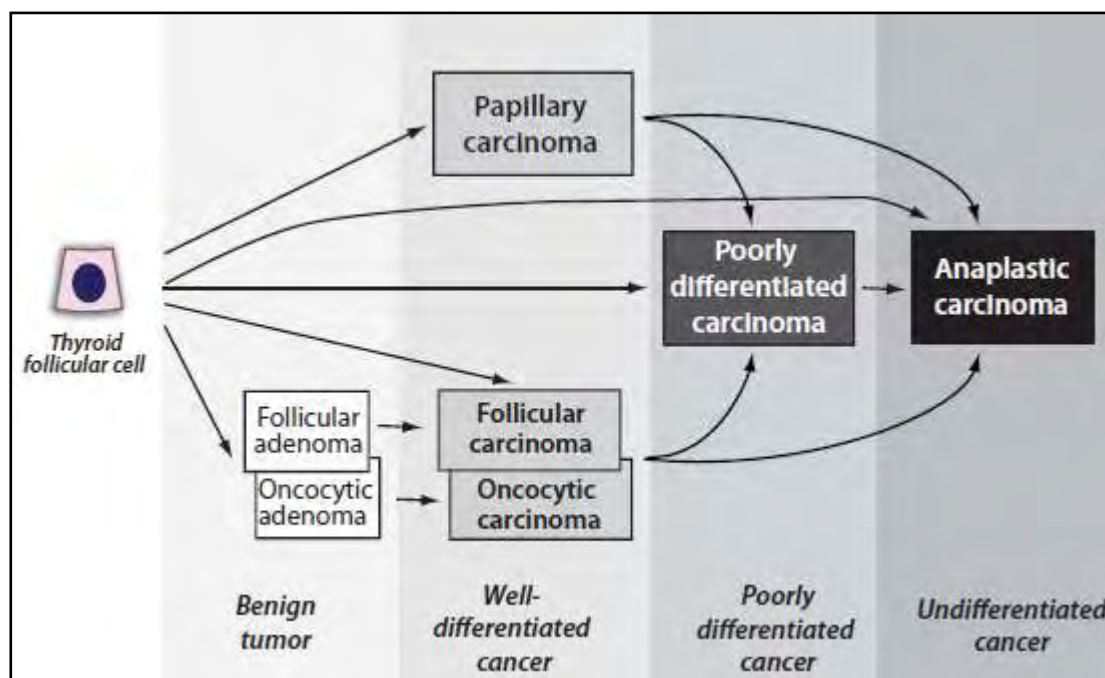
Πρωτοπαθείς	Δευτεροπαθείς (Μεταστατικοί)
I. Επιθηλιακοί όγκοι	
A. Καλοήθεις	1. Θυλακιώδες αδένωμα 2. Άλλοι
B. Κακοήθεις	1. Θυλακιώδες καρκίνωμα 2. Θηλώδες καρκίνωμα 3. Μυελοειδές καρκίνωμα 4. Αδιαφοροποίητο (αναπλαστικό) καρκίνωμα 5. Χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα 6. Άλλοι
II. Μη επιθηλιακοί όγκοι	
A. Καλοήθεις	
B. Κακοήθεις	
III. Κακοήθη λεμφώματα	
IV. Διάφοροι όγκοι	
V. Δευτερογενείς όγκοι	
VI. Αταξινόμητοι όγκοι	
VII. Βλάβες όμοιες με όγκους (tumor-like lesions)	



Οι περισσότεροι πρωτοπαθείς όγκοι του θυρεοειδούς είναι επιθηλιακοί όγκοι, δηλαδή προέρχονται από τα θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς (thyroid follicular cells) (Nikiforov, 2010a). Οι τύποι του καρκίνου του θυρεοειδούς, που προέρχονται από τα θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς αδένα, περιλαμβάνουν το θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς (papillary thyroid cancer, PTC), το θυλακιώδη καρκίνο του θυρεοειδούς (follicular thyroid cancer, FTC), τον χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνο του θυρεοειδούς (poorly differentiated thyroid cancer, PDTC) και τον αναπλαστικό καρκίνο του θυρεοειδούς (anaplastic thyroid cancer, ATC), οι οποίοι και αποτελούν την πλειοψηφία των θυρεοειδών κακοηθειών, αντιπροσωπεύοντας πάνω από το 90% όλων των νέων κρουσμάτων που έχουν διαγνωστεί (Davies & Welch, 2006).

Οι τύποι PTC και FTC συλλογικά ταξινομούνται ως διαφοροποιημένοι καρκίνοι του θυρεοειδούς (differentiated thyroid cancer, DTC). Ο πιο κοινός τύπος καρκίνου του θυρεοειδούς είναι ο θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς (PTC), που περιλαμβάνει το 80% όλων των περιπτώσεων. Ο δεύτερος πιο κοινός τύπος είναι ο θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς (FTC), που αντιπροσωπεύει το 10-20% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του θυρεοειδούς (Schneider & Chen, 2013).

Τα χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα και τα αναπλαστικά καρκινώματα προέρχονται, επίσης, από τα θυλακιώδη κύτταρα, ενώ θεωρείται ότι αναπτύσσονται ως αποτέλεσμα της αποδιαφοροποίησης των καλά-διαφοροποιημένων θηλωδών ή θυλακιωδών καρκινωμάτων. Είναι πιθανόν ορισμένα θυλακιώδη καρκινώματα να προκύπτουν από τον κακοήγη μετασχηματισμό ενός προϋπάρχοντος θυλακιώδους αδενώματος, αλλά μπορεί και να παρακαμφθεί αυτό το στάδιο προ-κακοήθειας (Εικόνα 3) (Nikiforov, 2010a).



**Εικόνα 3.** Σχέδιο της υποτιθέμενης εξέλιξης και αποδιαφοροποίησης των όγκων του θυρεοειδούς που προέρχεται από θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς. (Nikiforov, 2010a).

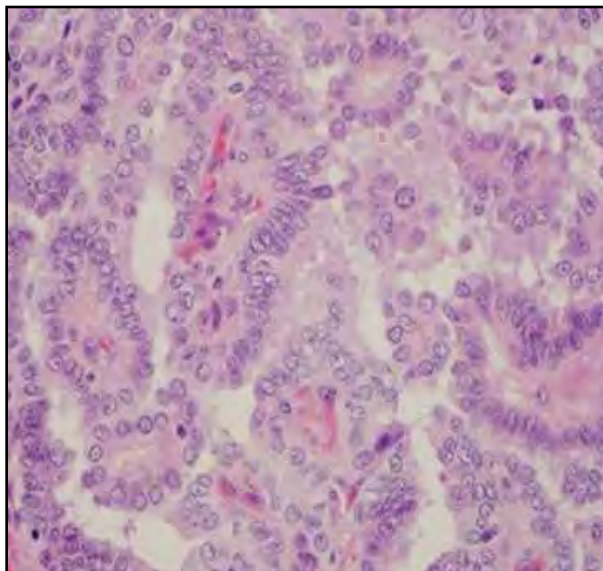
Από τα παραθυλακιδώδη κύτταρα ή C κύτταρα (C cells) του θυρεοειδούς αδένου προέρχεται ο μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς (medullary thyroid cancer, MTC), που αντιπροσωπεύει ένα μικρό ποσοστό των θυρεοειδών κακοηθειών (Xing, 2013). Ο μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς (MTC), που προέρχεται από τα παραθυλακιδώδη κύτταρα του θυρεοειδούς, αποτελεί το 2-8% όλων των καρκίνων του θυρεοειδούς (Pacini et al. 2010).

Σε ασθενείς με διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς (PTC και FTC), οι συνήθεις μέθοδοι αντιμετώπισης είναι η χειρουργική εκτομή, η καταστολή της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSH) με λεβοθυροξίνη (levothyroxine) και η θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο ή εξωτερική ακτινοβολία (Liebner & Shah, 2011) ή ένας συνδυασμός των παραπάνω. Τα αποτελέσματα είναι γενικά θετικά, αλλά έως και το 30% των ασθενών μπορεί να υποτροπιάσει μετά την αρχική θεραπεία και το 15% από αυτούς να αποβιώσει από τη νόσο (Mazzaferrri, 1999). Αντίθετα, ο καρκίνος MTC είναι εγγενώς ιώδιο-ανθεκτικός, και οι ασθενείς με αυτόν τον τύπο καρκίνου, συνήθως, υποβάλλονται σε χειρουργική εκτομή με ή χωρίς επικουρική θεραπεία με εξωτερική ακτινοβολία (Liebner & Shah, 2011). Ωστόσο, παρά την επιθετική αυτή χειρουργική θεραπεία, σχεδόν το 50% των ασθενών, που πάσχουν από μυελοειδή καρκίνο, θα υποστούν υποτροπή (Moo-Young et al. 2009). Τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικής χημειοθεραπείας για όλους τους τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς είναι γενικώς απογοητευτικά. Αυτό έχει οδηγήσει σε μία αναζήτηση βελτιωμένων θεραπευτικών επιλογών για ασθενείς με ανεγχείρητο DTC, ανεγχείρητο MTC, και σε όλες τις περιπτώσεις του ATC (Liebner & Shah, 2011). Η χρήση μοριακών δεικτών είναι υψίστης σημασίας και αναμένεται να βελτιώσει σημαντικά την ακρίβεια της διάγνωσης και πρόγνωσης του καρκίνου του θυρεοειδούς και να επιτρέψει την εξατομικευμένη χειρουργική και μετεγχειρητική αντιμετώπιση των ασθενών με καρκίνο του θυρεοειδούς (Nikiforov, 2011).

### 1.2.2.1. Θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς

Ο θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς είναι ο πιο κοινός ιστολογικός τύπος καρκίνου του θυρεοειδούς και αντιπροσωπεύει περίπου το 70-80% (Chan, 2001) όλων των καρκίνων του θυρεοειδούς. Αυτός ο τύπος καρκίνου του θυρεοειδούς εμφανίζεται και σε νέους ανθρώπους. Ο θηλώδης καρκίνος ορίζεται, σύμφωνα με την ταξινόμηση του WHO, ως ένας «κακοήθης επιθηλιακός όγκος», εμφανίζοντας στοιχεία διαφοροποίησης των θυλακιδωδών κυττάρων με χαρακτηριστικές πυρηνικές αλλαγές, όπως μεγάλο μέγεθος και ακανόνιστο περίγραμμα με βαθιές αυλακώσεις (Εικόνα 4). Εκτός από τα προαναφερθέντα πυρηνικά χαρακτηριστικά, το θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς αποτελείται από ένα μεταβλητό μείγμα θηλών και θυλακίων, με αποτέλεσμα ένα πολύπλοκο πρότυπο (Rivera et al. 2010b). Η πυκνή υαλώδης ίνωση του στρώματος του όγκου μπορεί να είναι χρήσιμο χαρακτηριστικό για τη διάκριση του θηλώδους καρκινώματος από το θυλακιδώδες. Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό για τη διάγνωση του θηλώδους καρκίνου βασίζεται σε χαρακτηριστικά του πυρήνα. Δείκτες ανοσοϊστοχημείας δεν είναι εντελώς ειδικοί στη διάγνωση του θηλώδους καρκίνου σε σχέση με άλλους όγκους του θυρεοειδούς. Η χρώση μπορεί να είναι αποσπασματική και αδύναμη, ακόμη, και στον κλασικό τύπο θηλώδους καρκίνου

(Chan, 2001). Ο καρκίνος PTC μπορεί, επίσης, να είναι πολυεστιακός χωρίς κυρίαρχη μάζα. Ο πολυεστιακός καρκίνος είναι συχνός (~65%), αν και αυτό παραδοσιακά αποδίδεται σε μετάσταση εντός του θυρεοειδούς αδένα (Liska et al. 2005). Οι θηλώδεις καρκίνοι είναι συνήθως «infiltrative» (δηλαδή τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να διηθηθούν στο γειτονικό ιστό του θυρεοειδούς).



**Εικόνα 4.** Θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς. Το καρκίνωμα έχει θηλές με διευρυμένους πυρήνες (Lloyd et al. 2011).

Σε γενικές γραμμές, οι καλά διαφοροποιημένοι PTC έχουν μια εξαιρετική πρόγνωση με μία πενταετή επιβίωση να είναι μεγαλύτερη από 97% (SEER Cancer Stat Fact Statistics, 2015, <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>). Η συχνότητα του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς (PTC) σε ενήλικες έχει αυξηθεί κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, κυρίως λόγω καρκίνων PTC μικρότερων από 1 cm σε μέγεθος, οι οποίοι ονομάζονται θηλώδη μικροκαρκινώματα (Roti et al. 2006; Bradley et al. 2009). Οι σημαντικότεροι προγνωστικοί παράγοντες, όπως το φύλο, η ηλικία, το μέγεθος του όγκου, ο ιστολογικός τύπος, η αγγειακή ή η λεμφική εισβολή, έχουν δείξει ότι επηρεάζουν την επιβίωση των ασθενών με θηλώδη καρκίνο (Showalter et al. 2008). Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι ένας από τους μεγαλύτερους παράγοντες κινδύνου θνησιμότητας είναι η παρουσία μακρινών μεταστάσεων (Eustatia-Rutten et al. 2006).

Ο θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς (PTC) χαρακτηρίζεται από μεταστάσεις συνήθως στη λέμφο (Salter et al. 2010) ή και μακρινές μεταστάσεις, οι οποίες μπορεί να συμβούν με μια συχνότητα που κυμαίνεται μεταξύ 1.73-8.4% στις περισσότερες μελέτες (Sugitani et al. 2008). Οι πιο κοινές απομακρυσμένες μεταστάσεις στο PTC περιλαμβάνουν τον πνεύμονα (Lin et al. 2004). Επιπλέον, αλλά λιγότερο συχνά, απομακρυσμένες μεταστάσεις μπορεί να εμφανιστούν στα οστά, στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στο ήπαρ, στο περικάρδιο και τον υπεζωκότα, στους νεφρούς, στο πάγκρεας, στο δέρμα και τους μυς, και τέλος στο γαστρεντερικό σωλήνα. Καθότι, αποτελεσματική θεραπεία δεν μπορεί να υπάρξει για πολλούς από τους ασθενείς με

μεταστατικό θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς, είναι υψίστης σημασίας η ανάπτυξη δεικτών για τη διάγνωση και την αντιμετώπισή του (Chrisoulidou et al. 2011).

Συνήθως, στο 90% των περιπτώσεων, τα παιδιά παρουσιάζουν μεγάλους όγκους και μεταστάσεις στους λεμφαδένες, αλλά η πρόγνωση είναι γενικά καλή (Jarzab et al. 2005; Pazaitou-Panayiotou et al. 2005). Το ενδιαφέρον στον παιδιατρικό καρκίνο του θυρεοειδούς έχει αυξηθεί, κυρίως μετά το ατύχημα στον πυρηνικό σταθμό του εργοστασίου Chernobyl το 1986, το οποίο είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του θυρεοειδούς σε παιδιά στις αρχές της δεκαετίας του 1990 (Pazaitou-Panayiotou et al. 2015).

Σε πολλές μελέτες έχουν αναφερθεί διαφορετικοί υπότυποι του θηλώδους καρκίνου με διαφορετικά ιστοπαθολογικά πρότυπα ανάπτυξης, αλλά η σημαντικότερη παραλλαγή αποτελεί ο θυλακιώδης υπότυπος του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς. Μία χαρακτηριστική ταξινόμηση των κυριότερων παραλλαγών συνοψίζεται στον Πίνακα 2, όπως ακριβώς έχει παρουσιαστεί από τον Lloyd et al. (2011). Κάθε παραλλαγή χαρακτηρίζεται από ένα διαφορετικό συνδυασμό συγκεκριμένων μοτίβων ανάπτυξης, κυτταρικών τύπων και στρωματικών αλλαγών (Lloyd et al. 2011). Ωστόσο, μόνο ορισμένες από τις παραλλαγές του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς έχουν προγνωστική σημασία (Liska et al. 2005). Ένα σημαντικό πρόβλημα που συναντάται στην ταξινόμηση των διαφόρων υποτύπων του θηλώδους καρκίνου είναι ότι τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό αυτών των υποτύπων δεν είναι αυστηρά καθορισμένα, γεγονός που οδηγεί σε ασυμφωνία μεταξύ των διαφορετικών παθολόγων.

**Πίνακας 2.** Υπότυποι θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς (Lloyd et al. 2011).

---

Conventional  
Follicular variant  
Papillary microcarcinoma  
Tall cell  
Oncocytic  
Cilumnar cell

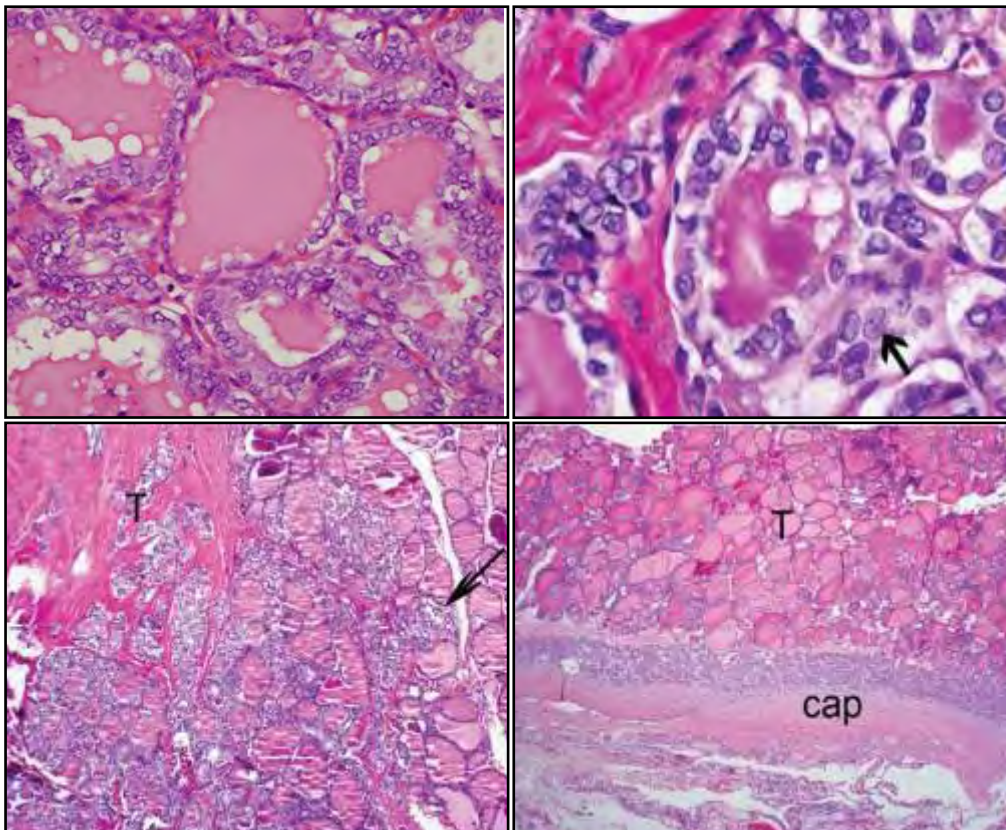
---

### 1.2.2.2. Θυλακιώδης υπότυπος του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς

Ο πιο κοινός υπότυπος αποτελεί η θυλακιώδης παραλλαγή του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς (FVPTC), που περιέχει χαρακτηριστικά τόσο του PTC όσο και του FTC (Schneider & Chen, 2013). Κατατάσσεται, όμως, ως υπότυπος του PTC, γιατί παρά τη συνολική θυλακιώδη δομή, επιδεικνύει τα πυρηνικά χαρακτηριστικά του PTC (Εικόνα 5A, 5B). Αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από θυλάκια διαφόρων μεγεθών με μία επένδυση από κύτταρα με χαρακτηριστικούς πυρήνες θηλώδους καρκινώματος (Rosai et al. 1992). Η βιολογική συμπεριφορά αυτής της παραλλαγής είναι ανάλογη με εκείνη του κλασικού θηλώδους καρκινώματος. Οι μεταστάσεις μπορεί να έχουν ένα μικτό θηλώδη και θυλακιώδη σχηματισμό (Scora, 2004).



Η πρόγνωση αυτών των όγκων είναι παρόμοια με τον κλασικό τύπο του PTC (Lloyd et al. 2011) ή ενδιάμεση μεταξύ του κλασικού τύπου θηλώδους καρκινώματος (PTC) και του θυλακιώδους καρκινώματος (FTC) (Schneider & Chen, 2013). Εξαιρεση αποτελεί η διάχυτη ή πολυοζώδης θυλακιώδης παραλλαγή του PTC, η οποία χαρακτηρίζεται από μία πιο επιθετική κλινική πορεία (DeLellis et al. 2004). Ως επί των πλείστων, η πρόγνωση εξαρτάται από το εάν οι όγκοι είναι πλήρως ενθυλακωμένοι (encapsulated) ή εισβάλλοντες - επιθετικοί (invasive) (Rivera et al. 2010a). Η θυλακιώδης παραλλαγή του θηλώδους καρκίνου παρουσιάζεται συνήθως ως ένας ενθυλακωμένος (encapsulated) όγκος (Εικόνα 5Δ) και λιγότερο συχνά ως ένας μερικώς ή μη ενθυλακωμένος, διηθητικός (infiltrative) όγκος (Εικόνα 5Γ) (Liu et al. 2006). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ενθυλακωμένη μορφή σπάνια σχετίζεται με μεταστάσεις σε λεμφαδένες (5% των περιπτώσεων), σε αντίθεση με τη διηθητική παραλλαγή (65% των ασθενών) (Liu et al. 2006). Συνεπώς, η ενθυλακωμένη παραλλαγή είναι πιο κοντά στο επιθετικό και μεταστατικό μοτίβο του θυλακιώδους αδενώματος ή καρκινώματος, ενώ η διηθητική παραλλαγή συμπεριφέρεται παρόμοια με το κλασικό θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς (Εικόνα 5Γ, 5Δ) (Liu et al. 2006).



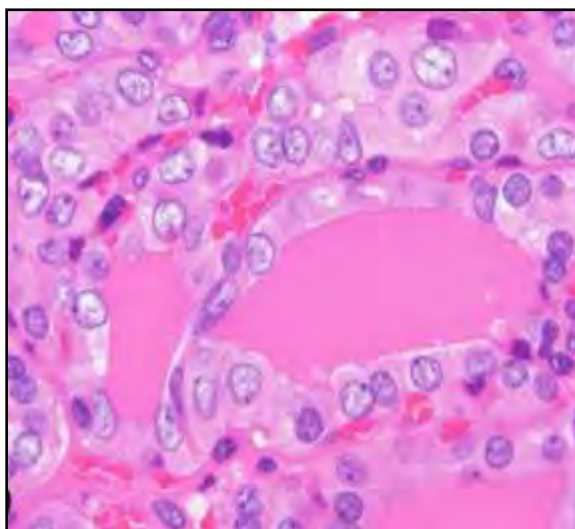
**Εικόνα 5.** Θυλακιώδης υπότυπος θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς. Α. Θυλακιώδης υπότυπος. Τα θυλάκια αποτελούνται από κύτταρα με διευρυμένους πυρήνες με κυτταρολογικά χαρακτηριστικά του θηλώδους καρκινώματος. (Lloyd et al. 2011). Β. Ο θυλακιώδης υπότυπος έχει τα πυρηνικά χαρακτηριστικά του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς: ακανόνιστους και επικαλυπτόμενους πυρήνες με αυλακώσεις (βέλος). (Rivera et al. 2010a). Γ. Διηθητικός (infiltrative) θυλακιώδης υπότυπος του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς. Ο όγκος (T) αναπτύσσεται σε ένα θυλακιώδες μοτίβο με έντονη ίνωση (βέλος). (Rivera et al. 2010a). Δ. Ενθυλακωμένος (encapsulated) θυλακιώδης υπότυπος του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς. Ο όγκος (T) περιβάλλεται από την κάψουλα (cap) χωρίς εισβολή. (Rivera et al. 2010a).

Οι όγκοι με τη θυλακιώδη παραλλαγή του PTC συχνά συγγέονται ιστολογικά με τα θυλακιώδη αδενώματα και καρκινώματα (LiVolsi, 2011), καθιστώντας έτσι τη διάγνωσή τους αρκετά δύσκολη και αμφιλεγόμενη (Wallander et al. 2010). Έχει αποδειχθεί ότι η χρήση μοριακών δεικτών και ανοσοϊστοχημικών δεικτών, όπως οι HBME-1 (Hector Battifora mesothelial cell antibody), galectin-3, και CK-19 (cytokeratin-19), μπορεί να είναι πολύ χρήσιμη για την επιβεβαίωση της διάγνωσης σε δύσκολες περιπτώσεις (Scognamiglio et al. 2006).

### 1.2.2.3. Θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς

Ο θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς είναι ένας επιθηλιακός όγκος του θυρεοειδούς, που παρουσιάζει διαφοροποίηση των θυλακιωδών κυττάρων, αλλά έλλειψη των διαγνωστικών χαρακτηριστικών του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς (Εικόνα 6) (Liska et al. 2005). Οι θυλακιώδεις καρκίνοι αντιπροσωπεύουν περίπου το 20% όλων των καρκίνων του θυρεοειδούς. Αυτός ο τύπος θυρεοειδούς καρκίνου προκύπτει σπάνια από καλοήγη αδενώματα ως αποτέλεσμα μετασχηματιστικών γεγονότων. Όμως, σε περιοχές με ανεπάρκεια ιωδίου, ο θυλακιώδης καρκίνος είναι πιο συχνός από το θηλώδη (Sherman, 2003). Η συχνότητα του θυλακιώδους καρκινώματος μεταξύ των θυρεοειδών κακοηθειών κυμαίνεται μεταξύ 5 με 10% σε περιοχές χωρίς ανεπάρκεια ιωδίου, και μεταξύ 30 με 40% σε περιοχές με ανεπάρκεια ιωδίου (Rosai et al. 1992).

