

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ
ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

Λούκου Καλλιόπη

**Μοριακή ανάλυση του γονιδίου NRAS στον
καρκίνο του
Θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό**

2015

Μοριακή ανάλυση του γονιδίου NRAS στον καρκίνο
του Θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό

Molecular analysis of NRAS gene in Thyroid cancer in
Greek population

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Λιαδάκη Καλλιόπη (Επιβλέπουσα)
Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

Καρπούζας Δημήτριος
Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας &
Βιοτεχνολογίας
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

Σαραφίδου Θεολογία
Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Abstract	6
1. Εισαγωγή	7
1.1. Θυρεοειδής Αδένας	7
1.2. Καρκίνος του θυρεοειδούς	9
<u>A. Εισαγωγή –Αιτιολογία</u>	9
<u>B. Ιστολογική Κατάταξη</u>	10
<u>Γ. Μονοπάτια μετάδοσης σήματος</u>	10
• <i>Μονοπάτι σηματοδότησης των MAP κινασών (MAPK)</i>	10
• <i>Μονοπάτι σηματοδότησης P13K/Akt</i>	12
<u>Δ. Μοριακή διάγνωση στον καρκίνο του θυρεοειδούς</u>	13
I. <i>Μεταλλάξεις του γονιδίου BRAF στον καρκίνο του θυρεοειδούς</i>	15
II. <i>Μεταλλάξεις των γονιδίων RAS στον καρκίνο του θυρεοειδούς</i>	16
• <i>Διαγνωστική και προγνωστική χρησιμότητα της ανίχνευσης των μεταλλάξεων των γονιδίων RAS</i>	17
III. <i>Αναδιατάξεις μεταξύ των γονιδίων RET και PTC στον καρκίνο του θυρεοειδούς</i>	18
IV. <i>Αναδιατάξεις μεταξύ των γονιδίων PAX8 και PPARγ στον καρκίνο του θυρεοειδούς</i>	19
1.3. Θεραπευτική αντιμετώπιση στον καρκίνο του θυρεοειδούς	20
1.4. Νέες προσεγγίσεις στη θεραπεία του καρκίνου του θυρεοειδούς	21
2. Υλικά και Μέθοδοι	22
2.1. Δείγματα	22
2.2 Χημικά Αντιδραστήρια	24
2.3 Μέθοδοι	24
2.3.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από βιοψίες ιστών	24
<u>A. Διαλύματα-Αντιδραστήρια</u>	24
<u>B. Πρωτόκολλο απομόνωσης</u>	25
2.3.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	26
<u>A. Διαλύματα-Αντιδραστήρια</u>	26
<u>B. Αρχή της Μεθόδου</u>	26
<u>Γ. Πειραματική διαδικασία</u>	27
2.3.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)	28
<u>A. Αρχή της Μεθόδου</u>	28
<u>B. Touchdown PCR</u>	31
<u>Γ. Πειραματική διαδικασία</u>	32
2.3.4 Καθαρισμός προϊόντων PCR	35
2.3.5. Αλληλούχιση των προϊόντων της PCR	36
3. Αποτελέσματα	36
3.1. Ηλεκτροφόρηση γενωμικού DNA	36

3.2. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR	37
3.3. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR	38
3.4. Αλληλούχιση των προϊόντων της PCR	40
4. Συζήτηση	41
Αναφορές	43

Περίληψη

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς είναι ο πιο συχνός τύπος ενδοκρινικής κακοήθειας και η συχνότητα εμφάνισής του είναι σταθερά αυξανόμενη τις τελευταίες δεκαετίες. Τα καρκινώματα του θυρεοειδούς, με βάση ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά, κατατάσσονται σε τέσσερις βασικούς τύπους (θηλώδη, θυλακιώδη, μυελοειδή, αναπλαστικά), ενώ έχουν παρατηρηθεί και παραλλαγές αυτών, όπως ο θυλακιώδης υπότυπος του θηλώδους καρκίνου. Η κατανόηση της μοριακής παθογένειας και η ταυτοποίηση μοριακών δεικτών που θα χρησιμοποιηθούν με σκοπό τη διάγνωση και την πρόγνωση του καρκίνου του θυρεοειδούς έχει μεγάλη κλινική σημασία. Στο πλαίσιο αυτό έχει αποδειχθεί ότι διάφορες γενετικές μεταλλάξεις παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη και εξέλιξη των καρκινωμάτων του θυρεοειδούς. Οι πιο συχνές γενετικές μεταλλάξεις που παρατηρούνται περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια BRAF (κωδικόνιο 600) και RAS (κωδικόνια 12,13 και 61 των γονιδίων HRAS, NRAS, KRAS), καθώς και αναδιατάξεις μεταξύ των γονιδίων RET/PTC και PAX8/PPAR γ . Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις αυτές όταν υπάρχουν, κατά τεκμήριο αποκλείουν την ύπαρξη άλλων μεταλλάξεων. Στη βιβλιογραφία είναι διαθέσιμα περιορισμένα δεδομένα σχετικά με τη συχνότητα των μεταλλάξεων στον καρκίνο του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συσχέτιση μεταλλάξεων του γονιδίου NRAS (κωδικόνια 12,13 και 61) με τους διαφορετικούς τύπους καρκινωμάτων 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 και την ενίσχυση συγκεκριμένων περιοχών του γονιδίου NRAS χρησιμοποιώντας την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR). Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των προϊόντων της PCR έδειξαν ότι δεν υπάρχει μετάλλαξη στα κωδικόνια 12, 13 και 61 του γονιδίου NRAS σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν. Εντούτοις, για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων είναι απαραίτητο η μελέτη αυτή να επεκταθεί, ώστε να περιλαμβάνει την ανάλυση επιπρόσθετων μεταλλάξεων στα γονίδια RAS και BRAF, καθώς και χρωμοσωμικών αναδιατάξεων, σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

Abstract

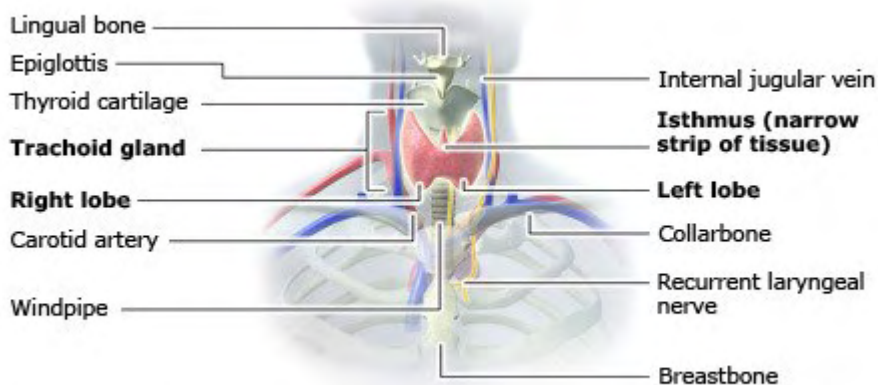
Thyroid cancer is the most common type of endocrine malignancy and its incidence is steadily increasing over the last decades. Based on histopathological characteristics, thyroid tumors are classified into four major types (papillary, follicular, medullary and anaplastic), while additional variants exist between these major types, with the most common being the follicular subtype of papillary carcinoma. The understanding of the molecular pathogenesis and the identification of molecular markers which will be used for diagnosis and prognosis of thyroid carcinoma is of high clinical significance. In this aspect, recent studies have demonstrated that several genetic mutations play a major role in the initiation and progression of thyroid tumors. The most common genetic mutations include point mutations in BRAF (codon 600) and RAS genes (codons 12, 13 and 61 of KRAS, HRAS and NRAS), as well as genetic rearrangements between RET / PTC and PAX8 / PPAR γ . 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 present study investigated the correlation of point mutations of the NRAS gene (codons 12, 13, 61) with different types of thyroid cancer in the Greek population. The study involved 33 patients diagnosed with differentiated thyroid cancer, including 11 papillary, 14 follicular variants of papillary carcinoma, 7 follicular and 2 medullary carcinomas. Genomic DNA was isolated from patient biopsies and was used as a template for the amplification of specific regions of the NRAS gene using Polymerase Chain Reaction (PCR). Direct sequencing of the PCR products did not identify any mutations in codons 12, 13 and 61 in all the analyzed 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. Εισαγωγή

1. 1. Θυρεοειδής Αδένας

Ο θυρεοειδής αδένας είναι ο μεγαλύτερος ενδοκρινής αδένας στο ανθρώπινο σώμα. Παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό, την ανάπτυξη και την ωρίμανση του ανθρώπινου σώματος και βοηθά στη ρύθμιση πολλών λειτουργιών μέσω της ελεγχόμενης απελευθέρωσης ορμονών στην κυκλοφορία του αίματος. Οι περισσότερες ορμόνες παράγονται όταν το σώμα χρειάζεται περισσότερη ενέργεια.

Ο θυρεοειδής αδένας εντοπίζεται στην πρόσθια πλευρά του λαιμού, που βρίσκεται έναντι και γύρω από το λάρυγγα και την τραχεία και φθάνει οπίσθια τον οισοφάγο και την καρωτίδα. Ο αδένας έχει το σχήμα πεταλούδας και αποτελείται από δύο λοβούς, τον αριστερό και τον δεξιό, οι οποίοι συνδέονται μέσω του ισθμού. Κάθε λοβός έχει μήκος περίπου 5 cm, πλάτος 3 cm και πάχος 2 cm. Ενίοτε, σε ορισμένους ανθρώπους, υπάρχει και ένα τρίτος λοβός, ο πυραμοειδής, που είναι μια προσεκβολή του θυρεοειδούς προς τα άνω (Εικόνα 1).

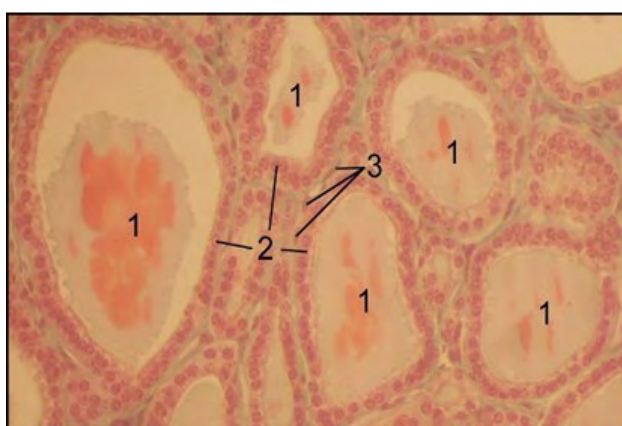


Thyroid gland (front view)

Εικόνα 1: Θυρεοειδής αδένας (NIH - National Cancer Institute)

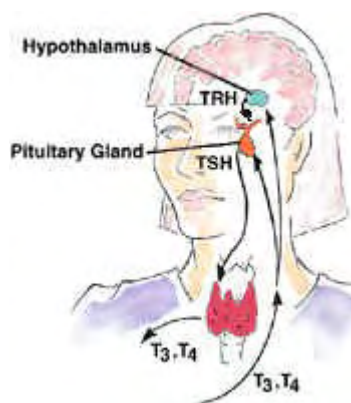
Ο θυρεοειδής αδένας αποτελείται από τα θυρεοειδή θυλακιώδη επιθηλιακά κύτταρα (Thyroid Follicular Cells, TFC) και τα παραθυλακιώδη (parafollicular cells) ή κύτταρα C. Τα θυλακιώδη κύτταρα είναι σφαιρικές δομές που λειτουργούν ως χώροι αποθήκευσης της θυρεοσφαιρίνης (Tg) και επιτρέπουν την ελεγχόμενη απελευθέρωση των θυρεοειδών ορμονών (Εικόνα 2) (Fawcett, D. & Jensch, R. 2002). Οι δύο κύριες ορμόνες που παράγονται από τον θυρεοειδή είναι η θυροξίνη ή τετραϊωδοθυρονίνη (T4) και η τριιωδοθυρονίνη (T3), οι οποίες ρυθμίζουν το μεταβολισμό όλων των ιστών. Ένας θυρεοειδής που λειτουργεί κανονικά παράγει περίπου 80% T4 και περίπου 20% T3. Ωστόσο, η T3 έχει περίπου τέσσερις φορές την ορμόνη "δύναμη", όπως η T4. Σε μικρότερο βαθμό, ο θυρεοειδής αδένας παράγει την καλσιτονίνη, η οποία εκκρίνεται από τα παραθυλακιώδη C κύτταρα και ελαττώνει τα επίπεδα ασβεστίου του αίματος. Το ιώδιο είναι μια σημαντική ουσία

για το μεταβολισμό του θυρεοειδούς, καθώς αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά των ορμονών T4 και T3, οι οποίες συντίθενται από τα θυλακιώδη επιθηλιακά κύτταρα του θυρεοειδούς. Το ιώδιο είναι ένα ιχνοστοιχείο που δεν μπορεί να παραχθεί από το ανθρώπινο σώμα,, αλλά πρέπει να ληφθεί από την τροφή. Τα κύτταρα του θυρεοειδούς είναι τα μόνα κύτταρα στο σώμα που μπορούν να απορροφήσουν το ιώδιο, τα οποία συνδυάζοντας το ιώδιο και το αμινοξύ τυροσίνη συνθέτουν τις ορμόνες T3 και T4. Στη συνέχεια, οι T3 και T4 απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος και μεταφέρονται σε όλο το σώμα όπου δρουν οι βασικοί ρυθμιστές του μεταβολισμού (μετατροπή οξυγόνου και θερμίδων σε ενέργεια).



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, D. & Jensch, R. 2002)

Ο θυρεοειδής αδένος ελέγχεται από την υπόφυση, ένα μικρό αδένος που βρίσκεται στη βάση του εγκεφάλου (Εικόνα 3). Όταν το επίπεδο των ορμονών του θυρεοειδούς μειωθεί σημαντικά, η υπόφυση παράγει την θυρεοειδοτρόπο ορμόνη (TSH), η οποία διεγείρει τον αδένος να παράγει περισσότερες ορμόνες, αυξάνοντας έτσι τα επίπεδα τους στο αίμα. Από την άλλη η υπόφυση ρυθμίζεται από ένα άλλο αδένος, τον υποθάλαμο (Εικόνα 3). Ο υποθάλαμος είναι τμήμα του εγκεφάλου και παράγει την θυρεοεκλυτική ορμόνη (TRH) που δίνει εντολή στην υπόφυση να διεγείρει τον θυρεοειδή αδένος. Ο θυρεοειδής αδένος μέσω της απελευθέρωσης των θυρεοειδικών ορμονών ελέγχει το μεταβολισμό και ρυθμίζει ζωτικές λειτουργίες του σώματος, όπως την αναπνοή, τον παλμό της καρδιάς, το κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, το σωματικό βάρος, τη θερμοκρασία σώματος τα επίπεδα χοληστερόλης (Mullur, R. et al 2014).



Εικόνα 3: Ο θυροειδής αδένας ελέγχεται από την υπόφυση, η οποία παράγει την TSH. Η υπόφυση ρυθμίζεται από τον υποθάλαμο, ο οποίος παράγει την TRH (Mullur, R. et al 2014)

1.2. Καρκίνος του Θυροειδούς

A. Εισαγωγή-Αιτιολογία

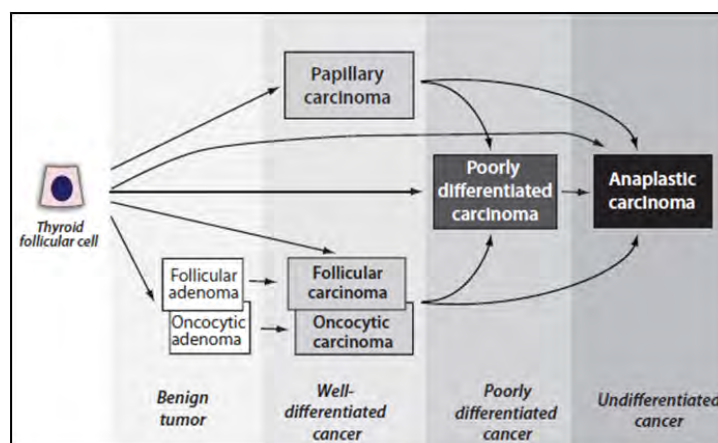
Ο καρκίνος του θυροειδούς είναι ο πιο συχνός τύπος ενδοκρινικής κακοήθειας και η συχνότητα εμφάνισης του είναι σταθερά αυξανόμενη τις τελευταίες δεκαετίες. Αν και το ποσοστό θανάτου από καρκίνο του θυροειδούς είναι σχετικά χαμηλό, εντούτοις ο ρυθμός υποτροπής ή επιμονής της νόσου είναι υψηλός και το γεγονός αυτό σχετίζεται με αυξημένη ανίατη νοσηρότητα και θνησιμότητα.

Η εξωτερική έκθεση σε ακτινοβολία στην περιοχή του κεφαλιού και του λαιμού είναι ένα από τα πιο γνωστά αίτια του καρκίνου του θυροειδούς. Η εμφάνιση του παρουσιάζεται σε όλες τις ηλικίες, με ιδιαίτερη ευαισθησία στα παιδιά και οφείλεται στο περιβάλλον, στη διατροφή, στην αύξηση του ραδιενεργού ιωδίου της ατμόσφαιρας αλλά και σε εξειδικευμένες τεχνικές διάγνωσης.

