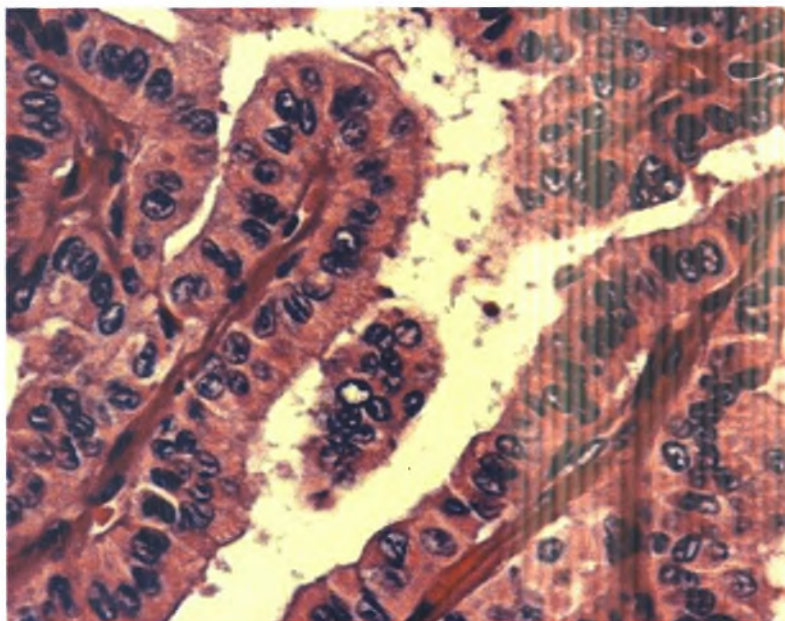


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ BRAF ΚΑΙ KRAS ΣΕ
ΘΗΛΩΔΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ**



Πράπα Ερμιόνη –Δήμητρα(ΑΕΜ:1805345)

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ – ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ - ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΛΑΡΙΣΑ, 2010**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 8164/1

Ημερ. Εισ.: 16-04-2010

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2010

ΠΡΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087101

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΘΕΜΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ: ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ BRAF
ΚΑΙ KRAS ΣΕ ΘΗΛΩΔΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ**

Η εργασία πραγματοποιήθηκε στο: ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ – ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ -
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Κουκούλης Γεώργιος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- Κουκούλης Γεώργιος, Τακτικός Καθηγητής Παθολογοανατομίας του τμήματος
Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Ζωικών Πληθυσμών του τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- Μπαλατσός Νικόλαος, Λέκτορας Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά τον κύριο Κουκούλη Γεώργιο για όλα όσα μου δίδαξε και για την
συμπράσταση σε κάθε στάδιο της διπλωματικής εργασίας, τον κύριο Μαμούρη
Ζήση και τον κύριο Μπαλατσό Νικόλαο ως μέλοι της τριμελούς επιτροπής, την
κυρία Σαμαρά Μαρία, Λέκτορα Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Ιατρικής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που με καθοδήγησε σε όλη την διάρκεια της

διπλωματικής εργασίας και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής Μοριακής Ιστοπαθολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την συνεργασία τους και την φιλική τους διάθεση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ΣΕΛΙΔΕΣ
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1. Γενικά	7
1.2. Η φυσιολογία του θυρεοειδούς	8
1.3. Η παθολογία του θυρεοειδούς	10
1.4 Θηλωδες Καρκίνωμα	10
1.4.2 Κλινικά Χαρακτηριστικά	13
1.5 Καρκινογένεση και μοριακοί μηχανισμοί	13
1.6 Μοριακοί μηχανισμοί καρκινογένεσης στα θυρεοειδικά καρκινώματα	17
1.6.1 Το γονίδιο Braf	18
1.6.2 Το γονίδιο Kras	22
2. Σκοπός	25
3. Πειραματικό μέρος	26
3.1 Υλικό μελέτης	26
3.2 Μεθοδολογία	26
3.2.1 Επιλογή Υλικού	26
3.2.2 Απομόνωση γενωμικού DNA	26
3.2.3 Έλεγχος ποιότητας γενωμικού DNA	29
3.2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	30
3.2.5 Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων-πολυμορφισμοί μεγέθους περιοριστικών ενζύμων (RFLPs)	35
3.2.6 Αλληλούχιση (sequencing)	38
4. Αποτελέσματα	41
5. Συζήτηση	49
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αδένος είναι η πιο κοινή κακοήθεια του ενδοκρινικού συστήματος και εμφανίζεται σε ποσοστό περίπου 1% όλων των προσφάτων διαγνωσμένων καρκινικών περιπτώσεων στο ενδοκρινικό σύστημα. Ο πιο συχνός τύπος θυρεοειδικής κακοήθειας είναι το θηλώδες καρκίνωμα, καθώς παρουσιάζεται σε ποσοστό 80% όλων των περιπτώσεων.

Στα θηλώδη καρκινώματα θυρεοειδούς αδένος, είναι συχνή η εμφάνιση γενετικών μεταλλαγών που οδηγούν στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAP κινασών (MAPK). Οι πιο συχνές μεταλλαγές που εμφανίζονται στα θηλώδη καρκινώματα είναι οι σημειακές μεταλλάξεις των γονιδίων Braf (V600E στο εξόνιο 15) και Kras (οποιαδήποτε αντικατάσταση στα κωδικόνια 12-GGT- και 13-GGC- του εξονίου 2) , δυο γονιδίων που έχουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην μετάδοση του μηνύματος μέσω του μονοπατιού της κινάσης MAP, ERK (RAS/RAF/MEK/ERK → μεταφορά του μηνύματος στον πυρήνα). Οι μεταλλαγές αυτές αποτελούν καλούς προγνωστικούς δείκτες της ασθένειας.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 32 δείγματα παραφινωμένου ιστού από θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς αδένος, 32 δείγματα παραφινωμένου ιστού οζώδους βρογχοκήλης χωρίς στοιχεία ατυπίας και 20 δείγματα υγρού FNA (fine needle aspiration method) από όζο θυρεοειδούς αδένος .

Τα δείγματα αυτά επεξεργάστηκαν και αναλύθηκαν με μοριακές τεχνικές. από τις οποίες βρέθηκαν τα εξής ποσοστά μεταλλαγής σε παθολογικά δείγματα θυρεοειδούς αδένος: 3.5% για το γονίδιο Braf, 18.75% για το κωδικόνιο 12 του Kras και 25% για το κωδικόνιο 13 του Kras.

Τα αποτελέσματα αυτά θα αξιοποιηθούν στα πλαίσια εύρεσης στοχευμένης θεραπείας στους ασθενείς με κατάλληλα φάρμακα

ABSTRACT

The cancer of the thyroid gland is the most common malignancy of the endocrine system and is present in a percentage of 1% of all the recently diagnosed cancer cases of the endocrine system. The most common type of thyroid malignancy is the papillary carcinoma (PTC), since it is present in a percentage of 80% of all cases.

In papillary carcinomas of the thyroid gland, the presence of genetic alterations, which lead to the activation of the signaling pathway of MAP kinases (MAPK), are very frequent. The most common alterations, which occur in papillary carcinomas, are point mutations of the Braf gene (V600E in exon 15) and Kras gene (any substitution in codon 12-GGT and 13-GGC of exon 2). These two genes play an important regulatory role into the transduction of the message via the kinase pathway MAP, ERK (RAS/RAF/MEK/ERK message transfer into the nucleus). These alterations constitute good prognosis indexes for the disease.

In this study, 32 samples of paraffin tissue from papillary carcinomas of the thyroid gland have been studied, as well as 32 samples of paraffin tissue from nodular goiter without any indication of malignancy and 20 samples of liquid FNA (fine needle aspiration method) from thyroid gland node.

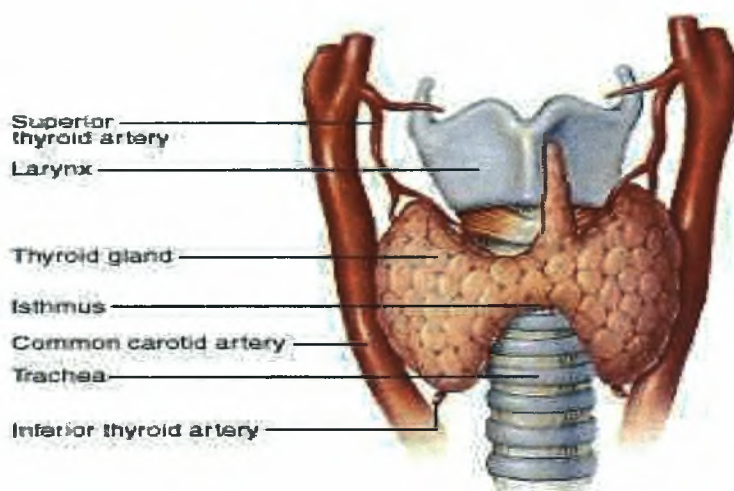
These samples were treated and analysed by molecular biology techniques which showed the following mutation percentages in pathological samples of thyroid gland: 3.5% for Braf gene, 18.75% for codon 12 and 25% for codon 13 of Kras gene.

These results will be evaluated in search for a targeted treatment of the patients with the most effective drugs.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά.

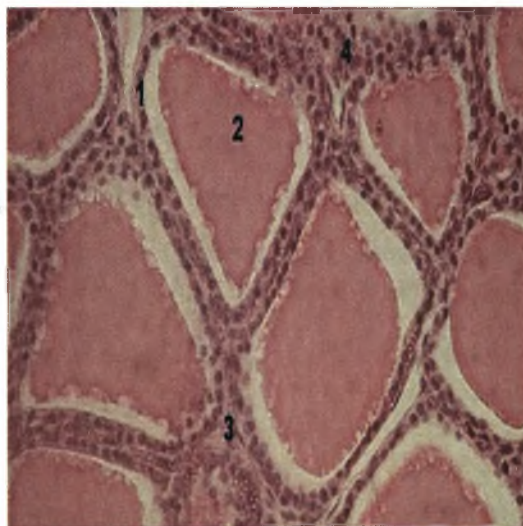
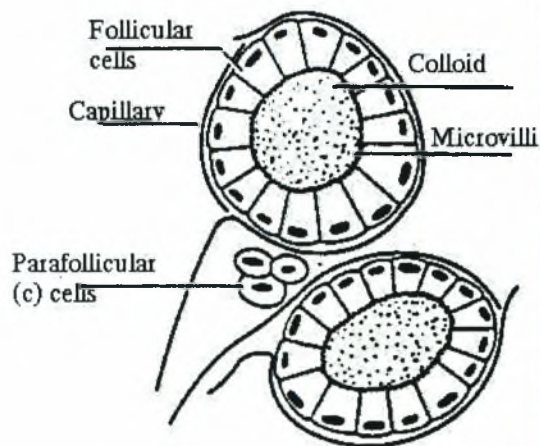
Ο θυρεοειδής αδένας είναι ένας από τους πιο σημαντικούς αδένες του ενδοκρινικού μας συστήματος. Στον άνθρωπο ο θυρεοειδής αδένας (thyroid gland) βρίσκεται στο πρώτο ή στο δεύτερο ημικρίκιο της τραχείας (στην κάτω ή πρόσθια πλευρά). Είναι βάρους 15-35 γραμμαρίων και αποτελείται από δύο πλάγιους λοβούς που συνδέονται μεταξύ τους με μία γέφυρα ιστού τον ισθμό (Εικ.1.1)(1,8). Η βασική μορφολογική μονάδα του θυρεοειδούς αδένος είναι το θυρεοειδές κυστίδιο ή θυλάκιο (thyroid follicle) (Εικ.1.2.A.).Ο θυρεοειδής αδένας αποτελείται από ποικίλου μεγέθους θυλάκια με μέση διάμετρο 200μm., τα οποία περιέχουν μια κολλοειδή ουσία, που παράγεται από το επιθήλιο του κάθε θυλακίου (Εικ1.2.B.). Ο χώρος ανάμεσα στα θυλάκια καταλαμβάνεται από συνδετικό ιστό, που διαθέτει ένα καλά αναπτυγμένο δίκτυο αιμοφόρων αγγείων. Γενικά, ο θυρεοειδής αδένας αιματώνεται από ένα δίκτυο 3 αρτηριών και το αίμα στη συνέχεια απάγεται σε 3 κύριες φλέβες. Η ροή του αίματος στον θυρεοειδή αδένος είναι από τις μεγαλύτερες στον οργανισμό, αν ληφθεί υπόψη το μέγεθος του. Ο θυρεοειδής αδένος δέχεται νευρικές ίνες από το συμπαθητικό σύστημα (8).



ΕΙΚΟΝΑ1.1. Απεικόνιση του θυρεοειδούς αδένου. Διακρίνονται ο αριστερός και ο δεξιός λοβός, ο ισθμός, οι καρωτίδες, οι άνω και κάτω θυρεοειδείς αρτηρίες και η τραχεία.

A)

B)



ΕΙΚΟΝΑ1.2. Α) Δομή θυρεοειδούς θυλακίου. Β) Θυρεοειδής αδένου βαμμένος με αιματοξυλίνη και ηωσίνη-1: θυρεοειδικό θυλάκιο, 2: κολλοειδής ουσία, 3: αγγείο, 4: παραθηλακοειδές κύτταρο.

Τα κύτταρα των θυλακίων παράγουν τις ορμόνες τετραϊωδοθυρονίνη ή θυροξίνη (T₄) και την τριϊωδοθυρονίνη (T₃) που αποταμιεύονται στην θυρεοσφαιρίνη της κολλοειδούς ουσίας από όπου και αποσπώνται κατά την κινητοποίηση ως εξής:

α) Μεταφορά ιωδίου, του οποίου η παρουσία είναι απαραίτητη για την σύνθεση των ορμονών, από το αίμα προς τα θυλάκια με τον μηχανισμό της ενεργητικής αντλίας.

β) Οξείδωση του ιωδίου με την βοήθεια υπεροξειδάσης και την μετατροπή του σε μεταλλικό I_2 .

γ) Ιωδίωση των τυροσυλικών ριζών της θυρεοσφαιρίνης της κολλοειδούς ουσίας και τοπική παραγωγή μονοϊωδοτυροσίνης (MIT) και διϊωδοτυροσίνης (DIT).

Δύο μόρια διϊωδοτυροσίνης παράγουν την ορμόνη θυροξίνη (T4), ενώ ένα μόριο διϊωδοτυροσίνης και ένα μόριο μονοϊωδοτυροσίνης παράγουν την ορμόνη τριιωδιοθυρονίνη (T3). Η τριιωδιοθυρονίνη (T3) μπορεί να παραχθεί και από την θυροξίνη (T4). Οι ορμόνες T3 και T4 παραμένουν δεσμευμένες και αποθηκευμένες στη θυρεοσφαιρίνη και ελευθερώνονται μετά από πρωτεολυτική αποδήμηση αυτής (7).