Ο θυλακιώδης καρκίνος χαρακτηρίζεται από χειρότερη πρόγνωση σε σύγκριση με το θηλώδη καρκίνο. Ακόμη και όταν η νόσος περιορίζεται στο θυρεοειδή ιστό, τα ποσοστά θνησιμότητας ανέρχονται στο ποσοστό του 5-15%, παρ' όλο που ο χρόνος επιβίωσης εξακολουθεί να εκτείνεται σε δεκαετίες, όπως και στο θηλώδη καρκίνο (Schlumberger, 1998). Η πρόγνωση στο θυλακιώδη καρκίνο εξαρτάται κυρίως από το βαθμό της αγγειακής εισβολής. Επιθετικοί όγκοι φέρουν χειρότερη πρόγνωση, αφού εισβάλλουν και στα αγγεία (Harness et al. 1984; Thompson et al. 2001). Για τους λόγους αυτούς, η παρακέντηση βιοψίας με λεπτή βελόνη (FNA) δεν μπορεί να συμβάλλει αρκετά στη διάκριση του θυλακιώδους αδενώματος από το θυλακιώδες καρκίνωμα, και αυτό έχει οδηγήσει στη διερεύνηση μοριακών δεικτών για καλύτερη διάγνωση. Ωστόσο, μέχρι η μοριακή διαγνωστική να τελειοποιηθεί, το σημερινό πρότυπο διάγνωσης είναι η λοβεκτομή, ώστε να γίνεται διάκριση θυλακιωδών αδενωμάτων από θυλακιώδη καρκινώματα (Brennan et al. 1991; Grebe & Hay, 1995).



**Εικόνα 6.** Θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς (Radakay et al. 2014).

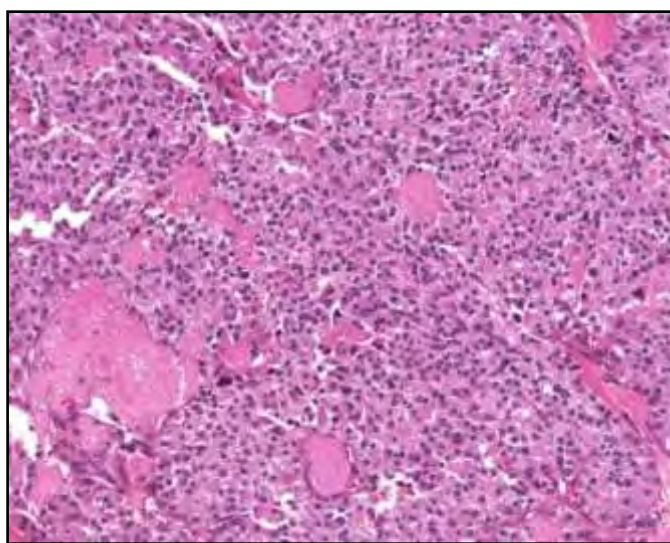
Ένας όγκος του θυρεοειδούς ταξινομείται ως Hürthle cell θυρεοειδής καρκίνος, όταν περισσότερο από το 75% των θυλακιωδών καρκινικών κυττάρων εμφανίζουν χαρακτηριστικά Hürthle κυττάρων (Dean & Hay, 2000). Τέτοιοι κακοήθεις όγκοι του θυρεοειδούς μοιράζονται κάποιες ομοιότητες με τα θυλακιώδη καρκινώματα, όπως η κλινική παρουσίαση, τα αρχιτεκτονικά χαρακτηριστικά, ο βαθμός εξάπλωσης, και ως εκ τούτου θα πρέπει να θεωρούνται ως μια παραλλαγή του θυλακιώδους θυρεοειδούς καρκίνου (Franssila et al. 1985; Rosai et al. 1992). Ωστόσο, ορισμένοι επιστήμονες προτείνουν ότι τα μορφολογικά χαρακτηριστικά αυτών των όγκων είναι αρκετά διακριτά, ώστε να μπορούν να θεωρούνται ως μια ξεχωριστή κατηγορία (Pappoti et al. 1996).

#### **1.2.2.4. Μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς**

Το μυελοειδές καρκίνωμα του θυρεοειδούς (MTC) είναι ένας σπάνιος νευροενδοκρινής καρκίνος, που προέρχεται από τα παραθυλακιώδη κύτταρα (ή C cells), που παράγουν καλσιτονίνη (Ct) (Εικόνα 7) (Pennelli et al. 2015). Αντιπροσωπεύει το 1.4-4% όλων των καρκίνων του θυρεοειδούς και χαρακτηρίζεται από υπερέκκριση καλσιτονίνης (calcitonin) και καρκινοεμβρυονικού αντιγόνου (carcinoembryonic antigen, CEA) (Roy et al. 2013). Άλλες έρευνες αναφέρουν ότι το 5% έως 10% του συνόλου των καρκινωμάτων του θυρεοειδούς αδένα αποτελεί ο μυελοειδής τύπος θυρεοειδούς καρκίνου, με συνολικό ποσοστό επιβίωσης 10 ετών περίπου 65% έως 70%. Οι περισσότερες περιπτώσεις MTC εμφανίζουν αργή πρόοδο, αλλά έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις επιθετικότητας του όγκου, οδηγώντας σε επίμονη, υποτροπιάζουσα ή μεταστατική ασθένεια (Yamazaki et al. 2014).

Η πλειοψηφία των περιστατικών μυελοειδούς καρκίνου, σχεδόν το 75%, είναι σποραδικές, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό, περίπου το 20-40%, αποδίδεται σε κληρονομικότητα, λόγω των βλαστικών μεταλλάξεων που ενεργοποιούν το πρωτο-

ογκογονίδιο Rearranged during Transfection (RET) (Leboulleux et al. 2004). Παραδείγματα της δεύτερης περίπτωσης, αποτελούν η πολλαπλή ενδοκρινική νεοπλασία τύπου 2 (multiple endocrine neoplasia type 2, MEN2) και ο οικογενής MTC (familial MTC, FMTC) (Kameyama & Takami, 2004; American Thyroid Association Guidelines Task et al. 2009). Διάφορες κλινικοί, παθολογικοί και γενετικοί παράγοντες έχουν προταθεί ως δείκτες πρόγνωσης, συμπεριλαμβανομένων της ηλικίας κατά τη διάγνωση, της έκτασης της ασθένειας, των απομακρυσμένων μεταστάσεων, του παθολογικού σταδίου και των μεταλλαξιγόνων βλαβών σε ογκοκατασταλτικά γονίδια (Sheikh et al. 2004). Διακριτές βλαστικές RET μεταλλάξεις στις κληρονομήσιμες περιπτώσεις και σωματικές RET μεταλλάξεις στις σποραδικές περιπτώσεις αντιπροσωπεύουν τους πιο σημαντικούς μοριακούς δείκτες για επαρκή πρόγνωση των ασθενών με MTC (Frank-Raue et al. 2010).



Εικόνα 7. Μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς (Liska et al. 2005).

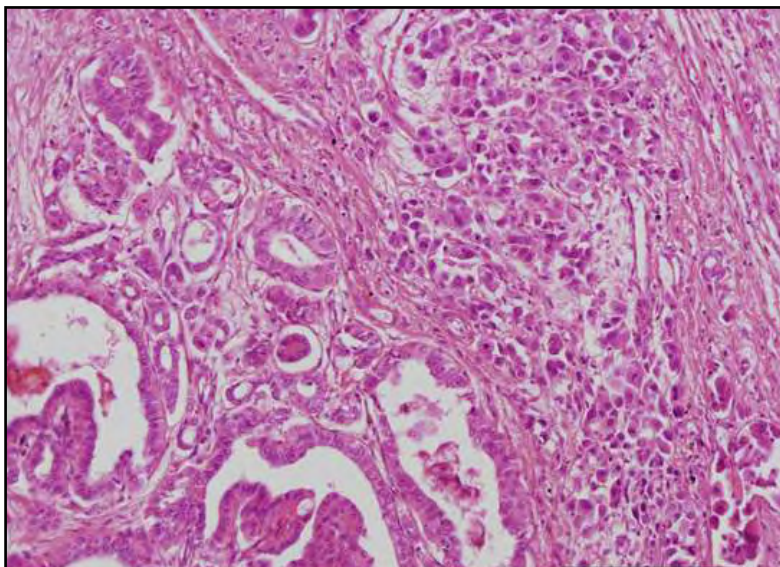
### 1.2.2.5. Αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς

Ο αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς (ATC), σε αντίθεση με το καλά διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς (DTC), είναι μία από τις πιο επιθετικές ανθρώπινες κακοήθειες (Εικόνα 8) (Hsu et al. 2014). Αυτός ο αδιαφοροποίητος καρκίνος του θυρεοειδούς είναι υπεύθυνος για περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις θανάτου με ένα χαμηλό συνολικό ποσοστό επιβίωσης (13%), παρ' όλο που η συχνότητα εμφάνισης αναπλαστικού καρκίνου του θυρεοειδούς ανέρχεται στο 2% (Sherman, 2003; Kebebew et al. 2005). Ο καρκίνος ATC εμφανίζει, επίσης, έντονη επιθετική συμπεριφορά, με μετάσταση στους λεμφαδένες, επηρεάζοντας το 40% των ασθενών, ενώ το υπόλοιπο 60% των ασθενών παρουσιάζουν απομακρυσμένες μεταστάσεις (Chen et al. 2008).

Σε αντίθεση με τους καλά διαφοροποιημένους θυρεοειδείς καρκίνους (DTC), οι οποίοι μπορούν συχνά να θεραπευτούν με χειρουργική εκτομή, με ραδιενεργό ιώδιο, και με θεραπεία καταστολής της ορμόνης TSH (suppressive therapy treatment), οι



επιλογές θεραπείας για τον ATC είναι κυρίως καταπραϋντικές, λόγω της επιθετικής φύσης του. Η θεραπευτική θυρεοειδεκτομή μπορεί να ανακουφίσει τη συμπίεση των αεραγωγών, αλλά είναι συχνά αδύνατη (Pinchot et al. 2008). Ο καρκίνος ATC είναι ανθεκτικός σε ραδιενεργό ιώδιο, ενώ η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία έχουν επιδείξει μειωμένη αποτελεσματικότητα, συμβάλλοντας, έτσι, περιορισμένα στη βελτίωση της επιβίωσης κατά τις τελευταίες δεκαετίες (Are & Shaha, 2006; Spitzweg, 2009). Ως εκ τούτου, υπάρχει συνεχές ενδιαφέρον για νέες αντί-πολλαπλασιαστικές, ανοσολογικές και γονιδιακές θεραπείες (Deshpande et al. 2013).



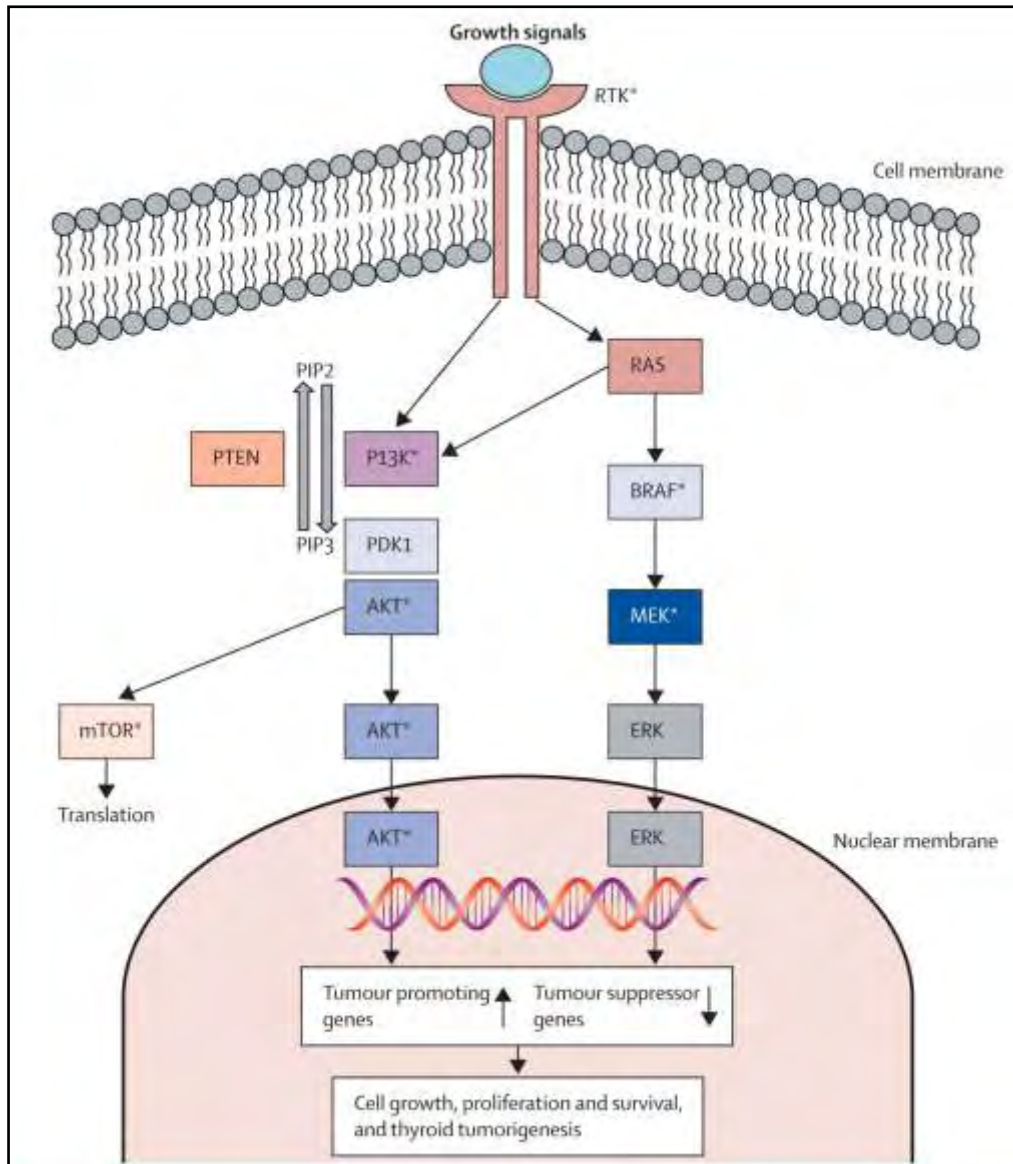
**Εικόνα 8.** Αναπλαστικός (αδιαφοροποίητος) καρκίνος του θυρεοειδούς (Abe et al. 2014).

## 1.3. ΓΟΝΙΔΙΑ RAS

### 1.3.1. Σηματοδοτικό μονοπάτι MAP κινασών

Οι πρωτεΐνες RAS μεταδίδουν μιτογόνα σήματα από τους μεμβρανικούς υποδοχείς, μέσω ενός καταρράκτη τελεστών, σε μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι τελικά ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση (Miller & Miller, 2011; McCubrey et al. 2012).

Σε φυσιολογικά κύτταρα, ο καταρράκτης σηματοδότησης MAPK αρχίζει με την ενεργοποίηση του υποδοχέα EGFR μέσω της πρόσδεσης σε αυτόν ενός προσδέτη (Εικόνα 9). Έως έντεκα προσδέτες μπορούν να δεσμευτούν στην οικογένεια υποδοχέων ErbB, συμπεριλαμβανομένου και του υποδοχέα EGF (Hynes & Lane, 2005). Η δέσμευση του προσδέτη επάγει το διμερισμό του υποδοχέα με το σχηματισμό ομοδιμερών ή ετεροδιμερών, ο οποίος οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης της τυροσίνης. Στη συνέχεια, τα ενδοκυτταρικά κατάλοιπα κινάσης τυροσίνης αυτοφωσφορυλιώνονται, επάγοντας την ενεργοποίηση πολλαπλών μονοπατιών μεταγωγής σήματος.



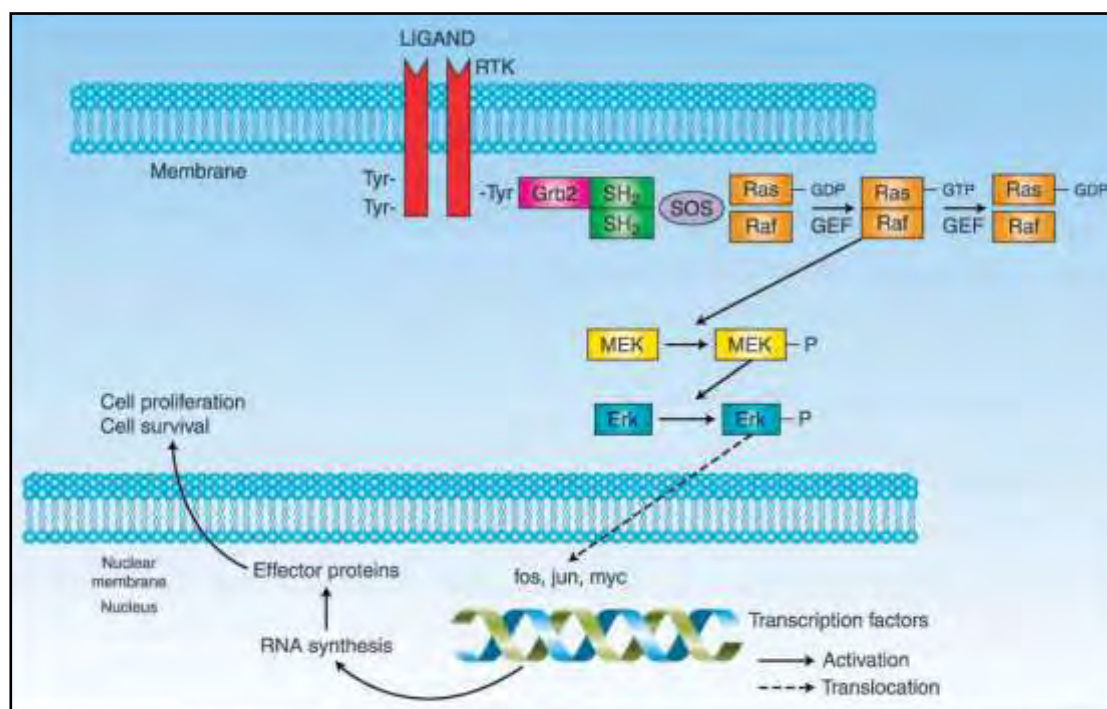
**Εικόνα 9.** Τα σηματοδοτικά μονοπάτια MAPK και PI3 / AKT / mTOR. Σημειώνονται με \* οι γενετικές αλλαγές και θεραπευτικοί στόχοι στον καρκίνο του θυρεοειδούς. (Xing et al. 2013).

Δύο κύρια ενδοκυττάρια μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τον EGFR είναι το μονοπάτι MAPK (mitogen activated protein kinase, MAPK) και το μονοπάτι PI3K/AKT (phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) protein kinase B (AKT)) (Εικόνα 9) (Krasinskas, 2011).

Αυτά τα μονοπάτια οδηγούν στην ενεργοποίηση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι στη συνέχεια πυροδοτούν κυτταρικές αποκρίσεις, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση των κυττάρων (Citri & Yarden, 2006). Η σηματοδότηση μέσω της οδού του EGFR είναι μία πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί αυστηρή ρύθμιση (Citri & Yarden, 2006).

### 1.3.2. Πρωτεΐνες RAS

Τα ομόλογα ογκογονίδια RAS (rat sarcoma viral oncogenes) είναι ζωτικής σημασίας μόρια τελεστές, που συμμετέχουν σε ένα μεγάλο αριθμό σηματοδοτικών μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένων των μονοπατιών MAPK (mitogen activated protein kinase), PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) και RalGEF (Ral guanine nucleotide exchange factor) (Bounacer et al. 2004). Αυτά τα μονοπάτια σηματοδότησης αποτελούν τους κύριους μηχανισμούς του κυττάρου για τον έλεγχο της επιβίωσης, της διαφοροποίησης, του πολλαπλασιασμού και του μεταβολισμού του (Εικόνα 10) (Mendoza et al. 2011). Τα τρία ογκογονίδια RAS, HRAS, KRAS και NRAS, είναι τρία ουσιαστικά μέλη της οικογένειας ογκογονιδίων RAS (Duman et al. 2014), και κωδικοποιούν ομόλογες ισομορφές πρωτεϊνών 21-kDa που βρίσκονται στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και παίζουν κεντρικό ρόλο στη μεταγωγή σημάτων από υποδοχείς κινάσης τυροσίνης και υποδοχείς συζευγμένους με G πρωτεΐνες (Nikiforova et al. 2003b). Και οι τρεις Ras ισομορφές φέρουν σημαντική ομολογία σε αλληλουχίες που είναι υπεύθυνες για τη δέσμευση GDP/ GTP, τη δραστηριότητα GTPάσης και τις αλληλεπιδράσεις με μόρια τελεστές. Παρ' όλα αυτά, γίνεται ολοένα και πιο εμφανές ότι οι πρωτεΐνες Ras διαθέτουν λειτουργίες ειδικές για την κάθε ισομορφή (Omeronic et al. 2007). Αυτές οι λειτουργικές διαφορές πιθανότατα σχετίζονται με την C-τελική υπερμεταβλητή περιοχή (HVR) κάθε ισομορφής, η οποία πιστεύεται ότι ρυθμίζει την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης Ras και μεμβράνης (Henis et al. 2009).



**Εικόνα 10.** Ενεργοποίηση και μεταφορά μηνύματος μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης MARK (Friday & Adjei, 2008).

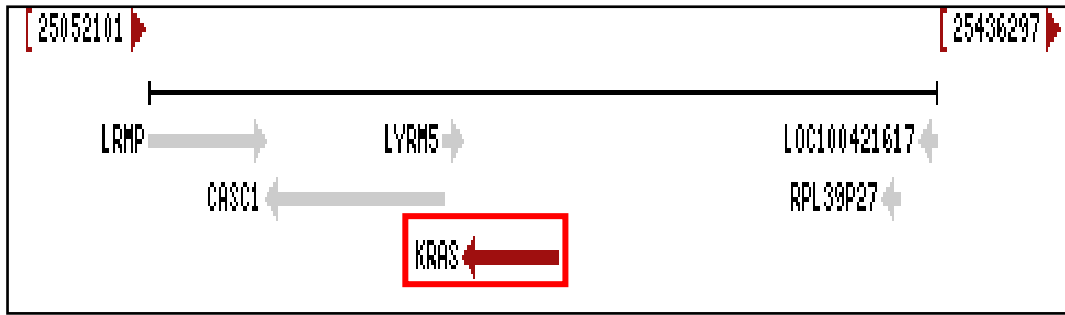


Οι μικρές πρωτεΐνες GTP (GTPases) στην ανενεργή τους κατάσταση είναι δεσμευμένες με GDP, ενώ στην ενεργή κατάσταση έχουν δεσμευμένο GTP. Η δραστικότητα των RAS πρωτεϊνών ρυθμίζεται στενά από την υδρόλυση της ενεργοποιημένης RAS (συνδεδεμένης με GTP) στην απενεργοποιημένη (συνδεδεμένη με GDP) RAS μορφή (Prior et al. 2012). Τα μόρια GEF (guanine nucleotide exchange factor) και GAP (GTPase activating protein) προωθούν την εναλλαγή αυτών των καταστάσεων: ο παράγοντας GEF υποστηρίζει την απελευθέρωση του GDP επιτρέποντας τη δέσμευση του GTP και οδηγώντας σε μετάβαση από την ανενεργή στην ενεργή κατάσταση. Η πρωτεΐνη GAP είναι υπεύθυνη για την αποδέσμευση του GTP και την απενεργοποίηση των μικρών GTPασών πρωτεϊνών (Schulten et al. 2013). Μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12, 13, και 61 των RAS πρωτεϊνών επηρεάζουν τη δραστικότητα GTPάσης με αποτέλεσμα μία ιδιοσυστατικά ενεργοποιημένη κατάσταση (Castellano & Santos, 2011).

Τα δύο πρώτα γονίδια RAS, το HRAS και το KRAS, ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά μετά από μελέτες δύο ιών που προκαλούν καρκίνο (Malumbres & Barbacid, 2003), τον ιό του σαρκώματος Harvey και τον ιό του σαρκώματος Kirsten, από τον Edward M. Scolnick και τους συνεργάτες του στο Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (National Institute of Health, NIH) (Chang et al. 1982). Αυτοί οι ιοί ανακαλύφθηκαν, αρχικά, σε αρουραίους κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1960 από την Jennifer Harvey (Harvey, 1964) και τον Werner Kirsten (Kirsten et al. 1970) αντίστοιχα, και, έτσι, προέκυψε το όνομα Rat σάρκωμα (rat sarcoma, RAS). Στη συνέχεια, ένα τρίτο γονίδιο RAS ανακαλύφθηκε από την ομάδα του Robin Weiss στο Ινστιτούτο Έρευνας για τον Καρκίνο (Marshall et al. 1982; Hall et al. 1983) και την ομάδα του Michael Wigler στο Cold Spring Harbor Laboratory (Shimizu et al. 1983) με το όνομα NRAS, λόγω της αρχικής ταυτοποίησης του σε ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος. Τα τρία ανθρώπινα γονίδια RAS κωδικοποιούν εξαιρετικά ομόλογες πρωτεΐνες, που αποτελούνται από αλυσίδες 188-189 αμινοξέων και ορίζονται ως H-Ras, N-Ras, K-Ras4A και K-Ras4B (οι δύο πρωτεΐνες K-Ras προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα).