Η ιονίζουσα ακτινοβολία είναι μια βασική αιτία του καρκίνου του θυροειδούς. Στην περίπτωση του πυρηνικού ατυχήματος στο Τσέρνομπιλ, οι ραδιενεργές ουσίες που απελευθερώθηκαν στο περιβάλλον, ιδιαίτερα το ραδιενεργό ιώδιο, απορροφήθηκε από τον οργανισμό ατόμων της περιοχής που έγινε το ατύχημα. Το ραδιενεργό ιώδιο συσσωρεύεται κυρίως στο θυροειδή και με παρατεταμένη κατανάλωση προκαλεί δυσλειτουργία ή καρκίνο. Στην ευρύτερη περιοχή του Τσέρνομπιλ της Ουκρανίας, μετά το ατύχημα, τα παιδιά απορρόφησαν πολύ περισσότερο ραδιενεργό ιώδιο λόγω της ανάπτυξης τους με αποτέλεσμα ο καρκίνος του θυροειδούς να αυξηθεί κατά εννιά φορές σε παιδιά και έφηβους. Επίσης, για την εμφάνιση καρκίνου του θυροειδούς σε άτομα νεαρής ηλικίας (< 15-20 ετών) έχει ενοχοποιηθεί και η ακτινοβολία που χρησιμοποιείται για ιατρικές διαγνώσεις ή θεραπεία. Τέλος, έχει διαπιστωθεί ότι άτομα με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του θυροειδούς παρουσιάζουν μεγαλύτερες πιθανότητες να ανάπτυξης καρκίνου (Schneider, D.F. & Chen, H. 2013).

B. Ιστολογική κατάταξη

Υπάρχουν διάφοροι ιστολογικοί τύποι και υπότυποι του καρκίνου του θυρεοειδούς που διαφέρουν ως προς την κυτταρική προέλευση, τα χαρακτηριστικά και την πρόγνωση. Από τα θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς προέρχονται το Θηλώδες καρκίνωμα (*Papillary Carcinoma, PC*), το Θηλακιώδες καρκίνωμα (*Follicular Carcinoma, FC*), τα καρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης (*poorly differentiated carcinoma*), καθώς και το Αναπλαστικό καρκίνωμα (*Anaplastic Carcinoma*) (Xing, M. 2013). Τα θηλώδη και τα θυλακιώδη καρκινώματα αποτελούν καλώς διαφοροποιημένα καρκινώματα και τα ποσοστά τους ανέρχονται στο 80% και 15% αντίστοιχα (Hundahl, S.A. et al 1998), ενώ το αναπλαστικό καρκίνωμα ανέρχεται στο 2% (Hundahl, S.A. et al 1998). Σε πολλές μελέτες έχουν αναφερθεί διαφορετικοί υπότυποι του θηλώδους καρκίνου με διαφορετικά ιστοπαθολογικά πρότυπα ανάπτυξης, και η σημαντικότερη παραλλαγή αποτελεί ο θυλακιώδης υπότυπος του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς. Τα θυλακιώδη καρκινώματα υποδιαιρούνται σε καρκινώματα συμβατικού και ογκοκυτταρικού (*κύτταρα Hürthle*) τύπου. Τα χαμηλής διαφοροποίησης και τα αναπλαστικά καρκινώματα θεωρείται ότι αναπτύσσονται ως αποτέλεσμα της αποδιαφοροποίησης των καλά διαφοροποιημένων θηλωδών ή θυλακιδών καρκινωμάτων. Τα Μυελοειδή καρκινώματα (*Medullary Carcinoma*) προέρχονται από τα παραθυλακιώδη κύτταρα (ή κύτταρα C) και αντιπροσωπεύουν περίπου το 3% των καρκίνων του θυρεοειδούς (Εικόνα 4).



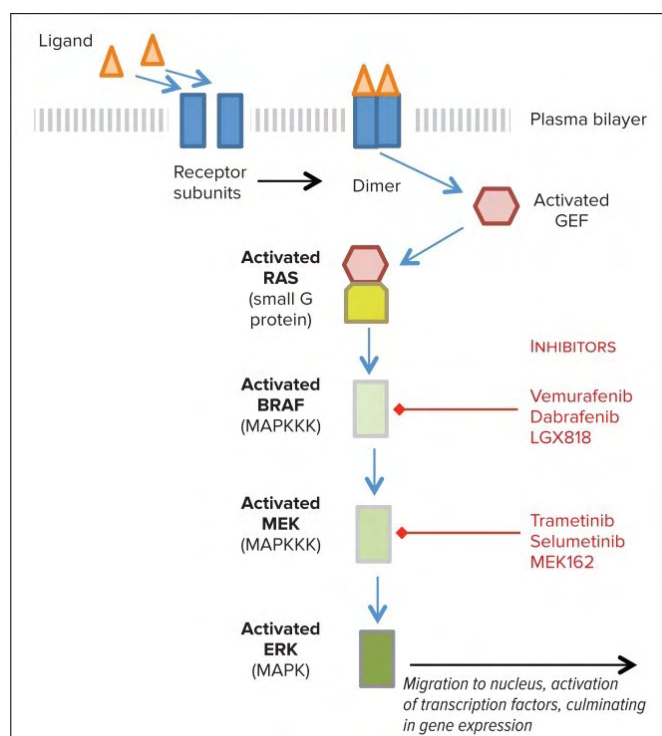
Εικόνα 4: Σχέδιο της υποτιθέμενης εξέλιξης και αποδιαφοροποίησης των όγκων του θυρεοειδούς που προέρχεται από θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς (Nikiforov, Y.E. 2010).

Γ. Μονοπάτια μετάδοσης σήματος

Μονοπάτι σηματοδότησης των MAP κινασών (MAPK)

Το μονοπάτι της πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από μιτογόνο (Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK) είναι ένα ενδοκυττάριο μονοπάτι μεταγωγής σήματος απαραίτητο σε σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες που περιλαμβάνουν την κυτταρική ανάπτυξη, πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και

απόπτωση, ως απόκριση σε εξωκυτταρικά ερεθίσματα (Εικόνα 5). Εξωκυτταρικά ερεθίσματα περιλαμβάνουν ορμόνες ή αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι αλληλεπιδρούν και ενεργοποιούν διαμεμβρανικούς υποδοχείς, συμπεριλαμβανομένων των υποδοχών με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης (όπως ο RET) και των υποδοχών που συζεύγονται με G -πρωτεΐνες.



Εικόνα 5: Μονοπάτι σηματοδότησης των MAPK (McCain J., 2013)

Το μονοπάτι MAPK ενεργοποιείται με τη δέσμευση ενός συνδέτη (π.χ. αυξητικός παράγοντας, κυτοκίνη, ή ορμόνη) στο εξωκυτταρικό τμήμα δύο υπομονάδων του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης (RTK), η οποία είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Η δέσμευση του συνδέτη προκαλεί τον διμερισμό των υπομονάδων του και οδηγεί στην φωσφορυλίωση των κυτταροπλασματικών περιοχών τους. Αυτή η ενεργοποίηση του υποδοχέα επιτρέπει την σύνδεση με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες του προσαρμογέα, οι οποίες με τη σειρά τους προσελκύουν παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίου γουανίνης (GEFs) προς την πλασματική μεμβράνη, και ενεργοποιούν την πρωτεΐνη RAS. Η πρωτεΐνη RAS συνήθως βρίσκεται σε ανενεργή κατάσταση (συνδεδεμένη με GDP) και γίνεται παροδικά ενεργή όταν ο GEF μετατοπίζει τη GDP της RAF και επιτρέπει τη δέσμευση του GTP. Η διάσπαση του δεσμευμένου GTP οδηγεί σε απενεργοποίηση της πρωτεΐνης RAS. Όταν η RAS είναι ενεργή, ενεργοποιεί μια πρωτεΐνη κινάση, τη MAPKKK, (όπως η BRAF), η οποία φωσφορυλιώνει δύο κατάλοιπα σερίνης μιας δεύτερης πρωτεϊνικής κινάσης στον καταρράκτη, της MAPKK (όπως η MEK). Η MEK στη συνέχεια φωσφορυλιώνει σε

ένα κατάλοιπο θρεονίνης και ένα κατάλοιπο τυροσίνης το τελευταίο ένζυμο του μονοπατιού, την MAPK (όπως η ERK). Τέλος, η ERK ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης άλλους τελεστές και μεταγραφικούς παράγοντες, ρυθμίζοντας έτσι την γονιδιακή έκφραση. Στον καρκίνο του θυρεοειδούς, η ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAPK μπορεί να προκληθεί λόγω σημειακών μεταλλάξεων στα γονίδια BRAF και RAS και ή ως αποτέλεσμα των αναδιατάξεων RET / PTC και TRK (McCain, J., 2013).

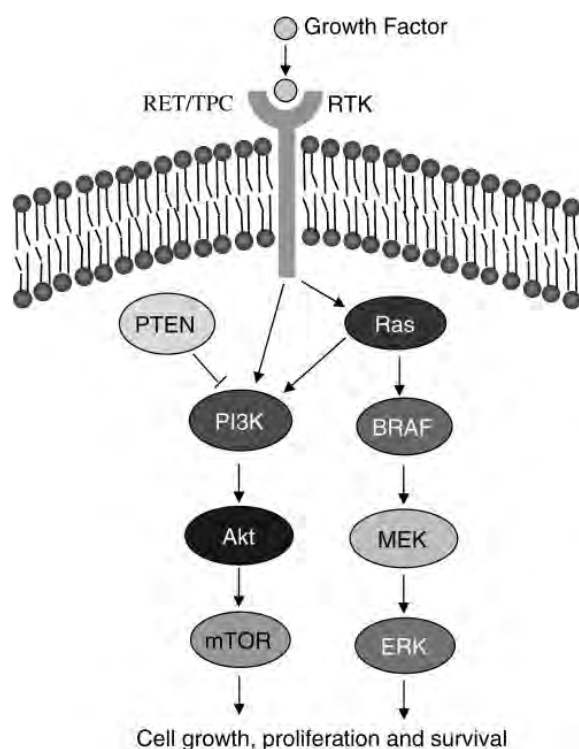
Μονοπάτι σηματοδότησης P13K/Akt

Το μονοπάτι σηματοδότησης P13K/Akt παίζει θεμελιώδη ρόλο στη ρύθμιση σημαντικών κυτταρικών και μοριακών λειτουργιών, που περιλαμβάνουν την πρόσληψη της γλυκόζης, την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την κυτταρική κινητικότητα. Τα τελευταία χρόνια έχει ερευνηθεί εκτενώς ο ρόλος αυτού του μονοπατιού σηματοδότησης στην ανθρώπινη ογκογένεση και η αξία του ως θεραπευτικός στόχος σε ανθρώπινους καρκίνους. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες P13K, μεταξύ των οποίων, η κατηγορία I είναι η καλύτερα χαρακτηρισμένη και η πιο σημαντική στην ανθρώπινη ογκογένεση. Αποτελείται από ετεροδιμερή της ρυθμιστικής υπομονάδας, συνήθως της μονάδας p85, και μίας από τις καταλυτικές υπομονάδες (p110). Μεταξύ των υπομονάδων p110, η α-τύπου (PIK3CA) και η β-τύπου (PIK3CB) εκφράζονται ευρέως σε διάφορους ιστούς και διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο σε ανθρώπινους καρκίνους. Η PIK3CA και η PIK3CB ανήκουν στην κατηγορία IA, που ενεργοποιείται από τον υποδοχέα κινάσης τυροσίνης (RTK), καθώς και ορισμένους υποδοχείς που συζευγνύονται με G-πρωτεΐνες.

Οι πρωτεΐνες Ras μπορούν να ενεργοποιήσουν διττά τα μονοπάτια των MAPK και της P13K / Akt. Ένας μηχανισμός για τη λειτουργία των πρωτεϊνών Ras είναι μέσω της αλληλεπίδρασής τους με την θέση πρόσδεσης στις καταλυτικές υπομονάδες p110 της P13K. . Όπως απεικονίζεται στην εικόνα 7, σημείο εκκίνησης του μονοπατιού σηματοδότησης P13K / Akt είναι οι υποδοχείς διαφόρων μεμβρανικών αυξητικών παραγόντων που έχουν ενεργότητα κινάσης τυροσίνης (Receptor Tyrosine Kinase, RTK), συμπεριλαμβανομένου των υποδοχέων του αγγειακού επιθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR), του αυξητικού παράγοντα προερχομένου από αιμοπετάλια (PDGFR), του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR).

Η ενεργοποίηση των υποδοχέων από εξωκυτταρικά σήματα οδηγεί στην ενεργοποίηση της P13K με ενεργοποιημένη την καταλυτική υπομονάδα p110 (π.χ. PIK3CA), η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει τη φωσφατιδυλινοσιτόλη-4,5-διφωσφορική ώστε να παράγει φωσφατιδυλινοσιτόλη-3,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (PIP3). Η λειτουργία της PIP3 είναι να περιορίσει την Akt στην κυτταρική μεμβράνη, όπου η Akt φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται από τις φωσφοϊνοσιτιδικές-εξαρτώμενες κινάσες (PDK), όπως την PDK1. Η Akt είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης και απαντάται σε τρεις ισομορφές (Akt-1, Akt-2, και Akt-3) σε ανθρώπινους ιστούς. Η ενεργοποιημένη Akt φωσφορυλιώνει πρωτεϊνικούς τελεστές, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνεται ο στόχος της ραπαμυκίνης (mTOR). Το ενισχυμένο μονοπάτι σηματοδότησης ρυθμίζει ένα ευρύ φάσμα

μοριακών και κυτταρικών λειτουργιών, προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και αναστέλλει την κυτταρική απόπτωση. Ένας σημαντικός αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού σηματοδότησης PI3K / Akt είναι η πρωτεΐνη ομόλογη φωσφατάσης και τενσίνης (Phosphatase and tensin homolog, PTEN). Η PTEN είναι μια φωσφατάση που αποφωσφορυλιώνει την PIP3 και έτσι τερματίζει τη σηματοδότηση του μονοπατιού PI3K / AKT. Στη Εικόνα 6 φαίνονται οι βασικοί παράγοντες στη μοριακή αλληλεπίδραση του μονοπατιού σηματοδότησης PI3K / AKT, οι οποίοι αποτελούν γενετικές αλλοιώσεις στον καρκίνο του θυρεοειδούς (Xing, M. 2010).



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των μονοπατιών PI3K / Akt και MAP κινασών στον καρκίνο του θυρεοειδούς. Ορατά είναι τα κύρια στοιχεία των δύο μονοπατιών. RTK, που ενεργοποιείται από αυξητικούς παράγοντες, RET / PTC, και RAS μπορούν να συζευχθούν και με τα δύο μονοπάτια. Τα υπόλοιπα συστατικά ρυθμίζουν τα αντίστοιχα μονοπάτια, όπως περιγράφεται στο κείμενο. PTEN είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού σηματοδότησης PI3K / Akt (Xing, M. 2010).

Δ. Μοριακή διάγνωση στον καρκίνο του θυρεοειδούς

Η ολοκλήρωση του προγράμματος αλληλούχισης του ανθρώπινου γονιδιώματος και η πρόοδος στις τεχνικές της μοριακής βιολογίας έχουν βελτιώσει την κατανόηση των γενετικών αλλαγών που οδηγούν σε καρκινογένεση και παρέχουν ευκαιρίες για τον εντοπισμό βιοδεικτών ασθένειας. Έτσι, τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημαντική πρόοδος στις μοριακές αλλαγές που συνδέονται με συγκεκριμένους τύπους καρκινωμάτων του θυρεοειδούς, οι οποίες συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Τα θηλώδη καρκινώματα φέρουν σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια BRAF και RAS, καθώς και αναδιατάξεις μεταξύ των γενετικών τόπων RET/PTC και TRK,

αποτέλεσμα των οποίων είναι η ενεργοποίηση του μονοπατιού μετάδοσης σήματος των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνο (Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK). Αυτές οι μεταλλάξεις εμφανίζονται να είναι αμοιβαία αποκλειόμενες (mutually exclusive) και απαντώνται σε περισσότερο από 70% του ποσοστού των θηλωδών καρκινωμάτων. Τα θυλακιώδη καρκινώματα φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια RAS ή αναδιατάξεις μεταξύ των γενετικών τόπων PAX8/PPAR γ . Αυτές οι μεταλλάξεις είναι επίσης αμοιβαία αποκλειόμενες και προσδιορίζονται στο 70-75% των θηλακιδών καρκινωμάτων. Επιπλέον, σε καρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης και σε αναπλαστικά καρκινώματα εμφανίζονται μεταλλάξεις των γονιδίων RAS και BRAF, καθώς και μεταλλάξεις των γονιδίων TP53 και CTNNB1. Τέλος, τα μυελοειδή καρκινώματα συχνά διαθέτουν σημειακές μεταλλάξεις που βρίσκονται στο γονίδιο RET (Nikiforov, Y.E. 2011). Στη συνέχεια αναφέρονται αναλυτικά οι μεταλλάξεις αυτές που συναντώνται σε καρκινώματα του θυρεοειδούς.