Η θυρεοσφαιρίνη, που περιέχει τις T₄ και T₃, είναι σε θέση να ανταποκριθεί στις ανάγκες του οργανισμού για αρκετό χρονικό διάστημα, (2-3 μήνες στον άνθρωπο), έστω κι αν σταματήσει τελείως η παραγωγή της από τον αδένα. Ανοϊστοχημικά θετικότητα (θετική χρώση) στις θυρεοσφαιρίνη, T3 και T4 παρουσιάζουν η κολλοειδής ουσία και το κυτταρόπλασμα των θυλακικών κυττάρων. Τα τελευταία είναι επίσης θετικά στις χαμηλού μοριακού βάρους κερατίνες και στην βιμεντίνη. Ανάμεσα και κοντά στα θυρεοειδικά θυλάκια υπάρχουν διάσπαρτα ή κατά μικρές αθροίσεις τα ενδοκρινικά κύτταρα C ή παραθυλακίωδη κύτταρα. Αυτά υπερπλάσσονται στις μεγάλες ηλικίες, περιέχουν νευροεκκριτικά κοκκία και παράγουν την καλσιτονίνη, ορμόνη που παρεμβαίνει στον μεταβολισμό του ασβεστίου (7,8).

1.2 Φυσιολογία του θυρεοειδούς

Οι θυρεοειδικές ορμόνες κυκλοφορούν δεσμευμένες με πρωτεΐνες κατά 99,9%. Το υπόλοιπο ελάχιστο ποσοστό ελεύθερων ορμονών είναι το δραστικό. Ο φυσιολογικός ρόλος των ορμονών του θυρεοειδούς αδένα εντοπίζεται στο να αυξάνου τον μεταβολισμό στους περισσότερους ιστούς. Αυξάνουν την κατανάλωση οξυγόνου, κυρίως στο ήπαρ, στην καρδιά, στους νεφρούς, στους σκελετικούς μυς, στο πάγκρεας στους σιελογόνους αδένες, στην επιδερμίδα, στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Η κατανάλωση οξυγόνου στον εγκέφαλο του ενηλίκου οργανισμού σχεδόν δεν επηρεάζεται από τις T₄ και T₃.

Επίσης, η κατανάλωση του οξυγόνου στους γεννητικούς αδένες, στους πνεύμονες, στο σπλήνα και στους λείους μυς του στομάχου δεν επηρεάζεται από τις ορμόνες του θυρεοειδούς αδένου. Αξίζει να αναφερθούμε έστω και συνοπτικά στον ευρύτερο φυσιολογικό ρόλο των T_3 και T_4 ορμονών του θυρεοειδούς αδένου.

- Επίδραση των T_3 και T_4 στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών.
- Επίδραση των T_3 και T_4 στη σωματική ανάπτυξη.
- Επίδραση των T_3 και T_4 στο μεταβολισμό των υδατανθράκων.
- Επίδραση των T_3 και T_4 στο μεταβολισμό των λιπιδίων.
- Επίδραση των T_3 και T_4 στο κεντρικό νευρικό σύστημα.
- Επίδραση των T_3 και T_4 στο κυκλοφορικό σύστημα.
- Επίδραση των T_3 και T_4 στο αναπνευστικό σύστημα.
- Επίδραση της T_4 στο γαστρεντερικό σωλήνα
- Επίδραση της T_4 και T_3 στο δέρμα και στο τρίχωμα
- Επίδραση των T_4 και T_3 στο αναπαραγωγικό σύστημα.

Η δραστηριότητα του θυρεοειδούς αδένου ρυθμίζεται από την θυρεοτρόπο ορμόνη (TSH) της υποφύσεως της οποίας η έκλυση ελέγχεται από την ορμόνη του υποθαλάμου TRF (εκλυτικός παράγων της TSH). Αύξηση των T_3 και T_4 στην κυκλοφορία δρα ανασταλτικά στον υποθάλαμο και την υπόφυση με αποτέλεσμα την ελάτωση της TSH και την μείωση της παραγωγής των θυρεοειδικών ορμονών (1,8).

1.3 Παθολογία του θυρεοειδούς.

Δυσλειτουργία των κυττάρων του θυρεοειδούς οδηγεί στην εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων που συνοδεύονται από μικρής ή μεγάλης έκτασης βλάβες του θυρεοειδούς και συσχετίζονται με υπερβολική ή ανεπαρκή απελευθέρωση των θυρεοειδικών ορμονών.

Οι παθολογικές αυτές καταστάσεις είναι:

α) Υπερθυρεοειδισμός, μία κατάσταση αυξημένης μεταβολικής δραστηριότητας που προκαλείται από υπερλειτουργία του θυρεοειδούς και συνοδεύεται από αυξημένα επίπεδα ελεύθερων T_3 και T_4 ορμονών στο αίμα .

β) Υποθυρεοειδισμός, μία κατάσταση που προκαλείται από οποιαδήποτε δομική ή λειτουργική διαταραχή η οποία επηρεάζει την παραγωγή ικανοποιητικών επιπέδων θυρεοειδικής ορμόνης.

γ) Νόσος του GRAVES, μία αυτοάνοση νόσος που συνοδεύεται από μία διάχυτη διόγκωση του θυρεοειδούς αδένου, οφθαλμοπάθεια, δερματοπάθεια και αυξημένα επίπεδα των T_3 και T_4 ορμονών.

δ) Διάχυτη μη τοξική βρογχοκήλη και πολυζώδης βρογχοκήλη, καταστάσεις στις οποίες έχουμε απλή διόγκωση του θυρεοειδούς αδένου και μειωμένη σύνθεση θυρεοειδικής ορμόνης που συχνά οφείλεται σε διατροφική ανεπάρκεια ιωδίου.

ε) Θυρεοειδίτιδα, ένα είδος φλεγμονής του θυρεοειδούς αδένου η οποία μπορεί να εμφανίζεται σε διάφορες θέσεις. Οι συνηθέστεροι τύποι θυρεοειδίτιδας περιλαμβάνουν:

- i) τη μη λεμφοκυτταρική θυρεοειδίτιδα
- ii) τη θυρεοειδίτιδα του Hashimoto και,
- iii) την υποξεία (κοκκιωματώδη) θυρεοειδίτιδα.

στ) Νεοπλάσματα του θυρεοειδούς. Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αδένου είναι η πιο συχνή κακοήθεια του ενδοκρινικού συστήματος σε ποσοστά που προσεγγίζουν το 1% των πιο πρόσφατων διαγνωσμένων όγκων του ενδοκρινικού συστήματος. Ο θυρεοειδής αδένος αναπτύσσει μία ποικιλία νεοπλασμάτων, κυμαινόμενων από περιγεγραμμένα καλοήγη αδενώματα ως τα πολύ επιθετικά αναπλαστικά καρκινώματα. Ιστολογικά μπορούν να διακριθούν σε εκείνα που δείχνουν διαφοροποίηση προς α) κύτταρα θυλακίων, β) παραθυλακίωδη κύτταρα C και γ) κύτταρα θυλακίων και κύτταρα C. Τα αδενώματα είναι αποκλειστικά θυλακίωδη. Όταν ένα θυρεοειδικό νεόπλασμα έχει σαφή και γνήσια θηλώδη διαμόρφωση τότε αντιστοιχεί σε θηλώδες καρκίνωμα και όχι αδένωμα (8) Επίσης, αν και έχουν περιγραφεί σπανιότατα, εντούτοις αμφισβητείται η ύπαρξη αδενωμάτων από κύτταρα C.

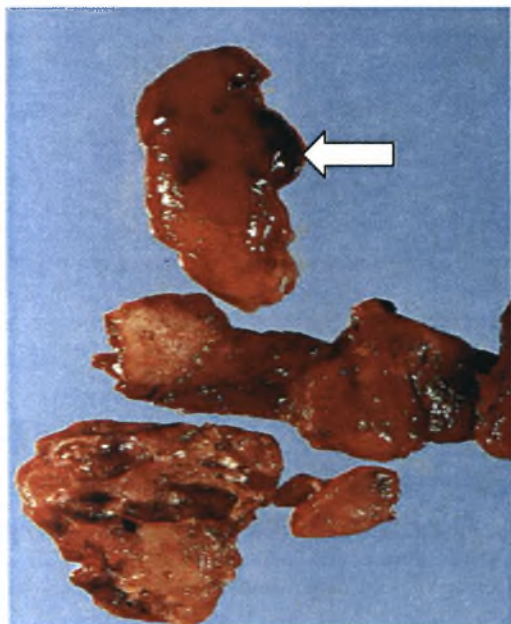
1.4 Θηλώδες καρκίνωμα.

Τα θηλώδη ή θηλωματώδη καρκινώματα αντιπροσωπεύουν τη συνηθέστερη μορφή θυρεοειδικού καρκίνου, σε ποσοστό 80% του συνόλου. Μπορούν να εμφανίζονται σε κάθε ηλικία και υπολογίζονται ως η μεγάλη πλειονότητα των καρκινωμάτων του θυρεοειδούς που σχετίζονται με προηγούμενη έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία. Παράλληλα, φαίνεται να υπάρχει θετική συσχέτιση ανάμεσα στο γυναικείο φύλο και στην ανάπτυξη θηλώδων καρκινωμάτων στην πρώιμη και μέση ενήλικη ζωή, σχετιζόμενη με την έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων στο νεοπλασματικό θυρεοειδικό επιθήλιο.

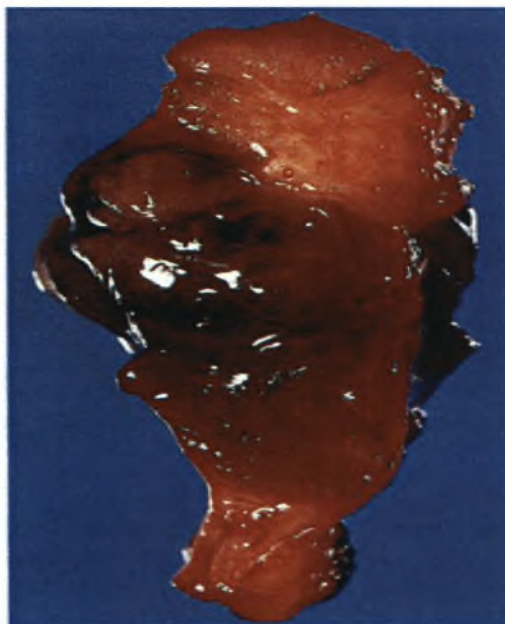
1.4.1 Μορφολογία.

Τα θηλώδη καρκινώματα μπορεί να εμφανίζονται ως μεμονωμένες ή πολυεστιακές βλάβες μέσα στο θυρεοειδή(Εικ1.3). Σε μερικές περιπτώσεις, μπορεί να είναι καλά οριοθετημένα ή να σχηματίζουν κύστες. Σε άλλες περιπτώσεις διηθούν το παρακείμενο παρέγχυμα έχοντας ασαφή όρια. Μπορεί να περιέχουν περιοχές ίνωσης και αποτιάνωσης . Στην επιφάνεια της τομής μπορεί να φαίνονται κοκκιώδης θηλωματώδης εστίες. Η οριστική διάγνωση μπορεί να γίνει μόνο με μικροσκοπική εξέταση γιαυτό απαιτείται η ολική αφαίρεση του αδένα. Η διάγνωση του θηλώδους καρκινώματος βασίζεται στα πυρηνικά σε σχέση με τη θηλωματώδη αρχιτεκτονική. Οι πυρήνες των θηλωματωδών καρκινικών κυττάρων περιέχουν μία πολύ λεπτή διάσπαρτη χρωματίνη, η οποία προσδίδει μία οπτικά διαυγή εμφάνιση. Επιπρόσθετα εγκολώματα του κυτταροπλάσματος μπορεί να δώσουν σε εγκάρσια τομή τη εμφάνιση ενδοπυρηνικών εγκλείστων (Εικ.1.4). Μία θηλωματώδης αρχιτεκτονική εμφανίζεται σε πολλές περιπτώσεις αν και μερικοί όγκοι αποτελούνται αποκλειστικά από θυλάκια. Οι τελευταίοι συμπεριφέρονται βιολογικά ως θηλωματώδης βλάβες, αν και έχουν τα περιγραφέντα πυρηνικά χαρακτηριστικά. Όταν εμφανίζονται, οι θηλές του θηλωματώδους καρκινώματος διαφέρουν από αυτές που παρατηρούνται στις περιοχές της υπερπλασίας. Σε αντίθεση προς τις υπερπλαστικές θηλωματώδης αλλοιώσεις, οι νεοπλασματικές θηλές έχουν πυκνά ινοαγγειακά κέντρα. Στην περιοχή της αλλοίωσης εμφανίζονται ομόκεντροι ασβεστοποιημένοι σχηματισμοί, που ονομάζονται ψαμμώδη σωματίδια.η(Εικ1.4).

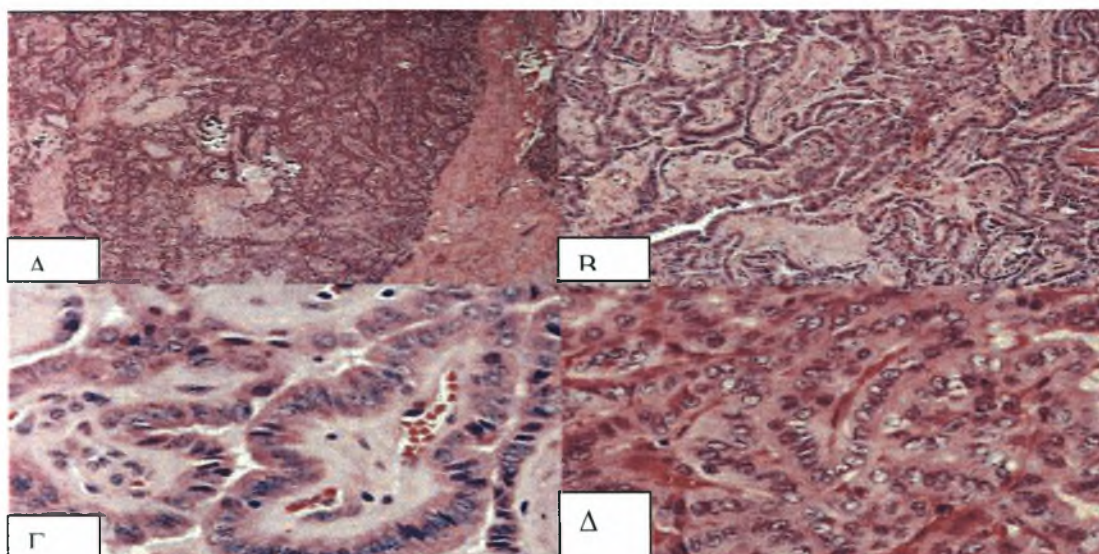
A.



B.



ΕΙΚΟΝΑ 1.3. **A:** Απομονωμένο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς αδένος. Εδώ παρουσιάζεται σαν βόλος τοποθετημένος στον αριστερό λοβό του θυρεοειδούς αδένος. **B:** Πολυεστιακό θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς αδένος. Ο όγκος εντοπίζεται σε όλη την έκταση του διογκωμένου αδένος.