### 1.3.2.1. KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)

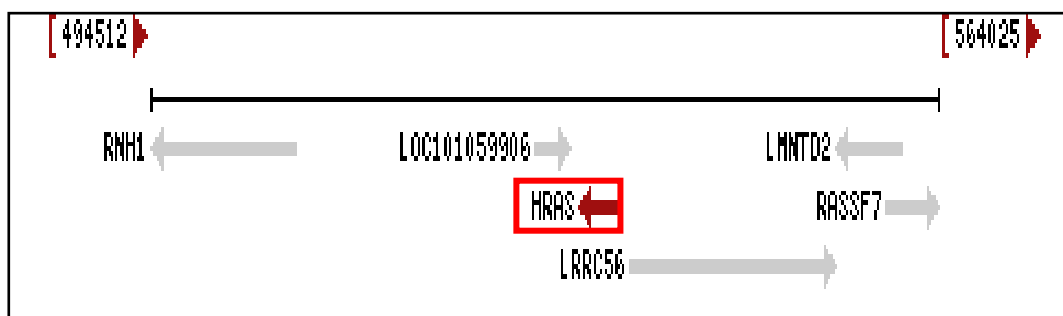
Το γονίδιο KRAS είναι ομόλογο με τα υπόλοιπα γονίδια της οικογένειας RAS των θηλαστικών, και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που είναι μέλος της υπεροικογένειας των μικρών GTPασών πρωτεϊνών. Μια απλή αντικατάσταση αμινοξέος είναι υπεύθυνη για μεταλλάξεις ενεργοποίησης. Η μετασχηματισμένη πρωτεΐνη που προκύπτει εμπλέκεται σε διάφορες κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου του θυρεοειδούς, του καρκίνου του πνεύμονα, του καρκίνου του παγκρέατος και του καρκίνου του παχέος εντέρου. Εναλλακτικό μάτισμα οδηγεί σε παραλλαγές κωδικοποιώντας δύο ισομορφές που διαφέρουν στη C-τελική περιοχή. Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12 στη θέση 12p12.1 και περιέχει έξι εξόνια (Εικόνα 11) (NCBI, 2015, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3845>).



Εικόνα 11. Χρωμοσωμική θέση του γονιδίου KRAS (NCBI, 2015, Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3845>).

### 1.3.2.2. HRAS (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog)

Το γονίδιο HRAS ανήκει στην οικογένεια ογκογονιδίων RAS, τα μέλη της οποίας συνδέονται με τα μετασχηματισμένα γονίδια των ρετροϊών σαρκώματος θηλαστικών. Τα προϊόντα που κωδικοποιούνται από αυτά τα γονίδια λειτουργούν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν να δεσμεύουν GTP και GDP, και έχουν μία εγγενή δραστικότητα GTPάσης. Αυτή η πρωτεΐνη υποβάλλεται σε συνεχή κύκλο απο- και επανα-παλμιτουλίωσης, που ρυθμίζει την ταχεία ανταλλαγή της μεταξύ της πλασματικής μεμβράνης και της συσκευής Golgi. Ακόμη, σημειακές μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο εμπλέκονται σε μία ποικιλία καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου του θυρεοειδούς, του καρκίνου της ουροδόχου κύστης και του καρκίνου του στόματος. Το γονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα έντεκα στη θέση 11p15.5, ενώ έχουν καταμετρηθεί συνολικά επτά εξόνια (Εικόνα 12) (NCBI, 2015, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3265>).



Εικόνα 12. Χρωμοσωμική θέση του γονιδίου HRAS (NCBI, 2015, Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3265>).

### 1.3.3. Μοριακή διάγνωση στον καρκίνο του θυρεοειδούς

#### 1.3.3.1. Γενικά

Τα γονίδια RAS (HRAS, KRAS, και NRAS) είναι πρωτο-ογκογονίδια που είναι συχνά μεταλλαγμένα σε ανθρώπινους καρκίνους. Οι πρωτεΐνες Ras είναι GTPάσες, που λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες στη ρύθμιση μονοπατιών υπεύθυνων για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων (Prior et al. 2012). Η ανώμαλη λειτουργία των πρωτεϊνών Ras συνδέεται με υπερπολλαπλασιαστικές αναπτυξιακές διαταραχές, ενώ σε καρκίνους συνδέεται με μεταλλάξεις κυρίως στα κωδικόνια 12, 13 ή 61 (Quinlan & Settleman, 2009). Μεταλλάξεις σε αυτές τις συντηρημένες θέσεις ευνοούν τη δέσμευση του GTP και, επομένως, τη συνεχή ενεργοποίηση των Ras. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση, από τις πρώτες ημέρες έρευνας των Ras, είναι ότι οι διαφορετικοί τύποι καρκίνου φαίνεται να συσχετίζονται με μεταλλάξεις σε συγκεκριμένες ισομορφές Ras (Bos, 1989).

Η κυτταρολογική εξέταση παρακέντησης με λεπτή βελόνη (fine-needle aspiration cytology, FNAC) είναι η κύρια προεγχειρητική διαγνωστική μέθοδος για ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών βλαβών σε ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του θυρεοειδούς (Baloch & LiVolsi, 2001). Η σωστή διάγνωση δεν επιτυγχάνεται πάντοτε με τη μικροσκοπική παρατήρηση συμβατικών χρωματισμένων επιχρισμάτων κυτταρολογίας και, επομένως, απαιτούνται εναλλακτικά εργαλεία (Gomez Saez, 2010). Συγκεκριμένα, παρά τα οφέλη της κυτταρολογικής εξέτασης με FNA για τη διάγνωση θηλώδους, μυελοειδούς και αναπλαστικού καρκίνου του θυρεοειδούς, δεν είναι το ίδιο χρήσιμη για τον καλοήγη ή κακοήγη προσδιορισμό του θυλακιδώδους καρκίνου του θυρεοειδούς (Grogan et al. 2010). Επίσης, ορισμένα αποτελέσματα της εξέτασης FNA, δεν παρέχουν οριστική διάγνωση για το θηλώδες καρκίνο του θυρεοειδούς. Τις τελευταίες δεκαετίες, έχει διερευνηθεί η διαγνωστική, προγνωστική και θεραπευτική χρησιμότητα ενός αριθμού πρωτεϊνών και τροποποιημένων γονιδίων που εκφράζονται στον καρκίνο του θυρεοειδούς (Guerra et al. 2013; Vitale, 2013a; Vitale, 2013b). Η ιδέα της ταυτοποίησης ενός δείκτη γενετικής μετάλλαξης, που θα διακρίνει τον καλοήγη καρκίνο του θυρεοειδούς από το καρκίνωμα του θυρεοειδούς ή θα διευκρινίσει τη διάγνωση των διαφορετικών τύπων του θυρεοειδούς καρκινώματος, είναι ιδιαίτερα σημαντική (Grogan et al. 2010).

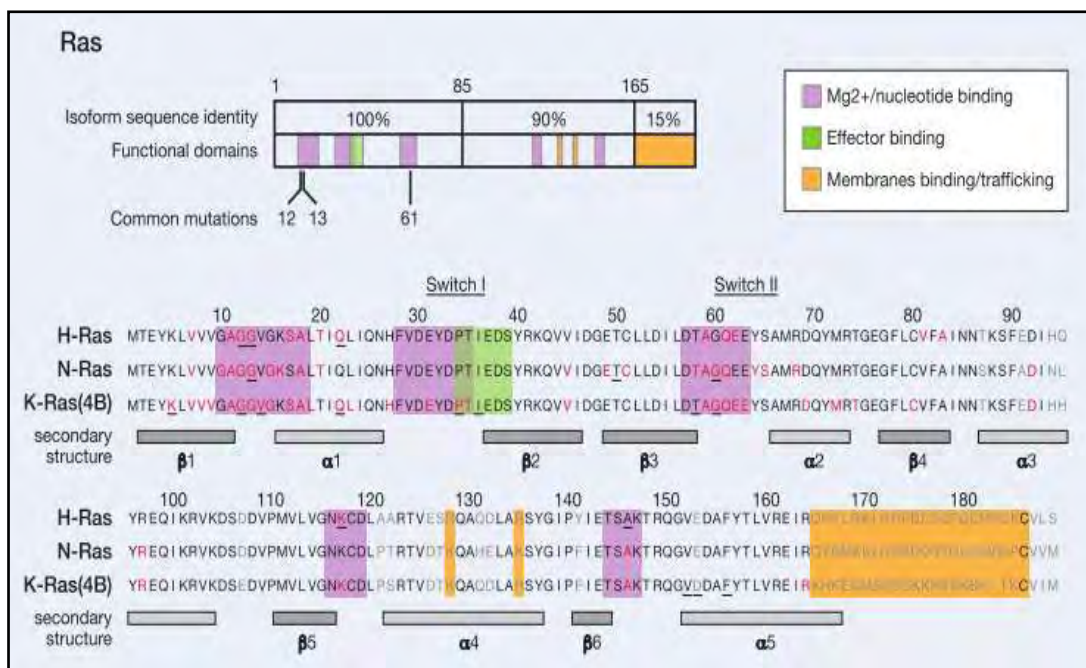
Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο δεκαετιών, έχουν περιγραφεί διάφορες γενετικές μεταλλάξεις στον καρκίνο του θυρεοειδούς, και έχουν χρησιμοποιηθεί στην κλινική πρακτική μοριακοί δείκτες για τη βελτίωση της τεχνικής FNA (Nikiforova & Nikiforov, 2009). Σε διαφοροποιημένους καρκίνους του θυρεοειδούς, μεταλλάξεις στα μέλη του μονοπατιού σηματοδότησης MAPK είναι παρούσες στο 75% των όγκων (Mond et al. 2014). Έτσι, λοιπόν, ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στον καταρράκτη Ras / Raf / MEK / ERK, επειδή μεταλλάξεις ενεργοποίησης των πρωτεϊνών Ras είναι παρούσες σε ένα μεγάλο ποσοστό καρκινωμάτων του θυρεοειδούς, και περίπου στο 1/3 των ανθρώπινων νεοπλασιών γενικότερα (Kimura et al. 2003).

Οι κλασικές γενετικές μεταβολές που παρατηρούνται συχνά στον καρκίνο του θυρεοειδούς περιλαμβάνουν τις σημειακές μεταλλάξεις RAS (Bongarzone & Pierotti, 2003), τις αναδιατάξεις RET / PTC (Tallini, 2002), και τις αναδιατάξεις PAX8-

PPAR $\gamma$  (McIver et al. 2004). Οι μεταλλάξεις RAS, BRAF<sup>V600E</sup> και οι αναδιατάξεις RET / PTC έχουν μελετηθεί ευρέως στα θηλώδη και θυλακιώδη καρκινώματα του θυρεοειδούς (Nikiforov & Nikiforova, 2011). Πολλές σημειακές μεταλλάξεις RAS, που εντοπίζονται ευρέως σε διάφορους καρκίνους, εμφανίζονται κυρίως στους τύπους FTC και PTC του θυρεοειδούς καρκίνου (Vasko et al. 2003; Zhu et al. 2003). Οι RET μεταλλάξεις είναι κυρίως υπεύθυνες για τον καρκίνο MTC (Clayman & el-Baradie, 2003). Πρόσφατα, έχουν ταυτοποιηθεί στο γονίδιο BRAF τόσο σημειακές μεταλλάξεις (Cohen et al. 2003), όσο και γονιδιακές αναδιατάξεις (Ciampi et al. 2005). Έχει αναφερθεί ότι οι μεταλλάξεις του γονιδίου BRAF περιορίζονται στο θηλώδες και στον αναπλαστικό καρκίνο του θυρεοειδούς, αλλά και στα χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα, τα οποία προκύπτουν από τα θηλώδη καρκινώματα (Nikiforova et al. 2003a). Οι μετατοπίσεις PAX8-PPAR $\gamma$  εμφανίζονται κυρίως στο θυλακιώδη καρκίνο του θυρεοειδούς σε ποσοστό έως και 63%, αποτελώντας έναν ικανό μοριακό δείκτη για αυτόν τον τύπο καρκίνου (Kroll et al. 2000). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι γενετικές μεταλλάξεις, που έχουν παρατηρηθεί στον καρκίνο του θυρεοειδούς, είναι αμοιβαία αποκλειόμενες και διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο του θυρεοειδούς καρκινώματος, ακόμη και μεταξύ διαφορετικών παραλλαγών του ίδιου τύπου, επομένως η μελέτη τους κρίνεται αναγκαία.

### 1.3.3.2. Μεταλλάξεις RAS

Σημειακές μεταλλάξεις σε σημαντικές επικράτειες των γονιδίων RAS είναι κοινές σε διαφορετικούς τύπους ανθρώπινων όγκων (Εικόνα 13). Μεταλλάξεις στα γονίδια RAS (η δεύτερη πιο συχνή γενετική μεταβολή μετά τις μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF) σημειώνονται στα καρκινώματα του θυρεοειδούς και σχετίζονται κυρίως με το θυλακιώδη μοτίβο νεοπλασμάτων (Nikiforov & Nikiforova, 2011). Ενώ στους περισσότερους τύπους καρκίνου, κυριαρχούν οι μεταλλάξεις του γονιδίου KRAS στα κωδικόνια 12/13, στον καρκίνο του θυρεοειδούς, οι πιο συχνές σημειακές μεταλλάξεις αφορούν το κωδικόνιο 61 στα γονίδια H-RAS και N-RAS (Nikiforov, 2011), και λιγότερο συχνά τα κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου K-RAS (Handkiewicz-Junak et al. 2010).



**Εικόνα 13.** Ογκογόνοι μεταλλάξεις στις Ras ισομορφές. Οι βασικές μεταλλάξεις βρίσκονται στην περιοχή που είναι πανομοιότυπη μεταξύ των 3 ισομορφών. 44 ξεχωριστές σημειακές μεταλλάξεις έχουν χαρακτηριστεί στις Ras ισομορφές, με το 99,2% του συνόλου αυτών να συμβαίνουν στα κωδικόνια 12, 13 και 61. Τα κατάλοιπα, τα οποία είναι μεταλλαγμένα στον καρκίνο, επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα, αυτά που μεταλλάσσονται σε αναπτυξιακές διαταραχές είναι υπογραμμισμένα, και εκείνα που είναι μεταβλητά μεταξύ των ισομορφών είναι σε γκρι. (Prior et al. 2012).

Οι μεταλλάξεις RAS εμφανίζονται με μεταβλητές συχνότητες σε όλους τους τύπους θυρεοειδών όγκων, που προέρχονται από τα θυλακιώδη κύτταρα. Στο θηλώδες καρκίνο του θυρεοειδούς (PTC), οι μεταλλάξεις RAS εμφανίζονται στο 10% με 20% των όγκων (Karga et al. 1991; Vasko et al. 2004). Τα περισσότερα από τα θηλώδη καρκινώματα, που φέρουν μια μετάλλαξη RAS, αποτελούν τη θυλακιώδη παραλλαγή (FVPTC) (Zhu et al. 2003; Adeniran et al. 2006) με συχνότητα εμφάνισης που ανέρχεται σε ποσοστό 30-45% (Radkay et al. 2014), όπου αντίθετα οι μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF εκπροσωπούνται με μικρότερο ποσοστό (Miccoli, 2014). Μεταλλάξεις RAS εντοπίζονται, επίσης, στο 40-50% του κλασικού θυλακιώδους τύπου (FTC) (Esapa et al. 1999) και στο 20-40% του θυλακιώδους αδενώματος (FTA) (Namba et al. 1990). Επίσης, οι μεταλλάξεις RAS σχετίζονται με την επιθετικότητα του θυρεοειδούς καρκίνου (Nikiforova & Nikiforov, 2008) και, έτσι, έχουν ταυτοποιηθεί στο 20-40% των περιπτώσεων χαμηλής διαφοροποίησης καρκινωμάτων (PDTC), και στο 20-30% των αναπλαστικών καρκινωμάτων (ATC) (Xing, 2013).

Μεγάλο μέρος της αύξησης στη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του θυρεοειδούς, κατά τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες, έχει αποδοθεί στην αύξηση του ποσοστού των όγκων με μεταλλάξεις RAS σε ασθενείς με καρκινώματα του θυρεοειδούς (Jung et al. 2014). Αρκετές μελέτες αναλύουν μια σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις μεταλλάξεις RAS και τη μεταστατική συμπεριφορά των θυλακιοδών και θηλωδών καρκινωμάτων, ιδιαίτερα σε σχέση με μεταστάσεις στα οστά (Manenti et al. 1994;



Garcia-Rostan et al. 2003). Επιπλέον, οι μεταλλάξεις RAS συχνά βρίσκονται σε ενθυλακωμένους τύπους της θυλακιώδους παραλλαγής του θηλώδους καρκίνου (Liu et al. 2006). Επομένως, είναι πιθανόν ότι οι μεταλλάξεις RAS σηματοδοτούν ένα σημαντικό δείκτη των καλά διαφοροποιημένων καρκίνων του θυρεοειδούς, οι οποίοι είναι επιρρεπείς σε μεταστατική εξάπλωση και αποδιαφοροποίηση. Ωστόσο, αυτή η μετάλλαξη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης σε όλους τους τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς. Η σημασία της ανίχνευσης μεταλλάξεων RAS έγκειται στο γεγονός ότι αποτελούν ένα δείκτη της θυλακιώδους παραλλαγής του θηλώδους καρκινώματος, που είναι δύσκολο να ταυτοποιηθεί, ειδικά μετά από την κυτταρολογική εξέταση FNA (Nikiforov, 2011).

Έχει αναφερθεί μία προηγούμενη μελέτη μεταλλάξεων στα γονίδια KRAS και BRAF στα PTC και MTC καρκινώματα στον ελληνικό πληθυσμό (Goutas et al. 2008). Σκοπός της μελέτης ήταν η ανάλυση 55 θηλωδών (PTC) και 44 μυελοειδών καρκινωμάτων του θυρεοειδούς (MTC), για μεταλλάξεις στα γονίδια KRAS (κωδικόνιο 12) και BRAF (κωδικόνιο 600). Μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του KRAS βρέθηκαν στο 54.5% των περιπτώσεων PTC και στο 40.9% των περιπτώσεων MTC, που εξετάστηκαν. Τα ευρήματα για τα θηλώδη καρκινώματα ήταν σε συμφωνία με αρκετές μελέτες, που διεξήχθησαν στη Βόρεια Αμερική και άλλους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς, αλλά διέφεραν από τα αποτελέσματα μιας ιταλικής μελέτης. Όσον αφορά τα MTC καρκινώματα, σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες, βρέθηκε μια υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του KRAS. Περιορισμένα δεδομένα είναι γνωστά σχετικά με το MTC, αλλά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το KRAS θα μπορούσε να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση του MTC.

### 1.3.3.3. Μεταλλάξεις BRAF

Η πρωτεΐνη BRAF είναι μία κινάση σερίνης-θρεονίνης που ανήκει στην οικογένεια των RAF πρωτεϊνών, οι οποίες είναι ενδοκυτταρικοί τελεστές του καταρράκτη σηματοδότησης MAPK. Η ενεργοποίηση της πυροδοτείται από την πρόσδεση της ενεργοποιημένης RAS και τη στρατολόγησή της στην κυτταρική μεμβράνη, και οδηγεί στη φωσφορύλιωση και ενεργοποίηση των στόχων της στο μονοπάτι MAPK (Nikiforov, 2011).

Σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF είναι οι πιο κοινές γενετικές μεταβολές που προκύπτουν στο θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς, έχοντας βρεθεί σε ποσοστό 40% έως 45% σε αυτούς τους όγκους (Cohen et al. 2003; Kimura et al. 2003). Οι περισσότερες μεταλλάξεις στον καρκίνο του θυρεοειδούς είναι σημειακές μεταλλάξεις, οι οποίες περιλαμβάνουν το νουκλεοτίδιο 1799 και έχουν ως αποτέλεσμα την υποκατάσταση της βαλίνης από το γλουταμινικό οξύ στο κατάλοιπο 600 (V600E) (Ciampi & Nikiforov, 2005; Xing, 2005). Συγκεκριμένα, οι περισσότερες μεταλλάξεις στη θέση 1799 και άρα στο κωδικόνιο 600 (V600E) είναι μια μεταστροφή T → A (T1799A) (Mitsiades et al. 2007). Αυτή η μετάλλαξη οδηγεί σε συνεχή ενεργοποίηση της κινάσης BRAF και σε χρόνια διέγερση του μονοπατιού MAPK, και, επομένως, αποτελεί ογκογόνο για τα θυρεοειδή κύτταρα (Wan et al.

2004; Knauf et al. 2005). Στο 1-2% των θηλωδών καρκινωμάτων, μπορούν να βρεθούν και άλλες μεταλλάξεις BRAF, συμπεριλαμβανομένων της σημειακής μετάλλαξης K601E και των ενθέσεων ή ελλειμμάτων, που περιβάλλουν το κωδικόνιο 600 (Hou et al. 2007; Chiosea et al. 2009), καθώς και την αναδιάταξη AKAP9 /BRAF (Ciampi et al. 2005), η οποία είναι πιο συχνή στα θηλώδη καρκινώματα που συνδέονται με την έκθεση σε ακτινοβολία. Η μετάλλαξη BRAF K601E έχει αναφερθεί και σε μεμονωμένες περιπτώσεις θυλακιώδους αδενώματος (Soares et al. 2003).

Η μετάλλαξη BRAF<sup>V600E</sup> βρίσκεται συνήθως στα θηλώδη καρκινώματα με κλασική ιστολογία (60%), ενώ είναι σπάνια στη θυλακιώδη παραλλαγή του θηλώδους καρκινώματος (10%) (Adeniran et al. 2006). Εκτός από τα θηλώδη καρκινώματα, η μετάλλαξη BRAF<sup>V600E</sup> βρίσκεται, επίσης, στα χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα και στα αναπλαστικά καρκινώματα του θυρεοειδούς καρκίνου (Nikiforova et al. 2003a; Begum et al. 2004). Η μετάλλαξη BRAF<sup>V600E</sup> δεν έχει βρεθεί σε θυλακιώδη καρκινώματα και καλοήθεις όζους του θυρεοειδούς, και ως εκ τούτου η μετάλλαξη αυτή δεν αποτελεί έναν αρκετά ειδικό δείκτη για το θηλώδες καρκίνο και τους υποτύπους του (Xing, 2005). Τέλος, η μετάλλαξη BRAF<sup>V600E</sup> μπορεί να χρησιμεύσει ως ένας προγνωστικός δείκτης για το θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς (Nikiforov, 2011).

Περιορισμένα δεδομένα είναι διαθέσιμα για τη μελέτη μεταλλάξεων BRAF<sup>V600E</sup> σε θυρεοειδή καρκινώματα στον ελληνικό πληθυσμό. Μία προηγούμενη μελέτη μεταλλάξεων στα γονίδια KRAS (κωδικόνιο 12) και BRAF (κωδικόνιο 600) σε 55 PTC και 44 MTC καρκινώματα στον ελληνικό πληθυσμό (Goutas et al. 2008). Η μετάλλαξη BRAF<sup>V600E</sup> ανιχνεύθηκε στο 27.3% και στο 68.2% των PTC και MTC καρκινωμάτων, αντίστοιχα. Όσον αφορά τις περιπτώσεις PTC, τα δεδομένα επιβεβαιώνουν προηγούμενα ευρήματα και παρέχουν σημαντικά στοιχεία για τον ηγετικό ρόλο του γονιδίου BRAF στην παθογένεση του PTC. Ωστόσο, τα αποτελέσματα βρίσκονται σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες, οι οποίες δεν βρίσκουν καμία μετάλλαξη BRAF<sup>V600E</sup> στο MTC.

#### 1.3.3.4. Αναδιατάξεις RET/PTC

Το πρωτο-ογκογονίδιο RET (REarrangement after Transfection) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10, αποτελείται από 21 εξόνια και κωδικοποιεί ένα μεμβρανικό υποδοχέα κινάσης τυροσίνης, που σχετίζεται με την ανάπτυξη και διαφοροποίηση του νευρικού ιστού που προέρχεται από την ακρολοφία (Yamazaki et al. 2014). Το γονίδιο RET εκφράζεται στα παραθυλακιώδη κύτταρα ή C cells του θυρεοειδούς, αλλά όχι στα θυλακιώδη κύτταρα, όπου μπορεί να ενεργοποιηθεί με μία χρωμοσωμική αναδιάταξη, γνωστή ως αναδιατάξη RET / PTC (RET/PTC rearrangements) (Grieco et al. 1990), στην οποία το τμήμα του γονιδίου RET, που κωδικοποιεί την επικράτεια της κινάσης τυροσίνης, συντήκεται με διάφορα μη συγγενικά γονίδια. Έχουν αναφερθεί έντεκα τύποι αναδιατάξεων RET/PTC, οι οποίες σχηματίζονται από τη συγχώνευση του RET με διαφορετικό γονίδιο (Tallini & Asa, 2001; Nikiforov, 2002). Οι δύο συνηθέστεροι τύποι αναδιατάξεων, οι RET / PTC1

και RET / PTC3, αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό αναδιατάξεων που έχουν βρεθεί στον καρκίνο του θυρεοειδούς. Το RET / PTC1 σχηματίζεται μετά από σύντηξη με το CCDC6 (H4) γονίδιο, ενώ το RET / PTC3 μετά από σύντηξη με το NCOA4 (ELE1) γονίδιο (Santoro et al. 1994). Όλες οι συντήξεις περιέχουν την άθικτη επικράτεια της κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα RET, η οποία επιτρέπει στην πρωτεΐνη RET / PTC την ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης MAPK (Jhiang et al. 1996; Santoro et al. 1996; Powell Jr et al. 1998).

Μολονότι, αναδιατάξεις RET / PTC έχουν ανιχνευθεί σε ορισμένα αδενώματα και άλλες καλοήθεις βλάβες του θυρεοειδούς (Nikiforov, 2002), οι RET / PTC είναι ιδιαίτερα ειδικές για τα θηλώδη καρκινώματα του θυρεοειδούς. Ωστόσο, η συσχέτιση μεταξύ των αναδιατάξεων RET / PTC και της πρόγνωσης σε ανθρώπινα θηλώδη καρκινώματα παραμένει ασαφής. Επίσης, οι μεταλλάξεις του γονιδίου προσδιορίζονται σε περισσότερες από 90% περιπτώσεις οικογενούς μυελοειδούς καρκίνου του θυρεοειδούς (FMTC) (Wiench et al. 2001; Wells Jr et al. 2013). Σε δείγματα FNA, η ανίχνευση RET / PTC μπορεί να βελτιώσει την προεγχειρητική διάγνωση των όζων, ιδιαίτερα σε δείγματα απροσδιόριστης ιστολογίας ή ανεπαρκούς ποσότητας κυττάρων για κυτταρολογική εξέταση (Cheung et al. 2001; Pizzolanti et al. 2007). Τέλος, έχει αναφερθεί πρόσφατα μια νέα μετάλλαξη του κωδικονίου 666 στο εξόνιο 11 του γονιδίου RET, που εντοπίστηκε σε ασθενείς με MTC (Yamazaki et al. 2014).