Πίνακας 1 : Μέσος όρος της συχνότητας των μεταλλάξεων στους τύπους του καρκίνου του θυρεοειδούς (Nikiforov, Y.E. 2011)

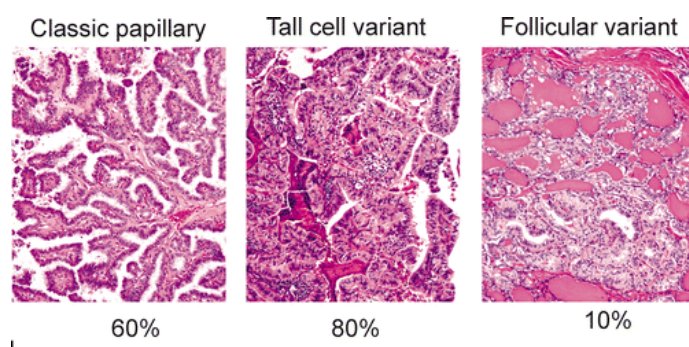
Μέσος όρος της Συχνότητας των Μεταλλάξεων στους Τύπους του Καρκίνου του Θυρεοειδούς	
Τύπος όγκου	Συχνότητα %
Θηλώδες Καρκίνωμα	
BRAF	40-45
RET/PTC	10-20
RAS	10-20
TRK	<5
Θυλακιώδες Καρκίνωμα	
RAS	40-50
PAX8-PPAR γ	30-35
PIK3CA	<10
PTEN	<10
Χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα	
RAS	25-30
β -κατενίνη (CTNNB1)	10-20
TP53	20-30
BRAF	10-15
Αναπλαστικό Καρκίνωμα	
TP53	70-80
β -κατενίνη (CTNNB1)	60-70
RAS	40-50
BRAF	20-30
Μυελοειδές Καρκίνωμα	
Familiar forms RET	>95
Sporadic RET	40-50

I. Μεταλλάξεις του γονιδίου BRAF στον καρκίνο του θυρεοειδούς

Το γονίδιο BRAF κωδικοποιεί για μία κινάση σερίνης-θρεονίνης που ανήκει στην οικογένεια των RAF πρωτεϊνών, οι οποίοι είναι ενδοκυτταρικοί ενεργοποιητές του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAPK, το οποίο θα περιγραφεί αναλυτικά στη συνέχεια. Οι σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου BRAF αποτελούν την πιο κοινή γενετική μεταλλαγή που παρατηρείται στα θυρεοειδή θηλώδη καρκινώματα και παρατηρείται σε ποσοστό 40-45% (Kimura, E.T. et al 2003). Η συντριπτική πλειοψηφία των μεταλλάξεων του γονιδίου BRAF που απαντώνται στον καρκίνο του θυρεοειδούς αφορά σημειακές μεταλλάξεις στο νουκλεοτίδιο 1799 που οδηγούν σε μετατροπή του αμινοξέος βαλίνη σε γλουταμίνη στο θέση 600 (V600E). Αυτή η μετάλλαξη οδηγεί σε συστηματική ενεργοποίηση της κινάσης BRAF και συνεχή διέγερση του μονοπατιού των MAPK, που προκαλεί συνεχή κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ογκογένεση στα κύτταρα του θυρεοειδούς.

Σε πολύ μικρό ποσοστό που αναλογεί σε 1% - 2% των θηλώδων καρκινωμάτων, έχουν ταυτοποιηθεί και άλλες μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF, όπως η σημειακή μετάλλαξη K601E και ένα μικρό πλαίσιο προσθηκών ή ελλείψεων γύρω από το κωδικόνιο 600. Η μετάλλαξη BRAF K601E έχει αναφερθεί σε μεμονωμένες περιπτώσεις θυλακιδώδους αδενώματος. Επίσης έχει παρατηρηθεί και η αναδιάταξη AKAP9/BRAF, η οποία είναι περισσότερη συχνή σε θηλώδη καρκινώματα που σχετίζονται με έκθεση σε ακτινοβολία.

Η μετάλλαξη BRAF V600E έχει ταυτοποιηθεί σε θηλώδη καρκινώματα με κλασσική ιστολογική και υψηλή κυτταρική παραλλαγή και είναι σπάνια στην θυλακιδώδη παραλλαγή του θηλώδους καρκινώματος (Εικόνα 7) (Xing, M. 2005). Εκτός από τα θηλώδη καρκινώματα, η μετάλλαξη BRAF V600E βρέθηκε, σε κακώς διαφοροποιημένα και αναπλαστικά καρκινώματα, ιδιαίτερα στους όγκους που περιέχουν περιοχές με καλά διαφοροποιημένο θηλώδες καρκίνωμα. Η μετάλλαξη BRAF V600E δεν έχει βρεθεί σε θυλακιδώδη καρκινώματα και καλοήγη θυρεοειδή οζίδια, και ως εκ τούτου, μεταξύ των θυρεοειδών αλλοιώσεων αποτελεί έναν αρκετά ειδικό δείκτη για το θηλώδες καρκίνωμα και των συναφών τύπων του (Nikiforov, Y. E. 2011).



Εικόνα 7: Συχνότητα των μεταλλάξεων του γονιδίου BRAF σε διαφορετικές ιστολογικές παραλλαγές σε θηλώδη καρκινώματα (Xing, M. 2005).

II. Μεταλλάξεις των γονιδίων RAS στον καρκίνο του θυρεοειδούς.

Η οικογένεια των γονιδίων RAS (rat sarcoma viral oncogenes) περιλαμβάνει τα γονίδια NRAS, HRAS και KRAS. Τα γονίδια κωδικοποιούν ομόλογες ισομορφές πρωτεϊνών 21-kDa που βρίσκονται στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σημάτων από διαμεμβρανικούς υποδοχείς (όπως υποδοχείς κινάσης τυροσίνης και υποδοχείς συζευγμένους με G πρωτεΐνες) στους τελεστές των σηματοδοτικών μονοπατιών MAPK και P13K-AKT. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η δραστηριότητα των πρωτεϊνών RAS ρυθμίζεται από την υδρόλυση GTP του ενεργοποιημένου συμπλόκου GTP-RAS στο αδρανισμένο σύμπλοκο GDP-RAS. Σημιακές μεταλλάξεις παράγουν ογκογόνα αλληλόμορφα του RAS που εμφανίζουν είτε αυξημένη συγγένεια για το GTP (κωδικόνια 12 και 13) ή την αναστολή της λειτουργίας της GTPάσης (κωδικόνιο 61). Και οι δύο μηχανισμοί οδηγούν σε ανώμαλη ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών MAPK και P13K-AKT, ένα κρίσιμο γεγονός στην ογκογένεση του θυρεοειδούς (Howell, G.M. et al 2013).

Τα θυρεοειδή νεοπλάσματα είναι μοναδικά στο ότι έχουν συνδεθεί και με τις τρεις μεταλλαγμένες ισομορφές των γονιδίων RAS. Η βιβλιογραφία αναφέρει συχνότητες των μεταλλάξεων RAS έως και 48% σε καλοήγη θυλακιώδη αδενώματα, 57% σε θυλακιώδη καρκινώματα και 21% σε θηλώδη καρκινώματα (Πίνακας 2). Ωστόσο, η συνολική επικράτηση των μεταλλάξεων RAS ποικίλει σημαντικά μεταξύ των βιβλιογραφικών αναφορών. Αυτό συμβαίνει διότι τα υπάρχοντα δεδομένα αποτελούνται κυρίως από μικρές μελέτες που συχνά διαφέρουν στα μεθοδολογικά κριτήρια. Για παράδειγμα, η επικράτηση RAS είναι χαμηλότερη όταν η ανάλυση περιορίζεται σε μελέτες που χρησιμοποιούν την άμεση αλληλούχιση. Αυτό παρατηρήθηκε από την έρευνα του Vasko et al, ο οποίος σημείωσε ένα σημαντικό υψηλό ποσοστό ανίχνευσης μετάλλαξης (17% έναντι 12%, ιδιαίτερα όσο αφορά την υπερεκτίμηση του HRAS 61, όταν δεν χρησιμοποιήθηκε άμεση αλληλούχιση (Vasko, V. et al 2003).

Πίνακας 2: Συνολική συχνότητα των μεταλλάξεων RAS σε θυρεοειδή νεοπλάσματα (Howell, G.M. et al 2013)

Reference	FA	FTC	HA	HC	PTC	PDTC	ATC
Lemoine et al. (1989) [18]	33% (8/24)	40% (4/10)	–	–	–	–	60% (6/10)
Namba et al. (1990) [24]	25% (6/24)	0% (0/3)	–	–	21% (3/14)	–	–
Esapa et al. (1999) [21]	18% (7/38)	44% (4/9)	0% (0/3)	–	8% (1/13)	–	100% (1/1)
Basolo et al. (2000) [25]	–	40% (2/5)	–	–	10% (3/31)	18% (8/44)	60% (3/5)
Garcia-Rostan et al. (2003) [27]	–	11% (2/19)	–	–	7% (2/30)	55% (16/29)	52% (15/29)
Nikiforova et al. (2003) [6]	48% (11/23)	52% (16/33)	8% (1/13)	11% (2/19)	–	–	–
Vasko et al. (2003) [19]	20% (9/46)	21% (7/34)	–	–	–	–	–
Zhu et al. (2003) [26]	–	–	–	–	17% (13/76)	–	–
Liu et al. (2004) [20]	8% (1/12)	38% (3/8)	0% (0/5)	–	0% (0/42)	–	0% (0/2)
Fukahori et al. (2012) [28]	30% (12/40)	57% (33/58)	–	–	–	–	–
Summary total	26% (54/207)	40% (71/179)	5% (1/21)	11% (2/19)	11% (22/206)	33% (24/73)	53% (25/47)

Abbreviations: –, not evaluated; ATC, anaplastic carcinoma; FA, follicular adenoma; FTC, follicular carcinoma; HA, Hurthle cell adenoma; HC, Hurthle cell carcinoma; PTC, papillary carcinoma; PDTC, poorly differentiated carcinoma.

Για την αντιμετώπιση αυτών των μεθοδολογικών περιορισμών, οι Liu et al. (Liu, R.T. et al 2004) έκαναν μια μετα-ανάλυση σε 86 όγκους RAS. Οι όγκοι υποβλήθηκαν σε άμεση αλληλούχιση για την ανίχνευση μετάλλαξης και εξετάστηκαν λεπτομερώς και οι τρεις μεταλλαγμένες ισομορφές RAS στον ίδιο όγκο. Η μελέτη έδειξε ότι οι μεταλλάξεις που περιλαμβάνουν NRAS στο κωδικόνιο 61 ήταν οι περισσότερες, αντιπροσωπεύοντας το 67% όλων των μεταλλάξεων RAS. Η διαπίστωση αυτή επιβεβαιώνεται και από μία άλλη συγκεντρωτική ανάλυση 22 μελετών με όμοια κριτήρια ένταξης, στην οποία το NRAS 61 αντιπροσώπευε το 88% των μεταλλάξεων RAS. Οι μελέτες αυτές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι μεταλλάξεις RAS είναι επικρατέστερες σε θυλακιώδες καρκίνωμα (ποσοστό 25-27%) από ό,τι σε καλόηθες θυλακιώδες αδένωμα (ποσοστό 14-15%) και σπάνιες σε θηλώδες καρκίνωμα (ποσοστό 5-6%) (Vasko, V. et al 2003, Liu, R.T. et al 2004).

Η σχεδόν αποκλειστική ύπαρξη μεταλλάξεων RAS σε θυλακιώδεις όγκους και η σπάνια ύπαρξη σε θηλώδες καρκίνωμα έχει, επίσης, αναφερθεί και σε άλλες μελέτες. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι μεταλλάξεις RAS μπορούν να περιοριστούν σε θηλώδες καρκίνωμα θυλακιώδους υποτύπου (FVPTC), δηλαδή σε θηλώδεις όγκους που έχουν θυλακιώδη ανάπτυξη. Για παράδειγμα, μια μελέτη που εξέτασε την ύπαρξη RAS μεταλλάξεων σε 30 περιπτώσεις FVPTC και 46 περιπτώσεις μη-FVPTC, έδειξε ότι καμία περίπτωση των μη-FVPTC δεν ήταν θετική σε μεταλλάξεις RAS, σε αντίθεση με το 43% των FVPTC (Zhu, Z. et al 2003).

Διαγνωστική και προγνωστική χρησιμότητα της ανίχνευσης των μεταλλάξεων των γονιδίων RAS

Οι μεταλλάξεις RAS που συμβαίνουν σε καλά διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς αποτελούν μοριακά γεγονότα που είναι αμοιβαία αποκλειόμενα με άλλες γενετικές αλλαγές. Θεωρείται ότι μέχρι 85% των συμβατικών θυλακιδίων καρκινωμάτων αναπτύσσονται είτε μετάλλαξη RAS είτε αναδιάταξη μεταξύ των PAX8 και PPARγ. Μια έρευνα ανέφερε ότι το 49% και το 36% των συμβατικών θυλακιδίων καρκινωμάτων ήταν θετικά για RAS και PAX8-PPARγ, αντίστοιχα. Επιπλέον, μόνο στο 1 από τα 33 θυλακιώδη καρκινώματα ταχτοποιήθηκαν και οι δύο αλλοιώσεις, γεγονός που υποστηρίζει την ιδέα δύο διαφορετικών, μη-επικαλυπτόμενων μοριακών μηχανισμών (Nikiforova, M.N. et al 2003).

Τα θυρεοειδή οζίδια είναι συχνά και η κλινική πρόκληση είναι να προσδιοριστεί το 5%-15% της ύπαρξης τους ή ότι βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη κακοήθειας (Cooper, D.S. et al 2009). Η βιοψία μέσω παρακέντησης δια λεπτής βελόνης (FNAB) είναι η προτεινόμενη διαγνωστική διαδικασία, αλλά μπορεί να δώσει απροσδιόριστα κυτταρολογικά αποτελέσματα. Ασθενείς με απροσδιόριστη κυτταρολογία μπορεί τελικά να χρειαστούν διαγνωστική χειρουργική επέμβαση για να αποκλειστεί η πιθανότητα κακοήθειας. Ωστόσο, αυτό συνεπάγεται με πιθανές επιπλοκές και δαπάνες υγειονομικής περίθαλψης. Για το λόγο αυτό, έχει δοθεί μεγάλη σημασία στη βελτίωση της διαγνωστικής ακρίβειας της βιοψίας μέσω FNA μέσω της χρήσης συμπληρωματικών διαγνωστικών δοκιμών για τα άτομα με απροσδιόριστη κυτταρολογία.

Ο μοριακός έλεγχος αποτελεί ένα αποτελεσματικό τμήμα της μεθόδου διάγνωσης καρκίνου του θυρεοειδούς, διότι οι πιο συχνές μεταλλαγές (BRAF, RAS, RET/PTC και PAX8-PPARγ) δεν είναι μόνο αμοιβαία-αποκλειόμενες αλλά μπορούν

να βρεθούν σε ποσοστό 70%-80% των περιπτώσεων (Nikiforov, Y.E. & Nikiforova, M.N. 2011). Τρεις πρόσφατες μελέτες που εξέτασαν την χρησιμότητα των προαναφερόμενων μεταλλαγών σε δείγματα FNAB, διαπίστωσαν ότι η παρουσία οποιαδήποτε μετάλλαξης ήταν ένας ισχυρός δείκτης του καρκίνου, με ιστολογική επιβεβαίωση της κακοήθειας σε ποσοστό 89-97% των δειγμάτων. Ωστόσο, σε αντίθεση με τις μεταλλάξεις BRAF και RET / PTC, οι οποίες σχεδόν πάντα προσδίδουν μια κακοήθη διάγνωση, η προγνωστική αξία της μετάλλαξης RAS είναι λιγότερο σαφής. Αυτό συμβαίνει επειδή οι μεταλλάξεις RAS ανιχνεύονται σταθερά και σε καλοήγη θυλακιώδη αδενώματα. Η επικρατούσα αντίληψη είναι ότι ένα θυλακιώδες αδένωμα θετικό για μεταλλάξεις RAS είναι πιθανό να αποτελεί πρόδρομο ενός θηλακιώδους καρκινώματος που είναι RAS-θετικό. (Howell, G.M. et al 2013).

Τέλος, σε μια μελέτη αξιολογήθηκαν δείγματα βιοψιών (FNAB) με απροσδιόριστη κυτταρολογία και διαπιστώθηκε ότι η μετάλλαξη RAS ήταν πιο συχνή (72%), ακολουθούμενη από BRAF (21%), PAX8-PPAR γ (6%) και RET / PTC (1%) (Nikiforov, Y.E. et al 2011). Επίσης, υπολογίστηκε ότι η πιθανότητα του καρκίνου που σχετίζεται με RAS-θετική μετάλλαξη ανέρχεται στο 85%, γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα άλλων αναφορών (74- 88%). Ο ιδιαίτερα αυξημένος κίνδυνος για καρκίνο όταν υπάρχει μετάλλαξη RAS, πιθανώς μεταβάλλει την αρχική χειρουργική αντιμετώπιση των ασθενών με διαφορετική απροσδιόριστη κυτταρολογία (Howell, G.M. et al 2013).

Επίσης, οι μεταλλάξεις RAS πιθανώς να σχετίζονται με την επιθετικότητα του θυρεοειδούς καρκίνου (Nikiforova, M.N. & Nikiforov, Y.E., 2008) καθώς έχουν ταυτοποιηθεί στο 25-30% των περιπτώσεων καρκινωμάτων χαμηλής διαφοροποίησης (PDTC) και στο 52-60% των αναπλαστικών καρκινωμάτων (ATC) (Xing, 2013, Lemoine et al. 1988). Καθώς οι μεταλλάξεις RAS συχνά βρίσκονται σε ενθυλακωμένους τύπους της θυλακιώδους παραλλαγής του θηλώδους καρκίνου (Liu et al. 2006), είναι πιθανόν ότι σηματοδοτούν ένα σημαντικό δείκτη των καλά διαφοροποιημένων καρκίνων του θυρεοειδούς, οι οποίοι είναι επιρρεπείς σε μεταστατική εξάπλωση και αποδιαφοροποίηση. Επίσης, αρκετές μελέτες αναλύουν μια σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις μεταλλάξεις RAS και τη μεταστατική συμπεριφορά των θυλακιωδών και θηλωδών καρκινωμάτων, ιδιαίτερα σε σχέση με μεταστάσεις στα οστά (Manenti et al. 1994, Karga et al, 1991, Garcia-Rostan et al. 2003). Αν και το μέγεθος του δείγματος των μελετών ήταν μικρό, καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η ανίχνευση της μετάλλαξης RAS δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης σε όλους τους τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς (Howell, G.M. et al. 2013). 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, Y.E. 2011).