ΕΙΚΟΝΑ 1.4. Θυλώδες καρκίνωμα. Εικόνα μικροσκοπικής εξέτασης όπου διακρίνονται οι πυρήνες και η θυλωματώδης αρχιτεκτονική καθώς επίσης και τα ψαμμώδη σωμάτια.

1.4.2 Κλινικά χαρακτηριστικά.

Τα θηλώδη καρκινώματα εμφανίζονται συχνότερα ως μία μάζα στο λαιμό ή μέσα στο θυρεοειδή ή τραχηλικό λεμφαδένα. Μικρό ποσοστό των ασθενών παρουσιάζει αιματογενείς μεταστάσεις υπάρχουν τη στιγμή της διάγνωσης, που εστιάζονται συνήθως στον πνεύμονα. Τα περισσότερα θυλώδη καρκινώματα είναι αδρανείς αλλοιώσεις και η πλειοψηφία των ασθενών (85%) παρουσιάζει 10ετή επιβίωση (4). Ωστόσο, η πρόγνωση είναι λιγότερο ευνοϊκή στους ηλικιωμένους ασθενείς, στους ασθενείς με διήθηση των εξωθυρεοειδικών ιστών και στους ασθενείς με απομακρυσμένες μεταστάσεις.

1.5 Καρκινογένεση και μοριακοί μηχανισμοί.

Η καρκινογένεση είναι μία πολύπλοκη διαδικασία.. Επιδημιολογικές μελέτες σε ανθρώπινους καρκίνους, σε συνδυασμό με αποτελέσματα από πειραματικά μοντέλα σε πειραματόζωα, και τις πρόσφατες έρευνες για τα ογκογονίδια, έχει αποδειχθεί ότι η

μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό κύτταρο με ικανότητα μετάστασης και διήθησης σε παρακείμενο ιστό, δεν αποτελεί διαδικασία ενός σταδίου.

Το πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης φαίνεται να περιλαμβάνει την ανάπτυξη διάφορων φαινοτυπικών αλλοιώσεων, όπως την απώλεια της ικανότητας του κυττάρου να φτάσει σε τελική διαφοροποίηση, την απώλεια της ρύθμισης του πολλαπλασιασμού ή της αναστολής πολλαπλασιασμού εξ'επαφής, την απώλεια της ικανότητας να επικοινωνεί με τα γειτονικά κύτταρα και την ικανότητα να διηθεί και να μεθίσταται. Η καρκινική έχει μονοκλωνική προέλευση. Πιο συγκεκριμένα, ένα αρχικά μεταλλαγμένο καρκινικό κύτταρο πολλαπλασιάζεται και δημιουργεί την εμφάνιση πολλών διαφορετικών φαινοτύπων μέσα στον όγκο, πιθανότατα μέσω επιπλέον γενετικών ή επιγενετικών αλλοιώσεων.

Το πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης φαίνεται ότι περιλαμβάνει τρία στάδια, που στηρίζονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς εξέλιξης.

α) Ο βασικός μηχανισμός που διέπει το πρώτο στάδιο (έναρξη) της καρκινογενετικής διαδικασίας, είναι η πρόκληση μεταλλάξεων σε ένα προγονικό κύτταρο (stem cell). Υπό την επίδραση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα, προκαλείται μετάλλαξη, πιθανότατα σε γονίδια που σχετίζονται με την ικανότητα του κυττάρου να φτάσει σε τελική διαφοροποίηση, δίνοντας γένεση σε ένα κύτταρο που έχει την ικανότητα συνεχούς αυτοανανέωσης (self renewal) ή αλλιώς ένα κύτταρο, που κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες μπορεί να εκτελεί μεγαλύτερο αριθμό μιτώσεων, από ότι κανονικά θα έκανε.

β) Ο βασικός μηχανισμός που διέπει το δεύτερο στάδιο (επαγωγή) της καρκινογενετικής διαδικασίας, είναι ο κλωνικός πολλαπλασιασμός των αρχικά μεταλλαγμένων κυττάρων μέσω επίδρασης παραγόντων που επάγουν την μίτωση (επαγωγείς). Το στάδιο αυτό είναι αντιστρεπτό με την αναστολή του μιτογόνου παράγοντα. Καθώς το αρχικό διαφοροποιημένο κύτταρο διαιρείται, φτάνοντας στην κυτταρική διαίρεση που κανονικά θα πέθαινε για παράδειγμα την 40^η, καθώς συνεχίζει να διαιρείται, προστίθενται συνεχώς γενωμικές βλάβες στα κύτταρα απογόνους. Οι γενωμικές βλάβες είναι ραγδαίες μιας και η γενωμική αστάθεια μετά την κρίσιμη διαίρεση αυξάνεται δραματικά. Από τα κύτταρα που προκύπτουν ένα κατά κανόνα αποκτά μια κρίσιμη μετάλλαξη η οποία και το μετατρέπει στο πρώτο προκαρκινικό κύτταρο.

γ) Στο στάδιο εξέλιξης, το μεταλλαγμένο και εξαρτώμενο από τον επαγωγέα κύτταρο, μετατρέπεται σε ένα καρκινικό, το οποίο δεν εξαρτάται πλέον από τον επαγωγέα. Φαίνεται ότι κάτω από τη συνεχή μιτογόνο επίδραση του επαγωγέα, κάποιο κύτταρο εμφανίζει επιπλέον γενετικές μεταλλάξεις που αθροιστικά δίνουν τον καρκινικό φαινότυπο. Τα αποτελέσματα των ερευνών δείχνουν ότι τουλάχιστον δύο είδη γενετικών αλλαγών είναι απαραίτητα για την καρκινική εξαλλαγή και υπάρχουν αρκετές ενδείξεις, ότι το δεύτερο είδος αφορά στην απάλειψη των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Στην ανάπτυξη των περισσότερων καρκίνων είναι απαραίτητες περισσότερες από δύο γενετικές αλλαγές.

Όπως αναφέρθηκε, οι βλάβες στο γενετικό υλικό των κυττάρων αποτελούν την καρδιά της καρκινογενετικής διαδικασίας. Τα γονίδια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και κυτταρικού θανάτου και εξασφαλίζουν την ισορροπία του αριθμού και της λειτουργικότητας ενός κυτταρικού πληθυσμού.

Θα μπορούσαμε να ξεχωρίσουμε τέσσερις βασικές κατηγορίες γονιδίων, που αποτελούν τους στόχους γενετικών μεταλλάξεων και σχετίζονται με την καρκινογένεση:

α) τα πρωτο-ογκογονίδια, γονίδια που προάγουν τον πολλαπλασιασμό και συμπεριφέρονται σαν κυρίαρχα γονίδια, μιας και τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα τους μπορούν να διαφοροποιήσουν τα κύτταρα ακόμη και παρουσία των φυσιολογικών αλληλομόρφων .

β) τα ογκοκατασταλτικά γονίδια (suppressor genes), γονίδια που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και συμπεριφέρονται ως υπολειπόμενα, καθώς η διαφοροποίηση του κυττάρου προϋποθέτει αλλοίωση και στα δύο αλληλόμορφα.

γ) γονίδια που ρυθμίζουν την απόπτωση ή προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (programmed cell death) και μπορεί να συμπεριφέρονται τόσο ως κυρίαρχα όσο και ως υπολειπόμενα.

δ) γονίδια που συμμετέχουν σε επιδιορθωτικούς μηχανισμούς (repair genes) και επιδιορθώνουν βλάβες κατά την αντιγραφή του DNA.

Οι μηχανισμοί της ογκογόνου δράσης, των γονιδίων που ανήκουν σε κάθε μια από τις προαναφερθείσες κατηγορίες αναφέρονται συνοπτικά:

α) Η ογκογόνος δράση των μεταλλαγμένων πρωτο-ογκογονιδίων, οφείλεται στην αλλοίωση της φυσιολογικής λειτουργίας των πρωτεϊνών που αυτά εκφράζουν (είτε μέσω υπερέκφρασης της πρωτεΐνης, είτε μέσω απώλειας σημαντικών ρυθμιστικών περιοχών της

πρωτεΐνης). Τα πρωτεϊνικά παράγωγα των πρωτο-ογκογονιδίων, μπορεί να είναι αυξητικοί παράγοντες ή υποδοχείς αυξητικών παραγόντων:

1. **Αυξητικοί παράγοντες:** Η ογκογόνος δράση των ογκογονιδίων αυτής της κατηγορίας, συνήθως σχετίζεται με υπερέκφραση αυξητικών παραγόντων, όπως για παράδειγμα υπερέκφραση του c-sis, που αντιστοιχεί στον αυξητικό παράγοντα PDGF (platelet derived growth factor), ή υπερπαραγωγή του αυξητικού παράγοντα TGF- α (transforming growth factor- α), που προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μέσω σύνδεσης με τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGF (epidermal growth factor).
2. **Υποδοχείς αυξητικών παραγόντων:** Η ογκογόνος δράση των ογκογονιδίων αυτής της κατηγορίας, σχετίζεται με υπερέκφραση ή μετάλλαξη των γονιδίων, που κωδικοποιούν τους υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων. Η πρωτεΐνη που παράγεται μεταφέρει συνεχή μιτωτικά μηνύματα για το κύτταρο, ακόμη και απουσία αυξητικού παράγοντα στο περιβάλλον.

3. **Πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος:** Η ογκογόνος δράση των ογκογονιδίων αυτής της κατηγορίας, σχετίζεται με υπερέκφραση ή μετάλλαξη των γονιδίων, που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες μεταφορείς του μηνύματος στον πυρήνα (από αυξητικούς συνήθως παράγοντες). Αυτές, μπορεί να εδράζονται στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ή να βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα.

β) Η ογκογόνος δράση των μεταλλαγμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων, οφείλεται στην απώλεια σημαντικών πρωτεϊνών, αναστολέων ή ρυθμιστών της εισόδου του κυττάρου στον κυτταρικό κύκλο, συνήθως μέσω ελλείψεων ή σημειακών μεταλλάξεων. Σημειώνουμε πάλι, ότι για την απώλεια της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης, είναι απαραίτητη η βλάβη και των δύο αλληλόμορφων των συγκεκριμένων γονιδίων. Τα πρωτεϊνικά παράγωγα των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, μπορεί να ανήκουν σε μία από τις ακόλουθες κατηγορίες :

1. **Διαλυτοί παράγοντες αναστολείς του πολλαπλασιασμού:** Πρόκειται για διαλυτούς παράγοντες, που συνδέονται με υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και μεταδίδουν ανασταλτικά για τον πολλαπλασιασμό μηνύματα.
2. **Μόρια που ρυθμίζουν την σύνδεση των κυττάρων.** Για παράδειγμα είναι το γονίδιο DCC (deleted in colon carcinoma), το οποίο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη, που

προσομοιάζει με μόρια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, που συμμετέχουν στη σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους και με την εξωκυττάρια ουσία. Η απώλεια και των δύο αλληλομόρφων, έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια της φυσιολογικής επικοινωνίας των κυττάρων μεταξύ τους και με το περιβάλλον και οδηγεί σε μεταβολή της φυσιολογικής οδού διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού.

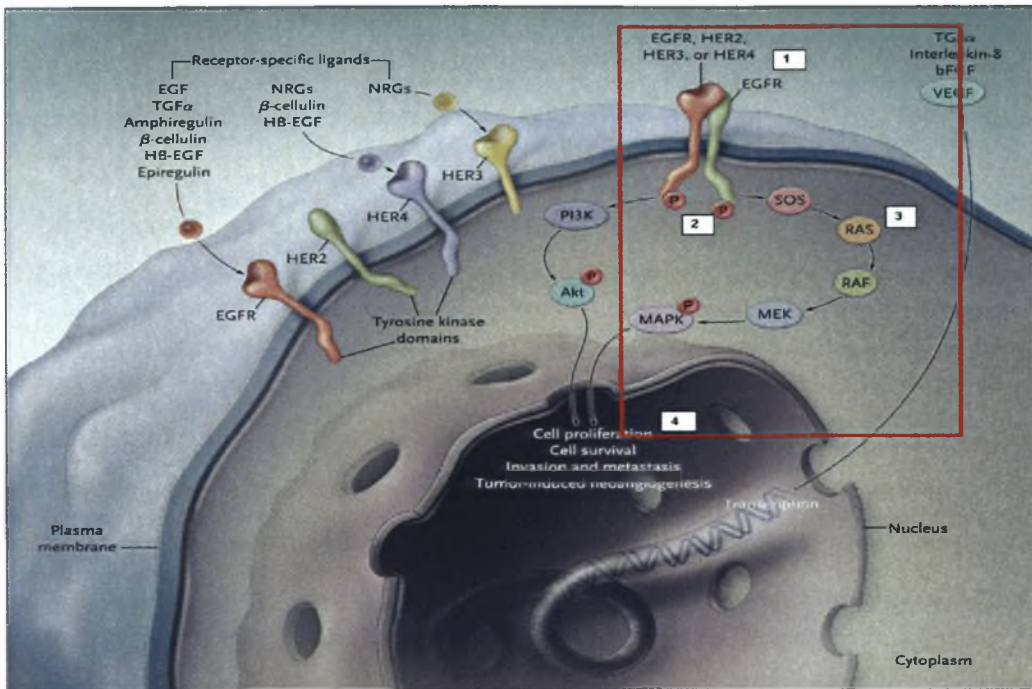
3. Μόρια της “οδού μετάδοσης του μηνύματος” (signal transduction pathway). Η απώλεια της λειτουργίας των πρωτεϊνών που ρυθμίζουν αρνητικά τη μετάδοση του μηνύματος.

γ) Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, είναι μια ισορροπημένη, γενετικά ελεγχόμενη κυτταρική αντίδραση σε εξειδικευμένα περιβαλλοντικά ή αναπτυξιακά ερεθίσματα που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο (17). Η απόπτωση, είναι απαραίτητη στη φυσιολογική ανάπτυξη ενός οργανισμού και η απορύθμιση της διαδικασίας της απόπτωσης, μπορεί να οδηγήσει σε ένα ευρύ φάσμα ανωμαλιών, από εμβρυϊκή θνησιμότητα, ειδική ιστική διαταραχή στην ανάπτυξη, έως και αυξημένη ευαισθησία στην ανάπτυξη καρκίνου.

δ) Γονίδια επιδιορθωτικών ενζύμων. Μεταλλάξεις σε αυτά συνδέονται με μειωμένη ικανότητα επιδιόρθωσης των λαθών του DNA κατά την μεταγραφή(7,14).

1.6 Μοριακοί μηχανισμοί καρκινογένεσης στα θηλώδη θυρεοειδικά καρκινώματα.

Όσον αφορά τα θηλώδη καρκινώματα του θυρεοειδούς αδένα, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν εστιάζονται στη μελέτη 2 κυρίως γονιδίων, των B-raf και K-ras, που φαίνονται να εμπλέκονται στη μοριακή καρκινογένεση που οδηγεί στην εμφάνιση θηλώδους καρκινώματος. Πρόκειται για δύο ογκογονίδια που εμπλέκονται στο μηχανισμό κυτταρικής διαίρεσης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων συμμετέχοντας στο σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK (mitogen-activated protein kinase) κινάσων RAS/RAF/MEK/ERK(Εικ.1.6). Μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά εντοπίζεται σε περισσότερες από 70% των περιπτώσεων και σπάνια συνυπάρχουν στον ίδιο όγκο (6,12).