### 1.3.3.5. Αναδιατάξεις PAX8/PPAR $\gamma$

Η αναδιάταξη PAX8/PPAR $\gamma$  (PAX8/PPAR $\gamma$  rearrangements) είναι αποτέλεσμα της μετάθεσης t(2;3)(q13;p25), που οδηγεί στη σύντηξη ανάμεσα στο γονίδιο PAX8, το οποίο κωδικοποιεί μια επικράτεια μεταγραφικού παράγοντα, και στο γονίδιο του υποδοχέα υπεροξισώματος PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor) (Kroll et al. 2000). Η αναδιάταξη οδηγεί στην υπερέκφραση της PPAR $\gamma$  πρωτεΐνης (Nikiforova et al. 2002). Αυτές οι αναδιατάξεις έχουν βρεθεί στο 30 με 40% του κλασικού τύπου του θυλακιώδους καρκίνου και σε χαμηλότερη συχνότητα σε ογκοκυτταρικά καρκινώματα (French et al. 2003; Nikiforova et al. 2003b). Αυτή η αναδιάταξη εντοπίζεται, επίσης, στο θυλακιώδη υπότυπο του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς με συχνότητα έως και 38% (Castro et al. 2006). Παρ' όλα αυτά, έχει αναφερθεί ότι στους περισσότερους πληθυσμούς, η συχνότητα του PAX8 / PPAR $\gamma$  σε αυτόν τον τύπο καρκίνου είναι πολύ χαμηλότερη, της τάξεως του 5% (Dwight et al. 2003). Σε άλλη έρευνα αναφέρεται ότι η σύντηξη PAX8 / PPAR $\gamma$  έχει ανιχνευθεί στο 63% των θυλακιωδών καρκινωμάτων, αλλά όχι σε θυλακιώδη αδενώματα ή θηλώδη καρκινώματα, προτείνοντας ότι μπορεί να αντιπροσωπεύσει έναν ειδικό μοριακό δείκτη για τα θυλακιώδη καρκινώματα (Kroll et al. 2000). Η χρωμοσωμική αναδιάταξη είναι ο πιθανότερος μηχανισμός για την ενεργοποίηση της PPAR $\gamma$  πρωτεΐνης σε θυρεοειδείς όγκους, καθώς δεν έχουν βρεθεί σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο PPAR $\gamma$  σε θυρεοειδή καρκινώματα ή κυτταρικές σειρές (Martelli et al. 2002).

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

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

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Υλικά

#### 2.1.1. Δείγματα

Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 33 ασθενείς που διαγνώστηκαν με καρκίνο του θυρεοειδούς. Τα δείγματα προήλθαν από το Παθολογοανατομικό Τμήμα του Στρατιωτικού Νοσοκομείου ΝΙΜΙΤΣ, στην Αθήνα.

Όλοι οι ασθενείς υπέγραψαν ένα έντυπο συγκατάθεσης, σύμφωνα με το οποίο ενέκριναν τη συλλογή δειγμάτων για τη χρησιμοποίησή τους σε γενετικές αναλύσεις και τη διεξαγωγή κλινικών πειραμάτων.

Τα δείγματα είναι βιοψίες ιστού και περιλαμβάνουν διαφορετικούς τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς με συχνότητες, οι οποίες είναι αντιπροσωπευτικές των συχνοτήτων εμφάνισής τους στο γενικό πληθυσμό (Πίνακας 3). Οι τύποι των ιστών με καρκίνο του θυρεοειδούς που εξετάστηκαν ήταν οι ακόλουθοι: 11 ιστοί με θηλώδες καρκίνωμα (papillary thyroid carcinoma, PTC), 13 ιστοί με θηλώδες καρκίνωμα θυλακιδώδους προτύπου ανάπτυξης (follicular variant of papillary thyroid carcinoma, FVPTC), 7 ιστοί με θυλακιδώδες καρκίνωμα (follicular thyroid carcinoma, FTC), και 2 ιστοί με μυελοειδές καρκίνωμα (medullary thyroid carcinoma, MTC). Οι όγκοι ταξινομήθηκαν σύμφωνα με ευρέως αποδεκτά ιστολογικά κριτήρια. Συγκεκριμένα, η κατάταξη των ιστών με καρκίνο του θυρεοειδούς προσδιορίστηκε με βάση την ιστοπαθολογία τους και την κυτταρολογική εξέτασή τους από εξειδικευμένο ιστοπαθολόγο, σύμφωνα με την ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO) (Hendinger et al. 1989).

**Πίνακας 3.** Τύποι καρκίνου του θυρεοειδούς και η συχνότητά τους στην παρούσα μελέτη και στο γενικό πληθυσμό (Albores-Saavedra et al. 2007).

Τύπου καρκίνου του θυρεοειδούς	Αριθμός Δειγμάτων	Συχνότητα στην παρούσα μελέτη (%)	Συχνότητα στον πληθυσμό (%)
Θηλώδες Καρκίνωμα	11	33	
Θηλώδες Καρκίνωμα Θυλακιδώδους Διαμόρφωσης	13	39	75
Θυλακιδώδες Καρκίνωμα	7	21	16
Μυελοειδές Καρκίνωμα	2	6	5

Τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών και τα κλινοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων τους καταγράφηκαν. Οι ασθενείς, των οποίων βιοψίες ιστού χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, ήταν ηλικίας 26 έως 83 ετών (μέσος όρος  $\pm$  SD,  $51.57 \pm 13.64$ ). Ειδικότερα, όσον αφορά το φύλο και την ηλικία των ασθενών με τους διαφορετικούς τύπους καρκινωμάτων, καταγράφηκαν τα ακόλουθα δεδομένα: 11 PTC (10 θήλεα και 1 άρρεν, μέση ηλικία  $47.63 \pm 12.14$  χρόνια), 13 PTCFV (10 θήλεα και 3 άρρενες, μέση ηλικία  $53.84 \pm 10.59$ ), 7 FTC (4 θήλεα και 3 άρρενες, μέση ηλικία  $52.28 \pm 17.63$ ) και 2 δείγματα MTC (2 θήλεα και 0 άρρενες, μέση ηλικία  $56 \pm 1.41$  χρόνια) (Πίνακας 4).

Σε όλες τις περιπτώσεις, ήταν διαθέσιμες βιοψίες ιστών από δείγματα θυρεοειδεκτομής ασθενών με καρκίνο του θυρεοειδούς σταθεροποιημένες με φορμαλίνη και εγκλεισμένες σε παραφίνη (Formalin – Fixed Paraffin Empted, FFPE).

**Πίνακας 4.** Δημογραφικά στοιχεία των δειγμάτων ανάλογα με τον τύπο καρκίνου του θυρεοειδούς.

Τύπος καρκίνου	Αριθμός Δειγμάτων	Φύλο		Ηλικία
		ΘΗΛΥ	ΑΡΡΕΝ	
Θηλώδες καρκίνωμα	11	10	1	$47.63 \pm 12.14$
Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδες πρότυπο ανάπτυξης	13	10	3	$53.84 \pm 10.59$
Θυλακιώδες καρκίνωμα	7	4	3	$52.28 \pm 17.63$
Μυελοειδές καρκίνωμα	2	2	0	$56.00 \pm 1.41$
<b>Σύνολο</b>	<b>33</b>	<b>26</b>	<b>7</b>	<b>51.57 13.64</b>

### 3.1.2. Χημικά αντιδραστήρια

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

- **Sigma-Aldrich**  
 Αιθανόλη ( $\geq 99.8\%$ , αριθμός καταλόγου 32221)  
 Ευλένιο (αριθμός καταλόγου 33817)
- **AppliChem Paureac ITW Companies**  
 Αγαρόζη (Agarose Low EEO – Agarose standard, αριθμός καταλόγου A2114)  
 Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml - αριθμός καταλόγου A1152)

- **NEW ENGLAND Biolabs® inc**  
Low Molecular DNA Ladder (αριθμός καταλόγου N3233S)
- **Kapa Biosystems**  
Πολυμεράση Kapa Taq (5U/μl) (αριθμός καταλόγου KE1000)  
Ρυθμιστικό διάλυμα Πολυμεράσης (10X Taq Buffer A, 1.5mM Mg στο 1X)  
(αριθμός καταλόγου KB1003)
- **QIAGEN**  
QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (αριθμός καταλόγου 56404)
- **MACHEREY-NAGEL**  
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (αριθμός καταλόγου REF 740609.250)

## 2.2. Μέθοδοι

### 2.2.1. Απομόνωση DNA από βιοψίες ιστών

#### 2.2.1.1. Αντιδραστήρια – Διαλύματα

Όλα τα αντιδραστήρια και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση DNA από βιοψίες ιστού παρατίθενται ακολούθως:

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

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

- Διάλυμα Πρωτεΐνωσης K (20mg/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 2ml

Τα διαλύματα AW1 και AW2 παρασκευάστηκαν ως εξής:

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

### 2.2.1.2. Πρωτόκολλο απομόνωσης

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από βιοψίες ιστού εγκλεισμένες σε παραφίνη, χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη διαδικασία. Αρχικά, χρησιμοποιώντας ένα αποστειρωμένο χειρουργικό νυστέρι, απομακρύνθηκε η περίσσεια παραφίνης από το κάθε δείγμα. Η απομόνωση DNA έγινε μετά από τεμαχισμό μίας έως και δύο τομών ιστού (ανάλογα με την ποσότητα ιστού σε κάθε τομή) πάχους 5-10μm. Τα τεμαχισμένα αυτά τμήματα του ιστού τοποθετήθηκαν σε σωλήνα erpendorf του 1.5ml (microcentrifuge tube), και ακολούθησε προσθήκη 1ml ξυλένιου και έντονη ανακίνηση με τη χρήση vortex για 10 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση (**Thermo ELECTRON CORPORATION, HERAEUS PICO17 Centrifuge**) σε πλήρη ταχύτητα (16.600 x g) για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η παραφίνη διαλύεται στο ξυλένιο και, έτσι, μπορεί να απομακρυνθεί από τον ιστό του δείγματος. Μετά τη φυγοκέντρηση, αφαιρέθηκε πολύ προσεκτικά το υπερκείμενο με πιπέτα χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα.

Στο ίζημα προστέθηκε 1ml αιθανόλης ( $\geq 99.8\%$ ), για την απομάκρυνση του εναπομείναντος ξυλένιου από τα δείγματα. Μετά από έντονη ανάδευση (με τη χρήση του vortex) για 10 δευτερόλεπτα, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε πλήρη ταχύτητα (16.600 x g) για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε η απομάκρυνση του υπερκειμένου, και το κάθε δείγμα (ίζημα) επώαστηκε (με ανοικτό καπάκι) σε επωαστικό κλίβανο 37° C για χρονικό διάστημα 10-30 λεπτών μέχρι να εξατμιστούν πλήρως τα υπολείμματα αιθανόλης.

Στη συνέχεια, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 180μl κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (buffer ATL) και, μετά από προσθήκη 20μl πρωτεΐνης K (20mg/ml), πραγματοποιήθηκε ισχυρή ανάδευση του δείγματος με vortex για 10 δευτερόλεπτα. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στους 56° C σε ένα θερμικό περιστρεφόμενο επωαστήρα για τουλάχιστον 2 ½ ώρες ή για περισσότερο χρονικό διάστημα, μέχρι να επέλθει η πλήρης λύση του κάθε δείγματος υπό συνθήκες μετουσίωσης με πρωτεΐνη K. Συγκεκριμένα, αρκετά δείγματα παρέμειναν στο στάδιο της επώασης στους 56° C καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight, 24ώρη), ενώ για ορισμένα από αυτά χρειάστηκε η επιπλέον προσθήκη 10 έως 20μl πρωτεΐνης K, εφόσον το δείγμα δεν είχε λυθεί πλήρως μετά από μια overnight (24ώρη) επώαση στους 56° C. Μετά από την πλήρη λύση, τα δείγματα επώασθηκαν στους 90° C σε μπλοκ θέρμανσης (heating block) για 1 ώρα. Η επώαση αυτή αποσκοπεί στην αντιστροφή της εγκάρσιας σύνδεσης φορμόλης.

Μετά από μία σύντομη φυγοκέντρηση, για τη συλλογή όλων των σταγόνων του δείγματος στον πάτο του σωλήνα των 1.5ml, έγινε προσθήκη 200μl ρυθμιστικού διαλύματος AL (Buffer AL) και 200 μl αιθανόλης ( $\geq 99.8\%$ ). Ακολούθησε καλή ανάμιξη του δείγματος με τη χρήση vortex, μετά από την προσθήκη τόσο του ρυθμιστικού διαλύματος AL, όσο και της αιθανόλης, αντίστοιχα. Μετά από μία σύντομη φυγοκέντρηση, όλο το δείγμα μεταφέρθηκε προσεκτικά στην ειδική στήλη QIAamp MinElute, η οποία εισάγεται σε ειδικό σωλήνα συλλογής των 2ml (collection tube). Η φυγοκέντρηση της ειδικής στήλης, σε ταχύτητα 6,000 x g για 1 λεπτό, οδήγησε στη δέσμευση του DNA στη μεμβράνη της στήλης, ενώ οι προσμίξεις περνάνε μέσω της μεμβράνης και απομακρύνονται, καθώς συλλέγονται στο σωλήνα συλλογής. Μετά τη φυγοκέντρηση, η στήλη QIAamp MinElute μεταφέρθηκε σε νέο 2ml σωλήνα διαλογής.



Ακολούθησε ο καθαρισμός του DNA, που είχε δεσμευθεί στη μεμβράνη, μέσω προσθήκης στη στήλη 500μl από τα ρυθμιστικά διαλύματα πλύσης AW1\* και AW2\* (Buffer AW1 και Buffer AW2), και, κατόπιν, φυγοκέντρωσης σε ταχύτητα 6,000 x g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφοράς της στήλης σε νέο σωλήνα συλλογής. Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία της πλύσης του DNA, η στήλη υπέστη νέα φυγοκέντρωση σε πλήρη ταχύτητα (16,600 x g) για 3 λεπτά, ώστε να στεγνώσει πλήρως η μεμβράνη της στήλης. Αυτό το βήμα είναι απαραίτητο, για την πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης από το έκλουσμα.

Στη συνέχεια, η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα eppendorf του 1.5ml (microcentrifuge tube), και ακολούθησε το τελικό στάδιο έκλουσης του DNA, κατά το οποίο 15-25μl (ανάλογα με την ποσότητα του ιστού του κάθε δείγματος) ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης ATE (Buffer ATE) προστέθηκαν στο κέντρο της μεμβράνης και η στήλη επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (15-25° C). Η επώαση αυτή αποτελεί ένα σημαντικό βήμα, καθώς αυξάνει την απόδοση της έκλουσης του DNA. Τέλος, μετά από φυγοκέντρωση ενός λεπτού σε πλήρη ταχύτητα (16,600 x g) πραγματοποιείται η έκλουση του DNA από τη στήλη. Το γενωμικό DNA αποθηκεύεται σε ψυγείο στους -20° C μέχρι τη μελλοντική χρήση.

## **2.2.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης**

### **2.2.2.1. Αντιδραστήρια – Διαλύματα**

Τα διαλύματα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης ήταν τα εξής:

- TAE 50X (stock): Tris-base (242gr), οξικό οξύ (57.1ml), EDTA (18.6gr), ddH<sub>2</sub>O μέχρι 1L. pH: 8.
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr): Υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 10mg/ml, αριθμός καταλόγου A1152.
- Χρωστική φόρτωσης διαλύματος (Loading Buffer, 6X): 0.25% Μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromofenol blue) (25mg), 30% w/v Γλυκερόλη (3ml), ddH<sub>2</sub>O (7ml). Συνολικός όγκος: 10ml.
- Αγαρόζη: (Agarose Low EEO - Agarose standard, 500gr, αριθμός καταλόγου A2114).
- Μάρτυρας Low Molecular DNA Ladder (500ug/ml, αριθμός καταλόγου N3233S).

Το πήκτωμα αγαρόζης παρασκευάστηκε με τη χρήση αγαρόζης, βρωμιούχου αιθιδίου και διαλύματος TAE 1X:

- TAE 1X: 20ml TAE 50X, 980 ml ddH<sub>2</sub>O μέχρι 1L.

### 2.2.2.2. Διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης

#### *Αρχή της μεθόδου*

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική, σχετικά γρήγορη και απλή. Χρησιμοποιείται ιδιαίτερα για την ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων, για τον έλεγχο της καθαρότητας και της απομόνωσης των βιομορίων, όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα, καθώς και πεπτιδίων, αμινοξέων, σακχάρων, ενζύμων, ισοενζύμων. Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια μέθοδο διαχωρισμού, κατά την οποία φορτισμένα μόρια (π.χ. πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα) μετακινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου στο εσωτερικό πηκτωμάτων ή διαλυμάτων. Διαφορετικά μόρια κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες και τα συστατικά ενός μείγματος διαχωρίζονται όταν βρεθούν μέσα σε κατάλληλο ηλεκτρικό πεδίο (Watson et al. 2007).

Πολλά βιομόρια περιέχουν ομάδες, που μπορούν να ιονισθούν, και, έτσι, σε υδατικά διαλύματα βρίσκονται ως κατιόντα ή ανιόντα ανάλογα με το καθαρό τους φορτίο. Όταν τα βιομόρια αυτά βρεθούν σε ένα ηλεκτρικό πεδίο θα μετακινηθούν προς τον θετικό ή αρνητικό πόλο με μια ταχύτητα, η οποία εξαρτάται από το φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα του μορίου, την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου και τη θερμοκρασία.

Παράγοντες που επηρεάζουν την πορεία της ηλεκτροφόρησης είναι το pH και η ιοντική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος, η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου και η θερμοκρασία (και κυρίως το μέγεθος των πόρων στα πηκτώματα αγαρόζης και πολυακρυλαμίδιου) (Lee et al. 2012).

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης έχει πολλά πλεονεκτήματα. Η αγαρόζη είναι ένας ουδέτερος, καθαρός πολυσακχαρίτης και χρησιμεύει για το διαχωρισμό σχεδόν όλων των βιολογικών μακρομορίων, με συγκεκριμένο ηλεκτρικό φορτίο (Borst, 2005).

Η αγαρόζη εξάγεται με τη μορφή του άγαρ από διάφορα είδη κόκκινων θαλάσσιων φυκών, που βρίσκονται στην Καλιφόρνια και την ανατολική Ασία. Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές, που αποτελείται από την επανάληψη των μονομερών μονάδων αγαροβιόζης. Η αγαροβιόζη είναι ένας δισακχαρίτης που αποτελείται από D-γαλακτόζη και 3,6-ανυδρο-L-γαλακτοπυρανόζη. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης αποτελεί μια πολύ συχνή μέθοδος ποιοτικής (αλλά και ποσοτικής) ανάλυσης του DNA, όπου γραμμικά μόρια DNA κινούνται προς την άνοδο (λόγω των αρνητικών φορτίων των φωσφορικών ομάδων του μορίου) με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το βάρος τους (Watson et al. 2007).

Ο ρυθμός της κινητικότητας του DNA εξαρτάται από τη στερεοδιάταξή του, αλλά και από τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Όταν ένα μόριο είναι κυκλικό (π.χ. πλασμίδιο), τότε εκτός από το βάρος του παίζει ρόλο και η διαμόρφωσή του. Κάτω από τυπικές συνθήκες (πλασμίδιο 3.000-10.000bp – αγαρόζη 1%), η υπερελικωμένη μορφή κινείται ταχύτερα από τη χαλαρή, γιατί είναι πιο συμπίεσμένη και περνά πιο εύκολα μέσα από τα κενά του πολυμερούς. Σε υψηλότερα ποσοστά αγαρόζης (2%), συμβαίνει το αντίθετο, γιατί τα κενά είναι πολύ μικρότερα και η χαλαρή μορφή ως πιο ευέλικτη μπορεί να κινηθεί ταχύτερα. Τα περισσότερα πηκτώματα αγαρόζης έχουν συγκεντρώσεις μεταξύ 0.7% και 2% και έτσι μπορεί να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός ενός μεγάλου εύρους τμημάτων DNA (Lee et al. 2012).

### **Πειραματική Διαδικασία**

Η διαδικασία δημιουργίας ενός πηκτώματος αγαρόζης, με ποσοστιαία περιεκτικότητα 1% σε αγαρόζη ήταν η εξής: αρχικά, ζυγίστηκαν 0.6gr αγαρόζης και μεταφέρθηκαν σε μία κωνική φιάλη, στην οποία προστέθηκαν 60ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1X. Η αγαρόζη διαλύεται σε φούρνο μικροκυμάτων και παραμένει υγρή σε θερμοκρασία έως 40° C. Στο μείγμα αφήνεται να κρυώσει υπό τρεχούμενο νερό βρύσης, και ακολουθεί προσθήκη 1.8ml από διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 10mg/ml (ώστε η τελική συγκέντρωση του EtBr να είναι 0.5μg/ml). Το διάλυμα μετά από καλή ανάμιξη μεταφέρθηκε σε ειδικό καλούπι ώστε να αποκτήσει το κατάλληλο σχήμα, μέχρι η αγαρόζη να πολυμεριστεί και να πήξει. Πριν, όμως, πολυμεριστεί η αγαρόζη, τοποθετούνται στο διάλυμα ειδικά χτενάκια, τα οποία οδηγούν στο σχηματισμό των λεγόμενων «wells» ή αλλιώς «πηγαδάκια», στα οποία και φορτώνονται τα προς εξέταση δείγματα. Μετά την πήξη του πηκτώματος, αφαιρέθηκαν τα χτενάκια και το πήκτωμα τοποθετήθηκε στην ειδική συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, η οποία ήταν γεμάτη με διάλυμα TAE 1X.

Πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων στο πήκτωμα, είναι απαραίτητη η ανάμιξή τους με μια χρωστική-διάλυμα φόρτωσης ή Loading Buffer. Επειδή η χρωστική φόρτωσης είναι ορατή στο φυσικό φως (λόγω της παρουσίας του μπλε της βρωμοφαινόλης), βοηθά στην αναγνώριση της θέσης φόρτωσης του δείγματος, αλλά και επειδή μετακινείται μαζί με το DNA ορισμένου μεγέθους, ανάλογα με τη χρωστική, χρησιμεύει στην αξιολόγηση της μετακίνησης των δειγμάτων στο πήκτωμα, ώστε να σταματήσει η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Τέλος, αυτή η χρωστική περιέχει γλυκερόλη, η οποία προσδίδει μεγαλύτερη πυκνότητα στο DNA, ώστε το δείγμα να καθιζήσει στο πηγαδάκι και να μην διαχυθεί στο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης. Εκτός από τη χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης, χρησιμοποιείται συχνά και η χρωστική κυανού του ξυλενίου (xylene cyanol), και η μετακίνηση αυτών των χρωστικών γίνεται με την ίδια ταχύτητα με αυτή τμημάτων DNA μεγέθους 300bp και 4,000bp αντίστοιχα (Watson et al. 2007).

Τέλος, μαζί με τα δείγματα είναι απαραίτητη η φόρτωση ενός δείκτη γνωστού μοριακού βάρους (Low Molecular DNA Ladder), για να προσδιοριστεί το μέγεθος του μορίου που τρέχει στο πήκτωμα. Τα μεγέθη των ζωνών που περιέχει είναι γνωστά και, επομένως, καθιστά δυνατή τη σύγκριση των άγνωστων ζωνών με τις γνωστές του μοριακού δείκτη, παρέχοντας αποτελεσματικά μια λογαριθμική κλίμακα με την οποία μπορεί να εκτιμηθεί το μέγεθος των άλλων τμημάτων (Lee et al. 2012).

Η συσκευή ηλεκτροφόρησης αποτελείται από μια πηγή ηλεκτρικού ρεύματος (τροφοδοτικό), που παρέχει συνεχές ρεύμα, με ρυθμιζόμενη τάση (volts) ή ένταση (mA), και από μια λεκάνη χωρισμένη σε δυο δεξαμενές (λουτρό), που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X. Στη μια δεξαμενή είναι προσαρμοσμένο το θετικό και στην άλλη το αρνητικό ηλεκτρόδιο. Τα μόρια προς διαχωρισμό «φορτώνονται» στο πήκτωμα, το οποίο τοποθετείται πάνω σε ένα στήριγμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, με το ένα άκρο του βυθισμένο στη δεξαμενή (-θετικός πόλος) και το άλλο στη δεξαμενή (-αρνητικός πόλος). Η εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου προκαλεί τη ροή ηλεκτρικού ρεύματος με την κατεύθυνση αρνητικό ηλεκτρόδιο – ρυθμιστικό διάλυμα – υλικό ηλεκτροφόρησης – ρυθμιστικό διάλυμα – θετικό ηλεκτρόδιο, και το διαχωρισμό των μορίων σε ζώνες (Watson et al. 2012).

### 2.2.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

#### Αρχή της μεθόδου

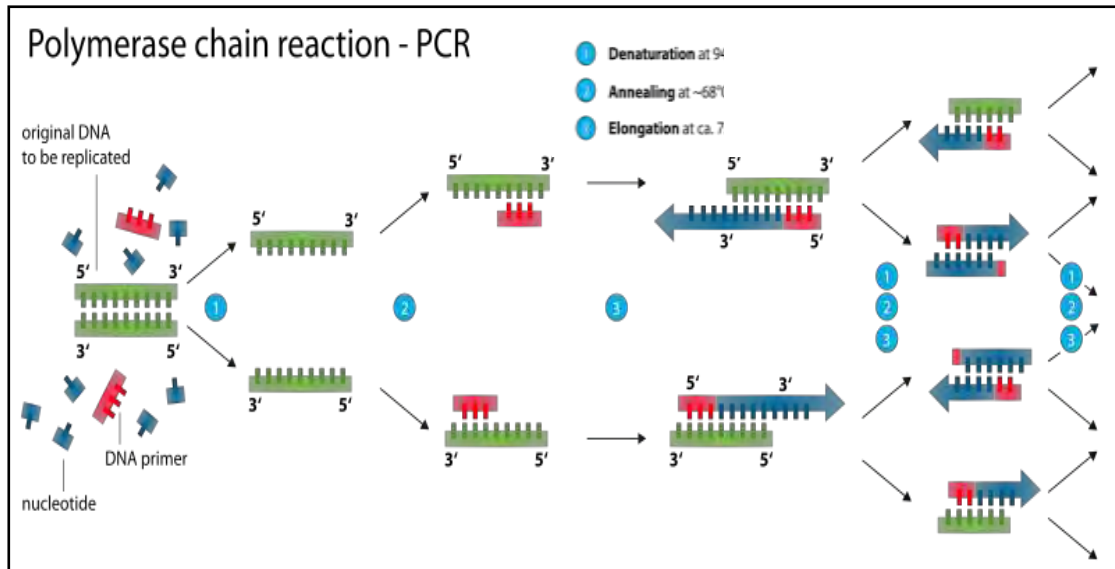
Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια μέθοδος της μοριακής βιολογίας, που αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Karry Mullis το 1983 (Mullis et al. 1986). Το 1993 ο Karry Mullis τιμήθηκε με το Nobel Χημείας, και σήμερα η PCR θεωρείται η πιο χρησιμοποιούμενη μέθοδος πολλαπλασιασμού νουκλεϊκών οξέων και μια από τις σημαντικότερες επιστημονικές εξελίξεις στον τομέα της βιοτεχνολογίας.