III. Αναδιατάξεις μεταξύ των γονιδίων RET και PTC στον καρκίνο του θυρεοειδούς

Μία από τις πρώτες γενετικές αλλαγές που ταυτοποιήθηκαν σε θηλώδη καρκινώματα θυρεοειδούς ήταν οι χρωμοσωματικές μεταλλαγές,

συμπεριλαμβανόμενου του πρωτο-ογκογονιδίου RET (rearranged during transfection). Το πρωτο-ογκογονίδιο RET αποτελείται από 21 εξώνια και εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 10, κοντά στο κεντρομερές, το οποίο κωδικοποιεί έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης. Εκφράζεται σε θυρεοειδή παραθυλακιώδη κύτταρα, αλλά η έκφρασή του μπορεί να ενεργοποιηθεί σε θυλακιώδη κύτταρα μετά από χρωμοσωματική αναδιάταξη, γνωστή ως αναδιάταξη RET/PTC. Στην αναδιάταξη RET/PTC, το τμήμα του RET που κωδικοποιεί την κινάση τυροσίνης συντήκεται σε διάφορα γονίδια. Συνολικά, έχουν αναφερθεί έντεκα τύποι αναδιατάξεων RET/PTC, που σχηματίζονται από σύντηξη του RET με διαφορετικό γενετικό τμήμα. Οι δύο πιο κοινοί τύποι αναδιατάξης είναι οι RET / PTC1 και RET / PTC3, οι οποίοι ευθύνονται για τις περισσότερες αναδιατάξεις που βρέθηκαν στον καρκίνο του θυρεοειδούς. Η RET / PTC1 σχηματίζεται με σύντηξη του RET με το γονίδιο CCDC6 (H4) και η RET / PTC3 με σύντηξη του RET με το γονίδιο NCOA4 (ELE1). Όλες οι συντήξεις περιέχουν το τμήμα της κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα RET, το οποίο επιτρέπει στην πρωτεΐνη RET/PTC να ενεργοποιήσει το μονοπάτι σηματοδότησης των MAPK.

Οι αναδιατάξεις RET/PTC ταυτοποιούνται στο 10- 20% των ενήλικων σε θηλώδη καρκινώματα (Πίνακας 1) και απαντώνται με μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς που έχουν ιστορικό έκθεσης σε ακτινοβολία (50-80%). Η RET / PTC1 είναι συνήθως ο πιο κοινός τύπος αναδιατάξης και περιλαμβάνει το 60 - 70% του συνόλου των περιπτώσεων. Η RET / PTC3 αντιπροσωπεύει το 20 - 30% και η RET / PTC2 και τα άλλα είδη αναδιατάξεων αντιπροσωπεύουν λιγότερο από 5% του συνόλου των αναδιατάξεων. Η εξαίρεση είναι μια ομάδα του θηλώδους καρκινώματος που αναπτύχθηκε σε παιδιά μέσα σε 10 χρόνια από έκθεση σε ακτινοβολία μετά από το ατύχημα του Τσερνομπίλ, για το οποίο η RET / PTC3 ήταν το πιο διαδεδομένο είδος αναδιατάξης.

Τα θηλώδη καρκινώματα που φέρουν RET / PTC αναδιατάξεις συνήθως εμφανίζονται σε νεαρότερη ηλικία και έχουν κλασσική θηλώδη ιστολογία και ένα υψηλό ποσοστό μεταστάσεων στους λεμφαδένες. Η αναδιάταξη, ιδιαίτερα του τύπου RET / PTC1, βρίσκεται συνήθως σε θηλώδη καρκινώματα, αλλά μπορεί επίσης να εμφανιστεί σε θηλώδη μικρο-καρκινώματα και σε άλλες μικροσκοπικές παραλλαγές θηλώδους καρκινώματος. Ο έλεγχος για αναδιατάξεις RET / PTC μπορεί να είναι χρήσιμος για τη διάγνωση του καρκίνου του θυρεοειδούς, ιδιαίτερα για θηλώδες καρκίνωμα. Σε θυρεοειδή δείγματα FNA, η ανίχνευση RET / PTC μπορεί να βελτιώσει την προεγχειρητική διάγνωση των θυρεοειδών οζιδίων, ιδιαίτερα σε δείγματα που έχουν απροσδιόριστη κυτταρολογία ή έχουν ανεπαρκή ποσότητα κυττάρων για κυτταρολογική αξιολόγηση (Nikiforov, Y.E. 2011).

IV. Αναδιατάξεις μεταξύ των γονιδίων PAX8 και PPAR γ στον καρκίνο του θυρεοειδούς

Η αναδιάταξη PAX8/PPAR γ είναι αποτέλεσμα της μετατόπισης t(2;3)(q13;p25), που οδηγεί στη σύντηξη ανάμεσα στο γονίδιο PAX8, το οποίο κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα, και στο γονίδιο του υποδοχέα υπεροξεισώματος PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor). Το γονίδιο PAX8 είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική ανάπτυξη του θυρεοειδούς, ενώ ο PPAR γ εμπλέκεται στη

διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, στο μεταβολισμό των λιπιδίων και των υδατανθράκων, καθώς και στην κυτταρική διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό.

Η αναδιάταξη PAX8/PPAR γ βρίσκεται στο 30% με 40% του συμβατικού τύπου θυλακιωδών καρκινωμάτων με μικρή επικράτηση στα ογκοκυτταρικά καρκινώματα και οδηγεί σε υπερέκφραση του PPAR γ , που μπορεί να ανιχνευθεί με ανοσοϊστοχημεία. Οι όγκοι που φέρουν PAX8 / PPAR γ τείνουν να παρουσιάζονται σε νεαρότερη ηλικία, να είναι μικρότεροι σε μέγεθος και να έχουν πιο συχνά αγγειακή εισβολή. Αυτή η αναδιάταξη βρίσκεται επίσης στη θυλακιώδη παραλλαγή του θηλώδους καρκινώματος, με μια υψηλή συχνότητα 38%, παρόλο που στους περισσότερους πληθυσμούς, η επικράτηση της PAX8 / PPAR γ σε αυτόν τον τύπο του όγκου είναι πολύ χαμηλότερη, πιθανώς λιγότερο από 5%. Επίσης, μπορεί να βρεθεί σε ένα μικρό ποσοστό (2% -13%) στα θυλακιώδη αδενώματα. Είναι σημαντικό, ότι οι PAX8 / PPAR γ αναδιατάξεις και οι RAS σημειακές μεταλλάξεις σπάνια συμπίπτουν στον ίδιο όγκο, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα θυλακιώδη καρκινώματα μπορούν να αναπτυχθούν μέσω τουλάχιστον δύο διακριτών μοριακών οδών, που έχουν ξεκινήσει είτε από PAX8 / PPAR γ είτε από μετάλλαξη RAS.

1.3. Θεραπευτική αντιμετώπιση στον καρκίνο του θυρεοειδούς

Τα τελευταία χρόνια αυξάνεται συνεχώς η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου θυρεοειδούς . Ο διαφοροποιημένος θυρεοειδής καρκίνος (DTC) αντιπροσωπεύει το 90% των περιπτώσεων του καρκίνου του θυρεοειδούς και περιλαμβάνει τόσο τα θηλώδη όσο και τα θυλακιώδη καρκινώματα. Η τυπική θεραπεία του καρκίνου του θυρεοειδούς περιλαμβάνει ολική θυρεοειδεκτομή, ραδιενεργό ιώδιο (RAI) και αναπλήρωση θυροξίνης T4 (δόση σε επαρκή επίπεδα για την καταστολή της θυρεοτρόπου ορμόνης TSH). Η γενική πρόγνωση για τους ασθενείς με DTC είναι καλή, με 85% ποσοστό επιβίωσης για τα επόμενα 10 χρόνια. Περίπου 10-15% των ασθενών μπορεί να αναπτύξουν απομακρυσμένες μεταστάσεις (*O'neill, C.J. et al. 2010*).

Η θυρεοειδεκτομή είναι η κύρια θεραπεία για DTC και η θεραπεία με RAI συνίσταται για τους ασθενείς με κίνδυνο εξέλιξης της νόσου. Η χορήγηση του RAI μετά την ολική ή σχεδόν ολική θυρεοειδεκτομή θεωρείται ασφαλής, ενώ η καταστροφή των θυρεοειδικών υπολειμμάτων μειώνει τα ποσοστά υποτροπής. Η χορήγησή του γίνεται στο πρώτο εξάμηνο μετά την χειρουργική επέμβαση και προηγουμένως, οι ασθενείς αρχίζουν μια δίαιτα χαμηλή σε ιώδιο και οι θυρεοειδικές ορμόνες (TH) διακόπτονται για να επιτευχθεί η υπερθυροτροπιναιμία που απαιτείται για την τόνωση της πρόσληψης ραδιενεργού ιωδίου στα εναπομείναντα κύτταρα του θυρεοειδούς. Η συνιστώμενη δόση για ασθενείς με χαμηλό κίνδυνο όγκου είναι 30-100 mCi και 100-200 mCi για ασθενείς με μεταστάσεις σε λεμφαδένες ή με υπολειπόμενο ιστό ή ο ιστολογικός ιστός είναι επιθετικός.

Η TSH παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του θυρεοειδούς. Η καταστολή των επιπέδων της TSH μέσω χορήγησης της θυροξίνης (T4) επιβραδύνει την ανάπτυξη των TSH-εξαρτώμενων όγκων. Σε

ασθενείς με υψηλού κινδύνου καρκίνου του θυρεοειδούς, η καταστολή της TSH (TSH <0.1mU / L) έχει αποδειχτεί ότι μειώνει τα ποσοστά υποτροπής του καρκίνου, εξέλιξης και θνησιμότητας (*Rotem B. et al. 2012*).

1.4. Νέες προσεγγίσεις στη θεραπεία του καρκίνου του θυρεοειδούς

Παρά την γενικά καλή πρόγνωση του καρκίνου του θυρεοειδούς, περίπου 5% των ασθενών αναπτύσσουν μεταστατική νόσο, η οποία αδυνατεί να ανταποκριθεί στη χορήγηση RAI, παρουσιάζοντας μια πιο επιθετική συμπεριφορά. Η απουσία ειδικών, αποτελεσματικών και καλά ανεκτών φάρμακων και ο περιορισμένος ρόλος του ραδιενεργού ιωδίου για τον αποδιαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς, επιτείνουν τις προσπάθειες στον τομέα της ανάπτυξης νέων φαρμάκων. Όπως αναφέρθηκε, οι μεταλλάξεις των γονιδίων BRAF και RAS και οι αναδιατάξεις RET / PTC και PAX8/PPARγ παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του θυρεοειδούς. Είναι επομένως σημαντική η ανάπτυξη νέων ενώσεων που στοχεύουν στις γενετικές αυτές αλλαγές, καθώς η χορήγησή τους μπορεί να αποτρέψει την εξέλιξη της νόσου (*Fallahi, P. et al. 2015*). Κάποια παραδείγματα αναφέρονται στη συνέχεια.

A. Αναστολείς των κινασών τυροσίνης (TKIs)

Οι αναστολείς κινάσης τυροσίνης (TKIs) αποτελούν μια κατηγορία φαρμάκων χημειοθεραπείας που αναστέλλουν ή μπλοκάρουν την ενζυμική ενεργότητα κινάσης τυροσίνης. Η αναστολή αυτή επιτυγχάνεται μέσω μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων. Ο υποδοχέας του EGF (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) παίζει ρόλο στην ανάπτυξη και την εξάπλωση του καρκίνου του θυρεοειδούς. Μεταλλάξεις του EGFR συμβάλλουν στην ενεργοποίηση του πρωτο-ογκογονιδίου RET, ενώ οι αναδιατάξεις RET / PTC1 και RET / PTC3 ρυθμίζουν με τη σειρά τους την έκφραση του EGFR. Η υψηλή έκφραση του EGFR σχετίζεται με μετάσταση στους λεμφαδένες σε θηλώδη καρκινώματα και παίζει ένα ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου του θυρεοειδούς.

i) Το φάρμακο **sorafenib** είναι ένας αναστολέας πολλαπλών κινασών που έχει δειχθεί ότι διαθέτει αντι-πολλαπλασιαστικές και αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες *in vitro* και *in vivo*. Έχει ισχυρή δράση έναντι του RAF, των υποδοχών VEGF (VEGFR-2, VEGFR-3), του υποδοχέα του PDGF (PDGFR) και των κινασών RET (*Fallahi, P. et al. 2015*).

ii) Το φάρμακο **imatinib** είναι αναστολέας της πρωτεϊνικής κινάσης της τυροσίνης. Αποτελεί ένα επιλεκτικό φάρμακο, καθώς αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και προάγει την απόπτωση των κυττάρων, τα οποία φέρουν το χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας, όπως συμβαίνει στη χρόνια μυελογενή ή στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (*Fallahi, P. et al. 2015*).

iii) Το φάρμακο **sunitinib** αναστέλλει πολλούς υποδοχείς των κινασών της τυροσίνης που εμπλέκονται στην αύξηση των όγκων, την παθολογική αγγειογένεση και τη μεταστατική εξέλιξη του καρκίνου. Χορηγείται σε περιπτώσεις κακοήθους όγκου του γαστρεντερικού συστήματος και μεταστατικού καρκίνου του νεφρού. Επίσης, *in*

vitro μελέτες αποδεικνύουν ότι είναι ένας ισχυρός αναστολέας των ογκοπρωτεϊνών RET / PTC (Fallahi, P. et al. 2015) .

B. Αναστολείς της κινάσης BRAF

i) Το φάρμακο **Dabrafenib** είναι ένας αναστολέας των κινασών RAF. Οι ογκογόνες μεταλλάξεις της κινάσης BRAF οδηγούν σε ιδιόσυσταση ενεργοποίηση του μονοπατιού RAS/RAF/MEK/ERK. Μεταλλάξεις BRAF έχουν διαπιστωθεί σε υψηλή συχνότητα σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του θυρεοειδούς και του μελανώματος. Η συχνότερη μετάλλαξη του BRAF που έχει παρατηρηθεί είναι η V600E. Προκλινικά δεδομένα που προέκυψαν από βιοχημικές δοκιμασίες έδειξαν ότι το φάρμακο Dabrafenib αναστέλλει τις κινάσες BRAF που έχουν μεταλλάξεις ενεργοποίησης στο κωδικόνιο 600 (Fallahi, P. et al. 2015)

ii) Το φάρμακο **Vemurafenib** είναι αναστολέας της πρωτεΐνης BRAF. και συμβάλλει στην επιβράδυνση του ρυθμού ανάπτυξης και εξάπλωσης του καρκίνου που προκαλείται από μεταλλάξεις BRAF V600. Χορηγείται μόνο σε ασθενείς των οποίων το μελάνωμα οφείλεται στη μετάλλαξη BRAF V600 (Fallahi, P. et al, 2015).

Γ. Αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες.

Η αυξημένη αγγειογένεση συσχετίζεται με την επιθετική συμπεριφορά του θυρεοειδούς και τη μετάσταση όγκων. Έχει αποδειχτεί ότι η θυρεοειδική νεοπλασματική ανάπτυξη και ο επακόλουθος σχηματισμός μετάστασης εξαρτάται από την ικανότητα του όγκου να επάγει μία αγγειογενετική διακοπή, που προκαλείται από αλλαγή στην ισορροπία των αγγειογενετικών διεγερτών και αναστολέων. Ο VEGF (Vascular Endothelial Growth factor) σχετίζεται με αυξημένη επιθετικότητα, ανάπτυξη και εξάπλωση αρκετών όγκων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του θυρεοειδούς. Σε θυρεοειδή καρκινώματα παρατηρήθηκε υπερέκφραση του VEGF, VEGF-C, αγγειοποιητίνης 2 και του κύριου υποδοχέα του VEGF (VEGFR-2) (Fallahi, P. et al. 2015). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι, σε όγκους του θυρεοειδούς, οι αγγειογενετικοί παράγοντες εμπλέκονται στην νεοπλασματική ανάπτυξη, εξέλιξη και επιθετικότητα. Η συστηματική χορήγηση των αντιαγγειογενετικών φαρμάκων που στοχεύουν στο μονοπάτι μετάδοσης σήματος του VEGF αποτελεί μια θεραπευτική επιλογή για τους ασθενείς με καρκίνο του θυρεοειδούς.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Δείγματα

Η μελέτη περιλαμβάνει 33 δείγματα ασθενών που προήλθαν από το Παθολογοανατομικό Τμήμα του Στρατιωτικού Νοσοκομείου ΝΙΜΙΤΣ στην Αθήνα. Όλα τα δείγματα είναι βιοψίες ιστών σταθεροποιημένες με φορμόλη και εγκλεισμένες σε παραφίνη (Formalin-fixed Paraffin Embedded, FFPE). Οι βιοψίες, με βάση την ιστοπαθολογία και την κυτταρολογική εξέταση από εξειδικευμένο παθολόγο, ταξινομήθηκαν με κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO) σε διαφορετικούς τύπους καρκινωμάτων. Τα δείγματα

περιλαμβάνουν διαφορετικούς τύπους καρκινώματος του θυρεοειδούς και η συχνότητά τους στην παρούσα μελέτη είναι αντιπροσωπευτική της συχνότητας εμφάνισής τους που έχει αναφερθεί στο γενικό πληθυσμό (Πίνακας 3 και 4).