ΕΙΚΟΝΑ 1.6: Το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK (mitogen-activated protein kinase) κινάσων RAS/RAF/MEK/ERK και η μετάδοση του μηνύματος στον πυρήνα.

1.6.1 Το γονίδιο B-raf.

Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών raf/mil με δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Αυτή η πρωτεΐνη παίζει ρόλο στη ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού της κινάσης MAP/ERK, που επηρεάζει την κυτταρική διαίρεση, διαφοροποίηση και έκκριση, καθότι ενεργοποίηση αυτής από την πρωτεΐνη RAS έχει ως αποτέλεσμα την στρατολόγηση της στη μεμβράνη και την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης MEK που στη συνέχεια θα ενεργοποιήσει την ERK και τα υπόλοιπα μόρια που συμμετέχουν στον καταρράκτη της MAPK κινάσης (13).

Μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό έχουν συνδεθεί με διάφορους καρκίνους, περιλαμβάνοντας το λέμφωμα μη-Hodgkin κακοήθες μελάνωμα, καρκίνος του θυρεοειδούς αδένα και αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα.

Το γονίδιο Braf εδράζει στο χρωμόσωμα 7, θέση 7q34(Εικ.1.7) και αποτελείται από 18 εξώνια (exons) καταλαμβάνοντας μία περιοχή 190284bp. Το mRNA του έχει μέγεθος 2478bp Έχει βρεθεί ένα ψευδογονίδιο, το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα X , το BRAF2 στη θέση Xq13,3.

Η πιο συνήθης μετάλλαξη είναι η μετάθεση T1799A στο εξώνιο 15 που χαρακτηρίζεται από αντικατάσταση βαλίνης με γλουταμικό οξύ, στη θέση 600 (V600E), της πρωτεϊνικής μορφής που κωδικοποιεί και φαίνεται να συναντάται σε ποσοστό ~45% των μεταλλάξεων που παρατηρήθηκαν. Άλλες μεταλλάξεις είναι οι μη νοηματικές μεταλλάξεις σε γλυκίνες της G-loop (θηλίας G) στο εξώνιο 2 και μεταλλάξεις στο τμήμα ενεργοποίησης/δραστικό τμήμα στο εξώνιο 15 κοντά στο V600.

Όπως αναφέρθηκε, το γονίδιο Braf κωδικοποιεί την BRAF κινάση σερίνης/θρεονίνης, μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, η οποία ανήκει στο μονοπάτι RAS/RAF/MEK/ERK/MARK το οποίο συμμετέχει στην μετάδοση μιτωτικών σημάτων από την μεμβράνη στον πυρήνα. Πολλά γονίδια ενεργοποιούνται από το μονοπάτι αυτό όπως είναι το γονίδιο της κυκλίνης D1, D2, D3, c-myc και mdn2.

Επίσης, το γονίδιο Braf φέρει 3 συντηρημένες περιοχές (CR1, CR2, CR3) (Εικ.1.8, 1.9) με άλλα 2 γονίδια raf, το A-raf και το raf-1.

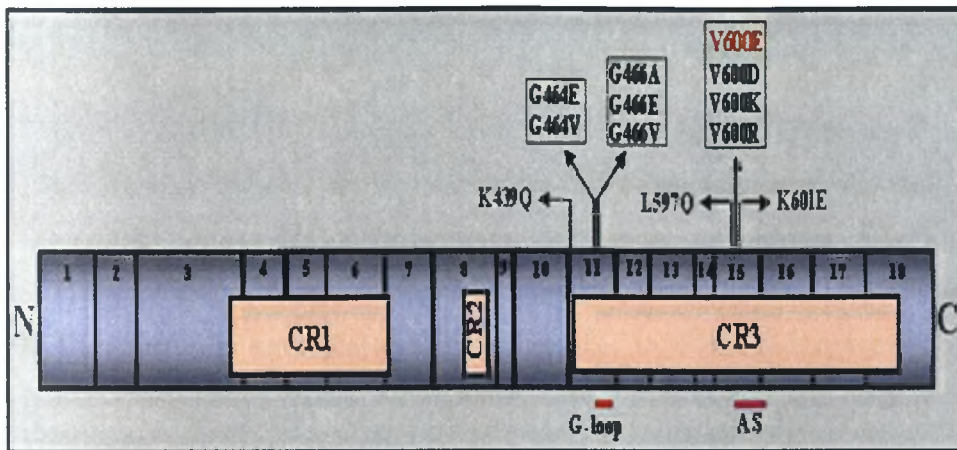
- Περιοχή CR1: Αποτελείται από 13αα (αμινοξέα) και περιέχει την πλούσια σε κυστεΐνες περιοχή CRD (Cysteine Rich Domain) και την μεγαλύτερη από την περιοχή πρόσδεσης της Ras ,RBD (Ras Binding Domain). Οι δύο αυτές περιοχές προσδένονται στην RAS-GTP ενεργοποιημένη μορφή μέσω κοινών αλληλουχιών που είναι πλούσιες σε κατάλοιπα φωσφοσερινών (SH2 περιοχές).
- Περιοχή CR2: Αποτελείται από 16αα (αμινοξέα) και είναι πλούσια σε κατάλοιπα σερίνης και περιλαμβάνει την περιοχή S365 που αναστέλλει την φωσφορυλίωση παίζοντας το ρόλο του ψευδουποστρώματος.
- Περιοχή CR3 : Αποτελείται από 293αα (αμινοξέα) . Εκεί βρίσκεται η περιοχή της κινάσης, η G-θηλιά με το GXGXXG motif (μοτίβο που είναι πολύ συντηρημένο στις

κινάσες), το τμήμα της ενεργοποίησης και οι ρυθμιστικές θέσεις φωσφορλίωσης. (S446, S447, D448, D449, T599, S602).

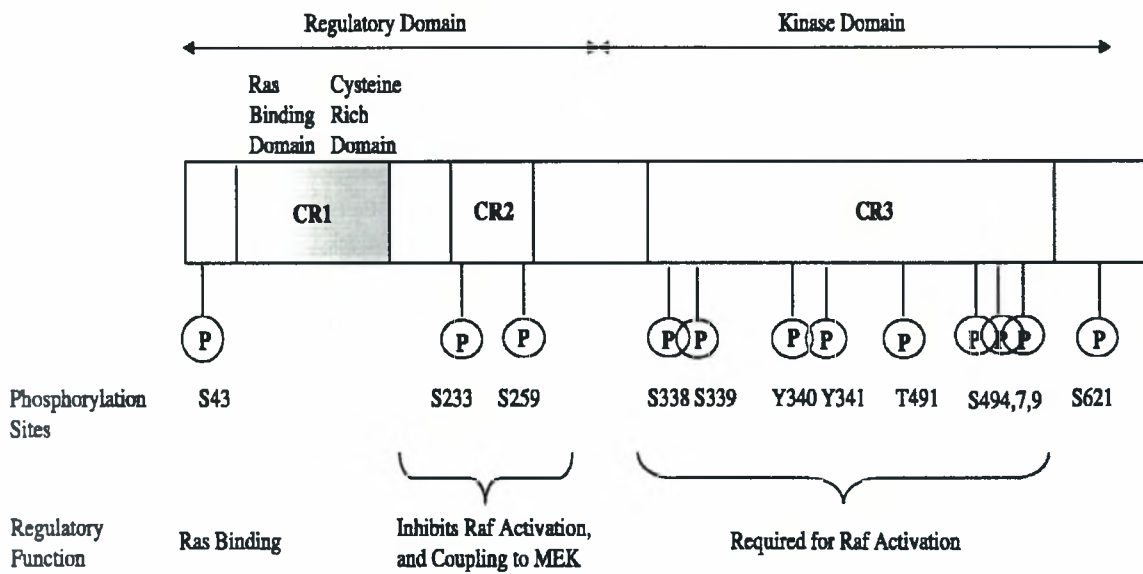
Η μετάλλαξη V600E διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο, προσδίνοντας στο κύτταρο μια μεταλλαγμένη δραστηριότητα. Στη μη φωσφορλιωμένη κατάσταση της πρωτεΐνης, οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του βρόγχου ενεργοποίησης και της θέσης πρόσδεσης του ATP, διατηρούν τη πρωτεΐνη σε ανενεργή κατάσταση. Η μετάλλαξη όμως καταστρέφει αυτές τις αλληλεπιδράσεις δίνοντας χώρο στη δημιουργία νέων οι οποίες μιμούνται τη φωσφορλίωση στις θέσεις T599 και S602 στη δραστική περιοχή. Έτσι η πρωτεΐνη BRAF είναι συνεχώς ενεργή ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση/απενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras, η οποία φυσιολογικά ελέγχει την ενεργοποίηση/απενεργοποίηση της BRAF(12,13).



ΕΙΚΟΝΑ 1.7. Η θέση του γονιδίου **b-raf** πάνω στο χρωμόσωμα 7(7q34).



EIKONA 1.8: Το γονίδιο b-raf και οι 3 συντηρημένες περιοχές (CR1, CR2, CR3). Στην εικόνα φαίνεται επίσης η θέση μεταλλαγής V600E στο εξώνιο 15.



EIKONA 1.9: Το γονίδιο Braf και οι τρεις συντηρημένες περιοχές CR1, CR2, CR3.

1.6.2 Το γονίδιο K-ras

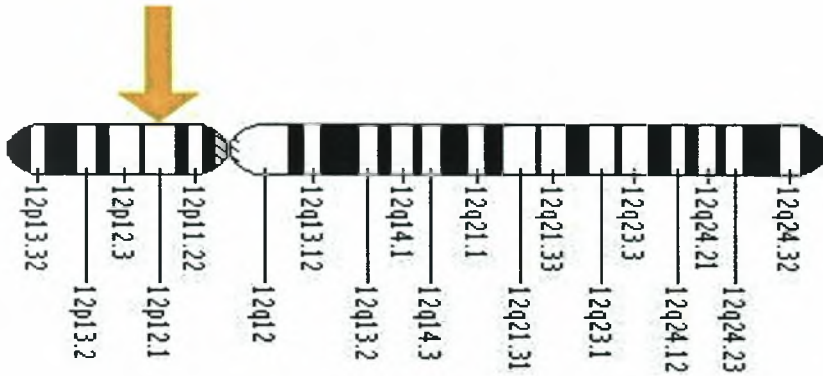
Το γονίδιο αυτό ανήκει στην υπερικογένεια των γονιδίων *ras* η οποία περιλαμβάνει τα γονίδια (H-RAS, K-RAS και N-RAS). Τα γονίδια εδράζονται στο χρωμόσωμα 12 στη θέση p12.1(Εικ.1.10) και κωδικοποιεί για μία μονομερή GTPάση περίπου 188 αμινοξέων και 21 kDa, της εσωτερικής επιφάνειας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και παίζει κεντρικό ρόλο στη ενδοκυτταρική μετάδοση μηνυμάτων που προέρχονται από μεμβρανικούς υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης και υποδοχείς G-πρωτεϊνών (14). Τα πρώτα 164 αμινοξέα είναι κοινά σε όλες τις RAS, ενώ η περιοχή 165-185 στο C-τελικό άκρο είναι τελείως διαφορετική και για αυτό ονομάζεται ετερογενής περιοχή.

Στην ανενεργή μορφή της, η πρωτεΐνη RAS είναι συνδεδεμένη με το GDP. Καθώς γίνεται η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης, κατά τη σύνδεση του αυξητικού παράγοντα με τον υποδοχέα του, το GDP φωσφορυλιώνεται σε GTP. Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη RAS, ενεργοποιεί με τη σειρά της αρκετές κυτταροπλασματικές κινάσες, που μεταφέρουν το μήνυμα για πολλαπλασιασμό στον πυρήνα. Γρήγορα γίνεται απενεργοποίηση της πρωτεΐνης RAS, με υδρόλυση του GTP προς GDP, η οποία επιτυγχάνεται με τη συνεργιστική δράση πρωτεϊνών ενεργοποιούμενων από τη δράση των GTPασών (GAP, GTPase Activating Proteins) (15). Η εμφάνιση μεταλλάξεων στα γονίδια των RAS και GAP πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα τη μη αδρανοποίηση της RAS πρωτεΐνης, γεγονός που οδηγεί σε συνεχή μετάδοση μηνυμάτων πολλαπλασιασμού στο κύτταρο, απουσία της αλληλεπίδρασης αυξητικού παράγοντα με τον υποδοχέα του, που αποτελεί το φυσιολογικό μηχανισμό ενεργοποίησης της RAS

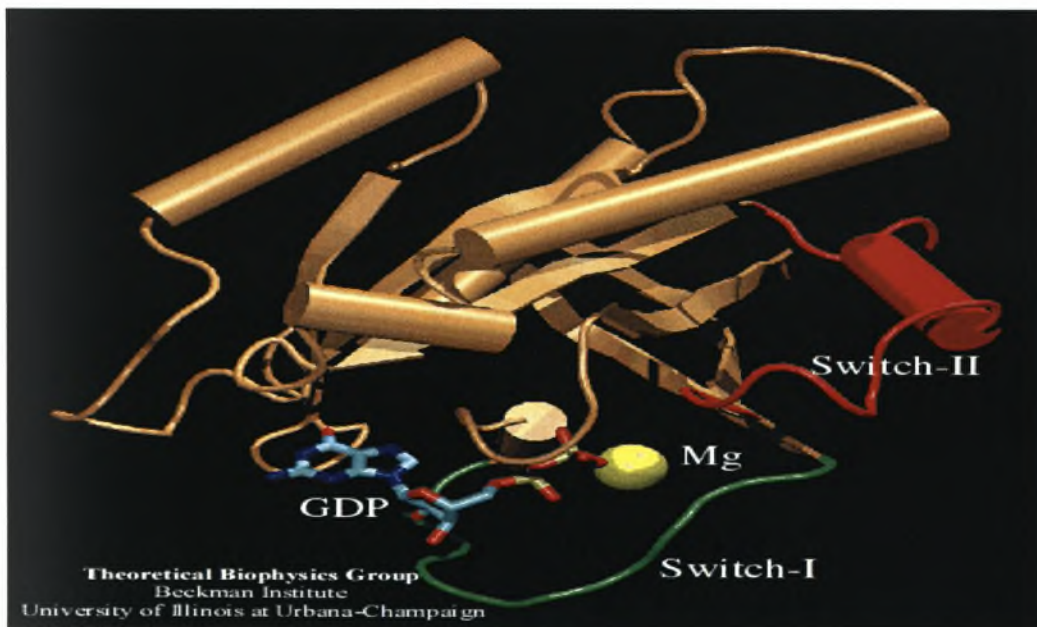
Τρία δομικά στοιχεία είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τη λειτουργία της πρωτεΐνης *ras*: οι βρόγχοι L1,L2 και L4. Και οι τρεις βρόγχοι έρχονται σε επαφή με την γ-φωσφορική ομάδα του GTP. Πιο συγκεκριμένα :

Ο βρόγχος L1 τυλίγεται γύρω από την β- και γ- φωσφορική ομάδα του GTP μορίου. Εδώ βρίσκεται το αμινοξύ γλυκίνη που κωδικοποιείται από το κωδικόνιο 12 (GGT) στο εξόνιο 2. Ο βρόγχος L2 (switch I) είναι σημαντικός για βιολογική δραστηριότητα της πρωτεΐνης καθώς αυτός παραλαμβάνει και διαδίδει τα μηνύματα.. Ο βρόγχος L4 (switch II) σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με την γ-φωσφορική ομάδα του GTP μέσω της Gly60.