Η PCR είναι μια τεχνική που βασίζεται στον εκθετικό πολλαπλασιασμό μεγάλου αριθμού αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε μια *in vitro* ενζυμική αντίδραση από μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση. Η γρήγορη βελτιστοποίηση της PCR επιτεύχθηκε με τη χρήση μιας θερμοσταθερής Taq DNA πολυμεράσης από το *Thermus aquaticus* (Saiki et al. 1988). Το σημαντικότερο στοιχείο της PCR είναι ο μεγάλος αριθμός αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας, που παράγεται με την εκθετική ενίσχυση της, γεγονός που επιτρέπει την ανίχνευση μεταλλάξεων σε μία μόνο μέρα. Επιπλέον, η PCR έχει μειώσει ή εξαλείψει πλήρως τη χρήση ραδιενέργειας στη μοριακή διαγνωστική ρουτίνας. Η ευαισθησία και η ταχύτητα της μεθόδου αυτής επέφερε επανάσταση στη μοριακή διαγνωστική δίνοντας καινούριες προοπτικές για τη μελέτη και ανάλυση γονιδίων (Patrinos & Ansorge, 2010).

Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει τρία βήματα (Εικόνα 14):

1. Ένα βήμα αποδιάταξης του DNA στους 94° ή 95° C.
2. Υβριδοποίηση των εκκινητών στα μονόκλιωνα μόρια DNA σε μια θερμοκρασία, που εξαρτάται από το μήκος των εκκινητών και την αλληλουχία τους.
3. Επιμήκυνση των εκκινητών στους 72° C.

Τα βήματα αυτά αναλύονται στη συνέχεια.



**Εικόνα 14.** Διαδικασία της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (Society of Mucosal Immunology, 2014, <http://www.socmucimm.org/pcr-polymerase-chain-reaction/#prettyPhoto>).

1. Κατά το στάδιο αποδιάταξης, η διπλή έλικα του DNA αποδιατάσσεται και ανοίγει προς δύο μονόκλωνες αλυσίδες DNA, και έτσι όλες οι ενζυματικές αντιδράσεις σταματούν (όπως η επέκταση από έναν προηγούμενο κύκλο). Για την αποδιάταξη του DNA, η θερμοκρασία συνήθως αυξάνεται στους 94-96° C, προκαλώντας το σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου και αυξάνοντας τον αριθμό των μη-ζευγαρωμένων βάσεων. Η θερμοκρασία στην οποία το δίκλωνο DNA γίνεται μονόκλωνο είναι γνωστή ως θερμοκρασία τήξης,  $T_m$  (melting temperature). Ο τύπος του διαλύτη, η συγκέντρωση άλατος και το pH μπορούν να επηρεάσουν τη διαδικασία της μετουσίωσης. Η συγκέντρωση των G/C και T/A μπορεί, επίσης, να επηρεάσει την τιμή  $T_m$ . Οι περιοχές DNA πλούσιες σε G/C έχουν υψηλότερες τιμές  $T_m$  σε σύγκριση με εκείνες που είναι πλούσιες σε T/A. Πολλά σύγχρονα πρωτόκολλα περιέχουν ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης πριν από την κλασική αποδιάταξη για την επιβεβαίωση της πλήρους αποδιάταξης του DNA - στόχου.
2. Το δεύτερο στάδιο, δηλαδή η φάση της δέσμευσης των εκκινητών στους δύο αποδιαταγμένους κλώνους του DNA, λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία κοντά στο  $T_m$  τους (συνήθως 55-65° C), η οποία και ονομάζεται θερμοκρασία υβριδοποίησης (temperature annealing,  $T_a$ ). Τα ολιγονουκλεοτίδια, που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές, αποτελούνται συνήθως από σχετικά βραχείες αλληλουχίες (15-25nt). Το ζεύγος των εκκινητών οριοθετεί την περιοχή που θα πολλαπλασιαστεί εκθετικά. Οι εκκινητές, που υβριδοποιούνται ο καθένας σε έναν κλώνο του δίκλωνου μορίου DNA, λειτουργούν ως υπόστρωμα για την DNA πολυμεράση και, έτσι, για κάθε αλυσίδα του υποστρώματος δημιουργείται ένας συμπληρωματικός κλώνος DNA μέσω διαδοχικής προσθήκης δεοξυριβονουκλεοτιδίων.
3. Η φάση επέκτασης διεξάγεται κατά μήκος της αλληλουχίας στόχου με τη χρησιμοποίηση μίας θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης, υπό την παρουσία dNTPs, ρυθμιστικού διαλύματος και  $MgCl_2$ . Αυτό το ένζυμο έχει 5' → 3'

δραστηριότητα πολυμεράσης του DNA, δηλαδή προσθέτει dNTPs από το 5' προς το 3' άκρο. 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 (Πλαγεράς et al. 2012). Τις περισσότερες φορές, μετά το τέλος των κύκλων της PCR, περιλαμβάνεται ακόμη ένα στάδιο τελικής επέκτασης των εκκινητών, που ελέγχει τυχόν λάθη στην προσθήκη νουκλεοτιδίων και καλύπτει κενά με ελεύθερα νουκλεοτίδια.

Στο τέλος της αντίδρασης, ο θερμικός κυκλοποιητής μπορεί σε ξεχωριστό στάδιο να διατηρήσει τα δείγματα σε χαμηλή θερμοκρασία (4-18° C) για σύντομο χρονικό διάστημα, μέχρι να αποθηκευτούν στο ψυγείο ή να επεξεργαστούν περαιτέρω (Πλαγεράς et al. 2012).

Κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης PCR, ο αριθμός των αρχικών αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου θεωρητικά διπλασιάζεται μιας και η αύξηση είναι εκθετική. Εάν η απόδοση της PCR είναι 100%, τότε μετά από  $n$  κύκλους, το προϊόν PCR περιέχει  $2^n$  αντίγραφα της αλληλουχίας, που καθορίζεται από τους εκκινητές. Στην πραγματικότητα, η απόδοση της PCR δεν είναι 100% και δε διπλασιάζονται σε κάθε κύκλο όλα τα μόρια DNA που φέρουν την ακολουθία στόχο. Η απόδοση της αντίδρασης εξαρτάται πολύ από τον αρχικό αριθμό των αντιγράφων. Όσο λιγότερα αντίγραφα, τόσο χαμηλότερη απόδοση. Στους τελευταίους κύκλους, η αντίδραση φτάνει σε «πλατό», κυρίως, λόγω της εξάντλησης των αντιδραστηρίων (Watson et al. 2007).

Η αντίδραση PCR λαμβάνει χώρα σε ειδικούς ξερούς επωαστήρες, που ονομάζονται θερμικοί κυκλοποιητές (thermal cycler), και που εναλλάσσουν τη θερμοκρασία (θέρμανση-ψύξη) βάσει προγραμματισμού, αποφεύγοντας τη μεταφορά σωληναρίων από υδατόλουτρο σε υδατόλουτρο. Η επιτυχία της αντίδρασης πιστοποιείται μετά από ηλεκτροφόρηση ενός μικρού κλάσματος του προϊόντος της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (Watson et al. 2007).

Τα πλεονεκτήματα της PCR είναι ότι παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένου τμήματος DNA σε μικρό χρονικό διάστημα. Επιπλέον, η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση ελάχιστης ποσότητας γενωμικού DNA, καθώς και όταν το DNA δεν είναι εξαιρετικής ποιότητας ή καθαρότητας.

### ***Πειραματική Διαδικασία***

Οι περιοχές των γονιδίων HRAS και KRAS, που ενισχύθηκαν με τη διαδικασία της PCR, ήταν οι περιοχές που περιέχουν το κωδικόνιο 61 για το γονίδιο H-RAS και τα κωδικόνια 12, 13 και 61 για το γονίδιο K-RAS. Οι αλληλουχίες των εκκινητών, που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των παραπάνω περιοχών, καθώς και το μέγεθος των ενισχυμένων προϊόντων και οι σημειακές μεταλλάξεις υπό μελέτη, παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

**Πίνακας 5.** Αλληλουχίες εκκινητών, μέγεθος ενισχυμένων προϊόντων και οι υπό μελέτη σημειακές μεταλλάξεις στα κωδικόνια 61 (για τα γονίδια HRAS και KRAS) και 12/13 (για το γονίδιο KRAS).

Γονίδιο	Αλληλουχία Εκκινητή (5' → 3')	Μετάλλαξη	Αμινοξύ/έα
<b>HRAS</b>	For*: TGTCCCTCCTGCAGGATTC Rev*: GTACTGGTGGATGTCCTC	<b>κωδικόνιο 61</b> (CAG)	Γλουταμίνη
<b>KRAS</b>	For*: AACCTTATGTGTGACATGTTC 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).

Στην παρούσα εργασία, η διαδικασία του Thermo cycling (**SENSQUEST lab cycler**) διεξήχθη ως εξής: 40 κύκλοι στους 95° C για 30 δευτερόλεπτα, 51° C για 30 δευτερόλεπτα και 72° C για 30 sec για την ενίσχυση των κωδικονίων 12/13 και 61 του γονιδίου KRAS. Αντίθετα, για την ενίσχυση του κωδικονίου 61 του γονιδίου HRAS, η PCR διεξήχθη ως ακολούθως: 40 κύκλοι που συνίστανται από 95° C για 30 sec, 54° C για 30 sec, 72° C για 30 sec. Σε όλες τις αντιδράσεις PCR, υπάρχει το αρχικό στάδιο της αποδιάταξης, που λαμβάνει χώρα στους 95° C για 5 λεπτά, και στο τέλος ακολουθεί η τελική επέκταση στους 72° C από 10 λεπτά. Οι συνθήκες αυτές παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 6.

**Πίνακας 6.** Συνθήκες για την αντίδραση PCR για τους εκκινητές HRAS 61, KRAS 12/13, KRAS 61.

Στάδιο	primer <b>HRAS 61</b>		primer <b>KRAS 12/13</b>		primer <b>KRAS 61</b>	
	Θερμοκρασία	Χρόνος	Θερμοκρασία	Χρόνος	Θερμοκρασία	Χρόνος
<b>Αρχική αποδιάταξη</b>	95° C	5 min	95° C	5 min	95° C	5 min
<b>Αποδιάταξη</b>	95° C	30 sec	95° C	30 sec	95° C	30 sec
<b>Υβριδοποίηση</b>	<b>54° C</b>	30 sec	<b>51° C</b>	30 sec	<b>51° C</b>	30 sec
<b>Επέκταση</b>	72° C	30 sec	72° C	30 sec	72° C	30 sec
<b>Επέκταση</b>	72° C	10 min	72° C	10 min	72° C	10 min
<b>hold</b>	4° C	Until analysis	4° C	Until analysis	4° C	Until analysis



Η αντίδραση πολυμερισμού γίνεται, συνήθως, σε όγκο 25-100μl σε ένα σωληνάριο erpendorf τελικού όγκου 0.2ml και περιλαμβάνει τα ακόλουθα αντιδραστήρια που διατηρούνται στον πάγο κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας της: DNA – στόχο, 10-100pmol/μl από τον κάθε εκκινητή, ίση ποσότητα (200mM) από κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), DNA πολυμεράση (Taq πολυμεράση) συνήθως 0,05 μονάδες/μl, 1X ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) (τυπικά 20mM Tris-HCl pH 8, 50mM KCl, 0.01% ζελατίνη), 1.5-2.5mM MgCl<sub>2</sub> και ddH<sub>2</sub>O (Lorenz, 2012).

Τα αντιδραστήρια, καθώς και οι ποσότητές τους, που χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε αντίδραση PCR αγοράστηκαν από την εταιρία **Kapa Biosystems (KAPA Taq PCR kit)**, και παρουσιάζονται στον Πίνακα 7. Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι ποσότητες των αντιδραστηρίων ήταν οι ίδιες για όλα κωδικόνια που ενισχύθηκαν στην εργασία αυτή. Επίσης, σε κάθε αντίδραση PCR έγινε και αρνητικό δείγμα ελέγχου, που περιείχε όλα τα ίδια αντιδραστήρια μιας αντίδρασης PCR, αλλά αντί για γενωμικό DNA χρησιμοποιήθηκε νερό. Το αρνητικό δείγμα ελέγχου δεν αναμένεται να δώσει κάποιο προϊόν, καθώς δεν περιέχει DNA για να ενισχυθεί, οπότε αν εμφανιστεί προϊόν στο αρνητικό control, αυτό αποτελεί σημάδι επιμόλυνσης στα αντιδραστήρια της PCR.

**Πίνακας 7.** Ποσότητες αντιδραστηρίων στις PCR αντιδράσεις.

Συστατικά	Τελική συγκέντρωση	Όγκος (μl)
<b>10X PCR Buffer (+ 15mM Mg<sup>2+</sup>)</b>	1X Buffer + 1.5mM (Mg <sup>2+</sup> )	5
<b>Μείγμα dNTPs (10mM το καθένα)</b>	0.2mM (το καθένα)	1
<b>10pmol/μl Εκκινητής Forward</b>	0.5pmol/μl	25
<b>10pmol/μl Εκκινητής Reverse</b>	0.5pmol/μl	2.5
<b>Kapa Taq Πολυμεράση (5 U/μl)</b>	0.02U/μl	0.2
<b>Template DNA</b>	-	4
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-	34.8
<b>ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ</b>		<b>50</b>

### **Επιλογή Εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR**

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (F/R-KRAS 12/13, F/R-KRAS 61 και F/R-HRAS 61) παρουσιάζονται παρακάτω (με κόκκινο χρώμα επισημαίνεται η αλληλουχία των εκκινητών και με πράσινο χρώμα τα υπό μελέτη κωδικόνια). Η επιλογή τους έγινε, έτσι, ώστε να ενισχύσουν αποτελεσματικά τις περιοχές, που περιλαμβάνουν τα κωδικόνια 12/13 και 61 του γονιδίου KRAS και το κωδικόνιο 61 του γονιδίου HRAS.

## Γονίδιο KRAS [Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (*Homo sapiens*)]

- **Πρόσθιος Εκκινητής KRAS 12/13 FORWARD:**  
AACCTTATGTGTGACATGTTCC (2nt)
- **Ανάστροφος Εκκινητής KRAS 12/13 REVERSE:**  
TCCTGCACCAGTAATATGC (19nt)
- **Μέγεθος προϊόντος PCR: 216bp**

GGATTGATAGTGTAATT**AACCTTATGTGTGACATGTTCT**AAATATAGTCCACATTTTCATTATTTTATTAT  
AAGCCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT**GGTGGC**GTAGGCAAGAGTGC  
CTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAATCTT  
GTTTAATAT**GCATATTACTGGTGCAGGA**CCATTCTTTGATACAGATAAAGGTTTCTCTGA

- **Πρόσθιος Εκκινητής KRAS 61 FORWARD:**  
AATCCAGACTGTGTTTCTCC (20nt)
- **Ανάστροφος Εκκινητής KRAS 61 REVERSE:**  
TTAAACCCACCTATAATGGTG (21nt)
- **Μέγεθος προϊόντος PCR: 217bp**

GTAAAAGGTGCACTGTAAT**AATCCAGACTGTGTTTCTCC**CTTCTCAGGATTCCTACAGGAAGCAAGT  
AGTAATTGATGGAGAAACCTGTCTCTTGGATATTCTCGACACAGCAGGT**CA**AGAGGAGTACAGTGCA  
ATGAGGGACCAGTACATGAGGACTGGGGAGGGCTTTCTTTGTGTATTGCCATAAATAATACTAAAT  
CATTTGAAGATATT**CACCATATAGGTGGGTTAA**ATTGAATATAATAAGCTGACAT

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

- **Πρόσθιος Εκκινητής HRAS 61 FORWARD:**  
TGTCCTCCTGCAGGATTC (18nt)
- **Ανάστροφος Εκκινητής HRAS 61 REVERSE:**  
GTACTGGTGGATGTCCTC (18nt)
- **Μέγεθος προϊόντος PCR: 190bp**

TGAGCCCT**TGTCCTCCTGCAGGATTC**CTACCGGAAGCAGGTGGTCATTGATGGGGAGACGTGCCTGTT  
GGACATCCTGGATACCGCCGGCC**AG**GAGGAGTACAGCGCCATGCGGGACCAGTACATGCGCACCCGG  
GGAGGGCTTCCTGTGTGTGTTGCCATCAACAACACCAAGTCTTTT**GAGGACATCCACCAGTACAGG**

Στη συνέχεια, τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης, με σκοπό να επιβεβαιωθεί τόσο η επιτυχία της αντίδρασης PCR, όσο και ότι τα προϊόντα της PCR έχουν το σωστό μέγεθος (216bp για το KRAS 12/13, 217bp για το KRAS 61 και 190bp για το HRAS 61).

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης των συγκεκριμένων προϊόντων, είναι ακριβώς ίδια με τη διαδικασία που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2.2.2. Η μόνη διαφορά βρίσκεται στη σύσταση του πηκτώματος σε αγαρόζη, η οποία στην

περίπτωση αυτή ήταν 2%, και αυτό έτσι ώστε να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των ενισχυμένων προϊόντων της PCR. Στα «πηγαδάκια» φορτώθηκαν 5μl από το προϊόν της αντίδρασης PCR, με 1μl χρωστικής-διαλύματος φόρτωσης (6X) σε τελικό όγκο ηλεκτροφόρησης 6μl. Στο πήκτωμα, φορτώθηκε και μάρτυρας μοριακού βάρους (Low MW DNA Ladder). Η απεικόνιση του αποτελέσματος πραγματοποιήθηκε μετά από την τοποθέτηση του πηκτώματος σε ειδική λάμπα UV.

## 2.2.4. Καθαρισμός προϊόντων PCR (PCR clean-up)

### *Πρωτόκολλο*

Ο καθαρισμός του ενισχυμένου PCR προϊόντος 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**, με αριθμό καταλόγου 740609.250 ([www.mn-net.com](http://www.mn-net.com))).

Η διαδικασία περιλαμβάνει διάφορα στάδια, τα οποία αναλύονται στη συνέχεια:

### *Ρύθμιση της κατάστασης δέσμευσης του DNA*

Πρώτο βήμα του πρωτοκόλλου ήταν η προσαρμογή της ποσότητας και της κατάστασης του DNA, έτσι, ώστε να μπορέσει να δεσμευθεί στη μεμβράνη της ειδικής στήλης σε επόμενο στάδιο. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, στη διαδικασία της τεχνικής PCR που εφαρμόστηκε στα πλαίσια αυτού του πειράματος, κάθε αντίδραση PCR για όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν έγινε σε τελική συγκέντρωση 50μl. Ωστόσο, 5μl από τα 50μl του τελικού προϊόντος της PCR χρησιμοποιήθηκαν μεταγενέστερα στην ηλεκτροφόρηση αγαρόζης (2% αγαρόζη), προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της αντίδρασης PCR. Έτσι, λοιπόν, παρέμειναν συνολικά 45μl τελικού προϊόντος PCR για κάθε δείγμα. Για το λόγο αυτόν, πριν την έναρξη της διαδικασίας καθαρισμού, προστέθηκαν σε κάθε προϊόν PCR 5μl αποσταγμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O), με αποτέλεσμα η συνολική ποσότητα κάθε προϊόντος PCR, που επρόκειτο πλέον να καθαριστεί, να ανέρχεται στην τιμή των 50μl. Μετά από αυτή τη ρύθμιση της συγκέντρωσης του προϊόντος PCR, έγινε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας του ρυθμιστικού διαλύματος NTI (Buffer NTI). Και επειδή οι οδηγίες του κατασκευαστή ανέφεραν τη μείξη 1 όγκου του δείγματος με 2 όγκους του ρυθμιστικού διαλύματος NTI, στα 50μl του PCR προϊόντος προστέθηκαν 100μl ρυθμιστικού διαλύματος NTI, τα οποία ανακατεύθηκαν με ένα καλό «πιπετάρισμα».

### *Δέσμευση του DNA*

Στη συνέχεια, ακολούθησε η δέσμευση του DNA στη μεμβράνη της ειδικής στήλης. Για κάθε δείγμα που μελετήθηκε, τοποθετήθηκε μία στήλη μέσα σε ένα σωλήνα συλλογής (2ml collection tube). Σε αυτή τη στήλη, προσεκτικά στο κέντρο της μεμβράνης της, φορτώθηκε όλη η ποσότητα του μείγματος, και συγκεκριμένα περίπου 150μl προϊόντος PCR και ρυθμιστικού διαλύματος NTI. Μετά από φυγοκέντρηση της στήλης σε ταχύτητα 11,000 x g για 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου, απομακρύνθηκε το απορρέων υγρό από το σωλήνα

συλλογής, και η στήλη επανατοποθετήθηκε στον ίδιο, αλλά καθαρισμένο πλέον, σωλήνα συλλογής.

### ***Πλύση της μεμβράνης πυριτίου (silica membrane)***

Επόμενο βήμα αποτέλεσε η πλύση της μεμβράνης πυριτίου (silica membrane), όπου βρισκόταν δεσμευμένο το DNA, η οποία επιτεύχθηκε με την προσθήκη 700μl του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης NT3 (Buffer NT3) στη στήλη. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 11,000 x g για 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου και απομάκρυνση του απορρέοντος υγρού από το σωλήνα συλλογής. Όπως προτεινόταν και από τον κατασκευαστή, μία δεύτερη πλύση της μεμβράνης έλαβε χώρα μέσω προσθήκης 700 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης NT3 (Buffer NT3) στη στήλη, και ακλούθησε φυγοκέντρηση του δείγματος σε ταχύτητα 11,000 x g για 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου.

### ***Στέγνωμα της μεμβράνης πυριτίου (silica membrane)***

Ήταν απαραίτητο η μεμβράνη πυριτίου (silica membrane) της ειδικής στήλης να στεγνώσει πλήρως πριν από το τελικό στάδιο της έκλουσης του DNA, καθώς το υπόλοιπο της αιθανόλης από το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης NT3 (Buffer NT3) μπορεί να αναστέλλει διάφορες ενζυματικές αντιδράσεις. Το στέγνωμα της μεμβράνης επιτεύχθηκε με φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 11.000 x g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, για να αφαιρεθεί το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης NT3 εντελώς.

### ***Έκλουση του DNA***

Τελικό στάδιο για έναν επιτυχημένο καθαρισμό των προϊόντων PCR αποτέλεσε η έκλουση του DNA. Προϋπόθεση ήταν η τοποθέτηση της ειδικής στήλης σε ένα νέο 1.5ml erpendorf σωλήνα και προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης NE (Buffer NE). Η ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης NE, που προστίθεται στην ειδική στήλη, αποφασίστηκε ανάλογα με την ένταση της ζώνης του κάθε προϊόντος PCR, όπως αυτή παρουσιάζόταν στην εικόνα που προέκυψε μετά από την ηλεκτροφόρηση αγαρόζης (2% αγαρόζη), στην οποία και υποβάλλονταν όλα τα δείγματα που μελετώνται στην παρούσα εργασία, ώστε να διαπιστωθεί επακριβώς η επιτυχία της αντίδρασης PCR. Οι όγκοι έκλουσης, που χρησιμοποιήθηκαν, κυμαίνονται μεταξύ 15 και 25μl, ανάλογα με την ποσότητα του προϊόντος PCR της κάθε αντίδρασης.

Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε μια σύντομη επώαση του διαλύματος έκλουσης στις στήλες (1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου) και ακολούθησε φυγοκέντρηση με ταχύτητα 11,000 x g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου (18-25° C). Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 2% και διατηρήθηκαν σε καταψύκτη θερμοκρασίας -20° C μέχρι την αλληλούχισή τους.

## 2.2.5. Αλληλούχιση των καθαρισμένων προϊόντων PCR

Η αλληλούχιση των προϊόντων 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>). Η απευθείας αλληλούχιση των καθαρισμένων προϊόντων PCR είναι προτιμότερη, επειδή επιτρέπει όχι μόνο την αναγνώριση της ύπαρξης ή όχι σημειακών μεταλλάξεων στα τμήματα των γονιδίων που μελετούνται, αλλά και την ταυτοποίηση των συγκεκριμένων σημειακών μεταλλάξεων που εμφανίζονται στα γονίδια. Επίσης, αποφεύγεται το πρόβλημα των ψευδώς θετικών μεταλλάξεων που εντοπίζεται σε άλλες τεχνικές, όπως είναι και η αντίδραση Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Αξίζει να σημειωθεί ότι για την αλληλούχιση των προϊόντων PCR, χρησιμοποιήθηκαν οι ανάστροφοι εκκινητές (reverse primers), που δίνονται στον Πίνακα 8.