Πίνακας 3: Τύποι καρκινωμάτων του θυρεοειδούς και η συχνότητά τους

Τύποι καρκινωμάτων του θυρεοειδούς	Δείγματα	Συχνότητα στην παρούσα μελέτη (%)	Συχνότητα στον γενικό πληθυσμό (%)
Θηλώδες καρκίνωμα	11	33	75
Θυλακιώδης υπότυπος του θηλώδους καρκινώματος	13	39	
Θυλακιώδες καρκίνωμα	7	21	16
Μυελοειδές καρκίνωμα	2	6	5

Πίνακας 4: Στοιχεία ασθενών ανάλογα με τον τύπο καρκινώματος του θυρεοειδούς

Τύποι καρκινωμάτων του θυρεοειδούς	Φύλο		Ηλικία (Μέσος όρος + SD)
	Θήλυ	Άρρεν	
Θηλώδες καρκίνωμα	10	1	47,64 ± 13,18
Θυλακιώδης υπότυπος του θηλώδους καρκινώματος	9	4	51,15 ± 12,33
Θυλακιώδες καρκίνωμα	5	2	57,29 ± 15,24
Μυελοειδές καρκίνωμα	2	0	56,00 ± 1,00

2.2 Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη ήταν υψηλής καθαρότητας. Στη συνέχεια, αναφέρονται οι εταιρείες από τις οποίες αγοράστηκαν τα χημικά αντιδραστήρια και kit.

- Sigma-Aldrich
Αιθανόλη ($\geq 99.8\%$)
Ξυλένιο
- AppliChem Paureac ITW Companies
Αγαρόζη (Agarose Low EEO –Agarose standard)
Βρωμιούχο αιθίδιο (συγκέντρωσης 10 mg/ml)
- NEW ENGLAND Biolabs®inc
Μάρτυρας μεγεθών DNA (Low Molecular DNA Ladder)
- QIAGEN
Kit απομόνωσης DNA από βιοψίες ιστών (QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit)
- Kapa Biosystems
Πολυμεράση Kapa Taq (5U/μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα Πολυμεράσης (10X Taq Buffer A που περιέχει 15 mM Mg)
- MACHEREY-NAGEL
Kit καθαρισμού προϊόντων PCR (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up)

2.3. Μέθοδοι

2.3.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από βιοψίες ιστών

A. Διαλύματα – Αντιδραστήρια

Τα διαλύματα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση DNA από βιοψίες ιστού είναι τα παρακάτω:

- Ξυλένιο
- Αιθανόλη
- kit απομόνωσης DNA (QIAamp DNA FFPE Tissue), το οποίο περιέχει τα εξής αντιδραστήρια:
- Ρυθμιστικά διαλύματα Buffer ATL, Buffer AL (Lysis Buffer), Wash Buffer AW1, Wash Buffer AW2 , Elution Buffer ATE
- Διάλυμα Πρωτεΐνωσης K (20 mg/ml)
- QIAamp MinElute κολώνες και σωληνάρια συλλογής χωρητικότητας 2 ml

Τα ρυθμιστικά διαλύματα AW1 και AW2 πριν από τη χρήση τους παρασκευάζονται ως εξής: Στα 19 ml του Buffer AW1 προστίθενται 25 ml αιθανόλης($\geq 99.8\%$) και στα 13 ml του Buffer AW2 προστίθενται 30 ml αιθανόλης ($\geq 99.8\%$).

B. Πρωτόκολλο απομόνωσης

Το QIAamp DNA FFPE Tissue Kit έχει βελτιστοποιηθεί για τον καθαρισμό του DNA από τομές ιστών. Οι ιστοί είναι σταθεροποιημένοι με φορμόλη και εγκλεισμένοι σε παραφίνη και οι τομές έχουν πάχος μέχρι 10 μm . Από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 1 με 2 τομές, ανάλογα με την ποσότητα ιστού που περιέχεται σε κάθε τομή. Χρησιμοποιώντας ένα αποστειρωμένο νυστέρι, αφαιρέθηκε προσεκτικά η περίσσεια παραφίνης από τις τομές και ο τεμαχισμένος ιστός μεταφέρθηκε σε σωλήνα μικροφυγοκέντρησης (erpendorf tube) χωρητικότητας 1.5 ml. Ακολούθησε προσθήκη 1 ml ξυλένιου, έντονη ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα (16.600 x g) για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το ξυλένιο βοηθά στη διάλυση και απομάκρυνση της παραφίνης. Μετά τη φυγοκέντρηση δημιουργήθηκε υπερκείμενο το οποίο αφαιρέθηκε προσεκτικά με πιπέτα τύπου Gilson, χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα. Στη συνέχεια, προστέθηκε στο ίζημα 1 ml αιθανόλης ($\geq 99.8\%$), ισχυρή ανάδευση για 10 δευτερόλεπτα, φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα (16.600 x g) για 2 λεπτά και προσεκτική αφαίρεση του υπερκείμενου. Η προσθήκη αιθανόλης στοχεύει στην απομάκρυνση του εναπομείναντος ξυλένιου από το δείγμα. Ακολούθησε επώαση του δείγματος στους 37° C με ανοικτό το καπάκι μέχρι να εξατμιστεί εντελώς η αιθανόλη για χρονικό διάστημα περίπου 15-20 λεπτών. Ακολούθησε επαναιώρηση του δείγματος σε 180 μl Buffer ATL, προσθήκη 20 μl πρωτεϊνάσης K (συγκέντρωσης 20 mg/ml) και έντονη ανάδευση για 10 δευτερόλεπτα. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 56° C για 3 ώρες μέχρι να λυθεί εντελώς ο ιστός, με τη δράση της πρωτεϊνάσης K. Για την πλειοψηφία των δειγμάτων ήταν επαρκής η 24-ωρη επώαση, ενώ για κάποια δείγματα ήταν απαραίτητη η προσθήκη επιπλέον 10 μl πρωτεϊνάσης K μέχρι να επέλθει η πλήρης λύση τους. Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση μιας ώρας στους 90 ° C, η οποία στοχεύει στην αντιστροφή της εγκάρσιας σύνδεσης φορμόλης. Μετά από σύντομη φυγοκέντρηση του δείγματος ώστε να συγκεντρωθεί στον πάτο του σωληναρίου έγινε προσθήκη 200 μl Buffer AL, ισχυρή ανάδευση και προσθήκη 200 μl αιθανόλης ($\geq 99.8\%$) και επιπλέον ισχυρή ανάδευση. Με τη διαδικασία αυτή δημιουργείται στο δείγμα ένα λευκό ίζημα, το οποίο απομακρύνεται μετά από σύντομη φυγοκέντρηση. Τελικά όλο το κυτταρόλυμα μεταφέρθηκε σε στήλη QIAamp MinElute, η οποία είχε προηγουμένως τοποθετηθεί σε σωληνάριο erpendorf χωρητικότητας 2 ml. Στη συνέχεια η στήλη φυγοκεντρήθηκε στις 8000 στροφές ανά λεπτό (rpm) ή 6000 x g για 1 λεπτό. Σε αυτό το στάδιο το DNA δεσμεύεται στην μεμβράνη και οι προσμίξεις ρέουν μέσω αυτής. Μετά τη φυγοκέντρηση η στήλη μεταφέρθηκε σε καθαρό 2 ml σωληνάριο και προστέθηκαν 500 μl Buffer AW1. Η στήλη φυγοκεντρήθηκε στις 8000 rpm για 1 λεπτό και μεταφέρθηκε σε καθαρό 2 ml σωληνάριο. Ακολούθησε προσθήκη 500 μl Buffer AW2, φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 λεπτό και τοποθέτηση σε καθαρό 2 ml

σωληνάριο. Σε όλα τα προαναφερθέντα στάδια η επαφή μεταξύ της στήλης και του απορρέοντος υγρού πρέπει να αποφεύγεται. Στο τέλος πραγματοποιήθηκε μια φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα (16.600 x g) για 3 λεπτά για να στεγνώσει εντελώς η μεμβράνη. Η απομόνωση του DNA ολοκληρώθηκε με την μεταφορά της στήλης σε καθαρό σωληνάριο χωρητικότητας 1.5 ml, προσθήκη 25 μl Buffer ATE στο κέντρο της μεμβράνης, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό. Η διαδικασία έκλουσης δίνει ένα καθαρό και συμπυκνωμένο DNA και η επώαση των πέντε λεπτών αυξάνει την απόδοση της απομόνωσης. Το DNA αποθηκεύτηκε σε ψυγείο -20° C μέχρι την επόμενη χρήση του.

2.3.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

A. Διαλύματα - Αντιδραστήρια

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

- TAE 50X (stock): Tris-base (242 gr), οξικό οξύ (57.1 ml), EDTA (18.6 gr), ddH₂O μέχρι 1L, pH: 8
- TAE 1X: 20 ml TAE 50X, 980 ml ddH₂O
- Αγαρόζη - (Agarose Low EEO - Agarose standard)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) - Υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/ml
- Χρωστική φόρτωσης διαλύματος (Loading Buffer, 6X): 0.25% Μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromofenol blue) (25 mg), 30% w/v Γλυκερόλη (3 ml), ddH₂O (7 ml). Συνολικός όγκος: 10 ml
- Μάρτυρας Low Molecular DNA Ladder (500 μg/ml)

B. Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια μέθοδο διαχωρισμού και ανάλυσης μορίων DNA, RNA και πρωτεϊνών σύμφωνα με το μέγεθος και το φορτίο τους και βασίζεται στην κίνηση των φορτισμένων σωματιδίων μέσα σ'ένα ρυθμιστικό διάλυμα ή εσωτερικό πήκτωμα υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης για την ανάλυση του γενωμικού DNA και των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Το πήκτωμα αγαρόζης αποτελείται από πυκνό δίκτυο ουδέτερων πολυσακχαριτών (επαναλαμβανομένων μονάδων αγαρόζης), των οποίων οι αλυσίδες σχηματίζουν πόρους κατά το σχηματισμό του πήκτωματος. Λόγω αυτών των μεγάλων πόρων που σχηματίζονται κατά τον πολυμερισμό δημιουργείται ένα ικανοποιητικό ηλεκτροφορητικό υλικό που δεν εμποδίζει στερεοχημικά την ελεύθερη μετακίνηση των βιομακρομορίων. Επίσης, λόγω του ουδέτερου φορτίου και χαμηλού βαθμού χημικής πολυπλοκότητας της αγαρόζης, αποτρέπεται η αλληλεπίδρασή της με τα βιομόρια.

Το DNA, σε ουδέτερο pH, είναι αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων του. Έτσι, κατά την ηλεκτροφόρηση τα μόρια του DNA μετακινούνται προς την άνοδο, με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογάριθμου του αριθμού των βάσεων τους. Τα μικρότερα μόρια DNA μετακινούνται μέσα στο πήκτωμα πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα γιατί διαπερνούν πιο εύκολα τους πόρους της πηκτώματος κι έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μορίων διαφορετικού μεγέθους. Επειδή το πήκτωμα εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μήκους διαχωρίζονται σε “ζώνες” και γίνονται ορατά με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Το βρωμιούχο αιθίδιο όταν παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA (ή στο RNA) μπορεί να φθορίζει στο υπεριώδες φως (U.V.) με αποτέλεσμα να μπορεί να ανιχνευθεί ακόμα και ποσότητα 1 ng DNA με άμεση εξέταση του πηκτώματος. Ανάλογα με το μέγεθος του DNA που αναλύεται χρησιμοποιούνται πηκτώματα διαφορετικής περιεκτικότητας σε αγαρόζη: ενδεικτικά πήκτωμα 0.7% αγαρόζης διαχωρίζει ικανοποιητικά μεγάλα τμήματα DNA (5-10 kb) και πήκτωμα 2% αγαρόζης διαχωρίζει καλά μικρά τμήματα DNA (0.2-1 kb). Τέλος, χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα τα οποία παρέχουν τα απαραίτητα ιόντα για να πραγματοποιείται η μεταφορά ρεύματος και ταυτόχρονα διατηρούν το pH σε μια σχετικά σταθερή τιμή. Το διάλυμα που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία είναι το **TAE** (Tris/Acetate/EDTA) το οποίο έχει μικρότερη ρυθμιστική ικανότητα, θέλει χαμηλότερη τάση και περισσότερο χρόνο αλλά παρέχει καλύτερα αποτελέσματα και καλό διαχωρισμό DNA μεγέθους > 4kb και σε υπερελικωμένο DNA. Τέλος, η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου επηρεάζει άμεσα την πραγματική απόσταση που διανύουν τα βιομόρια σ' ένα δεδομένο χρόνο. Για κάθε ηλεκτροφορητική συσκευή και μέθοδο, το μέγιστο δυναμικό που μπορεί να εφαρμοσθεί καθορίζεται μέσα σε αυστηρά όρια και η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει με σταθερή τάση ή ένταση ρεύματος.

Γ. Πειραματική διαδικασία

Για την ανάλυση του DNA που απομονώθηκε από βιοψίες ιστών χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης με περιεκτικότητα 1%. Ενδεικτικά χρησιμοποιήθηκε ένα καλούπι ηλεκτροφόρησης το οποίο έχει χωρητικότητα 60 ml ρυθμιστικού διαλύματος. Το ρυθμιστικό διάλυμα (60 ml) και η αγαρόζη (0.6 gr) αναμείχθηκαν σε κωνική φιάλη και η αγαρόζη διαλύθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 3 λεπτά. Στη συνέχεια, το μείγμα αφέθηκε να κρυώσει υπό τρεχούμενο νερό και ακολούθησε προσθήκη 1.8 ml βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) (από διάλυμα 10 mg/ml, ώστε η τελική συγκέντρωση του EtBr στο διάλυμα να είναι 0.5 mg/ml). Το διάλυμα μετά από καλή ανάμειξη μεταφέρθηκε στο καλούπι προσεκτικά ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες και αφέθηκε να πήξει για χρονικό διάστημα 30 – 45 λεπτών. Το πήκτωμα τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (συγκέντρωσης 1X). Έπειτα, έγινε η προετοιμασία των δειγμάτων χρησιμοποιώντας ένα διάλυμα φόρτωσης που περιείχε μια ουσία υψηλής πυκνότητας, όπως η γλυκερόλη και μια χρωστική που μετακινείται με ταχύτητα περίπου ίδια με του DNA, όπως μπλε της βρωμοφαινόλης. Ενδεικτικά από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 4 μl DNA, 3 μl από το διάλυμα φόρτωσης (loading

buffer) και 11 μl νερού, ώστε να φορτωθούν τελικά 18 μl. Για την ανάλυση των προϊόντων PCR και την ηλεκτροφόρηση των καθαρισμένων προϊόντων χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 2%. Τα βήματα και τα αντιδραστήρια ήταν τα ίδια με αυτά που προαναφέρθηκαν, με τη διαφορά ότι η ποσότητα της αγαρόζης ήταν 1.2 gr σε τελικό όγκο 60 ml. Ηλεκτροφορήθηκαν 5 μl από κάθε αντίδραση PCR (που αναμείχθηκαν με 1 μl loading buffer) και 10 μl από τον αρνητικό μάρτυρα (negative control) (που αναμείχθηκαν με 1.5 μl loading buffer). Στο πρώτο πηγαδάκι του πηκτώματος αγαρόζης φορτώθηκε ο δείκτης μοριακών βαρών (Low Molecular DNA Ladder). Η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόστηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης ήταν 90 V και παρέμεινε σταθερή μέχρι την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης. Τέλος, για την ανάλυση των δειγμάτων DNA, το πήκτωμα μεταφέρθηκε σε συσκευή UV (με μέγιστο απορρόφησης μεταξύ 270-320 nm) και φωτογραφήθηκε.

2.3.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)

A. Αρχή της μεθόδου

Η παραγωγή μεγάλου αριθμού πανομοιότυπων αντιγράφων DNA μέσω κλωνοποίησης κατέστη δυνατή κατά τη δεκαετία του 1970. Οι τεχνικές του ανασυνδυασμένου DNA έφεραν επανάσταση στη μοριακή γενετική, προσφέροντας νέους τρόπους ανάλυσης των γονιδίων και των λειτουργιών τους. Εντούτοις, η κλωνοποίηση του DNA είναι χρονοβόρα. Στα μέσα της δεκαετίας του 1990 αναπτύχθηκε η **αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης** (PCR, Polymerase Chain Reaction), η οποία έφερε μια νέα επανάσταση στον τομέα της γονιδιακής ανάλυσης. Μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται *πολλαπλασιασμός* (amplification), η PCR επιτρέπει την παραγωγή *in vitro* από κάποιο μείγμα DNA ενός εξαιρετικά μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Τα προϊόντα της PCR ονομάζονται *αμπλικόνια* (amplicons). Η PCR είναι πλέον ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία της σύγχρονης μοριακής βιολογίας. Ο Kary Mullis, που ανέπτυξε την τεχνική, μοιράστηκε το βραβείο Nobel Χημείας το 1993 με τον Michael Smith. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλυσίδων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος, που ανέπτυξαν οι Britten και Kohne στα τέλη της δεκαετίας του '60.