Σύγκριση της δομής της ενεργούς RAS με την ανενεργή, δείχνει σημαντικές αλλαγές στη διαμόρφωση των βρόγχων, κυρίως των switch I και switch II, με βασικότερη την απουσία της επαφής των βρόγχων με την γ-φωσφορική ομάδα του GTP λόγω υδρόλυσής του.(Εικ.1.11)

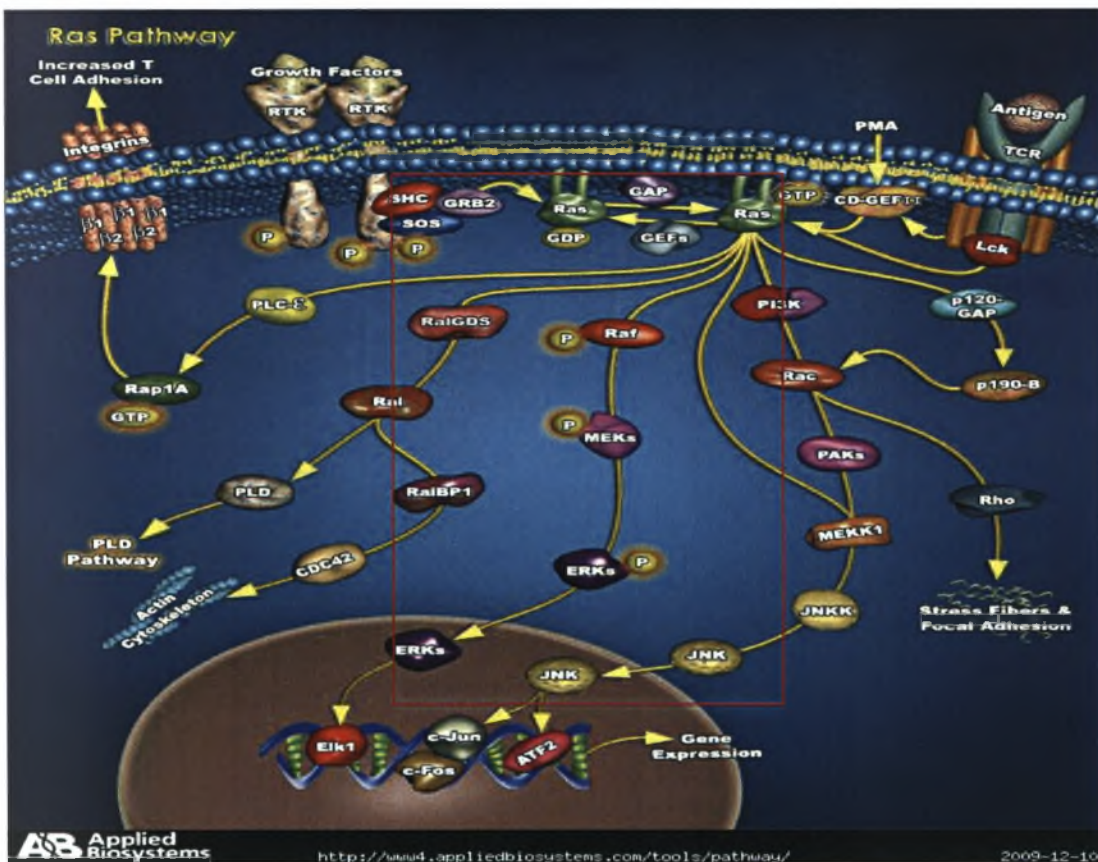


ΕΙΚΟΝΑ 1.10: Το γονίδιο Kras πάνω στο χρωμόσωμα 12 στη θέση p12.1.



ΕΙΚΟΝΑ 1.11: Η πρωτείνη RAS. Διακρίνονται οι βρόγχοι L2 και L4 (switch I και switch II αντίστοιχα) και η θέση σύνδεσης του GTP.

Σημειακές μεταλλάξεις που συμβαίνουν στα κωδικόνια 12 και 13 έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγγένειας της πρωτεΐνης για το GTP, με αποτέλεσμα η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη να βρίσκεται μόνιμα στην ενεργή της κατάσταση και συνεχώς να ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι RAS/RAF/MEK/ERK/MARK στο οποίο συμμετέχει.(Εικ.1.12)(11). Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο συνεχής πολλαπλασιασμός του κυττάρου.



ΕΙΚΟΝΑ 1.12: Τα διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια μέσα στα οποία εμπλέκεται η πρωτεΐνη Ras. Διακρίνεται το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras/Raf/Mek/Erk με το οποίο το μήνυμα για πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η συγκεκριμένη εργασία εστίασε στη μελέτη του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς αδένου για το λόγο ότι είναι το πιο συχνά εμφανιζόμενο καρκίνωμα, σε ποσοστό 80% των περιπτώσεων (2), δίνοντας προβάδισμα τόσο στην αναγκαιότητα μελέτης και διευκρίνησης των μοριακών μηχανισμών καρκινογένεσης που λαμβάνουν χώρα, όσο και πλεονέκτημα στην ευκολία συλλογής κατάλληλου αριθμού δειγμάτων. Τα αποτελέσματα από τη διευκρίνιση των μοριακών μηχανισμών που μεσολαβούν στην καρκινογενετική διαδικασία εμφάνισης θηλώδους καρκινώματος στον θυρεοειδή αδένου, θα αξιοποιηθούν στα πλαίσια εύρεσης στοχευμένης θεραπείας στους ασθενείς με κατάλληλα φάρμακα.

3. Πειραματικό μέρος

3.1 Υλικό μελέτης

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν:

- 32 ασθενείς με θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς αδένα (υλικό αρχείου) που αποτέλεσαν την ομάδα Α
- 32 ασθενείς με οζώδη βρογχοκήλη χωρίς στοιχεία ατυπίας (υλικό αρχείου) που αποτέλεσαν την ομάδα Β (φυσιολογικοί μάρτυρες)
- 20 ασθενείς, από τους οποίους έγινε λήψη υγρού (FNA) με χρήση λεπτής βελόνας (FNA, Fine Needle Aspiration) από όζο θυρεοειδούς αδένα και οι οποίοι αποτέλεσαν την ομάδα Γ.

Τα δείγματα των ομάδων Β και Γ δεν εμφανίζουν στοιχεία κακοήθειας σύμφωνα με την ιστολογική έκθεση, συνεπώς αποτέλεσαν τις ομάδες ελέγχου (φυσιολογικοί μάρτυρες).

3.2 Μεθοδολογία

3.2.1 Επιλογή υλικού

Αρχικά μελετήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο τομές του εγχειρητικού παρασκευάσματος χρωσμένες με αιματοξυλίνη-ηωσίνη προκειμένου να συσχετιστεί η θέση του καρκινώματος με την αντίστοιχη στο block παραφίνης. Στη συνέχεια η επιλεγμένη περιοχή ενδιαφέροντος απομονώθηκε από το block παραφίνης με νυστέρι και επεξεργασία στο μικροτόμο Leica CM1850.

3.2.2 Απομόνωση γενωμικού DNA

A. Αρχειακό υλικό

Στα δείγματα αρχειακού υλικού, μετά την επιλογή του υλικού πήραμε για κάθε δείγμα 10 τομές παραφίνης των 10 μm η κάθε μία σε σωληνάρια τύπου erpendorf. Ακολούθησε η διαδικασία αποπαραφίνωσης του ιστού ως εξής:

Αποπαραφίνωση ιστού

Στα erpendorf με τις τομές παραφίνης προσθέτω 1ml ξυλόλη.

1. Αφήνω για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου κάνοντας ενδιάμεσα ανάδευση (vortex).
2. Φυγοκέντρωση στις 12.000 στροφές (rpm) για 10 λεπτά στους 20⁰C.
3. Αφαιρώ το υπερκείμενο προσεκτικά και κρατάω το ίζημα.
4. Επαναλαμβάνω τα βήματα 1-4.
5. Προσθέτω 1ml απόλυτη αιθανόλη (100%) και φυγοκεντρώ στις 12.000 στροφές (rpm) για 10 λεπτά στους 20⁰C.
6. Πετάω το υπερκείμενο.
7. Επαναλαμβάνω τα βήματα 6, 7.
8. Προσθέτω 400μl διάλυμα λύσης ιστών (ATL), 100μl SDS 10% και 100μl πρωτεϊνάση K.

Απομόνωση γενομικού DNA με το kit της Qiagen (Qiamp DNA mini kit).

1. Βγάζω τα δείγματα από το υδατόλουτρο και όπως είναι προσθέτω 200μl buffer AL. Κάνω vortex για 15sec.
2. Βάζω τα δείγματα στους 70⁰C για 10min

3. Βγάζω τα δείγματα από τους 70⁰C και όπως είναι προσθέτω 200μl αιθανόλη 100%.
4. Μοιράζω προσεκτικά τα δείγματα σε δυο δόσεις των 700μl σε ειδικά erpendorf με στήλη και φυγοκεντρώ στις 8.000 rpm για 1min στους 20⁰C.
5. Πετάω ό,τι πέρασε από τη στήλη και προσθέτω 500μl buffer AW1 ethanol added.
6. Φυγοκεντρώ στις 8.000 rpm για 1min στους 20⁰C.
7. Πετάω ό,τι πέρασε από τη στήλη και προσθέτω 500μl buffer AW2 ethanol added.
8. Φυγοκεντρώ στις 8.000 rpm για 1min. στους 20⁰C.
9. Πετάω ό,τι πέρασε από τη στήλη και επαναλαμβάνω φυγοκέντρωση στις 12.000rpm για 6min στους 20⁰C ώστε να καθαρίσει καλά.
10. Αλλάζω στήλη και προσθέτω 60μl νερό. Αφήνω 5min στο πάγκο και φυγοκεντρώ στις 8.000 rpm για 1min. στους 20⁰C
11. Χωρίς να πετάζω τίποτα προσθέτω άλλα 60μl νερό. Αφήνω 5min στο πάγκο και φυγοκεντρώ στις 8.000 rpm για 1min. στους 20⁰C
12. Ότι έχει περάσει από τη στήλη το μεταφέρω σε καθαρό erpendorf του 1.5.ml.

B. Υλικό FNA βιοψίας με λεπτή βελόνα.

1^η μέρα απομόνωσης.

1. Ξεπλένω προσεκτικά τη σύριγγα με διάλυμα PBS και μεταφέρω το υλικό σε falcon των 15ml. Αφού το μεταφέρω προσθέτω PBS μέχρι τελικό όγκο 3ml.
2. Φυγοκεντρώ στις 2.000 rpm για 25min στους 25⁰C.
3. Αφαιρώ το υπερκείμενο και επαναδιαλύω το ίζημα σε 2ml PBS.
4. Φυγοκεντρώ στις 2.000 rpm για 25min στους 25⁰C
5. Αφαιρώ το υπερκείμενο και προσθέτω 400μl ATL buffer, 100μl SDS 10% και 100μl πρωτεϊνάση K. Αφήνω overnight στο υδατόλουτρο στους 37⁰C.

2^η μέρα απομόνωσης

Συνεχίζουμε την απομόνωση του γενωμικού DNA με το κιτ της Qiagen (Qiaprep DNA mini kit) ακολουθώντας τη διαδικασία που προαναφέρθηκε.

3.2.3 Έλεγχος ποιότητας γενωμικού DNA

Η ηλεκτροφόρηση συγκεκριμένων τμημάτων DNA σε πηκτώματα αгарόζης και η απομόνωση τους απ' αυτές αποτελεί έναν απλό και αποδοτικό τρόπο διαχωρισμού και καθαρισμού τους. Η μέθοδος βασίζεται στην παρασκευή πηκτών αгарόζης με τήξη της αгарόζης σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα έως ότου σχηματιστεί ένα διαυγές διάλυμα. Με τη ψύξη του διαλύματος σχηματίζεται ένα πλέγμα που η πυκνότητα του εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αгарόζης. Με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τα τμήματα του DNA, που είναι αρνητικά φορτισμένα σε ουδέτερο pH, μετακινούνται προς την άνοδο.

Η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων DNA εξαρτάται από ορισμένους παράγοντες όπως το μέγεθος και η διαμόρφωση των τμημάτων του DNA, η συγκέντρωση της αгарόζης, το δυναμικό που εφαρμόζεται στα άκρα της πηκτής και η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται πηκτές με συγκέντρωση 1% και 3% αгарόζης, σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X, παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου σε συγκέντρωση 0.5 μg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια χρωστική που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Η ιδιότητα του να απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία και να την επανεπέμψει στο κόκκινο ορατό φάσμα χρησιμοποιείται για να ανιχνευθούν τα τμήματα του DNA πάνω στην πηκτή.

Συγκεκριμένα, ελέγχουμε την ποιότητα του γενωμικού DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1%. Αναλυτικότερα, 5μl από το δείγμα μας φορτώνονται σε κατάλληλη θέση στο πήκτωμα αгарόζης και ηλεκτροφορούνται περίπου στα 110 volt για 20 λεπτά.

Στη συνέχεια το πήκτωμα τοποθετείται σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) και εκτιμούμε την ποιότητα με βάση την ένταση των ζωνών που παίρνουμε. Αξίζει να σημειωθεί ότι στα δείγματα που προέρχονται από αρχειακό υλικό το DNA είναι

κατακερματισμένο και εμφανίζεται σαν smear λόγω της επεξεργασίας του ιστού κατά την μονιμοποίησή του σε φορμόλη, σε αντίθεση με τα δείγματα FNA όπου το DNA θα εμφανίζεται σαν μία ζώνη.

Στη συνέχεια, ακολουθεί ενίσχυση του τμήματος του DNA που μας ενδιαφέρει με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR).

3.3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία *in vitro* μέθοδος η οποία επιτρέπει τη γρήγορη ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA με χρήση κατάλληλων εκκινητών από μικρά ποσά ενός αρχικού δίκλωνου DNA εκμαγείου.

Συγκεκριμένα η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποτελείται από τρία καθορισμένα στάδια:

1) Την αποδιάταξη των κλώνων του DNA εκμαγείου σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 90 °C (30 δευτερόλεπτα-5λεπτά).