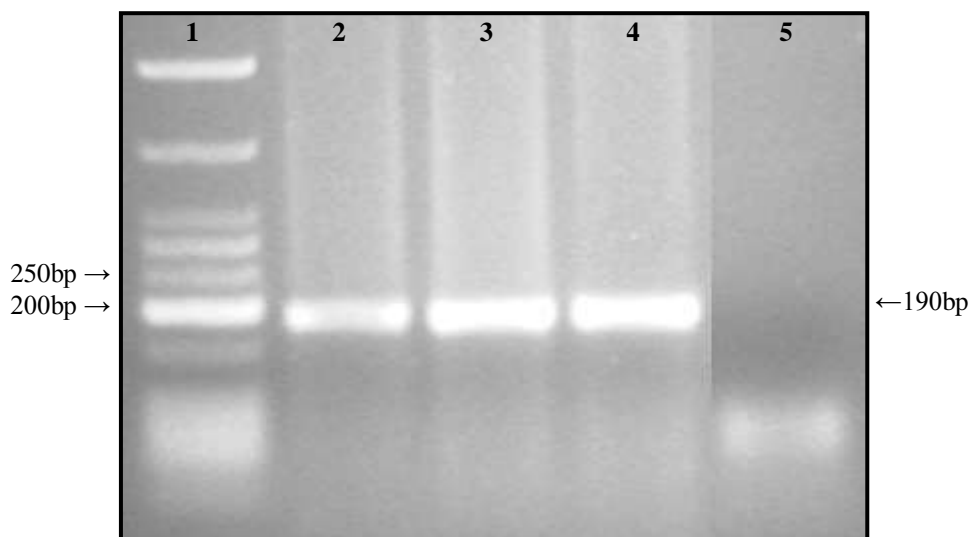
**Πίνακας 8.** Αλληλουχίες των ανάστροφων εκκινητών με τους οποίους έγινε η αλληλούχιση των καθαρισμένων προϊόντων PCR.

Όνομα Εκκινητή	Αλληλουχία (5' → 3')	Tm [°C]	GC-content
HRAS-c61-R	GTACTGGTGGATGTCCTC (18)	56.0	55.6%
KRAS-c12/13-R	TCCTGCACCAGTAATATGC (19)	54.5	47.4%
KRAS-c61-R	TTAAACCCACCTATAATGGTG (21)	54.0	38.1%

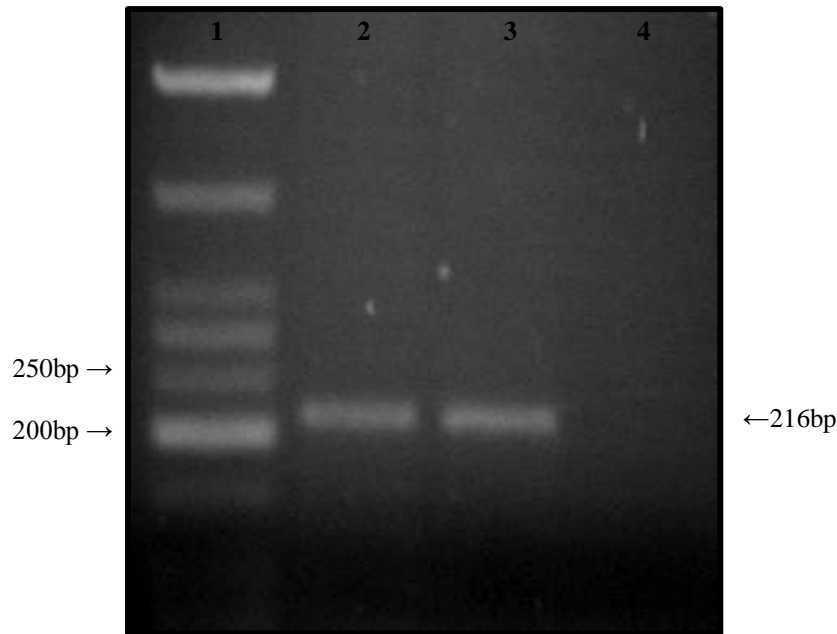
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Απομόνωση γενωμικού DNA και ενίσχυση της υπό μελέτη περιοχής των γονιδίων RAS με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

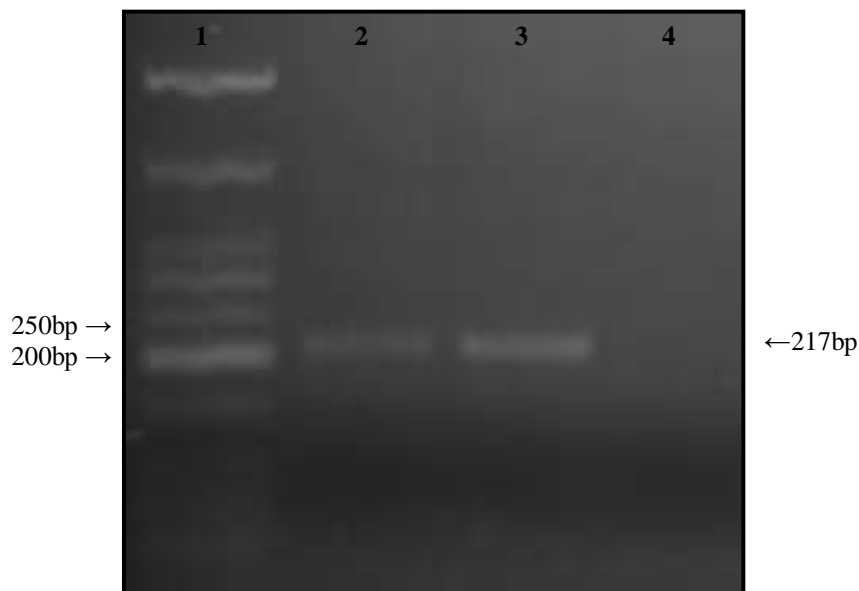
Το γενωμικό DNA, που απομονώθηκε από τις βιοψίες ιστού, ενισχύθηκε με χρήση κατάλληλων εκκινητών στις περιοχές των γονιδίων KRAS (κωδικόνια 12, 13 και 61) και HRAS (κωδικόνιο 61) με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Τα δείγματα που εξετάστηκαν για τις μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 61 του γονιδίου HRAS ήταν συνολικά 33 και αποτελούνταν από 11 θηλώδη καρκινώματα, 13 θηλώδη καρκινώματα με θυλακιώδη διαμόρφωση, 7 θυλακιώδη καρκινώματα και 2 μυελοειδή καρκινώματα. Αντίθετα, για τη μελέτη σημειακών μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12, 13 και 61 του γονιδίου KRAS εξετάστηκαν συνολικά 13 δείγματα (10 θηλώδη καρκινώματα με θυλακιώδη πρότυπο ανάπτυξης, 2 θυλακιώδη καρκινώματα και 1 μυελοειδές καρκίνωμα). Στις Εικόνες 15-17 απεικονίζονται ενδεικτικά τα προϊόντα ενίσχυσης με PCR της επιθυμητής περιοχής διαφορετικών δειγμάτων για τις μεταλλάξεις HRAS 61, KRAS 12/13 και KRAS 61, αντίστοιχα.



**Εικόνα 15.** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% της περιοχής που περιλαμβάνει το κωδικόνιο 61 του γονιδίου HRAS μετά από την ενίσχυση διαφορετικών DNA με αντίδραση PCR. **Λιαδρομή 1:** δείκτης μοριακών βαρών, DNA Ladder 50bp. **Λιαδρομές 2-4:** Ενίσχυση γενωμικού DNA των δειγμάτων 20, 22 και 31. **Λιαδρομή 5:** Δείγμα αρνητικού ελέγχου της αντίδρασης PCR.



**Εικόνα 16.** 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, DNA Ladder 50bp. **Διαδρομές 2-3:** Ενίσχυση γενωμικού DNA των δειγμάτων 22 και 27. **Διαδρομή 4:** Δείγμα αρνητικού ελέγχου της αντίδρασης PCR.

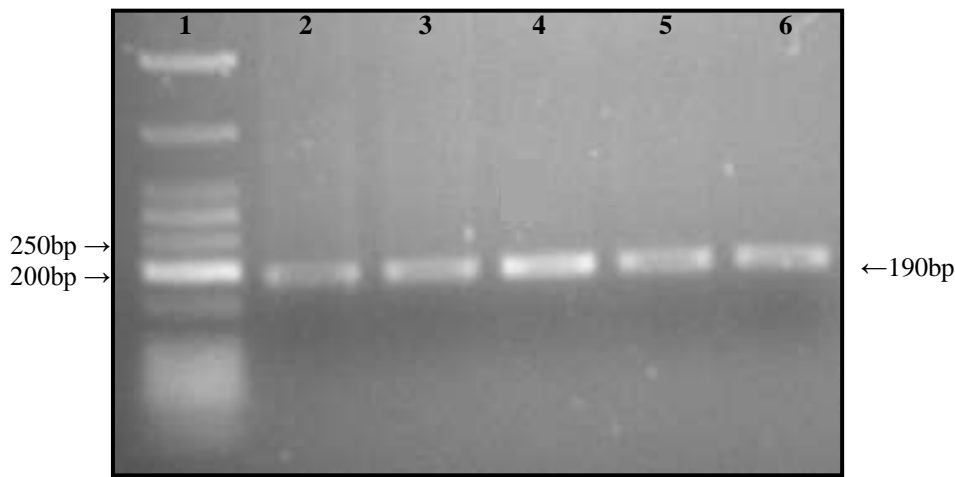


**Εικόνα 17.** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% της περιοχής που περιλαμβάνει το κωδικόνιο 61 του γονιδίου *KRAS* μετά από την ενίσχυση διαφορετικών DNA με αντίδραση PCR. **Διαδρομή 1:** δείκτης μοριακών βαρών, DNA Ladder 50bp. **Διαδρομές 2-3:** Ενίσχυση γενωμικού DNA των δειγμάτων 26 και 28. **Διαδρομή 4:** Δείγμα αρνητικού ελέγχου της αντίδρασης PCR.

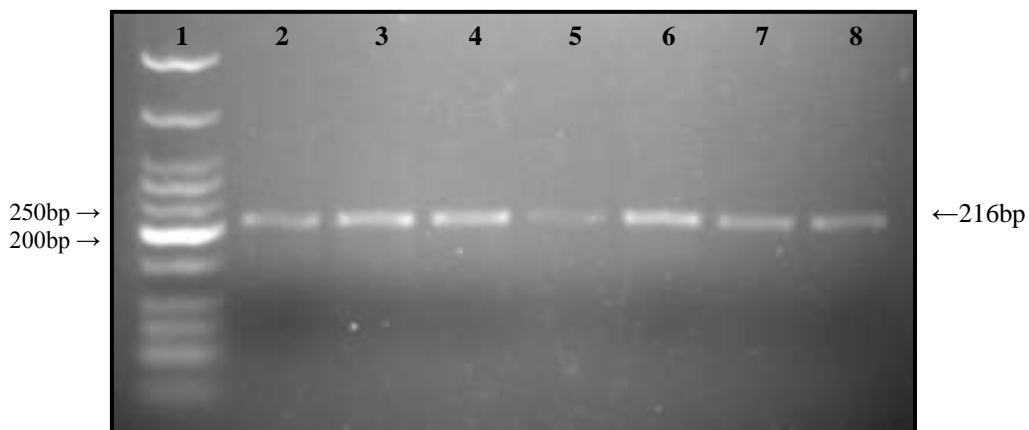


### 3.2. Καθαρισμός των προϊόντων PCR

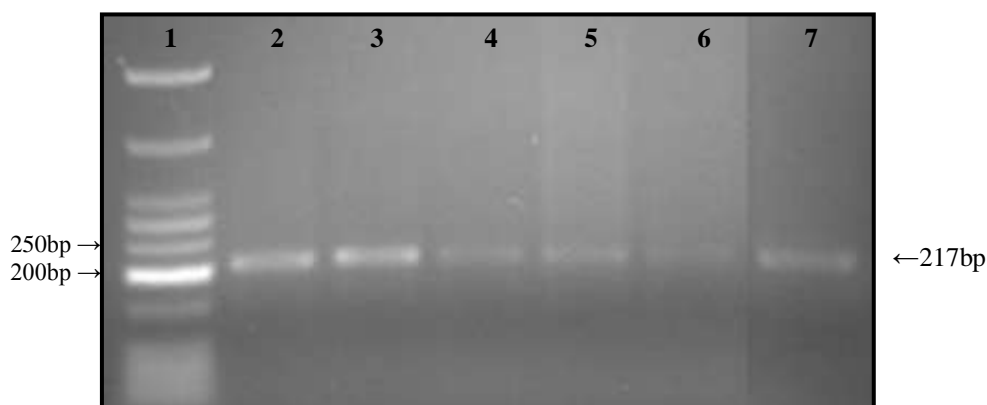
Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR είναι απαραίτητος για τον διαχωρισμό της ενισχυμένης γονιδιακής περιοχής από τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης PCR, και ειδικότερα εκκινητές ή διμερή εκκινητών, ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη αλληλούχιση για την ανάλυση των μεταλλάξεων των γονιδίων RAS. Στις Εικόνες 18-20, απεικονίζονται ενδεικτικά τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR.



**Εικόνα 18.** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των προϊόντων ενίσχυσης της περιοχής που περιλαμβάνει το κωδικόνιο 61 του γονιδίου HRAS μετά από τον καθαρισμό τους. **Διαδρομή 1:** δείκτης μοριακών βαρών, DNA Ladder 50bp. **Διαδρομές 2-6:** Καθαρισμένα προϊόντα ενίσχυσης του γενωμικού DNA των δειγμάτων 20, 22, 28, 29 και 30.



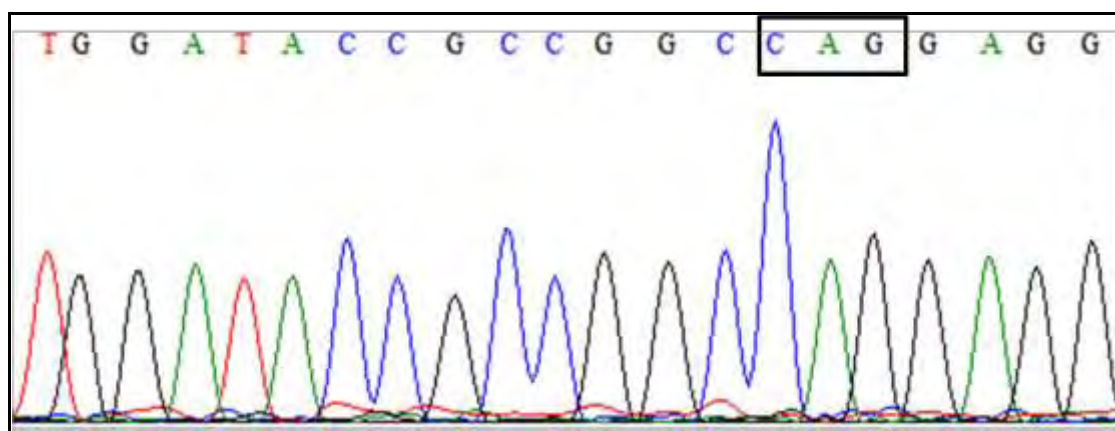
**Εικόνα 19.** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των προϊόντων ενίσχυσης της περιοχής που περιλαμβάνει τα κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου KRAS μετά από τον καθαρισμό τους. **Διαδρομή 1:** δείκτης μοριακών βαρών, DNA Ladder 50bp. **Διαδρομές 2-8:** Καθαρισμένα προϊόντα ενίσχυσης του γενωμικού DNA των δειγμάτων 22, 23, 24, 25, 26, 27 και 28.



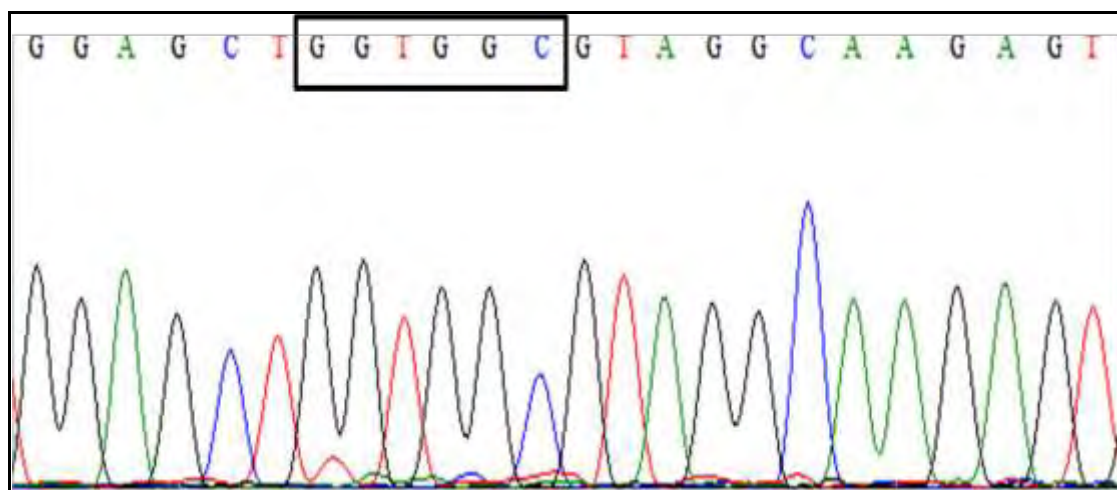
**Εικόνα 20.** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των προϊόντων ενίσχυσης της περιοχής που περιλαμβάνει το κωδικόνιο 61 του γονιδίου KRAS μετά από τον καθαρισμό τους. **Διαδρομή 1:** δείκτης μοριακών βαρών, DNA Ladder 50bp. **Διαδρομές 2-7:** Καθαρισμένα προϊόντα ενίσχυσης του γενωμικού DNA των δειγμάτων 21, 22, 23, 24, 25 και 26.

### 3.3. Αλληλούχιση των προϊόντων της PCR

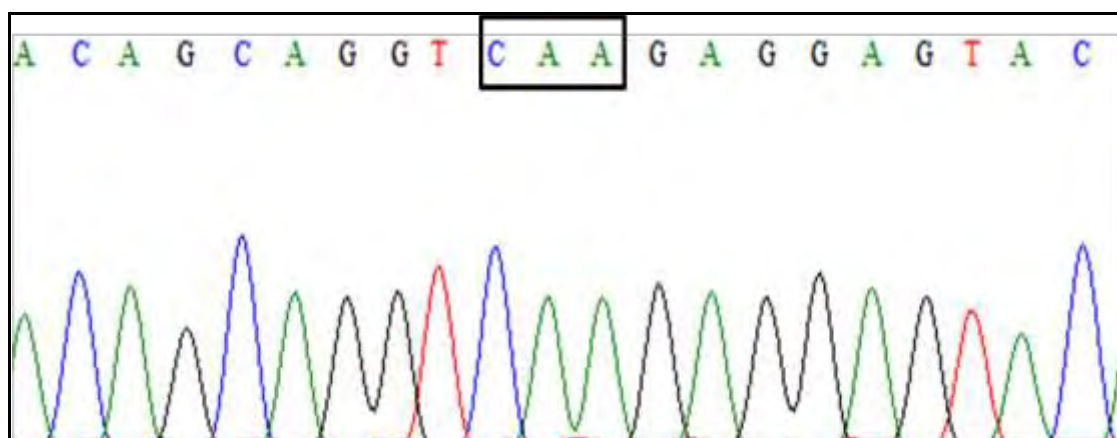
Η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR έδωσε 97-100% ομολογία με τις υπό μελέτη περιοχές των γονιδίων HRAS και KRAS, μετά από ευθυγράμμιση με το πρόγραμμα BLAST του NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Στις Εικόνες 21-23, δίνονται ενδεικτικά τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν μετά από την αλληλούχιση των προϊόντων της PCR. Οι Εικόνες εστιάζονται στην περιοχή που απαντώνται οι μεταλλάξεις, που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία. Συγκεκριμένα, για το γονίδιο HRAS, η αλληλουχία CAG απαντάται στην περιοχή του κωδικονίου 61, ενώ για το γονίδιο KRAS, οι αλληλουχίες GGT, GGC και CAA απαντώνται στην περιοχή των κωδικονίων 12, 13 και 61 αντίστοιχα.



**Εικόνα 21.** Χρωματογράφημα μιας περιοχής του γονιδίου HRAS για το δείγμα 1. Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση του κωδικονίου 61.



**Εικόνα 22.** Χρωματογράφημα μιας περιοχής του γονιδίου KRAS για το δείγμα 23. Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση των κωδικονίων 12 και 13.



**Εικόνα 23.** Χρωματογράφημα μιας περιοχής του γονιδίου KRAS για το δείγμα 21. Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση του κωδικονίου 61.

Η ανάγνωση των χρωματογραφημάτων έδειξε ότι δεν ταυτοποιήθηκε καμία μετάλλαξη στο κωδικόνιο 61 του γονιδίου HRAS και στα κωδικόνια 12, 13 και 61 του γονιδίου KRAS σε όλα τα δείγματα των διαφορετικών τύπων του καρκίνου του θυρεοειδούς που εξετάστηκαν. Μολονότι ο αριθμός των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη είναι αντιπροσωπευτικός της συχνότητας εμφάνισης των διαφόρων τύπων του καρκίνου του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό, τα αποτελέσματα αυτά θα πρέπει να αξιολογηθούν με προσοχή λόγω του μικρού μεγέθους των δειγμάτων.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς είναι η πιο κοινή ενδοκρινική κακοήθεια και η συχνότητά του αυξάνεται σταθερά τις τελευταίες δεκαετίες. Η πλειοψηφία των καρκινωμάτων προέρχεται από τα θυλακιώδη επιθηλιακά κύτταρα του θυρεοειδούς, ενώ ένα μικρότερο ποσοστό τους προέρχεται από τα παραθυλακιώδη (C cells) κύτταρα που εκκρίνουν καλσιτονίνη. Σύμφωνα με ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά, οι διαφορετικοί τύποι ταξινομούνται σε θηλώδη, θυλακιώδη, αναπλαστικά και μυελοειδή καρκινώματα. Επιπλέον, έχουν ταυτοποιηθεί ποικίλες παραλλαγές μεταξύ των παραπάνω τύπων, με την πιο κοινή να αποτελεί το θηλώδες καρκίνωμα του θυλακιώδους υποτύπου.

Η κατανόηση της μοριακής παθογένεσης και η ταυτοποίηση μοριακών δεικτών, που θα χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση και την πρόγνωση του θυρεοειδούς καρκίνου, είναι υψίστης κλινικής σημασίας. Προηγούμενες μελέτες έχουν μελετήσει και αναφέρει την ύπαρξη γενετικών μεταλλάξεων, ιδιαίτερα αυτών που έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης των MAP κινασών (MAPK), οι οποίες συμβάλλουν στην παθογένεση του θυρεοειδούς καρκίνου. 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. 2003b; Nikiforov et al. 2013).

Η οικογένεια των ανθρώπινων γονιδίων RAS περιλαμβάνει τα γονίδια HRAS, KRAS και NRAS. Κωδικοποιούν υψηλά ομόλογες πρωτεΐνες G, οι οποίες εντοπίζονται στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και προσδένοντας GTP μεταδίδουν σήματα προερχόμενα από υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης με ενεργότητα κίνησης τυροσίνης, μέσω του MAPK μονοπατιού και άλλων μονοπατιών σηματοδότησης (Nikiforov, 2011). Το μονοπάτι σηματοδότησης MAPK ρυθμίζει διάφορες διεργασίες, συμπεριλαμβανομένων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της επιβίωσης (Nikiforov & Nikiforova, 2011). Ογκογόνες μεταλλάξεις στα γονίδια RAS έχουν ως αποτέλεσμα τη συνεχή ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού. Σημειακές μεταλλάξεις σε συγκεκριμένες επικράτειες των γονιδίων RAS (κωδικόνια 12, 13 και 61) είναι κοινές σε διάφορους τύπους ανθρώπινων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων τύπων καρκινωμάτων του θυρεοειδούς (Nikiforov et al. 2013). Αν και στους περισσότερους καρκινικούς τύπους φαίνεται ότι η μετάλλαξη στα κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου KRAS υπερισχύουν, στον καρκίνο του θυρεοειδούς οι πιο συχνές μεταλλάξεις αφορούν τα κωδικόνια 61 των γονιδίων HRAS και NRAS (Nikiforov, 2011).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η συσχέτιση σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων HRAS και KRAS με τους διαφορετικούς τύπους καρκινωμάτων του θυρεοειδούς στον Ελληνικό πληθυσμό. Χρησιμοποιήθηκαν 33 δείγματα ασθενών, τα οποία προήλθαν από το Στρατιωτικό Νοσοκομείο ΝΙΜΙΤΣ της Αθήνας. Τα δείγματα περιελάμβαναν διαφορετικούς τύπους καρκινωμάτων του θυρεοειδούς με μία συχνότητα αντιπροσωπευτική της συχνότητας εμφάνισής τους στο γενικό πληθυσμό. Η πειραματική διαδικασία περιλάμβανε την απομόνωση γενωμικού DNA από βιοψίες ιστών εγκλεισμένων σε παραφίνη, την ενίσχυση συγκεκριμένων περιοχών των υπό μελέτη γονιδίων, χρησιμοποιώντας την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR), και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των

ενισχυμένων και καθαρισμένων προϊόντων PCR. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η παρούσα εργασία αποτελεί ένα τμήμα μίας μεγαλύτερης μελέτης που γίνεται σε συνεργασία με το Στρατιωτικό Νοσοκομείο ΝΙΜΙΤΣ, και για το λόγο αυτό εξετάστηκαν μόνο 13 δείγματα για μεταλλάξεις στο γονίδιο KRAS.

Τα αποτελέσματα της εργασίας έδειξαν ότι δεν εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 61 του γονιδίου HRAS και στα κωδικόνια 12, 13 και 61 του γονιδίου KRAS σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν. Παρ' όλο που ο αριθμός των δειγμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, ήταν αντιπροσωπευτικός της συχνότητας εμφάνισης των διαφόρων τύπων καρκίνου του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό, τα αποτελέσματα αυτά θα πρέπει να αξιολογηθούν με προσοχή λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων που εξετάστηκαν.

Σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια HRAS, KRAS και NRAS σε θηλώδη καρκινώματα έχουν περιγραφεί με μια συχνότητα της τάξης του 10-20% σε διάφορες μελέτες (Figge, 2000), με τα περισσότερα θηλώδη καρκινώματα, που φέρουν τις μεταλλάξεις στα γονίδια RAS, να εμφανίζουν το ιστολογικό πρότυπο της θυλακιάδους παραλλαγής (Nikiforov, 2011). Αντίθετα, οι περιορισμένες μελέτες, που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής, έχουν αποτύχει να βρουν RAS μεταλλάξεις σε μυελοειδή καρκινώματα ή έχουν βρει σε πολύ μικρό ποσοστό (Bockhorn et al. 2000). Τα παραπάνω έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Στο σημείο αυτό είναι σημαντικό να αναφερθεί η μοναδική προηγούμενη μελέτη που έγινε σε μία ομάδα ελληνικού πληθυσμού, η οποία εστιάστηκε στη μετάλλαξη του γονιδίου BRAF (κωδικόνιο 600) και του γονιδίου KRAS (κωδικόνιο 12) σε θηλώδη και μυελοειδή καρκινώματα (55 και 44 δείγματα αντίστοιχα) (Goutas et al. 2008). Τα αποτελέσματα έδειξαν μια υψηλή συχνότητα των παραπάνω μεταλλάξεων σε σχέση με τη διεθνή βιβλιογραφία. Οι συγγραφείς (Goutas et al. 2008) εξηγούν ότι τα ευρήματα της μελέτης τους σχετικά με τα θηλώδη καρκινώματα βρίσκονται σε συμφωνία με μελέτες που διεξήχθησαν στη Βόρεια Αμερική και σε άλλους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς (Zhu et al. 2003), αλλά διαφέρουν από τα αποτελέσματα μιας ιταλικής μελέτης (Carta et al. 2006). Ωστόσο, όσον αφορά τα μυελοειδή καρκινώματα, σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες (Bockhorn et al. 2000), οι συγγραφείς (Goutas et al. 2008) αναφέρουν μια υψηλή συχνότητα (40.9%) της μετάλλαξης στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου KRAS.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι μοριακές αλλαγές διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο του θυρεοειδούς καρκινώματος, ακόμη και μεταξύ διαφορετικών παραλλαγών του ίδιου τύπου. Συγκεκριμένα, το κλασικό θηλώδες καρκίνωμα φέρει να έχει μία υψηλή συχνότητα (~50%) των μεταλλάξεων BRAF (Kimura et al. 2003) και καθόλου μεταλλάξεις RAS (Nikiforov et al. 2013), ενώ το θηλώδες καρκίνωμα του θυλακιάδους υποτύπου φέρει χαμηλότερη συχνότητα μεταλλάξεων στο BRAF (~14%) (Lee et al. 2013), και υψηλότερη συχνότητα (μέχρι και 20%) μεταλλάξεων στα RAS (Nikiforova et al. 2003b). Η προηγούμενη μελέτη (Goutas et al. 2008), ωστόσο, δεν έκανε καμία διάκριση μεταξύ του θηλώδους καρκινώματος και της παραλλαγής του. Επιπλέον, στην προηγούμενη μελέτη αναφέρθηκε μία υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων σε δείγματα μυελοειδούς καρκίνου στον ελληνικό πληθυσμό (~41%), σε αντίθεση τόσο με άλλες μελέτες (~7.6%) (Cho et al. 2014), όσο και με την παρούσα μελέτη, όπου δεν εντοπίστηκαν μεταλλάξεις, παρά τον περιορισμένο αριθμό δειγμάτων με μυελοειδή καρκίνο.

Ένας πιθανός λόγος για τέτοιες υψηλές συχνότητες μπορεί να είναι ο λανθασμένος υψηλός ρυθμός μετάλλαξης λόγω τεχνικών ελαττωμάτων της μεθόδου PCR-RFLP, που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη (Goutas et al. 2008). Η μέθοδος PCR-RFLP χρησιμοποιεί ενδονουκλεάσες περιορισμού για την πέψη των προϊόντων PCR. Ως εκ τούτου, όταν η ενζυματική δραστηριότητα είναι ανεπαρκής για τα προϊόντα PCR, μπορεί να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Cho et al. 2014). Ωστόσο, η αιτία για μια τέτοια διαφορά θα πρέπει να διευκρινιστεί.

Οι σημειακές μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12, 13 και 61 σε ένα από τα τρία γονίδια RAS έχουν βρεθεί σε ποσοστό 18-52% των θυλακιδίων καρκινωμάτων (Motoi et al. 2000), και οι μεταλλάξεις NRAS στο κωδικόνιο 61 ήταν οι πιο κοινές. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες (Nikiforova et al. 2003b). Στην παρούσα μελέτη, ο αριθμός των δειγμάτων με θυλακιδώδη καρκίνο του θυρεοειδούς ήταν περιορισμένος, εμποδίζοντας την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Οι μεταλλάξεις των γονιδίων RAS έχουν αναφερθεί σε ανθρώπινους καρκίνους του θυρεοειδούς τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* πειράματα (Vasko et al. 2003). Ωστόσο, η συχνότητα και η εξειδίκευση των μεταλλάξεων RAS είναι αρκετά μεταβλητή στη βιβλιογραφία. Ένας σημαντικός περιορισμός για τη μελέτη των μεταλλάξεων RAS σε όγκους του θυρεοειδούς είναι η χρήση διαφορετικών μεθόδων ανίχνευσης. Οι πιο δημοφιλείς είναι η απευθείας αλληλούχηση του γονιδιωματικού DNA και η τεχνική πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP) (Guerra et al. 2014). Η απευθείας αλληλούχηση γίνεται αποδεκτή ως η πρότυπη μέθοδος για την ανίχνευση γενετικών αλλαγών και μπορεί να ανιχνεύσει μεταλλάξεις σε οποιαδήποτε θέση του γονιδίου. Ωστόσο, άλλες μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού που περιλαμβάνουν την αλληλούχηση με βάση τη σύνθεση (pyrosequencing), χρωματομετρικές δοκιμές (colorimetric assays) και PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR) χρησιμοποιούνται κυρίως για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 600 του γονιδίου BRAF (Cho et al. 2014).

## 5. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Με βάση το γεγονός ότι οι γενετικές μεταλλάξεις που έχουν παρατηρηθεί στον καρκίνο του θυρεοειδούς είναι αμοιβαία αποκλειόμενες, είναι αναγκαίο η μελέτη αυτή να επεκταθεί, ώστε να συμπεριληφθούν επιπρόσθετες μεταλλάξεις των γονιδίων RAS (κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου HRAS και κωδικόνια 12, 13 και 61 του γονιδίου NRAS), του γονιδίου BRAF (κωδικόνιο 600), καθώς και πιθανές γενετικές αναδιατάξεις μεταξύ των RET / PTC και PAX8 / PPAR $\gamma$ . Ταυτόχρονα, για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων είναι απαραίτητο να αυξηθεί ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων και των διαφορετικών τύπων του καρκίνου του θυρεοειδούς.

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Συνομογραφίες	Αγγλική επεξήγηση	Ελληνική επεξήγηση
ATC	Anaplastic thyroid cancer	Αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B	Πρωτο-ογκογονίδιο B-Raf
CEA	Carcinoembryonic antigen	Καρκινοεμβρυονικού αντιγόνου
CK-19	cytokeratin-19	Ανοσοϊστοχημικός δείκτης
Ct	calcitonin	Καλσιτονίνη
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβο(ζο)νουκλεϊκό οξύ
DTC	Differentiated thyroid cancer	Διαφοροποιημένος καρκίνος του θυρεοειδούς
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
ERK	Extracellular signal-regulated kinase	Κινάση ρυθμιζόμενη από εξωκυτταρικό σήμα
FMTC	Familiar medullary thyroid cancer	Οικογενής μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς
FNAB	Fine needle aspiration biopsy	Παρακέντηση βιοψίας με λεπτή βελόνη
FTA	Follicular thyroid adenoma	Θυλακιώδες αδένωμα του θυρεοειδούς
FTC	Follicular thyroid cancer	Θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς
FVPTC	Follicular variant of papillary thyroid cancer	Θυλακιώδης παραλλαγή του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς
GAP	GTPase activating protein	Πρωτεΐνη που ρυθμίζει GTPάση
GDP	Guanosine diphosphate	Διφωσφορική γουανοσίνη
GEF	Guanine nucleotide exchange factor	Παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης
GTP	Guanosine-5'-triphosphate	5'-τριφωσφορική γουανοσίνη
HBME-1	Hector Battifora mesothelial cell antibody	Ανοσοϊστοχημικός δείκτης
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	Ογκογονίδιο HRAS
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	Ογκογονίδιο KRAS
MAPK	Mitogen activated protein kinase	Σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK
MEK	ERK kinase (MAP kinase kinase)	ERK κινάση
MEN2	Multiple endocrine neoplasia type 2	Πολλαπλή ενδοκρινική νεοπλασία τύπου 2
MTC	Medullary thyroid cancer	Μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς
NIH	National Institute of Health	Εθνικό ινστιτούτο Υγείας
NRAS	Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene	Ογκογονίδιο NRAS
PAX8/PPARγ	Paired box gene 8/Peroxisome proliferator-activated receptor	Paired box γονίδιο 8/υποδοχέας του υπεροξεισώματος PPARγ
PDTC	Poorly-differentiated thyroid cancer	Χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνος του θυρεοειδούς
PI3/AKT	Phosphatidylinositol 3-kinase protein kinase B	Σηματοδοτικό μονοπάτι PI3/AKT
PTC	Papillary thyroid cancer	Θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς
RalGEF	Ral guanine nucleotide exchange factor	Σηματοδοτικό μονοπάτι RalGEF
RAS	Rat sarcoma viral oncogene	Ογκογονίδια RAS
RET	Rearranged during Transfection proto-oncogene	Πρωτο-ογκογονίδιο RET
RET/PTC	Rearrangement during transfection/PTC	Αναδιάταξη κατά τη διάρκεια



T3	triiodothyronine	επιμόλυνσης γονίδιο/PTC Τριϊωδοθυρονίνη
T4	thyroxine	Θυροξίνη
TRH	Thyrotropin-releasing hormone	Θυρεοειδοεκλυτίνη
TSH	Thyroid stimulating hormone	Θυρεοειδοτρόπος ορμόνη
WHO	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
µg/l	Microgram per liter	Μικρογραμμάριο ανά λίτρο
µl	Microliter	Μικρόλιτρο
µm	Micrometer	Μικρόμετρο
M	Molarity	Μολ
mg	Milligram	Χιλιοστόγραμμα
mg/ml	Milligram per mililiter	Χιλιοστόγραμμα ανά χιλιοστόλιτρο
min	Minute	Λεπτό
ml	Milliliter	Χιλιοστόλιτρο
pH	The negative logarithm of the hydrogen ion concentration	Αρνητικός λογάριθμος της συγκέντρωσης ιόντων υδρογόνου
°C	Degrees Celsius	Βαθμοί Κελσίου
V	Volts	βόλτ

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abe, T., Suzuki, M., Shimizu, K., Shinagawa, N., Oizumi, S., Matsuno, Y., Miyazaki, M., Tanino, M., Tanaka, S., Nishimura, M. (2014). Anaplastic transformation of papillary thyroid carcinoma in multiple lung metastases presenting with a malignant pleural effusion: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, 8: 460-464.
- Adeniran, A. J., Zhu, Z., Gandhi, M., Steward, D. L., Fidler, J. P., Giordano, T. J., Biddinger, P. W., Nikiforov, Y. E. (2006). Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol*, 30(2): 216-222.
- Albores-Saavedra, J., Henson, D. E., Glazer, E., Schwartz, A. M. (2007). Changing patterns in the incidence and survival of thyroid cancer with follicular phenotype – papillary, follicular, and anaplastic: a morphological and epidemiological study. *Endocr Pathol*, 18(1): 1-7.
- Altekruse, S., Kosary, C., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Waldron, W. (2010). Seer Cancer Statistics Review, 1975-2007, National Cancer Institute. Bethesda (MD). (<http://www.seercancer.gov/crs/1975/>)
- American Cancer Society. (2014). Cancer facts & figures, 2014. Atlanta (GA), USA. American Cancer Society, 2014: 21.
- American Thyroid Association Guidelines Task Force, Kloos, R. T., Eng, C., Evans, D. B., Francis, G. L., Gagel, R. F., Gharib, H., Moley, J. F., Pacini, F., Ringel, M. D., Schlumberger, M., Wells Jr, S. A. (2009). Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid*, 19(6): 565-612.
- Are, C., Shaha, A. R. (2006). Anaplastic thyroid carcinoma: Biology, pathogenesis, prognostic factors, and treatment approaches. *Ann Surg Oncol*, 13: 453-464.
- Baloch, Z. W., LiVolsi, V. A. (2001). Fine-needle aspiration of thyroid nodules: past, present, and future. *Endocr Pract*, 10: 234-241.
- Begum, S., Rosenbaum, E., Henrique, R., Cohen, Y., Sidransky, D., Westra, W. H. (2004). BRAF mutations in anaplastic thyroid carcinoma: implications for tumor origin, diagnosis and treatment. *Mod Pathol*, 17(11): 1359-1363.
- Bockhorn, M., Frilling, A., Kalinin, V., Schrader, S., Broelsch, C. E. (2000). Absence of H- and K-ras oncogene mutations in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 108: 49-53.
- Bongarzone, I., Pierotti, M. A. (2003). The molecular basis of thyroid epithelial tumorigenesis. *Tumori*, 89: 514-516.
- Borst, P. (2005). Ethidium DNA Agarose Gel Electrophoresis: How it started. *IUBMB Life*, 57(11): 745-747.
- Bos, J. L. (1989). Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*, 49: 4682-4689.
- Bounacer, A., McGregor, A., Skinner, J., Bond, J., Poghosyan, Z., Wynford-Thomas, D. (2004). Mutant RAS-induced proliferation of human thyroid epithelial cells requires three effector pathways. *Oncogene*, 23: 7839-7845.

- Bradly, D. P., Reddy, V., Prinz, R. A., Guttuso, P. (2009). Incidental papillary carcinoma in patients treated surgically for benign thyroid diseases. *Surgery*, 146: 1099-1104.
- Brennan, M. D., Bergstralh, E. J., van Heerden, J. A., McConahey, W. M. (1991). Follicular thyroid cancer treated at the Mayo Clinic, 1946 through 1970: initial manifestations, pathologic findings, therapy, and outcome. *Mayo Clin Proc*, 66(1): 11-22.
- Bufalo, N. F., Leite, J. L., Guilhen, A. C. T., Morari, E. C., Granja, F., Assumpção, L. V., Ward, L. S. (2006). Smoking and susceptibility to thyroid cancer: an inverse association with CYP1A1 allelic variants. *Endocrine-Related Cancer*, 13(4): 1185-1193.
- Burgess, J. R. (2002). Temporal trends for thyroid carcinoma in Australia: an increasing incidence of papillary thyroid carcinoma (1982-1997). *Thyroid*, 12: 141-149.
- Burgess, J. R., Tucker, P. (2006). Incidence trends for papillary thyroid carcinoma and their correlation with thyroid surgery and thyroid fine-needle aspirate cytology. *Thyroid*, 16(1): 47-53.
- Carta, C., Moretti, S., Passeri, L., Barbi, F., Avenia, N., Cavaliere, A., Monacelli, M., Macchiarulo, A., Santeusano, F., Tartaglia, M., Puxeddu, E. (2006). Genotyping of an Italian papillary thyroid carcinoma cohort revealed high prevalence of BRAF mutations, absence of RAS mutations and allowed the detection of a new mutation of BRAF oncoprotein (BRAFFV599Ins). *Clin Endocrinol*, 64: 105-109.
- Castellano, E., Santos, E. (2011). Functional specificity of RAS isoforms: So similar but so different. *Genes Cancer*, 2: 216-231.
- Castro, P., Rebocho, A. P., Soares, R. J., Magalhães, J., Roque, L., Trovisco, V., Vieira de Castro, I., Cardoso-de-Oliveira, M., Fonseca, E., Soares, P., Sobrinho-Simões, M. (2006). PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(1): 213-220.
- Chan, J. K. C. (2001). Tumors of the thyroid and parathyroid glands. In: Diagnostic histopathology of tumors, vol. 2. FLETCHER CDM. Churchill Livingstone, London, pp. 959-1038.
- Chang, E. H., Gonda, M. A., Ellis, R. W., Scolnick, E. M., Lowy, D. R. (1982). Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 79(16): 4848-4852.
- Chen, A. Y., Jemal, A., Ward, E. M. (2009). Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988- 2005. *Cancer*, 115(16): 3801-3807.
- Chen, J., Tward, J. D., Shrieve, D. C., Hitchcock, Y. J. (2008). Surgery and radiotherapy improves survival in patients with anaplastic thyroid carcinoma: Analysis of the surveillance, epidemiology, and end results 1983-2002. *Am J Clin Oncol*, 31(5): 460-464.
- Cheung, C. C., Carydis, B., Ezzat, S., Bedard, Y. C., Asa, S. L. (2001). Analysis of RET/PTC gene rearrangements refines the fine needle aspiration diagnosis of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(5): 2187-2190.
- Chiosea, S., Nikiforova, M., Zuo, H., Ogilvie, J., Gandhi, M., Seethala, R. R., Otori, N. P., Nikiforov, Y. (2009). A novel complex BRAF mutation detected in a solid variant of papillary thyroid carcinoma. *Endocr Pathol*, 20(2): 122-126.

- Cho, U., Oh, W. J., Bae, J. S., Lee, S., Lee, Y. S., Park, G. S., Lee, Y. S., Jung, C. K. (2014). Clinicopathological Features of Rare BRAF Mutations in Korean Thyroid Cancer Patients. *J Korean Med Sci*, 29: 1054-1060.
- Chrisoulidou, A., Boudina, M., Tzemailas, A., Doumala, E., Iliadou, K. P., Patakiouta, F., Pazaitou-Panayiotou, K. (2011). Histological subtype is the most important determinant of survival in metastatic papillary thyroid cancer. *Thyroid Research*, 4: 12-16.
- Ciampi, R., Knauf, J. A., Kerler, R., Gandhi, M., Zhu, Z., Nikiforova, M. N., Rabes, H. M., Fagin, J. A., Nikiforov, Y. E. (2005). Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest*, 115(1): 94-101.
- Ciampi, R., Nikiforov, Y. E. (2005). Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors. *Endocr Pathol*, 16(3): 163-172.
- Citri, A., Yarden, Y. (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(7): 505-516.
- Clayman, G. L., el-Baradie, T. S. (2003). Medullary thyroid cancer. *Otolaryngol Clin North Am*, 36: 91-105.
- Cohen, Y., Xing, M., Mambo, E., Guo, Z., Wu, G., Trink, B., Beller, U., Westra, W. H., Ladenson, P. W., Sidransky, D. (2003). BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 95(8): 625-627.
- Cooper, D. S., Doherty, G. M., Haugen, B. R., Kloos, R. T., Lee, S. L., Mandel, S. J., Mazzaferri, E. L., McIver, B., Pacini, F., Schlumberger, M., Sherman, S. I., Steward, D. L., Tuttle, R. M., American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. (2009). Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*, 19(11): 1167-1214.
- Cunha, L. L., Ferreira, R. C., Marcello, M. A., Vassallo, J., Ward, L. S. (2011). Clinical and pathological implications of concurrent autoimmune disorders and papillary thyroid cancer. *Journal of thyroid research*, vol. 2011, Article ID 387062, pp. 1-13.
- Davies, L., Welch, H. G. (2006). Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *Journal of the American Medical Association*, 295(18): 2164-2167.
- Dean, D. S., Hay, D. H. (2000). Prognostic indicators in differentiated thyroid carcinoma. *Cancer Control*, 7: 229-239.
- DeLellis, R. A., Lloyd, R. V., Heitz, P. U., Eng, C. (2004). Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. In: Kleihues, P., Sobrin, L. H. (eds.), World health organization. Classification of Tumours. Lyon: IARC Press.
- Deshpande, H. A., Roman, S., Sosa, J. A. (2013). New targeted therapies and other advances in the management of anaplastic thyroid cancer. *Curr Opin Oncol*, 25: 44-49.
- Duman, B. B., Kara, I. O., Uğuz, A., Ates, T. B. (2014). Evaluation of PTEN, PI3K, MTOR, and KRAS expression and their clinical and prognostic relevance to differentiated thyroid carcinoma. *Contemp Oncol (Pozn)*, 18(4): 234-240.
- Dwight, T., Thoppe, S. R., Foukakis, T., Lui, W. O., Wallin, G., Höög, A., Frisk, T., Larsson, C., Zedenius, J. (2003). Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated

- receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(9): 4440-4445.
- Esapa, C. T., Johnson, S. J., Kendall-Taylor, P., Lennard, T. W., Harris, P. E. (1999). Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 50(4): 529-535.
- Eustatia-Rutten, C. F., Corssmit, E. P., Biermasz, N. R., Pereira, A. M., Romijn, J. A., Smit, J. W. (2006). Survival and death causes in differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(1): 313-319.
- Fallahi, P., Giannini, R., Miccoli, P., Antonelli, A., Basolo, F. (2014). Molecular diagnostics of fine-needle aspiration for the presurgical screening of thyroid nodules. *Current Genomics*, 15: 171-177.
- Fawcett, D., Jensch, R. (2002). Bloom & Fawcett's Concise Histology. Arnold Publishers, New York, pp. 257-258.
- Figge, L. (2000). Molecular pathogenesis of thyroid cancer. In: Thyroid Cancer: A Comprehensive Guide to Clinical Management. Wartofsky, L. (ed). Humana Press, Totowa New Jersey, pp. 57-75.
- Frank-Raue, K., Rondot, S., Raue, F. (2010). Molecular genetics and phenomics of RET mutations: impact on prognosis of MTC. *Mol Cell Endocrinol*, 30: 2-7.
- Franssila, K. O., Ackerman, L. V., Brown, C. L., Hedinger, C. E. (1985). Follicular carcinoma. *Sem Diagn Pathol*, 2: 101-122.
- French, C. A., Alexander, E. K., Cibas, E. S., Nose, V., Laguette, J., Faquin, W., Garber, J., Moore Jr, F., Fletcher, J. A., Larsen, P. R., Kroll, T. G. (2003). Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer. *Am J Pathol*, 162(4): 1053-1060.
- Friday, B. B., Adjei, A. A. (2008). Advances in Targeting the Ras/Raf/MEK/ErkMitogen-Activated Protein Kinase Cascade with MEK Inhibitors for Cancer Therapy. *Clin Cancer Res*, 14(2): 342-346.
- Garcia-Rostan, G., Zhao, H., Camp, R. L., Pollan, M., Herrero, A., Pardo, J., Wu, R., Carcangiu, M. L., Costa, J., Tallini, G. (2003). Ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol*, 21(17): 3226-3235.
- Gomez Saez, J. M. (2010). Diagnostic usefulness of tumormarkers in the thyroid cytological samples extracted by fine-needle aspiration biopsy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 10: 47-56.
- Goutas, N., Vlachodimitropoulos, D., Bouka, M., Lazaris, A. C., Nasioulas, G., Gazouli, M. (2008). BRAF and K-RAS Mutation in a Greek Papillary and Medullary Thyroid Carcinoma Cohort. *Anticancer Research*, 28: 305-308.
- Grebe, S. K., Hay, I. D. (1995). Follicular thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 24(4): 761-801.
- Grieco, M., Santoro, M., Berlingieri, M. T., Melillo, R. M., Donghi, R., Bongarzone, I., Pierotti, M. A., Della Porta, G., Fusco, A., Vecchio, G. (1990). PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell*, 60(4): 557-563.

- Grogan, H. R., Mitmaker, J. E., Clark, H. O. (2010). The Evolution of Biomarkers in Thyroid Cancer-From Mass Screening to a Personalized Biosignature. *Cancers*, 2: 885-912.
- Guth, S., Theune, U., Aberle, J., Galach, A., Bamberger, C. M. (2009). Very high prevalence of thyroid nodules detected by high frequency (13 MHz) ultrasound examination. *Eur J Clin Invest*, 39(8): 699-706.
- Guerra, A., Carrano, M., Angrisani, E., Puzziello, A., Izzo, G., Di Crescenzo, V., Vatrella, A., Vitale, M. (2014). Detection of RAS mutation by pyrosequencing in thyroid cytology samples. *International Journal of Surgery*, 12: S91-S94
- Guerra, A., Di Crescenzo, V., Garzi, A., Cinelli, M., Carlomagno, C., Pepe, S., Zeppa, P., Tonacchera, M., Vitale, M. (2013). Diagnostic utility of BRAFV600E mutation testing in thyroid nodules in elderly patients. *BMC Surg*, 13 (Suppl. 2): S37.
- Hall, A., Marshall, C. J., Spurr, N. K., Weiss, R. A. (1983). Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the RAS gene family located on chromosome 1. *Nature*, 303(5916): 396-400.
- Handkiewicz-Junak, D., Czarniecka, A., Jarzab, B. (2010). Molecular prognostic markers in papillary and follicular thyroid cancer: Current status and future directions. *Mol Cell Endocrinol*, 322(1-2): 8-28.
- Harness, J. K., Thompson, N. W., McLeod, M. K., Eckhauser, F. E., Lloyd, R. V. (1984). Follicular carcinoma of the thyroid gland: trends and treatment. *Surgery*, 96(6): 972-980.
- Hsu, K., Yu, X., Audhya, A. W., Jaume, J. C., Lloyd, V. R., Miyamoto, S., Prolla, A. T., Chen, H. (2014). Novel Approaches in Anaplastic Thyroid Cancer Therapy. *The Oncologist*, 19: 1148-1155.
- Harvey, J. J. (1964). An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature*, 204(4963): 1104-1105.
- Hedinger, C., Williams, E. D., Sobin, L. H. (1989). The WHO histological classification of thyroid tumors: A commentary on the second edition. *Cancer*, 63: 908-911.
- Henis, Y. I., Hancock, J. F., Prior, I. A. (2009). Ras acylation, compartmentalization and signaling nanoclusters (Review). *Mol Membr Biol*, 26: 80-92.
- Hou, P., Liu, D., Xing, M. (2007). Functional characterization of the T1799-1801del and A1799-1816ins BRAF mutations in papillary thyroid cancer. *Cell Cycle*, 6(3): 377-379.
- Hynes, N. E., Lane, H. A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 5(5): 341-354.
- Jarzab, B., Handkiewicz-Junak, D., Wloch, J. (2005). Juvenile differentiated thyroid carcinoma and the role of radioiodine in its treatment: a qualitative review. *Endocr Relat Cancer*, 12: 773-803.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61(2): 69-90.
- Jhiang, S. M., Sagartz, J. E., Tong, Q., Parker-Thornburg, J., Capen, C. C., Cho, J. Y., Xing, S., Ledent, C. (1996). Targeted expression of the RET/PTC1 oncogene induces papillary thyroid carcinomas. *Endocrinology*, 137(1): 375-378.