Η PCR αρχίζει με την αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA το οποίο περιέχει την αλληλουχία-στόχο, δηλαδή την αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Ο πολλαπλασιασμός επιτυγχάνεται με πολλαπλούς γύρους αντιγραφής της αλληλουχίας-στόχου, χρησιμοποιώντας ως εκκινητές (primers) ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία προσδένονται στο μονόκλωνο DNA στα άκρα της αλληλουχίας-στόχου σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας. Οι εκκινητές έχουν συνήθως μήκος περίπου 20 νουκλεοτιδίων και συντίθενται σε κατάλληλα μηχανήματα. Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει τρία βήματα:

1. Η αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA, που επιτυγχάνεται με θέρμανση στους 94-95° C. Στη θερμοκρασία αυτή το DNA υφίσταται μετουσίωση (*denaturation*), με αποτέλεσμα το σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου και

συνεπώς το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Φυσιολογικά η DNA πολυμεράση (το ένζυμο που χρησιμοποιείται στις αντιδράσεις PCR) θα μετουσιωνόταν στη συγκεκριμένη θερμοκρασία. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται ένα είδος πολυμεράσης που είναι θερμοανθεκτική. Η πολυμεράση αυτή προέρχεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* που επιβιώνει σε θερμοκρασία 90° C στις θερμοπηγές.

2. Στο δεύτερο στάδιο ακολουθεί ψύξη του μείγματος της αντίδρασης σε θερμοκρασία μεταξύ 37-65° C, ανάλογα με το μέγεθος και την αλληλουχία των εκκινητών. Στο στάδιο αυτό, οι εκκινητές προσδένονται (υβριδοποιούνται) (*primer annealing*) στο αποδιαταγμένο DNA. Οι δύο εκκινητές είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε, στην κατάλληλη θερμοκρασία ο καθένας, να προσδένεται με υψηλή ειδικότητα σε μία από τις δύο αλυσίδες του DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα, στα άκρα της αλληλουχίας η οποία πρόκειται να πολλαπλασιαστεί.
3. Στο τρίτο στάδιο, το μείγμα θερμαίνεται στους 70-75° C για να πραγματοποιηθεί η επιμήκυνση των εκκινητών. Με τη δράση της θερμοανθεκτικής Taq DNA πολυμεράσης προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε εκκινητή (*extension*). Έτσι σχηματίζονται δύο αλυσίδες συμπληρωματικές προς αυτές των δύο αλυσίδων του προτύπου DNA με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό του DNA στόχου.

Τα στάδια που προαναφέρθηκαν επαναλαμβάνονται 35-40 φορές (κύκλοι της PCR) και η αντίδραση πραγματοποιείται σε κατάλληλη συσκευή που καλείται *θερμοκυκλοποιητής*. Ο θερμοκυκλοποιητής προγραμματίζεται ώστε να πραγματοποιούνται οι απαραίτητες μεταβολές της θερμοκρασίας και το μείγμα της αντίδρασης να παραμένει στην κατάλληλη θερμοκρασία για όσο χρειάζεται.

Τα συστατικά που αποτελούν το μείγμα μιας αντίδρασης PCR είναι τα εξής:

- DNA στόχος: Στην αντίδραση PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί DNA που προέρχεται από διαφορετικούς τύπους δειγμάτων, όπως ζωικοί και φυτικοί ιστοί, κυτταρικές καλλιέργειες, βακτήρια, εγκληματολογικό και αρχαιολογικό υλικό. Κάθε δείγμα DNA περιέχει το στόχο DNA, δηλαδή τις αλληλουχίες που ενδιαφερόμαστε να πολλαπλασιάσουμε. Για το λόγο αυτό το DNA πρέπει να είναι καθαρό από προσμίξεις με ξένο DNA, να μην είναι κατεστραμμένο στην περιοχή του στόχου DNA, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα να πολλαπλασιαστεί αυτή η περιοχή και να είναι υψηλής καθαρότητας χωρίς φαινόλες, πολυσακχαρίτες, απορρυπαντικά, EDTA ή άλλα χημικά που μπορεί να έχουν ανασταλτική δράση στην αντίδραση PCR.
- Εκκινητές (*primers*): Οι εκκινητές αποτελούν ένα από τα πιο σημαντικά συστατικά της αντίδρασης PCR γιατί αντιπροσωπεύουν τα νουκλεοτιδικά άκρα του DNA στόχου και είναι απαραίτητοι προκειμένου να προστεθούν τα υπόλοιπα νουκλεοτίδια της αλληλουχίας. Οι εκκινητές είναι σύνθετα ολιγονουκλεοτίδια 18-22 βάσεων. Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών (T_a , annealing temperature) αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την αποδοτικότητα των εκκινητών και εξαρτάται από το μήκος και τη σύσταση των εκκινητών σε βάσεις GC και AT. Η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού εκκινητή/στόχου DNA διαφέρει από την υπολογίσιμη T_m τιμή

των δύο εκκινητών . Έτσι η θερμοκρασία υβριδισμού εκκινητή/στόχου DNA είναι περίπου 3°C - 5°C μικρότερη από την T_m , η οποία μπορεί να προσεγγισθεί από τον τύπο $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$. Ως καλύτερη θερμοκρασία υβριδισμού επιλέγεται συνήθως η υψηλότερη θερμοκρασία που δίνει τα καλύτερα προϊόντα. Οι εκκινητές πρέπει να έχουν υψηλή εξειδίκευση και αποδοτικότητα, συνεπώς ο επιτυχής σχεδιασμός τους είναι πολύ σημαντικός.

- DNA πολυμεράση: Η πολυμεράση είναι το ένζυμο με το οποίο επιτυγχάνεται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA στόχου μετά από κάθε αποδιάταξη και υβριδισμό των εκκινητών. Το ένζυμο αυτό έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus*, ένα θερμοφίλο βακτήριο. Βακτήρια που ζουν σε θερμές πηγές διαθέτουν θερμοανθεκτικές DNA πολυμεράσες οι οποίες λειτουργούν καλύτερα σε υψηλές θερμοκρασίες, όπως η Taq DNA πολυμεράση. Η βέλτιστη θερμοκρασία της είναι στους 72°C , αλλά είναι αρκετά σταθερή και στους 95°C . Προστίθεται μόνο μια φορά στην αρχή της αντίδρασης και παραμένει ενεργή για 40-45 κύκλους, καθιστώντας δυνατή την αυτοματοποίηση της PCR με την χρήση των θερμικών κυκλοποιητών. Βελτιώνει επίσης την εξειδίκευση και ευαισθησία της αντίδρασης PCR. Εάν οι εκκινητές υβριδοποιηθούν λανθασμένα τότε μπορεί να ενισχυθεί με την PCR και μία ανεπιθύμητη περιοχή DNA. Αντίθετα στις υψηλές θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται με την Taq DNA πολυμεράση τα φαινόμενα αυτά ελαχιστοποιούνται.
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs): Τα dNTPs (dATP, dTTP, dCTP και dGTP) είναι απαραίτητα για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού. Είναι σημαντικό τα δεοξυνουκλεοτίδια να βρίσκονται σε ίση συγκέντρωση μεταξύ τους για να μη γίνονται λάθη κατά την αντιγραφή του DNA στόχου. Η συγκέντρωση των dNTPs σε μια αντίδραση PCR μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 50-200 μM . Τα dNTPs δεσμεύουν τα ιόντα Mg^{2+} και συνεπώς το ποσό των dNTPs προσδιορίζει και το ελεύθερο ποσό διαθέσιμου Mg^{2+} . Έτσι αν η συγκέντρωση των dNTPs αλλάζει σημαντικά, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και μια αλλαγή στη συγκέντρωση του ελεύθερου ποσού του διαθέσιμου Mg^{2+} , δηλαδή η βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης ιόντων Mg^{2+} θα πρέπει να γίνεται παράλληλα με τη συγκέντρωση των dNTPs.
- Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης (buffer) και ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}): Το διάλυμα αυτό δημιουργεί το κατάλληλο ιοντικό περιβάλλον για να πραγματοποιηθεί η υβριδοποίηση του εκκινητή με το στόχο DNA και περιέχει NaCl ή KCl, Tris-HCl και σταθεροποιητές του ενζύμου. Η Taq DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί ιόντα Mg^{2+} ως μεταλλικό συμπάραγοντα. Η συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} , που συνήθως προέρχονται από την προσθήκη χλωριούχου μαγνησίου (MgCl_2) στο διάλυμα, έχει μεγάλη επίδραση στην ειδικότητα και στη ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης PCR και κυμαίνεται μεταξύ 0.5-2.5 mM. Γενικά η περίσσεια Mg^{2+} έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση παραγωγής μη ειδικών προϊόντων, ενώ η έλλειψη Mg^{2+} μειώνει την ποσότητα των προϊόντων.

Τα συστατικά μιας αντίδρασης αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την επιτυχία της αντίδρασης PCR. Ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης είναι ακόμη ένας παράγοντας. Ο βέλτιστος αριθμός κύκλων σε μία αντίδραση PCR πρέπει να προσδιορίζεται πειραματικά με βάση την επιθυμητή παραγωγή προϊόντος αλλά και την αποφυγή σχηματισμού μη ειδικού προϊόντος. Συνήθως ο βέλτιστος αριθμός κύκλων είναι 30-40, αλλά αυτό μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με την εφαρμογή. Μετά από κάποιους κύκλους, η εκθετική ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής του DNA-στόχου σταδιακά σταματά και μετά διέρχεται μια στατική φάση. Αυτή η 2^η φάση λέγεται πλατώ αύξησης (amplification plateau) και οφείλεται στην εξάντληση των αντιδραστηρίων.

B. Touchdown PCR

Η Touchdown PCR (TD) αντιπροσωπεύει μια ριζικά διαφορετική προσέγγιση της βελτιστοποίησης PCR όπου οι εκκινητές αποφεύγουν την μη ειδική ενίσχυση αλληλουχιών. Στην Touchdown PCR προγραμματίζονται πολλοί κύκλοι όπως η υβριδοποίηση τμημάτων σε διαδοχικούς κύκλους που εκτελούνται σε αυξητικά χαμηλές θερμοκρασίες. Καθώς εξελίσσεται η αντίδραση, η θερμοκρασία υβριδοποίησης τμήματος, η οποία έχει επιλεγθεί αρχικά πάνω από το αναμενόμενο T_m , σταδιακά μειώνεται και πέφτει κάτω από αυτό το επίπεδο. Αυτή η στρατηγική βοηθάει στο να διασφαλίσει ότι τα πρώτα στάδια υβριδοποίησης εκκινητή-δείγματος περιλαμβάνουν μόνο εκείνα τα αντιδραστήρια με τη μεγαλύτερη συμπληρωματικότητα, δηλαδή εκείνα που παρέχουν το αμπλικόνιο-στόχο. Ακόμη και αν η θερμοκρασία υβριδοποίησης μπορεί τελικά να πέσει κάτω από το T_m μη ειδικών υβριδοποιήσεων, το αμπλικόνιο-στόχος θα έχει ήδη ξεκινήσει την ενίσχυσή του και είναι έτσι σε μια θέση ώστε να εκτοπίσει οποιαδήποτε καθυστερημένα (μη ειδικά) προϊόντα PCR κατά τη διάρκεια των υπόλοιπων κύκλων. Η TD PCR αποτελεί μια πιθανή μέθοδο για την προσέγγιση βέλτιστης ενίσχυσης μιας αντίδρασης PCR. Έχει βρεθεί ότι μια ποικιλία από διαφορετικές ικανοποιητικές αντιδράσεις απόδοσης μοναδικού αμπλικονίου καθίστανται πιο ισχυρές (π.χ. απόδοση περισσότερου προϊόντος) όταν υποβάλλονται σε TD PCR. Τα πρώτα βήματα της TD PCR έχουν υψηλές θερμοκρασίες υβριδοποίησης. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης μειώνεται σταδιακά (π.χ. 1-2° C κάθε δεύτερο κύκλο). Η αρχική θερμοκρασία υβριδοποίησης πρέπει να έχει αρκετούς βαθμούς πάνω από την αναμενόμενη T_m των εκκινητών. Στη συνέχεια η θερμοκρασία υβριδοποίησης σταδιακά μειώνεται μέχρι να φτάσει την υπολογισμένη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών ή κάποιους βαθμούς κάτω. Έτσι η πρώτη αλληλουχία που ενισχύεται είναι αυτή μεταξύ των περιοχών με τη μεγαλύτερη ειδικότητα του εκκινητή, όπου είναι πολύ πιθανό να είναι η επιθυμητή αλληλουχία. Στη συνέχεια τα τμήματα αυτά ενισχύονται στους επόμενους κύκλους σε χαμηλότερες θερμοκρασίες όπου ανταγωνίζονται τις μη ειδικές αλληλουχίες. Έτσι, η Touchdown PCR αυξάνει την ειδικότητα της αντίδρασης σε υψηλότερες θερμοκρασίες και αυξάνει την αποτελεσματικότητα προς το τέλος με μείωση της θερμοκρασίας υβριδοποίησης. Αυτό βελτιώνει σε μεγάλο βαθμό το τελικό στάδιο της διαδικασίας της PCR.

Γ. Πειραματική διαδικασία

Στην παρούσα μελέτη ενισχύθηκαν οι αλληλουχίες του γονιδίου NRAS και συγκεκριμένα των κωδικονίων 12, 13 και 61. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι για την ενίσχυση της περιοχής του κωδικονίου 61 του γονιδίου NRAS χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών, τα NRAS 61#1 και NRAS 61#2. Ο λόγος χρήσης δύο ζευγών εκκινητών οφείλεται στο ότι οι εκκινητές NRAS 61#1 ήταν αρχικά αποτελεσματικοί με ένα αριθμό δειγμάτων DNA, εφαρμόζοντας την διαδικασία Touchdown PCR, αλλά δεν ήταν αποτελεσματικοί σε άλλα δείγματα DNA. Στον Πίνακα 5 αναφέρονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και στον Πίνακα 6 παρατίθενται οι αλληλουχίες που ενισχύθηκαν και τα υπό μελέτη κωδικόνια (12,13,61).

Πίνακας 5. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, η αλληλουχία τους, το Tm και το μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης με την αντίδραση PCR.

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία (5'→3')	Tm (C°)	Μέγεθος προϊόντος
NRAS 12/13	Forward	AAAGTACTGTAGATGTGGCTC	55,9	224 bp
	Reverse	GTGAGAGACAGGATCAGG	56	
NRAS 61#1	Forward	GCATTGCATTCCCTGTGG	56	245 bp
	Reverse	TAATATCCGCAAATGACTTGC	54	
NRAS 61#2	Forward	GATTCTTACAGAAAACAAGTG	52	157 bp
	Reverse	ATGACTTGCTATTATTGATGG	52	

Πίνακας 6. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, η θέση τους στη νουκλεοτιδική αλληλουχία και το αμινοξύ/έα ενδιαφέροντος.

Εκκινητής	Αλληλουχία γονιδίου	Αμινοξύ
NRAS 12/13	AAAGTACTGTAGATGTGGCTC GCCAATTAACCCTGATTACTGGT TTCCAACAGGTTCTTGCCTGGTGTGAAATGACTGAGTACAAACTG GTGGTGGTTGGAGCA GGTGGT GTTGGGAAAAGCGCACTGACAAT CCAGCTAATCCAGAACCACCTTTGTAGATGAATATGATCCCA TAGAGGTGAGGCCAGTGGTAGCCCGCTGA CCTGATCCTGTCTC TCAC	GGT-GGT Γλυκίνη- Γλυκίνη
NRAS 61#1	GCATTGCATTCCCTGTGG TTTTAAATAAAAATTGAACTTCCCTC CCTCCCTGCCCCCTTACCCTCCACACCCCAAGGATTCTTACAGA AAACAAGTGGTTATAGATGGTGAACCTGTTTGTGGACATACT GGATACAGCTGGA CAA GAAGAGTACAGTGCCATGAGAGACCAAT ACATGAGGACAGGCCGAAGGCTTCCCTCTGTGTATTGTCATCAAT AATA GCAAGTCATTGCGGATATTA	CAA Γλουταμίνη

NRAS 61#2

GATTCTTACAGAAAACAAGTGGTTATAGATGGTGAAACCTGTTT
 GTTGGACATACTGGATACAGCTGGACAAAGAAGAGTACAGTGCCA
 TGAGAGACCAATACATGAGGACAGGCCGAAGGCTTCCTCTGTGTA
 TTTGCCATCAATAATAGCAAGTCAT

CAA
 Γλουταμίνη

Ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων της κάθε αντίδρασης PCR αρχικά παρασκευάζεται ένα μείγμα (Master Mix) για όλα τα δείγματα, το οποίο περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από το δείγμα DNA. Το ένζυμο είναι το τελευταίο συστατικό που προστίθεται στο Master Mix, το οποίο μετά από καλή ανάμιξη μοιράζεται στα ειδικά σωληνάρια της PCR (PCR tubes). Τέλος, σε κάθε PCR tube ακολούθησε προσθήκη του DNA του κάθε δείγματος. Ανεξάρτητα από τον αριθμό των δειγμάτων σε κάθε αντίδραση PCR υπήρχε πάντα ένας αρνητικός μάρτυρας ελέγχου (negative control) που δεν περιείχε DNA, αλλά μόνο νερό. Το δείγμα αυτό λειτουργεί ως μάρτυρας ελέγχου για τον έλεγχο τυχόν επιμόλυνσης. Αφού ολοκληρώθηκαν όλα τα δείγματα, τα PCR tubes τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή επιλέγοντας το πρόγραμμα που είναι κατάλληλο για κάθε εκκινητή. Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR παρατίθενται στον Πίνακα 7 .