2) Την υβριδοποίηση των δύο εκκινητών σε θερμοκρασία που επιλέγεται συνήθως μεταξύ 40°-65°C (20-60 δευτερόλεπτα) ανάλογα με τις ιδιότητες των εκκινητών.

3) Την σύνθεση και επιμήκυνση της νέας αλυσίδας του DNA από μία θερμοάνθεκτική πολυμεράση, παρουσία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων.

Τα τρία παραπάνω στάδια αποτελούν ένα κύκλο όπου το DNA διπλασιάζεται. Η επανάληψη της διαδικασίας 30-40 φορές (κύκλοι) είναι αρκετή για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος DNA. Μετά τον πρώτο κύκλο χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία όχι μόνο οι αρχικές αλυσίδες αλλά και οι νεοσυντεθείσες, οι οποίες έχουν προκαθορισμένο μήκος από τα άκρα των περιοχών που είναι συμπληρωματικά με τους εκκινητές.

Οι παράμετροι που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού είναι:

- Η συγκέντρωση των εκκινητών πρέπει να αρκετά υψηλή ώστε η σύνδεση τους με την αντίστοιχη μονόκλωνη αλυσίδα να γίνεται γρήγορα και κατά την εξέλιξη της αντίδρασης η σύνδεση αυτή να είναι γρηγορότερη από την επανασύνδεση εκμαγείου-εκμαγείου.

- Η εκλογή κατάλληλης θερμοκρασίας και χρόνου σε κάθε στάδιο της αντίδρασης βοηθά την ειδικότητα της αντίδρασης
- Η ειδικότητα και απόδοση της μεθόδου αυξήθηκε με τη χρήση της Taq πολυμεράσης αφού χρησιμοποιούνται υψηλότερες θερμοκρασίες στα στάδια σύνδεσης και επιμήκυνσης.

Στην παρούσα εργασία ενισχύθηκε ειδικά το εξόνιο 15 του γονιδίου Braf και το εξόνιο 2 του γονιδίου Kras.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το εξόνιο 15 του γονιδίου Braf είναι:

Εκκινητής forward BF με την αλληλουχία: 5'-TCATAATgCTTgCTCTgATAggA-3'

Εκκινητής reverse BRI με την αλληλουχία: 5'-ggCCAAAATTTAATCAgTggA-3'

```

5'Tcataatgcttgctctgataggaaaaatgagatctactgttttcctttacttactac
acctcagatatatttcttcatgaagacctcacagtaaaaataggtgattttgggtcta
gctacattaaatctcgatggagtggggtcccatcagtttgaacagttgtctggatcc
atTTTgtggatggtaagaattgaggctatttttccactgattaatttttgg-3'

```

ΕΙΚΟΝΑ 3.1: Απεικόνιση τμήματος του εξονίου 15 του γονιδίου Braf. Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζονται οι περιοχές αναγνώρισης των εκκινητών BF και BRI.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το μείγμα της αντίδρασης στις ανάλογες συγκεντρώσεις είναι:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ / ΔΕΙΓΜΑ
DNA	6μl
10x buffer	5μl
MgCl (50 mM)	2μl
BF (αρχική συγκέντρωση 10mM, τελική συγκέντρωση	2μl

2,5Mμ)	
BRI (αρχική συγκέντρωση 10mM, τελική συγκέντρωση 2,5μM)	2μl
DNTPs	2μl
Taq Polymerase	0,3μl
DdH ₂ O	31,7μl
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	50μl

Οι συνθήκες της PCR είναι:

- 94 °C → 5min , αρχική αποδιάταξη
 - 94 °C → 1min , στάδιο αποδιάταξης
 - 58 °C → 1min , στάδιο υβριδοποίησης
 - 72 °C → 1min , στάδιο επιμήκυνσης
 - 72 °C → 10 min , τελική επιμήκυνση
 - 18 °C → for ever
- } x 35

Το μέγεθος του κομματιού που ενισχύεται είναι 220bp.

Το προϊόν της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση 15μl της αντίδρασης σε πηκτή αγαρόζης 3%.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το εξόνιο 2 του γονιδίου Kras προκειμένου το δείγμα να αλληλουχιστεί είναι:

Εκκινητής forward 2F με την αλληλουχία: 5'-CATgTTCTAATATAgTCACA-3'

Εκκινητής reverse 12b με την αλληλουχία: 5'-TCAAAGgAATggTCCTggACC-3'

5'tttgtattaaaagggtactgggtggagatatttgatagtgatttaaccttatgtgtgacat
 gttctaataatagtcaca ttttcattatTTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAA
 TATAAacttgtggtagttggagct ggTggc gtaggcaagagtgCCTTGACGATACAGCT
 aattcagaatcattttgtggacgaatatgatccaacaatagaggtaaattcttgttttaa
 tatgcatattact ggTgcaggaccattctttgata cagataaagggtttctctgac
 cattttcatg-3'

ΕΙΚΟΝΑ 3.2: Απεικόνιση τμήματος του εξονίου 2 του γονιδίου Kras. Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζονται οι περιοχές αναγνώρισης των εκκινητών 2F και 12b.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το μείγμα της αντίδρασης στις ανάλογες συγκεντρώσεις είναι:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ / ΔΕΙΓΜΑ
DNA	6μl
10x buffer	5μl
MgCl (50 mM)	2μl
2F (αρχική συγκέντρωση 10mM, τελική συγκέντρωση 2Μμ)	3μl
12b (αρχική συγκέντρωση 10mM, τελική συγκέντρωση 2μM)	3μl
DNTPs	2μl
Taq Polymerase	0,4μl
ddH ₂ O	28,7μl
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	50μl

Οι συνθήκες της PCR είναι:

- 94 °C → 10 λεπτά , αρχική αποδιάταξη
 - 94 °C → 10 λεπτά, στάδιο αποδιάταξης
 - 52 °C → 1 λεπτό , στάδιο υβριδοποίησης
 - 72 °C → 2 λεπτά, στάδιο επιμήκυνσης
 - 72 °C → 10 λεπτά , τελική επιμήκυνση
 - 18 °C → for ever
- } x 30

Το μέγεθος του κομματιού που ενισχύεται είναι 215bp.

Το προϊόν της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση 15μl της αντίδρασης σε πηκτή αγαρόζης 3%.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το εξόνιο 2 του γονιδίου Kras προκειμένου το δείγμα επεξεργαστεί με περιοριστικό ένζυμο είναι:

Εκκινητής forward 12a με την αλληλουχία:

5'-ACTgAATATAAACTTgTggTAgTTggACCT-3'

Εκκινητής reverse 12b με την αλληλουχία:

5'-TCAAAGaAATggTCCTggACC-3'

```
gactgaatat aaacttgtgg tagttggagc tggtagc gta ggcaagagtg ccttgacgat
acagctaatt cagaatcatt ttgtggacga atatgatcca acaatagagg taaatcttgt
ttaatatgc atattactgg tgcaggacca ttctttgata cagataaagg tttctctgac
cattttcatg
```

ΕΙΚΟΝΑ 3.3: Απεικόνιση τμήματος του εξονίου 2 του γονιδίου Kras. Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζονται οι περιοχές αναγνώρισης των εκκινητών 12a και 12b.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το μείγμα της αντίδρασης στις ανάλογες συγκεντρώσεις είναι:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ / ΔΕΙΓΜΑ
DNA	6μl
10x buffer	5μl
MgCl (50 mM)	2μl
2F (αρχική συγκέντρωση 10mM, τελική συγκέντρωση 2,5μM)	3μl
12b (αρχική συγκέντρωση 10mM, τελική συγκέντρωση 2,5μM)	3μl
dNTPs	2μl
Taq Polymerase	0,4μl
ddH ₂ O	28,7μl
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	50μl

Οι συνθήκες της PCR είναι:

- 94 °C → 10 λεπτά , αρχική αποδιάταξη
 - 94 °C → 1 λεπτό , στάδιο αποδιάταξης
 - 52 °C → 1 λεπτό, στάδιο υβριδοποίησης
 - 72 °C → 2 λεπτά στάδιο επιμήκησης
 - 72 °C → 10 λεπτά , τελική επιμήκηση
 - 18 °C → for ever
- } x 30 κύκλους

Το μέγεθος του κομματιού που ενισχύεται είναι 215bp.

Το προϊόν της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση 15μl της αντίδρασης σε πηκτή αγαρόζης 3%.

3.2.5 Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων– πολυμορφισμοί μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (RFLPs)

Το γενωμικό DNA μπορεί να κοπεί σε συγκεκριμένες θέσεις από εξειδικευμένα ένζυμα τα οποία ονομάζονται περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν ειδικές δίκλωνες αλληλουχίες DNA και κόβουν το μόριο μέσα ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης έχουν μήκος συνήθως 4-8 νουκλεοτίδια και συχνά είναι παλίνδρομες. Γνωρίζοντας επομένως την πλήρη αλληλουχία της περιοχής του γονιδίου μπορούμε μετά από πέψη με ένα περιοριστικό ένζυμο σε ένα αριθμό δειγμάτων και σύγκριση των τμημάτων DNA που προκύπτουν, να εντοπίσουμε την ύπαρξη ή την απουσία μίας σημειακής μετάλλαξης.

Στην παρούσα εργασία για την πέψη του γονιδίου Braf χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο TsPRI (10.000U/ml) με την εξής θέση αναγνώρισης :

5'- NNCASTGNN[↓] -3'

3'- [↓]NNGTSACNN-5'

, όπου S = C ή G

Όπως υποδεικνύεται και από τη θέση αναγνώρισης το ένζυμο θα κόψει τα ενισχυμένα τμήματα DNA που φέρουν το φυσιολογικό κωδικόνιο GTG ενώ θα αφήσουν ανέπαφα τα ενισχυμένα τμήματα DNA που φέρουν το μεταλλαγμένο κωδικόνιο GAG.

Το μείγμα της πέψης σε τελικό όγκο 60 μl είναι:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ / ΔΕΙΓΜΑ
Ένζυμο TsPRI (10.000U/ml)	3μl
10x buffer	6μl
H ₂ O	26μl
DNA	30μl

Το μείγμα επωάζεται στους 65 °C για 16 ώρες καθώς 50 μl αντίδρασης με 1μg DNA + 100 units ενζύμου μετά από επώαση 16 ωρών ακολουθεί το ίδιο πρότυπο αντίδρασης με το αν είχαμε 1 ώρα επώαση με 1unit ενζύμου.

Το αποτέλεσμα της πέψης ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3%.

Στην παρούσα εργασία για την πέψη του γονιδίου Kras χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο BstNI (10.000U/ml) με την εξής θέση αναγνώρισης :

5'- CC[↓]WGG-3'

3'- GGW[↓]CC-5'

, όπου W = A ή T

Όπως υποδεικνύεται και από τη θέση αναγνώρισης το ένζυμο θα κόψει τα ενισχυμένα τμήματα DNA που φέρουν οποιαδήποτε μεταλλαγή του φυσιολογικού κωδικονίου GGT ενώ θα αφήσουν ανέπαφα τα ενισχυμένα τμήματα DNA που φέρουν το φυσιολογικό κωδικόνιο 12 (GGT) .

Το μείγμα της πέψης σε τελικό όγκο 60 μl είναι:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ / ΔΕΙΓΜΑ
Ένζυμο BstNI (10.000U/ml)	3μl
10x buffer	6μl
H ₂ O	26μl
DNA	30μl

Το μείγμα επωάζεται στους 65 °C για 16 ώρες καθώς 50 μl αντίδρασης με 1μg DNA + 100 units ενζύμου μετά από επώαση 16 ωρών ακολουθεί το ίδιο πρότυπο αντίδρασης με το αν είχαμε 1 ώρα επώαση με 1unit ενζύμου.

Το αποτέλεσμα της πέψης ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3%.

3.3.5 Αλληλούχιση (Sequencing)

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

1. Το προϊόν PCR καθαρίστηκε με το Qiaquick PCR purification kit το οποίο συμπεριλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:
 - Προσθέτουμε στα δείγματα PCR buffer PB1. Η ποσότητα θα είναι 5 φορές η ποσότητα του δείγματος. Το χρώμα του δείγματος πρέπει να είναι κίτρινο διαφορετικά προσθέτουμε 10μl sodium acetate 3M, pH=5 και μεταφέρουμε τα δείγματα σε στήλες.
 - Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στις 13.000rpm στους 20 °C.
 - Πετάμε ότι πέρασε από τη στήλη και σκουπίζουμε καλά.
 - Προσθέτουμε 750 μl buffer PE και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 13.000rpm στους 20 °C.
 - Πετάμε ότι πέρασε από τη στήλη και φυγοκεντρούμε αμέσως για 2 λεπτά στις 13.000rpm στους 20 °C.
 - Χωρίς να αλλάξουμε στήλη προσθέτουμε 30μl H₂O σε κάθε δείγμα και αφήνουμε τα δείγματα για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
 - Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 13.000rpm στους 20 °C και μεταφέρουμε το καθαρό PCR 30μl που έχει περάσει από τη στήλη σε καθαρό eppendorf με καπάκι.
2. Ηλεκτροφορούμε 4μl από το καθαρισμένο PCR προϊόν και 1μl μάρτυρα 100bp σε πήκτωμα αγαρόζης 3%.
3. Με βάση τις ζώνες του μάρτυρα και τα ng που αντιστοιχούν σε κάθε ζώνη του μάρτυρα εκτιμούμε τα ng του δείγματος PCR.
4. Αφού υπολογίσουμε τη συγκέντρωση ng/ δείγμα προχωρούμε στο πρωτόκολλο για το sequencing PCR.
5. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το μείγμα της αντίδρασης PCR sequencing στις ανάλογες συγκεντρώσεις είναι:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ/ ΔΕΙΓΜΑ
---------------	---------------

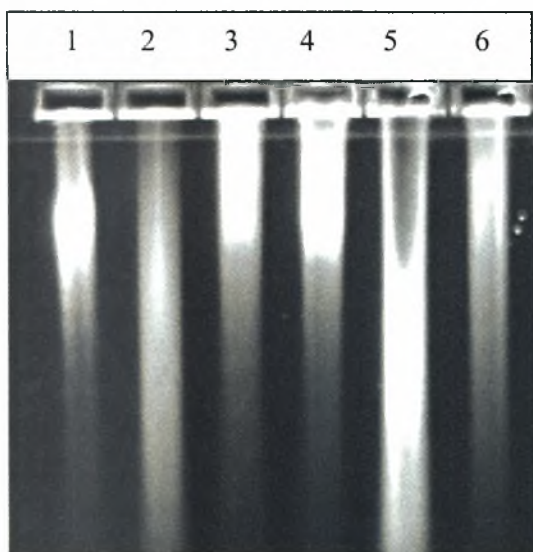
PCR καθαρισμένο	x^*
Sequencing mix (ABI BigDye Terminators)	4 μ l
Εκκινητές 2F/2R	1 μ l
H ₂ O	y^*

- x^* → τα ng που πρέπει να βάλω από το συγκεκριμένο PCR στο μηχάνημα για να διαβάσει τη συγκεκριμένη αλληλουχία, με βάση την εικόνα ηλεκτροφόρησης του καθαρισμένου PCR που γίνεται με μάρτυρα κατάλληλο για ποσοτικοποίηση και σύμφωνα με τον κανόνα $ng=0,1 \times bp$, το οποίο δίνει ο κατασκευαστής του μηχανήματος
 - y^* → υπόλοιπη ποσότητα νερού έτσι ώστε να έχουμε να τελικό όγκο 10 μ l
Οι συνθήκες της PCR είναι:
 - 95 °C → 20 δευτερόλεπτα, στάδιο αποδιάταξης
 - 50 °C → 15 δευτερόλεπτα, στάδιο υβριδοποίησης
 - 60 °C → 60 δευτερόλεπτα, στάδιο επιμήκυνσης
 x 25 κύκλους
6. Καθαρισμός των δειγμάτων της PCR sequencing με Sephadex ως εξής:
- Διαλύω 0,5gr σε 8ml dd H₂O.
 - Αναδεύω 30 λεπτά σε πάγο.
 - Μεταφέρω 600-700 μ l υγρού Sephadex σε στήλη.
 - Φυγοκεντρώ για 3 λεπτά στις 3470rpm στους 8 °C.
 - Πετάω το νερό που έχει περάσει από τη στήλη και η στήλη είναι έτοιμη.
 - Φορτώνω προσεκτικά 10 μ l του PCR στη στήλη και αφήνω για 15 λεπτά στον πάγο και σε σκοτάδι.
 - Φυγοκεντρώ για 3 λεπτά στις 3470rpm στους 8 °C.
7. Μετά τον καθαρισμό με τη στήλη Sephadex φορτώνω το προϊόν που εκλούεται από τη στήλη σε plate 96 θέσεων και το τοποθετώ στο sequencer Mbase 1000 Amersham.