- Jung, C. K., Little, M. P., Lubin, J. H., Brenner, A. V., Wells Jr, S. A., Sigurdson, A. J., Nikiforov, Y. E. (2014). The increase in thyroid cancer incidence during the last four decades is accompanied by a high frequency of BRAF mutations and a sharp increase in RAS mutations. *J Clin Endocrinol Metab*, 99: E276-E285.
- Kameyama, K., Takami, H. (2004). Medullary thyroid carcinoma: nationwide Japanese survey of 634 cases in 1996 and 271 cases in 2002. *Endocr J*, 51: 453-456.
- Karga, H., Lee, J. K., Vickery Jr, A. L., Thor, A., Gaz, R. D., Jameson, J. L. (1991). Ras oncogene mutations in benign and malignant thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab*, 73(4): 832-836.
- Kebebew, E., Greenspan, F. S., Clark, O. H., Woeber, K. A., McMillan, A. (2005). Anaplastic thyroid carcinoma: Treatment outcome and prognostic factors. *Cancer*, 103(7): 1330-1335.
- Kilfoy, B. A., Zheng, T., Holford, T. R., Han, X., Ward, M. H., Sjodin, A., Zhang, Y., Bai, Y., Zhu, C., Guo, G. L., Rothman, N., Zhang, Y. (2009). International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973-2002. *Cancer Causes and Control*, 20(5): 525-531.
- Kimura, E. T., Nikiforova, M. N., Zhu, Z., Knauf, J. A., Nikiforov, Y. E., Fagin, J. A. (2003). High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res*, 63(7): 1454-1457.
- Kirsten, W. H., Schauf, V., McCoy, J. (1970). Properties of a murine sarcoma virus. *Bibl Haematol*, 36: 246-249.
- Knauf, J. A., Ma, X., Smith, E. P., Zhang, L., Mitsutake, N., Liao, X. H., Refetoff, S., Nikiforov, Y. E., Fagin, J. A. (2005). Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res*, 65(10): 4238-4245.
- Krasinskas, M. A. (2011). EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma. *Pathology Research International*, vol. 2011, Article ID 932932, 6 pages.
- Kroll, T. G., Sarraf, P., Pecciarini, L., Chen, C. J., Mueller, E., Spiegelman, B. M., Fletcher, J. A. (2000). PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science*, 289(5483): 1357-1360.
- Leboulleux, S., Baudin, E., Travagli, J., Schlumberger, M. (2004). Medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol*, 61: 299-310.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*, 62(e3923): 1-5.
- Leenhardt, L., Grosclaude, P., Cherie-Challine, L. (2004). Increased incidence of thyroid carcinoma in france: a true epidemic or thyroid nodule management effects? Report from the French Thyroid Cancer Committee. *Thyroid*, 14: 1056-1060.
- Liebner, A. D., Shah, H. M. (2011). Thyroid cancer: pathogenesis and targeted therapy. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 2(5): 173-195.
- Lin, J. D., Chao, T. C., Chou, S. C., Hsueh, C. (2004). Papillary thyroid carcinomas with lung metastases. *Thyroid*, 14: 1091-1096.



- Liska, J., Altanerova, V., Galbavy, Š., Stvr̃tiina, S., Brtko, J. (2005). Thyroid tumors: Histological Classification and Genetic Factors Involved in the Development of Thyroid Cancer. *Endocrine Regulations*, 39: 73-83.
- Liu, X. H., Chen, G. G., Vlantis, A. C., Van Hasselt, C. A., (2009). Iodine mediated mechanisms and thyroid carcinoma. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 46(5-6): 302-318.
- Liu, J., Singh, B., Tallini, G., Carlson, D. L., Katabi, N., Shaha, A., Tuttle, R. M., Ghossein, R. A. (2006). Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a clinicopathologic study of a problematic entity. *Cancer*, 107(6): 1255-1264.
- LiVolsi, V. A. (2011). Papillary thyroid carcinoma: an update. *Mod Pathol*, 24(Suppl 2): S1-9.
- Lloyd, R. V., Buehler, D., Khanafshar, E. (2011). Papillary Thyroid Carcinoma Variants. *Head and Neck Pathol*, 5: 51-56.
- Malumbres, M., Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*, 3(6): 459-465.
- Manenti, G., Pilotti, S., Re, F. C., Della Porta, G., Pierotti, M. A. (1994). Selective activation of ras oncogenes in follicular and undifferentiated thyroid carcinomas. *Eur J Cancer*, 30A(7): 987-993.
- Marshall, C. J., Hall, A., Weiss, R. A. (1982). A transforming gene present in human sarcoma cell lines. *Nature*, 299(5879): 171-173.
- Martelli, M. L., Iuliano, R., Le Pera, I., Sama, I., Monaco, C., Cammarota, S., Kroll, T., Chiarotti, L., Santoro, M., Fusco, A. (2002). Inhibitory effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on thyroid carcinoma cell growth. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 4728-4735.
- Mazzaferri, E.L. (1999). An overview of the management of papillary and follicular thyroid carcinoma. *Thyroid*, 9: 421-427.
- McCubrey, J. A., Steelman, L.S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Montalto, G., Cervello, M., Nicoletti, F., Fagone, P., Malaponte, G., Mazzarino, M.C., Candido, S., Libra, M., Basecke, J., Mijatovic, S., Maksimovic-Ivanic, D., Milella, M., Tafuri, A., Cocco, L., Evangelisti, C., Chiarini, F., Martelli, A. M. (2012). Mutations and deregulation of RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT/mTOR cascades which alter therapy response. *Oncotarget*, 3: 954-987.
- McIver, B., Grebe, S. K., Eberhardt, N. L. (2004). The PAX8/PPAR gamma fusion oncogene as a potential therapeutic target in follicular thyroid carcinoma. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 4: 221-234.
- Mendoza, M. C., Er, E. E., Blenis, J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways : cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci*, 36: 320-328.
- Miccoli, P. (2014). Application of Molecular Diagnostics to the Evaluation of the Surgical Approach to Thyroid Cancer. *Current Genomics*, 15: 184-189.
- Miller, M. S., Miller, L. D. (2011). RAS Mutations and oncogenesis: Not all RAS mutations are created equally. *Front Genet*, 2: 100.
- Mitsiades, C. S., Negri, J., McMullan, C., McMillin, D. W., Sozopoulos, E., Fanourakis, G., Voutsinas, G., Tseleni-Balafouta, S., Poulaki, V., Batt, D., Mitsiades, N. (2007).

- Targeting BRAF V600E in thyroid carcinoma: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther*, 6(3): 1070-1078.
- Moo-Young, T. A., Traugott, A. L., Moley, J. F. (2009). Sporadic and familial medullary thyroid carcinoma: state of the art. *Surg Clin North Am*, 89: 1193-1204.
- Mond, M., Alexiadis, M., Fuller, P. J., Gilfillan, C. (2014). Mutation profile of differentiated thyroid tumours in an Australian urban population. *Internal Medicine Journal*, 44: 727-734.
- Morris, L. G., Myssiorek, D. (2010). Improved detection does not fully explain the rising incidence of well-differentiated thyroid cancer: a population-based analysis. *Am J Surg*, 200: 454-461.
- Motoi, N., Sakamoto, A., Yamochi, T., Horiuchi, H., Motoi, T., Machinami, R. (2000). Role of ras mutation in the progression of thyroid carcinoma of follicular epithelial origin. *Pathol Res Pract*, 196(1): 1-7.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51(1): 263-273.
- Namba, H., Rubin, S. A., Fagin, J. A. (1990). Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol*, 4(10): 1474-1479.
- Nikiforov, Y. E. (2002). RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocr Pathol*, 13(1): 3-16.
- Nikiforov, Y. E. (2010a). Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid. Chapter 7, Thyroid Tumors: Classification, Staging, and General Considerations, pp. 108-111.
- Nikiforov, Y. E. (2010b). Is ionizing radiation responsible for the increasing incidence of thyroid cancer? *Cancer*, 116(7): 1626-1628.
- Nikiforov, Y. E. (2011). Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Arch Pathol Lab Med*, 135: 569-577.
- Nikiforov, Y. E., Nikiforova, M. N. (2011). Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol*, 7: 569-580.
- Nikiforov, Y. E., Yip, L., Nikiforova, M. N. (2013). New strategies in diagnosing cancer in thyroid nodules: impact of molecular markers. *Clin Cancer Res*, 19(9): 2283-2288.
- Nikiforova, M. N., Biddinger, P. W., Caudill, C. M., Kroll, T. G., Nikiforov, Y. E. (2002). PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol*, 26(8): 1016-1023.
- Nikiforova, M. N., Kimura, E. T., Gandhi, M., Biddinger, P. W., Knauf, J. A., Basolo, F., Zhu, Z., Giannini, R., Salvatore, G., Fusco, A., Santoro, M., Fagin, J. A., Nikiforov, Y. E. (2003, a) BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(11): 5399-5404.
- Nikiforova, M. N., Lynch, R. A., Biddinger, P. W., Alexander, E. K., Dorn 2<sup>nd</sup>, G. W., Tallini, G., Kroll, T. G., Nikiforov, Y. E. (2003b). RAS point mutations and PAX8-PPAR

gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(5): 2318-2326.

- Nikiforova, M. N., Nikiforov, Y. E. (2008). Molecular genetics of thyroid cancer: implications for diagnosis, treatment and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn*, 8(1): 83-95.
- Nikiforova, M. N., Nikiforov, Y. E. (2009). Molecular diagnostics and predictors in thyroid cancer. *Thyroid*, 19: 1351-1361.
- Nikiforova, M. N., Kimura, E. T., Gandhi, M., Biddinger, P. W., Knauf, J. A., Basolo, F., Zhu, Z., Giannini, R., Salvatore, G., Fusco, A., Santoro, M., Fagin, J. A., Nikiforov, Y. E. (2003). BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 5399-5404.
- Omerovic, J., Laude, A. J., Prior, I. A. (2007). Ras proteins: paradigms for compartmentalized and isoform-specific signalling. *Cell Mol Life Sci*, 64: 2575-2589.
- Pacini, F., Castagna, M. G., Cipri, C., Schlumberger, M. (2010). Medullary thyroid carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 22: 475-485.
- Pappoti, M., Torchio, B., Grassi, L., Favero, A., Bussolati, G. (1996). Poorly differentiated oxyphilic (Hürthle cell) carcinomas of the thyroid. *Am J Surg Pathol*, 20: 686-694.
- Patrinou, G. P., Ansorge, W. J. (2009). Molecular diagnostics. Academic Press, 2nd edition, pp.87-88.
- Pazaitou-Panayiotou, K., Iliadou, K. P., Mandanas, S., Vasileiadis, T., Mitsakis, P., Tziomalos, K., Alevizaki, M., Patakiouta, F. (2015). Papillary Thyroid Carcinomas in Patients under 21 Years of Age: Clinical and Histologic Characteristics of Tumors  $\leq 10$  mm. *J Pediatr*, 166(2): 451-456.e2.
- Pazaitou-Panayiotou, K., Kaprara, A., Boudina, M., Georgiou, E., Drimonitis, A., Vainas, I., Raptou, E., Galaktidou, G. (2005). Thyroid carcinoma in children and adolescents: presentation, clinical course, and outcome of therapy in 23 children and adolescents in Northern Greece. *Hormones*, 4(4): 213-220.
- Pellegriti, G., De Vathaire, F., Scillo, C., Attard, M., Giordano, C., Arena, S., Dardanoni, G., Frasca, F., Malandrino, P., Vermiglio, F., Previtera, D. M., D'Azzò, G., Trimarchi, F., Vigneri, R. (2009). Papillary thyroid cancer incidence in the volcanic area of sicily. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(22): 1575-1583.
- Pennelli, G., Galuppini, F., Barollo, S., Cavedon, E., Bertazza, L., Fassan, M., Guzzardo, V., Pelizzo, M. R., Rugge, M., Mian, C. (2015). The PDCD4/miR-21 pathway in medullary thyroid carcinoma. *Human Pathology*, 46(1): 50-57.
- Pinchot, S. N., Sippel, R. S., Chen, H. (2008). Multi-targeted approach in the treatment of thyroid cancer. *Ther Clin Risk Manag*, 4: 935-947.
- Pizzolanti, G., Russo, L., Richiusa, P., Bronte, V., Nuara, R. B., Rodolico, V., Amato, M. C., Smeraldi, L., Sisto, P. S., Nucera, M., Bommarito, A., Citarrella, R., Lo Coco, R., Cabibi, D., Lo Coco, A., Frasca, F., Gulotta, G., Latteri, M. A., Modica, G., Galluzzo, A., Giordano, C. (2007). Fine-needle aspiration molecular analysis for the diagnosis of papillary thyroid carcinoma through BRAF(V600E) mutation and RET/PTC rearrangement. *Thyroid*, 17(11): 1109-1115.

- Powell Jr, D. J., Russell, J., Nibu, K., Li, G., Rhee, E., Liao, M., Goldstein, M., Keane, W. M., Santoro, M., Fusco, A., Rothstein, J. L. (1998). The RET/PTC3 oncogene: metastatic solid-type papillary carcinomas in murine thyroids. *Cancer Res*, 58(23): 5523-5528.
- Prior, I. A., Lewis, D. P., Mattos, C. (2012). A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res*, 72: 2457-2467.
- Quinlan, M. P., Settleman, J. (2009). Isoform-specific ras functions in development and cancer. *Future Oncol*, 5: 105-116.
- Radkay, L. A., Chiosea, S. I., Seethala, R. R., Hodak, S. P., LeBeau, S. O., Yip, L., McCoy, K. L., Carty, S. E., Schoedel, K. E., Nikiforova, M. N., Nikiforov, Y. E., Ohori, N. P. (2014). Thyroid Nodules With KRAS Mutations Are Different From Nodules With NRAS and HRAS Mutations With Regard to Cytopathologic and Histopathologic Outcome Characteristics. *Cancer Cytopathol*, 122(12): 873-882.
- Ramsden, J. D. (2000). Angiogenesis in the thyroid gland. *J Endocrinol*, 166: 475-480.
- Renehan, A. G., Soerjomataram, I., Tyson, M., Egger, M., Zwahlen, M., Coebergh, J. W., Buchan, I. (2010). Incident cancer burden attributable to excess body mass index in 30 European countries. *International Journal of Cancer*, 126(3): 692-702.
- Ries, L. A. G., Young, J. L., Keel, G. E., Eisner, M. P., Lin, Y. D., Horner, M. J. (2007). SEER Survival monograph: Cancer Survival Among Adults. In: U.S. SEER Program, 1988-2001, (ed.), Patient and Tumor Characteristics. Bethesda (MD): National Cancer Institute, SEER Program. NIH Pub. No. 07-6215. pp. 217.
- Rivera, M., Ricarte-Filho, J., Knauf, J., Shaha, A., Tuttle, M., Fagin, A. J., Ghossein, A. R. (2010a). Molecular genotyping of papillary thyroid carcinoma follicular variant according to its histological subtypes (encapsulated vs infiltrative) reveals distinct BRAF and RAS mutation patterns. *Modern Pathology*, 23: 1191-1200.
- Rivera, M., Ricarte-Filho, J., Patel, S., Tuttle, M., Shaha, A., Shah, J. P., Fagin, J. A., Ghossein, R. A. (2010b). Encapsulated thyroid tumors of follicular cell origin with high grade features (high mitotic rate/tumor necrosis): a clinicopathologic and molecular study. *Hum Pathol*, 41(2): 172-180.
- Rosai, J., Carcangiu, M. L., Delellis, R. A. (1992). Tumors of the thyroid gland. In: Rosai, J., Sobin, L. H. (eds). Atlas of Tumor Pathology. Armed Forces Institute of Pathology: Washington, D.C., New York. Vol. 5. pp. 161-182.
- Roti, E., Rossi, R., Trasforini, G., Bertelli, F., Ambrosio, M. R., Busutti, L., Pearce, E. N., Braverman, L. E., Degli Uberti, E. C. (2006). Clinical and histological characteristics of papillary thyroid microcarcinoma: results of a retrospective study in 243 patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(6): 2171-2178.
- Roy, M., Chen, H., Sippel, R. S. (2013). Current understanding and management of medullary thyroid cancer. *Oncologist*, 18: 1093-1100.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839): 487-491.
- Salter, K. D., Andersen, P. E., Cohen, J. I., Schuff, K. G., Lester, L., Shindo, M. L., Sauer, D., Gross, N. D. (2010). Central node metastases in papillary thyroid carcinoma based

- on tumor histologic type and focality. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 136: 692-696.
- Santoro, M., Chiappetta, G., Cerrato, A., Salvatore, D., Zhang, L., Manzo, G., Picone, A., Portella, G., Santelli, G., Vecchio, G., Fusco, A. (1996). Development of thyroid papillary carcinomas secondary to tissue-specific expression of the RET/PTC1 oncogene in transgenic mice. *Oncogene*, 12(8): 1821-1826.
- Santoro, M., Dathan, N. A., Berlingieri, M. T., Bongarzone, I., Paulin, C., Grieco, M., Pierotti, M. A., Vecchio, G., Fusco, A. (1994). Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. *Oncogene*, 9(2): 509-516.
- Schlumberger, M. J. (1998). Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Engl J Med*, 338(5): 297-306.
- Schneider, F. D., Chen, H. (2013). New developments in the diagnosis and treatment of thyroid cancer. *CA Cancer J Clin*, 63(6): 373-394.
- Schulten, H. J., Salama, S., Al-Ahmadi, A., Al-Mansouri, Z., Mirza, Z., Al-Ghamdi, K., Al-Hamour, O. A., Huwait, E., Gari, M., Al-Qahtani, M. H., Al-Maghrabi, J. (2013). Comprehensive Survey of HRAS, KRAS, and NRAS Mutations in Proliferative Thyroid Lesions from An Ethnically Diverse Population. *Anticancer Research*, 33: 4779-4784.
- Scognamiglio, T., Hyjek, E., Kao, J., Chen, Y. T. (2006). Diagnostic usefulness of HBME1, galectin-3, CK19, and CITED1 and evaluation of their expression in encapsulated lesions with questionable features of papillary thyroid carcinoma. *Am J Clin Pathol*, 126(5): 700-708.
- Scopa, D. C. (2004). Histopathology of thyroid tumors. An Overview. *Hormones*, 3(2): 100-110.
- Sheikh, H. A., Tometsko, M., Niehouse, L., Aldeeb, D., Swalsky, P., Finkelstein, S., Barnes, E. L., Hunt, J. L. (2004). Molecular genotyping of medullary thyroid carcinoma can predict tumor recurrence. *Am J Surg Pathol*, 18(1): 101-106.
- Sherman, S. I. (2003). Thyroid carcinoma. *Lancet*, 361: 501-511.
- Shimizu, K., Goldfarb, M., Perucho, M., Wigler, M. (1983). Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. *PNAS*, 80(2): 383-387.
- Showalter, T. N., Siegel, B. A., Moley, J. F., Baranski, T. J., Grisby, P. W. (2008). Prognostic factors in patients with well-differentiated thyroid cancer presenting with pulmonary metastasis. *Cancer Biother Radiopharm*, 23: 655-659.
- Soares, P., Trovisco, V., Rocha, A. S., Lima, J., Castro, P., Preto, A., Máximo, V., Botelho, T., Seruca, R., Sobrinho-Simões, M. (2003). BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene*, 22(29): 4578-4580.
- Spitzweg, C. (2009). Gene therapy in thyroid cancer. *Horm Metab Res*, 41: 500-509.
- Sugitani, I., Fujimoto, Y., Yamamoto, N. (2008). Papillary thyroid cancer with distant metastases: survival predictors and the importance of local control. *Surgery*, 143: 35-42.

- Tallini, G. (2002). Molecular pathobiology of thyroid neoplasms. *Endocr Pathol*, 13: 271-288.
- Tallini, G., Asa, S. L. (2001). RET oncogene activation in papillary thyroid carcinoma. *Adv Anat Pathol*, 8(6): 345-354.
- Thompson, L. D., Wieneke, J. A., Paal, E., Frommelt, R. A., Adair, C. F., Heffess, C. S. (2001). A clinicopathologic study of minimally invasive follicular carcinoma of the thyroid gland with a review of the English literature. *Cancer*, 91(3): 505-524.
- Vander, A., Sherman, J., Luciano, D., Tsakopoulos, M. (2001a). Human Physiology: The mechanisms of body function. Vol. I, 8<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill Higher Education, pp. 374-377, 388-392.
- Vander, A., Sherman, J., Luciano, D., Tsakopoulos, M. (2001b). Human Physiology: The mechanisms of body function. Vol. II, 8<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill Higher Education, pp. 719-720, 815.
- Vasko, V., Ferrand, M., Di Cristofaro, J., Carayon, P., Henry, J. F., de Micco, C. (2003). Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 2745-2752.
- Vasko, V. V., Gaudart, J., Allasia, C., Savchenko, V., Di Cristofaro, J., Saji, M., Ringel, M. D., De Micco, C. (2004). Thyroid follicular adenomas may display features of follicular carcinoma and follicular variant of papillary carcinoma. *Eur J Endocrinol*, 151(6): 779-786.
- Vitale, M. (2013a). Intratumor BRAF(V600E) heterogeneity and kinase inhibitors in the treatment of thyroid cancer: a call for participation. *Thyroid*, 23(4): 517-519.
- Vitale, M. (2013b). SEREX: a promising approach for identification of thyroid cancer serological biomarkers. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 79(1): 12-13.
- Wallander, M., Layfield, L. J., Jarboe, E., Emerson, L., Liu, T., Thaker, H., Holden, J., Tripp, S. (2010). Follicular variant of papillary carcinoma: reproducibility of histologic diagnosis and utility of HBME-1 immunohistochemistry and BRAF mutational analysis as diagnostic adjuncts. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 18(3): 231-235.
- Wan, P. T., Garnett, M. J., Roe, S. M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V. M., Jones C. M., Marshall, C. J., Springer, C. J., Barford, D., Marais, R., Cancer Genome Project. (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, 116(6): 855-867.
- Wartofsky, L. (2010). Increasing world incidence of thyroid cancer: increased detection or higher radiation exposure? *Hormones*, 9(2): 103-108.
- Watson, J. D., Caudy, A. A., Myers, R. M., Witkowski, J. A. (2007). Recombinant DNA (Genes and Genomes – a short course). W. H. Freeman and Company, New York and Basingstoke, 3<sup>rd</sup> edition, pp. 103, 126-135.
- Wells Jr, S. A., Pacini, F., Robinson, B. G., Santoro, M. (2013). Multiple endocrine neoplasia type 2 and familial medullary thyroid carcinoma: an update. *J Clin Endocrinol Metab*, 98: 3149-3164.
- Wiench, M., Wygoda, Z., Gubala, E., Wloch, J., Lisowska, K., Krassowski, J., Scieglinska, D., Fiszler-Kierzkowska, A., Lange, D., Kula, D., Zeman, M., Roskosz,

- J., Kukulska, A., Krawczyk, Z., Jarzab, B. (2001). Estimation of risk of inherited medullary thyroid carcinoma in apparent sporadic patients. *J Clin Oncol*, 19: 1374-1380.
- Xing, M. (2005). BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*, 12(2): 245-262.
- Xing, M. (2013). Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer*, 13(3): 184-199.
- Xing, M., Haugen, B. R., Schlumberger, M. (2013). Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer. *Lancet*, 381: 1058-1069.
- Yamazaki, M., Hanamura, T., Ito, K., Uchino, S., Sakurai, A., Komatsu, M. (2014). A newly identified missense mutation in RET codon 666 is associated with the development of medullary thyroid carcinoma. *Endocrine Journal*, 61(11): 1141-1144.
- Yu, X. M., Wan, Y., Sippel, R. S., Chen, H. (2011). Should all papillary thyroid microcarcinomas be aggressively treated? An analysis of 18,445 cases. *Ann Surg*, 254(4): 653-660.
- Zhu, Z., Gandhi, M., Nikiforova, M. N., Fischer, A. H., Nikiforov, Y. E. (2003). Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma: an unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol*, 120(1): 71-77.

## **ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Πλαγεράς, Π., Γεροβασίλη, Α., Παπαϊωάννου, Α. (2012). Εφαρμογές Μοριακής Διαγνωστικής. Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, Broken Hill Publishers ltd, pp. 185-194, 247-252, 254-256.

## **ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- British Thyroid Foundation. (2014). Your Thyroid Gland. British Thyroid Foundation, 2nd Floor, 3 Devonshire Place, Harrogate, HG1 4AA, telephone: 01423709707/709448, email: info@btf-thyroid.org. (Available from: <http://www.btf-thyroid.org/index.php/thyroid/your-thyroid-gland>).
- Leibniz Institute For Age Research - Fritz Lipmann Institute. (2014). (Available from: <http://www.fli-leibniz.de/>).
- National Center for Biotechnology Information, NCBI. (2015). KRAS Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog [*Homo sapiens* (human)]. U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. (Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3845>).

- National Center for Biotechnology Information, NCBI. (2015). HRAS Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog [*Homo sapiens* (human)]. U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. (Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3265>).
- SEER - Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. (2015). SEER Stat Fact Statistics: Thyroid Cancer, Review 1975-2009. National Cancer Institute. Bethesda (MD). (Available from: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>)
- Society of Mucosal Immunology. (2014). (Available from: <http://www.socmucimm.org/pcr-polymerase-chain-reaction>)
- University of Maryland, Medical Center for Diabetes and Endocrinology. (2014). Thyroid Gland. University of Maryland Medical Center, 22 S. Greene Street, Baltimore, MD 21201-1595. (Available from: <http://umm.edu/programs/diabetes/health/endocrinology-health-guide/thyroid-gland>)