Πίνακας 7. Ποσότητες αντιδραστηρίων στις αντιδράσεις PCR

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση	Όγκος (μl) αντιδραστηρίου
10x Buffer (+15 mM Mg ⁺²)	1X Buffer (+1.5 mM Mg ⁺²)	5
dNTPs (10 mM)	0.2 mM	1
10pm/μl Forward NRAS	0.5 pm/μl	2,5
10pm/μl Reverse NRAS	0.5 pm/μl	2,5
Πολυμεράση Kara Taq (5 U/μl)	0.02 U/μl	0,2
Δείγμα DNA	-	4
H₂O	-	34,8
Συνολικός όγκος	-	50

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, για κάθε γονίδιο χρησιμοποιείται διαφορετικό πρόγραμμα αντίδρασης PCR στο θερμοκυκλοποιητή, το οποίο ρυθμίζεται ανάλογα με το Tm των εκκινητών και τη θερμοκρασία υβριδοποίησης στην οποία αποδίδει ο κάθε εκκινητής δίνοντας το καλύτερο προϊόν. Μετά από διαφορετικά πειράματα βρέθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης PCR για τους εκκινητές NRAS 12/13, NRAS 61#1 και NRAS 61#2 και δίνονται στους Πίνακες 8,9,10.

Πίνακας 8. Πρόγραμμα PCR για την ενίσχυση του γονιδίου NRAS που περιέχει τα κωδικόνια 12 και 13, με τους εκκινητές NRAS12/13

Αποδιάταξη	95° C/5 min	
Αποδιάταξη	95° C/30 sec	45 κύκλοι
Υβριδοποίηση	53° C/30 sec	
Επέκταση	72° C/30 sec	
Επέκταση	72° C/10 min	
Παραμονή μέχρι να αναλυθεί	4° C	

Πίνακας 9. Πρόγραμμα touchdown PCR για την ενίσχυση του γονιδίου NRAS που περιέχει το κωδικόνιο 61, με τους εκκινητές NRAS61#1.

Αποδιάταξη	95° C/5 min	
Αποδιάταξη	95° C/30 sec	2 κύκλοι
Υβριδοποίηση	66° C/30 sec	
Επέκταση	72° C/30 sec	
Αποδιάταξη	95° C/30 sec	2 κύκλοι
Υβριδοποίηση	64° C/30 sec	
Επέκταση	72° C/30 sec	
Αποδιάταξη	95° C/30 sec	2 κύκλοι
Υβριδοποίηση	62° C/30 sec	
Επέκταση	72° C/30 sec	
Αποδιάταξη	95° C/30 sec	2 κύκλοι
Υβριδοποίηση	60° C/30 sec	
Επέκταση	72° C/30 sec	
Αποδιάταξη	95° C/30 sec	2 κύκλοι
Υβριδοποίηση	58° C/30 sec	
Επέκταση	72° C/30 sec	
Αποδιάταξη	95° C/30 sec	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση	56° C/30 sec	
Επέκταση	72° C/30 sec	
Επέκταση	72° C/10 min	
Παραμονή μέχρι να αναλυθεί	4° C	

Πίνακας 10. Πρόγραμμα PCR για την ενίσχυση του γονιδίου NRAS που περιέχει το κωδικόνιο 61, με τους εκκινητές NRAS 61#2

Αποδιάταξη	95° C/5 min	
Αποδιάταξη	95° C/30 sec	45 κύκλοι
Υβριδοποίηση	49° C/30 sec	
Επέκταση	72° C/30 sec	
Επέκταση	72° C/10 min	
Παραμονή μέχρι να αναλυθεί	4° C	

Μετά την ολοκλήρωση των αντιδράσεων PCR, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (η παρασκευή του πηκτώματος και η ηλεκτροφόρηση έχει αναλυθεί παραπάνω). Σκοπός είναι η ανάλυση και έλεγχος των προϊόντων της PCR. Συγκεκριμένα, ο έλεγχος για τυχόν επιμόλυνση παρατηρώντας ότι δεν υπάρχει ίχνος προϊόντος στο δείγμα αρνητικού μάρτυρα ελέγχου (negative control). Σε περίπτωση επιμόλυνσης όλα τα αντιδραστήρια αντικαθίστανται με καινούρια και επανελέγχονται. Επίσης, με την ηλεκτροφόρηση ελέγχεται η παρουσία του επιθυμητού προϊόντος, καθώς και η παρουσία παραπροϊόντων, συγκρίνοντας με τον μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών. Τα προϊόντα της PCR αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι τον καθαρισμό τους.

2.3.4. Καθαρισμός προϊόντων PCR

Το NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit της εταιρείας MACHEREY – NAGEL χρησιμοποιήθηκε για τον γρήγορο καθαρισμό των προϊόντων της PCR από άλατα, ένζυμα, ίχνη εκκινητών, διμερή εκκινητών και παραπροϊόντα που προκύπτουν από μη ειδικό υβριδισμό, ώστε να μην επηρεάσουν την μετέπειτα αλληλούχιση τους. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής: αρχικά στο διάλυμα NT3 προστέθηκε αιθανόλη σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Το πρώτο βήμα αφορά την προσαρμογή των συνθηκών δέσμευσης του DNA. Για πολύ μικρούς όγκους δείγματος (<30 μl), ο τελικός όγκος του μείγματος της αντίδρασης προσαρμόστηκε στα 50 μl με προσθήκη νερού. Ακολούθησε ανάμειξη 1 όγκου του δείγματος με 2 όγκους του διαλύματος NTI. Συγκεκριμένα, αναμειχθηκαν 100 μl Buffer NTI με τα 50 μl δείγματος. Στη συνέχεια το μείγμα φορτώθηκε σε στήλη NucleoSpin Gel and PCR Clean-up η οποία έχει προηγουμένως τοποθετηθεί σε σωληνάριο 2 ml. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 30 δευτερόλεπτα στα $11.000 \times g$, ώστε το DNA να δεσμευτεί στη στήλη. Ακολούθησε πλύση της μεμβράνης, προσθέτοντας 700 μl Buffer NT3 στην στήλη και φυγοκέντρηση στα $11.000 \times g$. Μετά από απόρριψη του απορρέοντος υγρού η διαδικασία επαναλήφθηκε για ελαχιστοποίηση μεταφοράς του άλατος. Στο επόμενο βήμα η μεμβράνη ξηράνθηκε μετά από με φυγοκέντρηση στα $11.000 \times g$ για 1 λεπτό, με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος NT3 καθώς τα υπολείμματα αιθανόλης από το διάλυμα NT3 μπορεί να αναστείλουν ενζυματικές αντιδράσεις. Η διαδικασία καθαρισμού ολοκληρώθηκε με την έκλουση του DNA. Η στήλη τοποθετήθηκε σε ένα καινούριο 1,5 ml tube και προστέθηκαν 15-30 μl Buffer NE, ανάλογα με την ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης PCR. Η στήλη επώαστηκε για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό στα $11.000 \times g$. Τα καθαρισμένα προϊόντα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% με σκοπό την ποσοτικοποίησή τους.

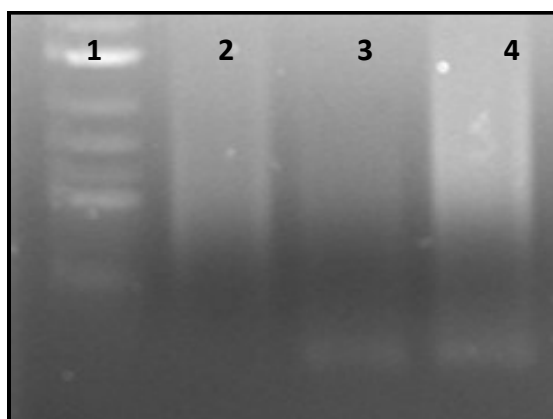
2.3.5. Αλληλούχιση των προϊόντων της PCR

Η αλληλούχιση του DNA χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας ενός γονιδίου και κατ' επέκταση για την ανίχνευση μεταλλαγών στο γονίδιο. Η αλληλούχιση πραγματοποιείται σε καθαρισμένα προϊόντα PCR και αποτελεί μια ευαίσθητη μέθοδο η οποία μπορεί να ανιχνεύσει μεταλλαγές μεγέθους μιας βάσης. Η αλληλούχιση των καθαρισμένων προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε από εταιρεία κυτταρικών και μοριακών ανοσολογικών εφαρμογών με την επωνυμία *CEMIA* (Cellular and Molecular Immunological Applications) (Λάρισα). Τα αποτελέσματα των αλληλουχήσεων καταγράφονται με τη μορφή χρωματογραφημάτων τα οποία επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα *bioedit v7.2.5*. (Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad CA 92008, Last update 12/11/2013). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχιση των προϊόντων της PCR ήταν ο Reverse NRAS 12/13, Reverse NRAS 61#1 και Reverse NRAS 61#2.

3. Αποτελέσματα

3.1. Ηλεκτροφόρηση γενωμικού DNA

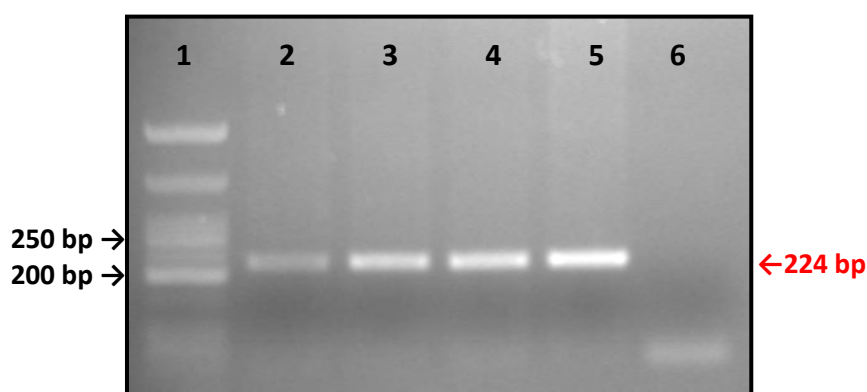
Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης του γενωμικού DNA από βιοψίες ιστών σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας QIAGEN, εκτελέστηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Σκοπός είναι ο έλεγχος της ποιότητας του DNA και της απόδοσης της απομόνωσής του. Στην Εικόνα 8, παρουσιάζεται ενδεικτικά η ηλεκτροφόρηση κάποιων δειγμάτων DNA .



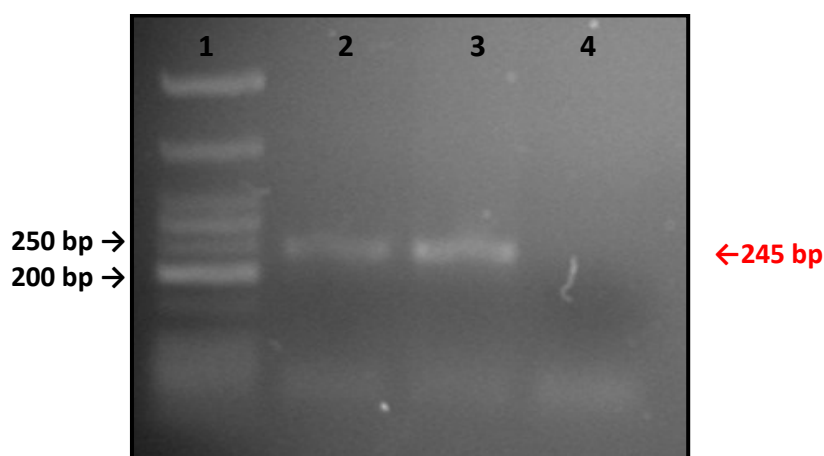
Εικόνα 8. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% του γενωμικού DNA διαφορετικών δειγμάτων μετά την απομόνωσή τους. **Διαδρομή 1:** δείκτης μοριακών βαρών, DNA Ladder 50 bp. **Διαδρομές 2-4:** Γενωμικό DNA από τα δείγματα 20, 22 και 31.

3.2. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR

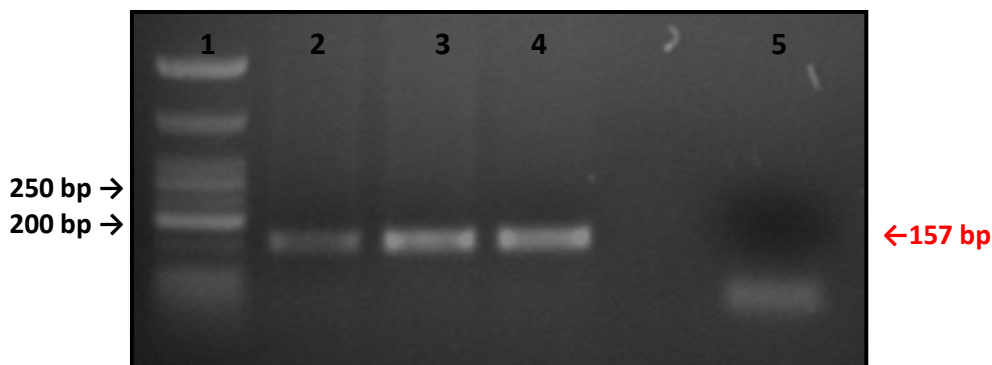
Με την διαδικασία της PCR το γενωμικό DNA ενισχύθηκε με χρήση κατάλληλων εκκινητών στις περιοχές των κωδικονίων 12, 13 και 61 του γονιδίου NRAS. Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Έτσι επιβεβαιώθηκε η παρουσία των ειδικών προϊόντων που διαθέτουν το κατάλληλο μέγεθος, σε συνδυασμό με την απουσία προϊόντων από το δείγμα αρνητικού ελέγχου (negative control) της κάθε αντίδρασης, το οποίο αποτελεί δείκτη πιθανής επιμόλυνσης. Στις Εικόνες 8-10 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα προϊόντα ενίσχυσης των περιοχών των κωδικονίων 12, 13 και 61 του γονιδίου NRAS διαφορετικών δειγμάτων.



Εικόνα 8. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% της περιοχής που περιλαμβάνει τα κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου NRAS μετά από την ενίσχυση διαφορετικών DNA με αντίδραση PCR, με τους εκκινητές NRAS 12/13. **Διαδρομή 1:** δείκτης μοριακών βαρών, DNA Ladder 50 bp. **Διαδρομές 2-5:** Ενίσχυση γενωμικού DNA των δειγμάτων 1, 2, 3 και 4. **Διαδρομή 6:** Δείγμα αρνητικού ελέγχου της αντίδρασης PCR.



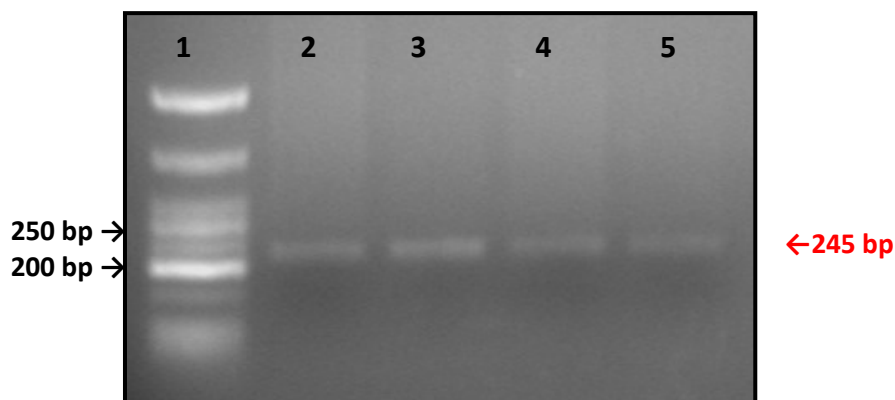
Εικόνα 9. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% της περιοχής που περιλαμβάνει το κωδικόνιο 61 του γονιδίου NRAS μετά από την ενίσχυση διαφορετικών DNA με αντίδραση PCR, με τους εκκινητές NRAS 61#1. **Διαδρομή 1:** δείκτης μοριακών βαρών, DNA Ladder 50 bp. **Διαδρομές 2-3:** Ενίσχυση γενωμικού DNA των δειγμάτων 1 και 2. **Διαδρομή 4:** Δείγμα αρνητικού ελέγχου της αντίδρασης PCR.



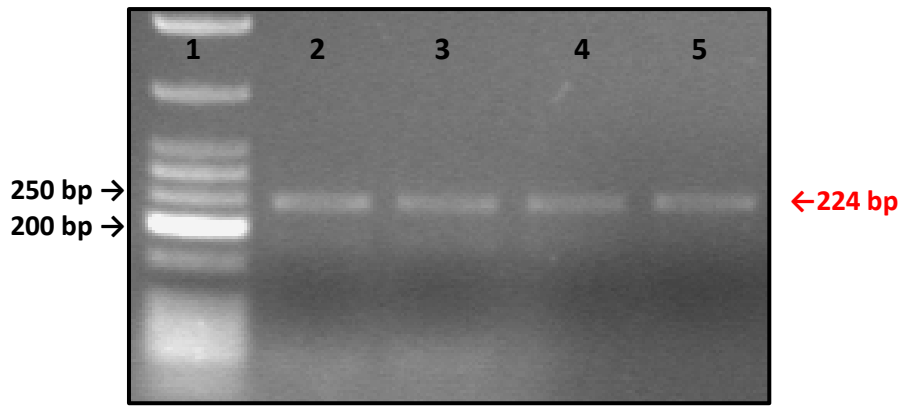
Εικόνα 10. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% της περιοχής που περιλαμβάνει το κωδικόνιο 61 του γονιδίου NRAS μετά από την ενίσχυση διαφορετικών DNA με αντίδραση PCR, με τους εκκινητές NRAS 61#2. **Διαδρομή 1:** δείκτης μοριακών βαρών, DNA Ladder 50 bp. **Διαδρομές 2-4:** Ενίσχυση γενωμικού DNA των δειγμάτων 1 και 2. **Διαδρομή 5:** Δείγμα αρνητικού ελέγχου της αντίδρασης PCR.