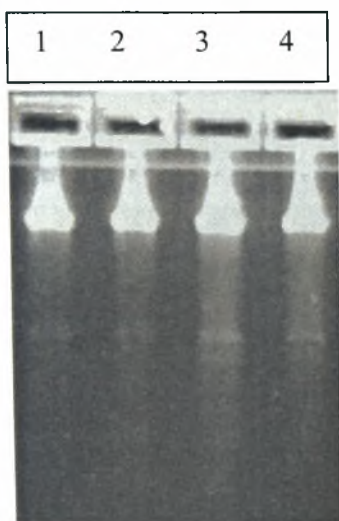
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη αυτή επεξεργάστηκαν:

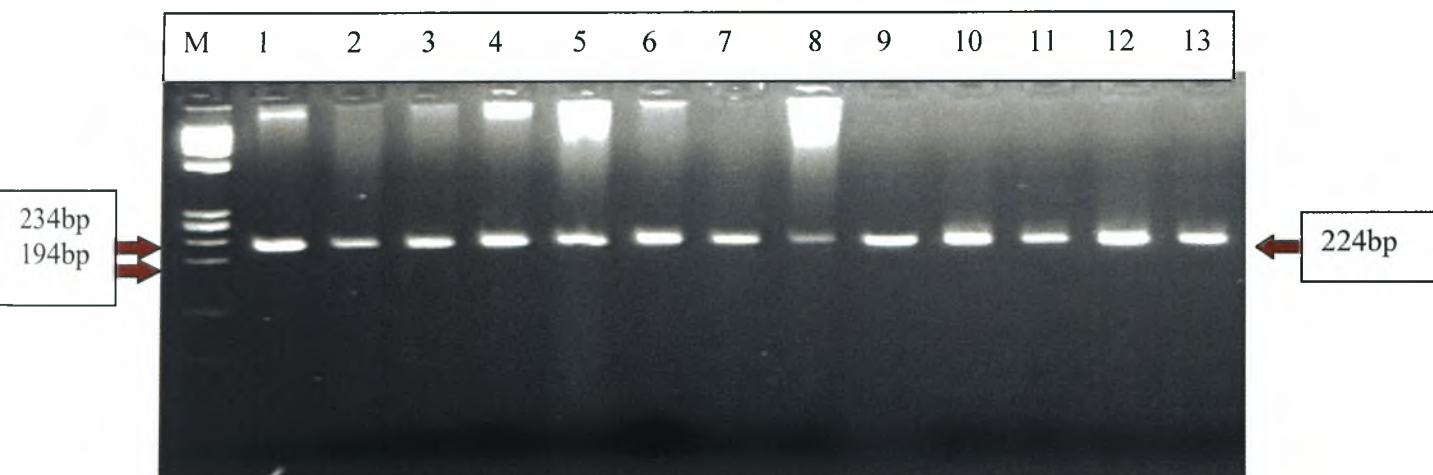
- 32 ασθενείς με θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς αδένα (υλικό αρχείου) που αποτέλεσαν την ομάδα Α
- 32 ασθενείς με οζώδη βρογχοκήλη χωρίς στοιχεία ατυπίας (υλικό αρχείου) που αποτέλεσαν την ομάδα Β (φυσιολογικοί μάρτυρες)
- 20 ασθενείς, από τους οποίους έγινε λήψη υγρού (FNA) με χρήση λεπτής βελόνας (FNA, Fine Needle Aspiration) από όζο θυρεοειδούς αδένα και οι οποίοι αποτέλεσαν την ομάδα Γ.



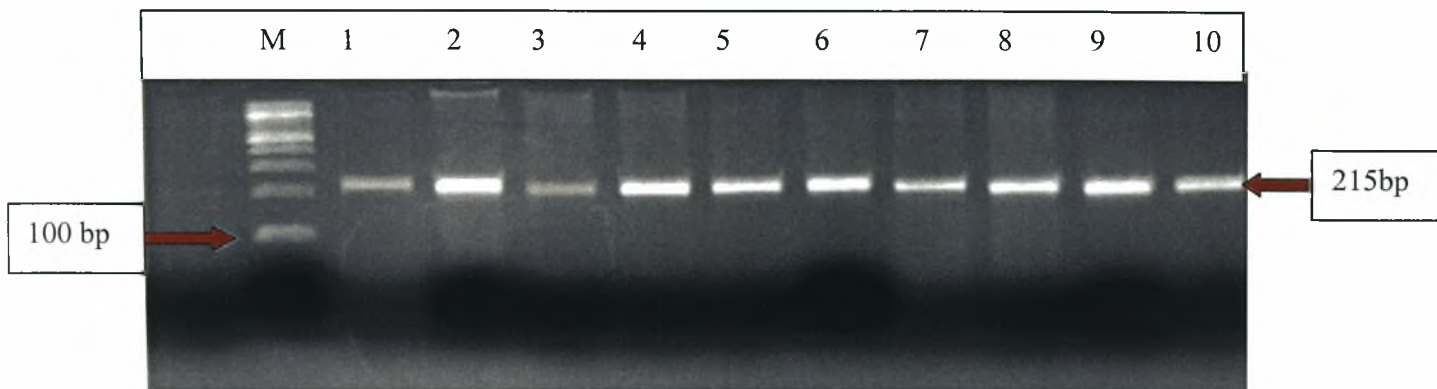
ΕΙΚΟΝΑ 4.1: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA παραφίνης της ομάδας Α (1-6) σε πήκτωμα αγαρόζης, 1%. Το DNA εμφανίζεται κατακερματισμένο.



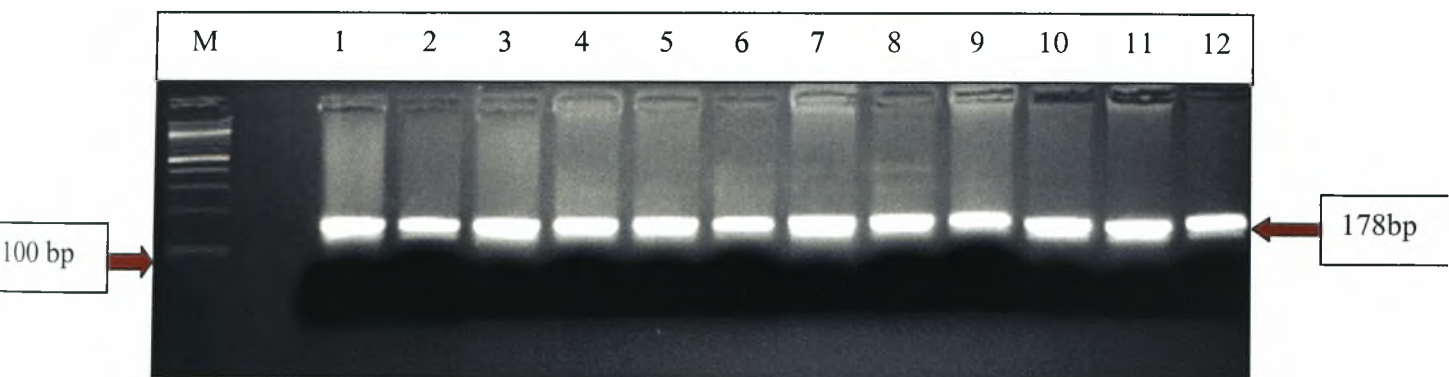
ΕΙΚΟΝΑ 4.2: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA ομάδας Γ (FNA) σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.



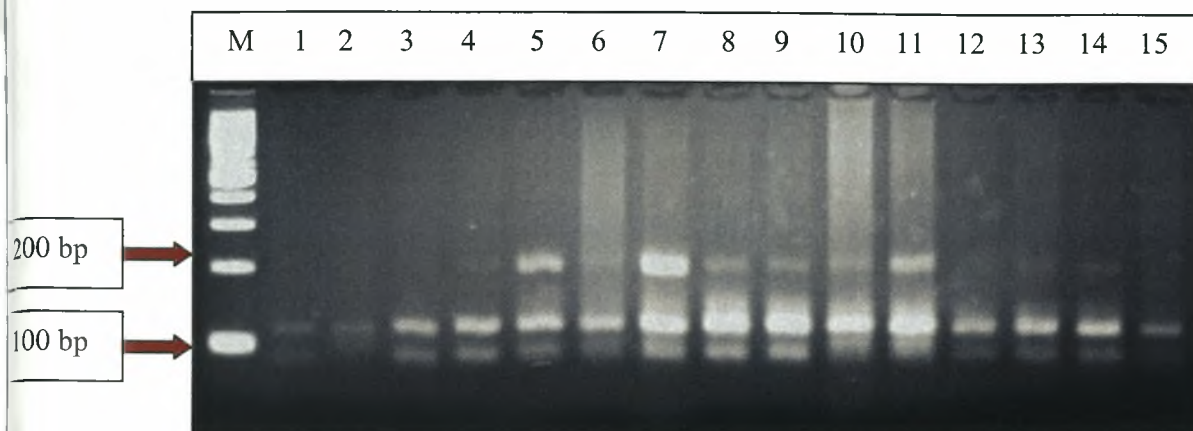
ΕΙΚΟΝΑ 4.3: Ηλεκτροφόρηση PCR των δειγμάτων ομάδας Α (1-13) για το γονίδιο Braf σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας (M) φ X/HaeIII. Το μέγεθος του προϊόντος είναι 224bp.



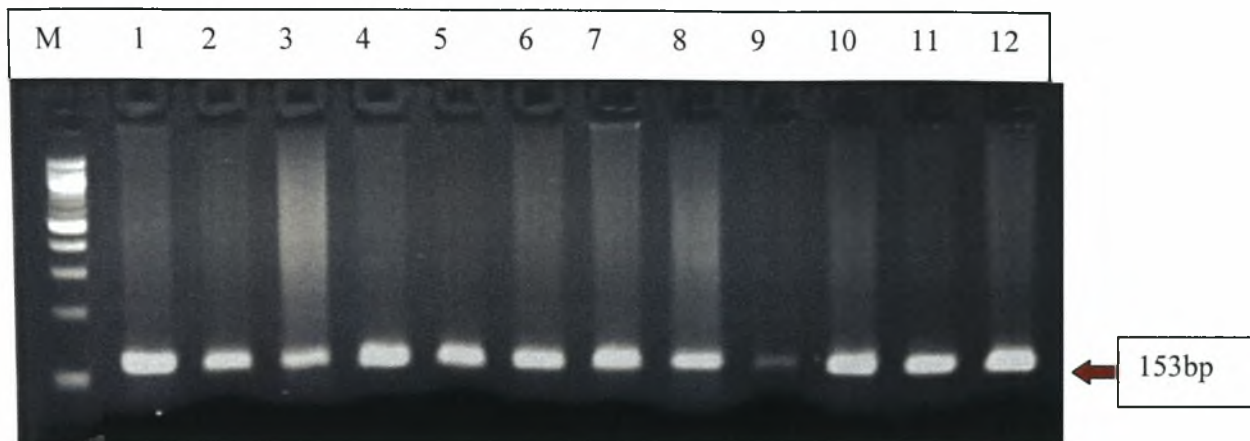
ΕΙΚΟΝΑ 4.4: Ηλεκτροφόρηση PCR των δειγμάτων ομάδας Β (1-10) για το γονίδιο Kras. Για την ενίσχυση χρησιμοποιήθηκε το ζευγάρι των εκκινητών 2F-12b. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 100bp . Το μέγεθος του κομματιού είναι 215 bp.



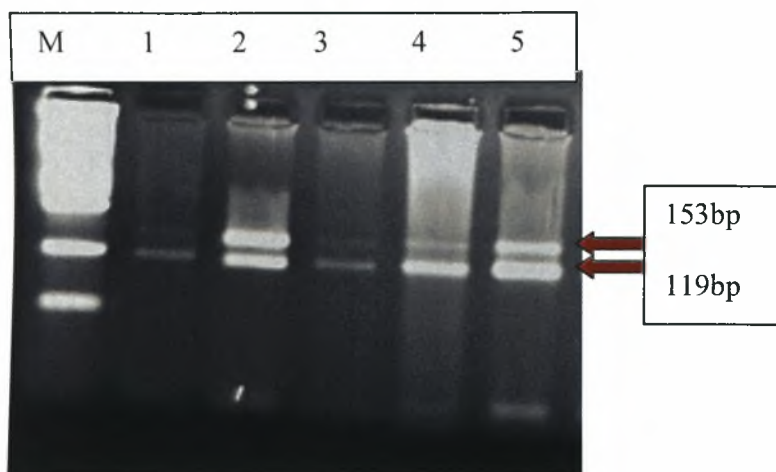
ΕΙΚΟΝΑ 4.5: Ηλεκτροφόρηση PCR των δειγμάτων ομάδας Γ (1-12) για το γονίδιο Kras. Για την ενίσχυση χρησιμοποιήθηκε το ζευγάρι των εκκινητών 12a-12b. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 100bp . Το μέγεθος του κομματιού είναι 178 bp.