3.3 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

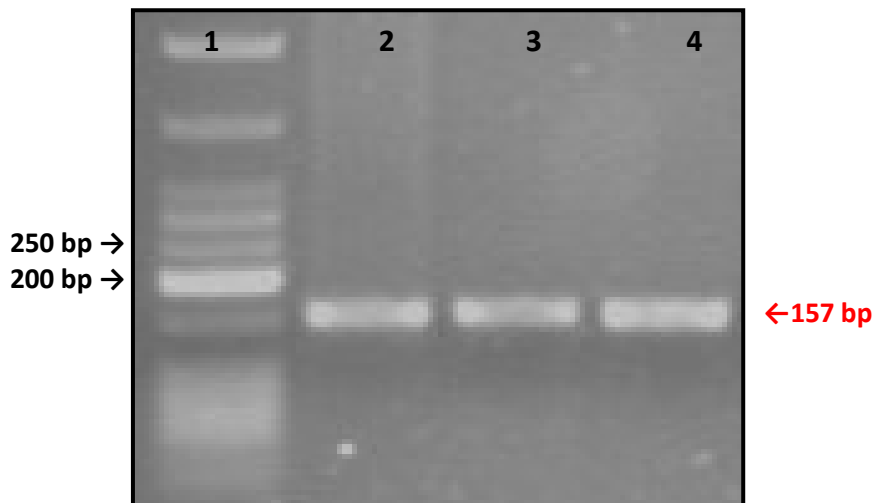
Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR στοχεύει στην απομάκρυνση των συστατικών της αντίδρασης PCR (συνήθως εκκινητές ή διμερή εκκινητών), ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη αλληλούχιση τους. Τα προϊόντα της PCR μετά τον καθαρισμό τους ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% με σκοπό την ανάλυση και την ποσοτικοποίησή τους. Στις Εικόνες 11-13 παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποια καθαρισμένα προϊόντα της PCR.



Εικόνα 11. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των προϊόντων ενίσχυσης της περιοχής που περιλαμβάνει τα κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου NRAS (με τους εκκινητές NRAS 12/13) μετά από τον καθαρισμό τους. **Διαδρομή 1:** δείκτης μοριακών βαρών, DNA Ladder 50 bp. **Διαδρομές 2-5:** Καθαρισμένα προϊόντα ενίσχυσης του γενωμικού DNA των δειγμάτων 16, 18, 20 και 25.



Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των προϊόντων ενίσχυσης της περιοχής που περιλαμβάνει το κωδικόνιο 61 του γονιδίου NRAS (με τους εκκινητές NRAS 61#1) μετά από τον καθαρισμό τους. **Διαδρομή 1:** δείκτης μοριακών βαρών, DNA Ladder 50 bp. **Διαδρομές 2-5:** Καθαρισμένα προϊόντα ενίσχυσης του γενωμικού DNA των δειγμάτων 1, 2, 4 και 5.

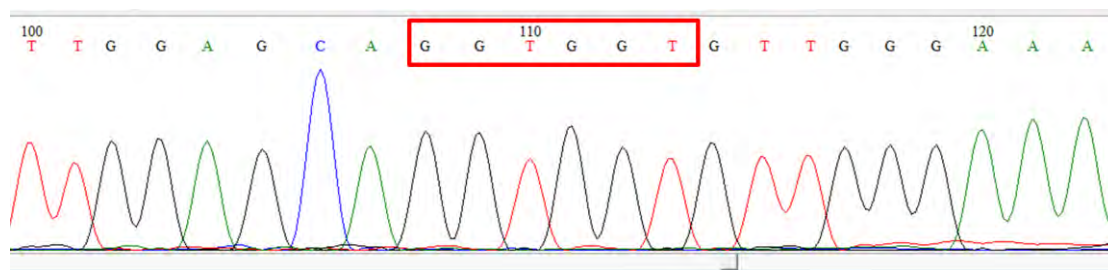


Εικόνα 13. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των προϊόντων ενίσχυσης της περιοχής που περιλαμβάνει το κωδικόνιο 61 του γονιδίου NRAS (με τους εκκινητές NRAS 61#2) μετά από τον καθαρισμό τους. **Διαδρομή 1:** δείκτης μοριακών βαρών, DNA Ladder 50 bp. **Διαδρομές 2-5:** Καθαρισμένα προϊόντα ενίσχυσης του γενωμικού DNA των δειγμάτων 10, 18, και 19.

3.4. Αλληλούχιση των προϊόντων της PCR

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των προϊόντων της PCR απεικονίζονται με τη μορφή χρωματογραφήματος. Αρχικά έγινε έλεγχος της ποιότητας του χρωματογραφήματος (σαφείς κορυφές) και στη συνέχεια σύγκριση της αλληλουχίας του κάθε δείγματος με τις κατατιθέμενες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων Genbank του NCBI. Μετά από ευθυγράμμιση με το πρόγραμμα BLAST του NCBI βρέθηκε 98-100% ομολογία στην αλληλουχία των προϊόντων της PCR με τις περιοχές του γονιδίου NRAS που περιλαμβάνουν τα κωδικόνια 12, 13 και 61.

Στις Εικόνες 14 και 15 δίνονται ενδεικτικά τα χρωματογραφήματα που εστιάζονται στην περιοχή των κωδικονίων 12 και 13 (GGT και GGT) και του κωδικονίου 61 (CAA).



Εικόνα 14. Χρωματογράφημα μιας περιοχής του γονιδίου NRAS για το δείγμα 16. Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση των κωδικονίων 12 και 13.



Εικόνα 15. Χρωματογράφημα μιας περιοχής του γονιδίου NRAS για το δείγμα 1. Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση του κωδικονίου 61.

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

4. Συζήτηση

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αποτελεί την πιο κοινή κακοήθεια του ενδοκρινικού συστήματος και η συχνότητά του αυξάνεται σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες. Η πλειοψηφία των καρκινωμάτων του θυρεοειδούς προέρχεται από τα θυλακίωδη επιθηλιακά κύτταρα, ενώ ένα μικρότερο ποσοστό προέρχεται από τα παραθυλακίωδη κύτταρα ή κύτταρα C. Με βάση τα ιστοπαθολογικά τους χαρακτηριστικά οι διαφορετικοί τύποι καρκινωμάτων του θυρεοειδούς ταξινομούνται σε θηλώδη, θυλακίωδη, αναπλαστικά και μυελοειδή καρκινώματα. Επιπλέον, έχουν ταυτοποιηθεί ποικίλες παραλλαγές μεταξύ των παραπάνω τύπων, με το θηλώδες καρκίνωμα του θυλακίωδους υποτύπου να αποτελεί την πιο κοινή παραλλαγή.

Η κατανόηση της μοριακής παθογένεσης και ο προσδιορισμός μοριακών δεικτών, οι οποίοι θα χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση και πρόγνωση του καρκίνου του θυρεοειδούς, είναι υψηλής κλινικής σημασίας. Έχει αποδειχθεί ότι διάφορες γενετικές και επιγενετικές μεταλλάξεις παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη και εξέλιξη των καρκινωμάτων του θυρεοειδούς. Οι πιο συχνές γενετικές μεταλλάξεις που παρατηρούνται περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια BRAF και RAS, καθώς και αναδιατάξεις μεταξύ των γονιδίων RET/PTC και PAX8/PPARγ. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι γενετικές μεταλλάξεις στον καρκίνο του θυρεοειδούς είναι αμοιβαίες αποκλειόμενες. Η BRAF είναι μία κινάση σερίνης-θρεονίνης που ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών RAF. Η BRAF ενεργοποιείται από τη δέσμευση RAS και ως επακόλουθο οδηγεί σε φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των μεταγενέστερων στόχων κατά μήκος του μονοπατιού σηματοδότησης των MAPK. Σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF (κωδικόνιο 600), οι οποίες οδηγούν στη συνεχή ενεργοποίηση της κινάσης, προκαλούν ογκογένεση στα κύτταρα του θυρεοειδούς. Η οικογένεια των γονιδίων RAS περιλαμβάνει τα γονίδια HRAS, KRAS και NRAS. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που μεταδίδουν σήματα προερχόμενα από τους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης κατά μήκος των σηματοδοτικών μονοπατιών MAPK και P13K/Akt. Η ενεργοποίηση των σημειακών μεταλλάξεων στα διακριτά πεδία των γονιδίων RAS (κωδικόνια 12, 13 και 61) είναι η δεύτερη πιο συχνή γενετική μεταλλαγή στον καρκίνο του θυρεοειδούς. Αν και στους περισσότερους τύπους καρκίνου φαίνεται να υπερισχύουν οι μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 και 13 του

γονιδίου KRAS, στον καρκίνο του θυρεοειδούς οι πιο συχνές μεταλλάξεις αφορούν τα κωδικόνια 61 των γονιδίων HRAS και NRAS (Nikiforou, 2011).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συσχέτιση μεταλλάξεων του γονιδίου NRAS και συγκεκριμένα στα κωδικόνια 12, 13 και 61 με συγκεκριμένους τύπους καρκινωμάτων του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε γονιδιωματικό DNA από βιοψίες ιστών ασθενών, και στη συνέχεια το DNA ενισχύθηκε στις ειδικές περιοχές του γονιδίου NRAS χρησιμοποιώντας την Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR) και ακολούθησε αλληλούχιση των καθαρισμένων προϊόντων της PCR. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης έδειξαν ότι δεν ταυτοποιήθηκαν μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12, 13 και 61 του γονιδίου NRAS σε κανένα από τα 33 δείγματα που μελετήθηκαν. Παρά το γεγονός ότι ο πληθυσμός των ασθενών που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη είναι αντιπροσωπευτικός της συχνότητας επικράτησης των διαφόρων τύπων καρκινώματος του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό, τα αποτελέσματα μας θα πρέπει να ερμηνευτούν με προσοχή λόγω του μικρού μεγέθους του πληθυσμού.

Σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια HRAS, KRAS και NRAS σε θηλώδη καρκινώματα έχουν περιγραφεί με μια συχνότητα της τάξης του 10-20% σε διάφορες μελέτες, με τα περισσότερα θηλώδη καρκινώματα, που φέρουν τις μεταλλάξεις στα γονίδια RAS, να εμφανίζουν το ιστολογικό πρότυπο της θυλακιδώδους παραλλαγής (Nikiforou, 2011). Αντίθετα, οι περιορισμένες μελέτες, που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής, έχουν αποτύχει να βρουν μεταλλάξεις RAS σε μυελοειδή καρκινώματα ή έχουν βρει σε πολύ μικρό ποσοστό (Bockhorn et al. 2000). Επίσης, οι σημειακές μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12, 13 και 61 σε ένα από τα τρία γονίδια RAS έχουν βρεθεί σε ποσοστό 18-52% των θυλακιδωδών καρκινωμάτων (Motoi et al. 2000), και οι μεταλλάξεις NRAS στο κωδικόνιο 61 ήταν οι πιο κοινές (Nikiforou et al. 2003). Στην παρούσα μελέτη, ο αριθμός των δειγμάτων με θυλακιδώδη καρκίνο του θυρεοειδούς ήταν περιορισμένος, εμποδίζοντας την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Η μοναδική μελέτη στον ελληνικό πληθυσμό που έχει πραγματοποιηθεί είχε ως αντικείμενο την συσχέτιση μεταλλάξεων BRAF και KRAS σε δείγματα θηλώδους και μυελοειδούς καρκίνου του θυρεοειδούς (Goutas et al., 2008). Στη μελέτη αυτή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του KRAS βρέθηκε σε υψηλό ποσοστό, τόσο σε θηλώδη (54,5%), όσο και σε μυελοειδή (40,9%) καρκινώματα. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη η μετάλλαξη BRAF V600E ανιχνεύτηκε σε μικρότερο ποσοστό σε σύγκριση με την μετάλλαξη του KRAS σε θηλώδη καρκινώματα (27,3%).

Παρά το γεγονός ότι στη παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση των μεταλλάξεων του γονιδίου NRAS στα κωδικόνια 12, 13 και 61 με τους διαφορετικούς τύπους καρκινωμάτων του θυρεοειδούς, είναι απαραίτητο να επισημάνουμε τα εξής: α) ο ολικός αριθμός των δειγμάτων που αναλύθηκαν είναι μικρός, συνεπώς δεν μπορεί να επιτρέψει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων και άρα η μελέτη πρέπει να επεκταθεί σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και β) λόγω του γεγονότος ότι οι μεταλλάξεις σε καρκινώματα θυρεοειδούς είναι αμοιβαία αποκλειόμενες είναι απαραίτητο η μελέτη των καρκινωμάτων αυτών να επεκταθεί και στην ανίχνευση επιπλέον μοριακών αλλαγών, όπως μεταλλάξεων στο γονίδιο BRAF, στα υπόλοιπα γονίδια της οικογένειας RAS (HRAS και KRAS) καθώς και των γενετικών αναδιατάξεων RET/PTC και PAX/PPARγ.

Αναφορές

1. Fawcett Don, Jensch Ronald. (2002). *Bloom & Fawcett's Concise Histology*. New York: Arnold Publishers. pp. 257–258
2. Schneider, D.F. , Chen, H. (2013). New Developments in the Diagnosis and Treatment of Thyroid Cancer. *CA Cancer J Clin*. 63(6): 373–394.
3. Mingzhao Xing. (2013). Molecular Pathogenesis and Mechanisms of Thyroid cancer. *Nat Rev Cancer PMC*. 13(3): 184–199.
4. Hundahl, S.A., Fleming, I.D., Fremgen, A.M., Menock, H.R. (1985-1995). A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the US. *Cancer*. 1998;83(12):2434-2436). 1998;83(12):2638-2648)
5. Nikiforov, Y.E. (2011). Molecular Diagnostics of Thyroid Tumors. *Arch Pathol Lab Med*. Vol 135, 569-577
6. Kimura, E.T., Nikiforova, M.N., Zha, 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 PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res*. 63: (7):1454-1457
7. Xing, M. (2005). BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 12(2):245-262
8. Howell, G.M, Hodak, S.P. ,Yip, L. (2013). RAS mutations in Thyroid Cancer. *The Oncologist*. 18:926-932
9. Vasko, V., Ferrand, M., Cristofaro, J. et al. (2003). Specific pattern of Ras oncogene mutations in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 88:2745-2752
10. Liu, R.T., Hou, C.Y., You, H.L. et al. (2004). Selective occurrence of Ras oncogene mutations in benign and malignant thyroid follicular neoplasms in Taiwan. *Thyroid*. 14:616-621
11. Zhu, Z. , Gandhi, M., Nikiforova, M.N. et al. (2003). Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 120:71-77
12. Nikiforova, M.N., Lynch, R.A., Biddinger, P.W. et al. (2003). Ras mutations and PAX8-PPAR γ rearrangement in thyroid tumors: Evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 88:2318-2326
13. Cooper, D.S., Doherty, G.M. et al. (2009). Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 19:1167-1214
14. Nikiforov, Y.E., Nikiforova, M.N. (2011). Molecular genetics and diagnosis on thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 7:569-580
15. Nikiforov, Y.E., Otori, N.P., Hodak, S.P. et al. (2011). Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: A prospective analysis of 1056 FNA samples. *J Clin Endocrinol Metab*. 96:3390-3397

16. Nikiforov, Y., Steward, D.L., Nikiforova, M.N. et al. (2006). Role of molecular testing for mutations improving the fine needle aspiration (FNA) diagnosis of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab.* 94:2092-8
17. Cantana, S., Capezzone, M., Marchisotta, S. et al. (2010). Impact of proto-oncogene mutation detection in cytological specimens from thyroid nodules improves the diagnostic accuracy of cytology. *J Clin Endocrinol Metab.* 95:1365-9
18. Moses, W., Weng, J., Sansano, I. et al. (2010). Molecular testing for somatic mutations improves the accuracy of thyroid fine needle aspiration biopsy. *World J Surg.* 34:2589-94
19. McCain Jack. (2013). The MAPK (ERK) Pathway. Investigational Combinations for the Treatment of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. *P.T.* 38:96-98, 105-108
20. Xing, M. (2010). Genetic Alterations in the Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt Pathway in Thyroid Cancer. *Thyroid.* 20:697-706
21. O’neill, J.C., Oucharek, J., Learoyd, D., Sidhu, S.B. (2010). Standard and Emerging Therapies for Metastatic Differentiated Thyroid Cancer. *Oncologist.* 15: 146–156
22. Ben-Shachar, R., Eisenberg, M., Huang, S.A., DiStefano, J.J. III (2012). Simulation of Post-Thyroidectomy Treatment Alternatives for Triiodothyronine or Thyroxine Replacement in Pediatric Thyroid Cancer Patients. *Thyroid.* 22: 595–603.
23. Fallahi, P., Mazzi, V., Vita, R., Ferrari S.M., Materazzi, G., Galleri, D., Benvenga, S., Miccoli, P., Antonelli, A. (2015). New Therapies for Dedifferentiated Papillary Thyroid Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 6153-6182
24. Nikiforov, Y. E. (2010). Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid. Chapter 7. Thyroid Tumors: Classification, Staging, and General Considerations, pp. 108-111.
25. 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.
26. Lemoine, N.R., Mayall, E.S., Wyllie, F.S., Farr, C.J., Hughes, D., Padua, R.A., Thurston, V., Williams, E.D., Wynford, T.D. (1988) Activated ras oncogenes in human thyroid cancers. *Cancer Res.* 15:48(16):4459-63.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. Rashmi Mullur, Yan-Yun Liu, Gregory A. Brent. (2014). Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. *Physiol Rev.* 94(2): 355–382.
 32. 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.
 33. 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.
 34. 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.