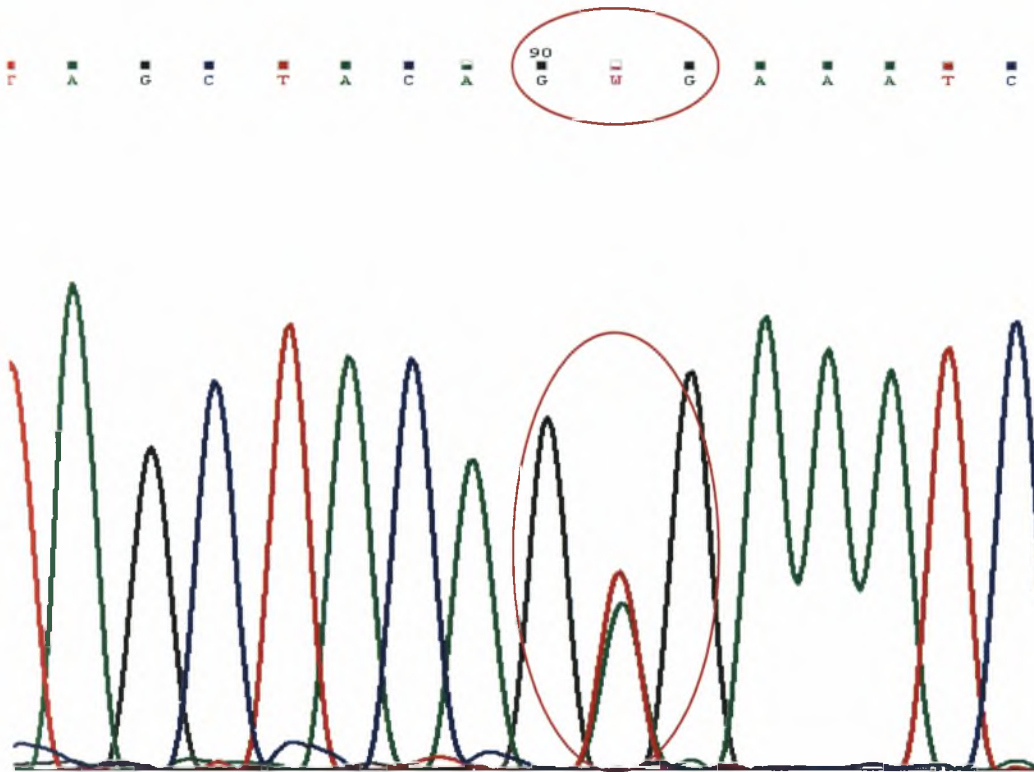
ΕΙΚΟΝΑ 4.6: Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πέψης ομάδας A (1-15) με το ένζυμο TsPRI για το γονίδιο Braf. Τα δείγματα 1-6 και 8-15 είναι αρνητικά για την αντικατάσταση GTG → GAG ενώ το δείγμα 7 είναι θετικό για τη μεταλλαγή αυτή. Η θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιέχει το φυσιολογικό κωδικόνιο, επομένως τα αρνητικά για τη μεταλλαγή δείγματα DNA θα κοπούν σε 3 κομμάτια των 124bp, 97bp και 27bp. Το κομμάτι των 27bp είναι πολύ μικρό για να φανεί σε πήκτωμα αγαρόζης 3% και χρησιμοποιώντας μάρτυρα των 100 bp. Τα θετικά για μεταλλαγή δείγματα δεν θα κοπούν από το ένζυμο καθώς η θέση αναγνώρισης έχει χαθεί, επομένως θα πάρουμε 2 κομμάτια των 197bp και 27bp. Τα δείγματα 5,8,9,10,11,14, αν και έχουν μία ζώνη κοντά στα 200 bp, δεν θεωρούνται θετικά καθώς η ζώνη είναι αρκετά αχνή και οφείλεται σε περίσσεια PCR προϊόντος που χρησιμοποιήθηκε για την πέψη. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα του sequencing. Το δείγμα 7 είναι ετεροζυγώτης καθώς εμφανίζονται και τα κομμάτια των 124bp και 97bp από το φυσιολογικό αλληλόμορφο.



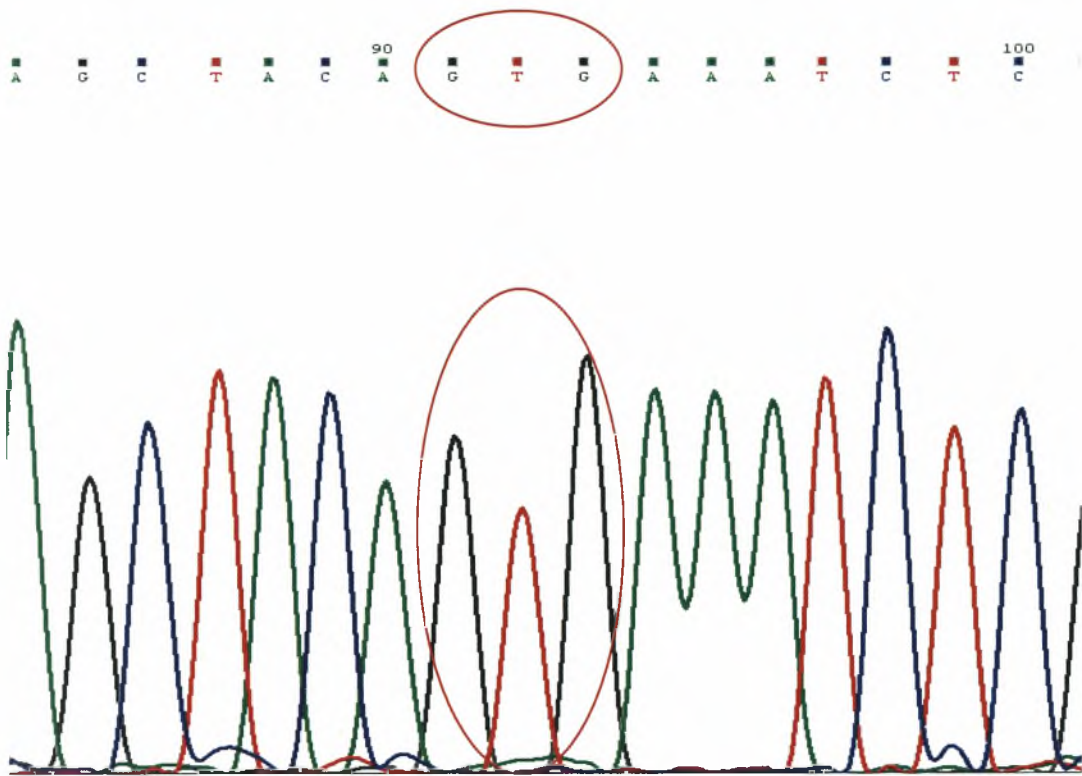
ΕΙΚΟΝΑ 4.7: Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πέψης ομάδας A (1-12) με το ένζυμο BstNI για το γονίδιο Kras. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 100bp. Τα δείγματα 1-12 είναι αρνητικά για μεταλλαγή στο κωδικόνιο 12.



ΕΙΚΟΝΑ 4.8: Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πέψης ομάδας A (1-5) με το ένζυμο BstNI για το γονίδιο Kras. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 100bp. Τα δείγματα 1-5 είναι θετικά για μεταλλαγή στο κωδικόνιο 12. Το γονίδιο που έχει τη μεταλλαγή κόβεται σε κομμάτια των 119bp και 34bp (πολύ μικρό για να φανεί στην ηλεκτροφόρηση).

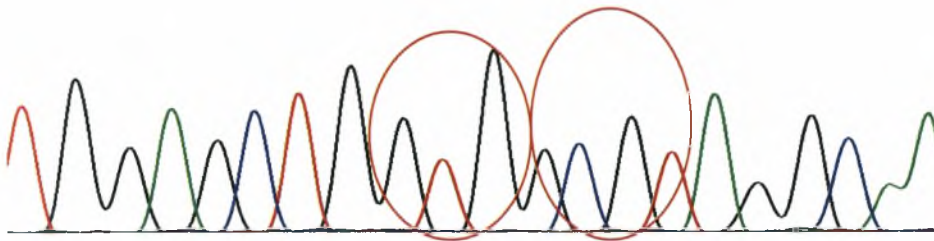


ΕΙΚΟΝΑ 4.9: Παρουσιάζεται η εικόνα από sequencing για το εξόνιο 15 του γονιδίου Braf σε δείγμα θετικό για τη μεταλλαγή GTG → GAG. Επισημαίνεται το μεταλλαγμένο κωδικόνιο GAG. Η ταυτόχρονη ύπαρξη θυμίνης (T) και αδενίνης (A) στη θέση 91, οφείλεται στο γεγονός ότι το δείγμα είναι ετεροζυγώτης.



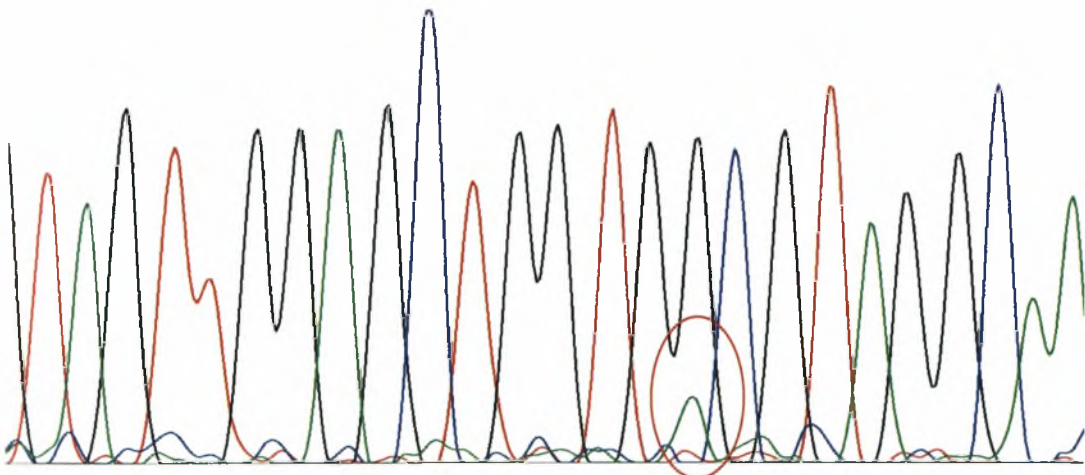
ΕΙΚΟΝΑ 4.10: Παρουσιάζεται η εικόνα από sequencing για το εξόνιο 15 του γονιδίου Braf σε δείγμα αρνητικό για τη μεταλλαγή GTG → GAG. Επισημαίνεται το φυσιολογικό κωδικόνιο GTG.

T G G A ^{5'}G C T G **G T G** **G C G** ^{3'}A G G C A A



ΕΙΚΟΝΑ 4.11: Παρουσιάζεται η εικόνα από sequencing για το εξόνιο 2 του γονιδίου Kras σε δείγμα αρνητικό για τη μεταλλαγή στα κωδικόνια 12 (GTG) και 13 (GCG).

T A G T T G G ^{5'}A G C T G G T G G C ^{3'}G T A G G C A A



ΕΙΚΟΝΑ 4.12: Παρουσιάζεται η εικόνα από sequencing για το εξόνιο 2 του γονιδίου Kras σε δείγμα θετικό για τη μεταλλαγή στο κωδικόνιο 13 (GCG → ACC).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αδένος είναι η πιο κοινή κακοήθεια του ενδοκρινικού συστήματος και εμφανίζεται σε ποσοστό περίπου 1% όλων των προσφάτων διαγνωσμένων καρκινικών περιπτώσεων στο ενδοκρινικό σύστημα (2). Ο πιο συχνός τύπος θυρεοειδικής κακοήθειας είναι το θηλώδες καρκίνωμα, καθώς παρουσιάζεται σε ποσοστό 80% όλων των περιπτώσεων. Στα θηλώδη καρκινώματα θυρεοειδούς αδένος, είναι συχνή η εμφάνιση γενετικών μεταλλάξεων που οδηγούν στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAP κινασών (MAPK). Οι πιο συχνές μεταλλάξεις που εμφανίζονται στα θηλώδη καρκινώματα είναι οι σημειακές μεταλλάξεις των γονιδίων Braf και Kras, δύο γονιδίων που έχουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην μετάδοση του μηνύματος μέσω του μονοπατιού της κινάσης MAP, ERK (RAS/RAF/MEK/ERK → εισαγωγή του μηνύματος στον πυρήνα).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 32 δείγματα παραφινόμενου ιστού από θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς αδένος (ομάδα δειγμάτων Α), 32 δείγματα παραφινόμενου ιστού οξώδους βρογχοκήλης χωρίς στοιχεία ατυπίας (ομάδα δειγμάτων Β) και 20 δείγματα υγρού FNA (fine needle aspiration method) από όζο θυρεοειδούς αδένος (ομάδα δειγμάτων Γ). Τόσο τα δείγματα της ομάδας Β όσο και τα δείγματα της ομάδας Γ, σύμφωνα με το αποτέλεσμα της ιστολογικής εξέτασης, δεν εμφανίζουν στοιχεία κακοήθειας επομένως είναι δείγματα φυσιολογικά.

Μεταλλαγή για το γονίδιο Braf ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 3,5% των δειγμάτων με θηλώδες καρκίνωμα (1 από τα 32 δείγματα ομάδας Α) και καθόλου στα δείγματα χωρίς στοιχεία κακοήθειας (ομάδα Β,Γ). Όσον αφορά το γονίδιο Kras μεταλλαγή για το κωδικόνιο 12 βρέθηκε σε ποσοστό 18,75% (6 από τα 32 δείγματα ομάδας Α) και καθόλου στα δείγματα χωρίς στοιχεία κακοήθειας (ομάδα Β,Γ), ενώ για το κωδικόνιο 13 μεταλλαγή βρέθηκε μόνο στα δείγματα ομάδας Α σε ποσοστό 28,5% (9 από τα 32 δείγματα ομάδας Α).

Αν εξετάσουμε τα στατιστικά αποτελέσματα των δύο γονιδίων ανεξάρτητα, χωρίς μεταξύ τους συσχέτιση, το ποσοστό μεταλλαγής για το γονίδιο Braf έρχεται σε έντονη αντίθεση με τα στατιστικά αποτελέσματα παλαιότερων μελετών σε δείγματα θυρεοειδούς αδένος με θηλώδες καρκίνωμα, καθώς στις μελέτες αυτές έχουμε την ύπαρξη της μεταλλαγής V600E για το γονίδιο Braf σε ποσοστό 43-56% των παθολογικών δειγμάτων (17,18) ενώ τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας παραθέτουν ένα ποσοστό 3,5%. Όσον αφορά το ποσοστό μεταλλαγής του γονιδίου Kras τα στατιστικά αποτελέσματα συγκλίνουν αρκετά καθώς στα θηλώδη καρκινώματα έχουμε την ύπαρξη μεταλλαγής σε ένα ποσοστό 20-30% των παθολογικών δειγμάτων για το κωδικόνιο 12 και 20-40% για το κωδικόνιο 13, και τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας παραθέτουν ένα ποσοστό 18,75% και 28,5% για τα κωδικόνια 12 και 13 αντίστοιχα.

Όσον αφορά τη μεταξύ τους συσχέτιση, παλαιότερες μελέτες προτείνουν ότι οι μεταλλαγές για τα γονίδια Kras και Braf σπάνια συνυπάρχουν στον ίδιο όγκο δίνοντας προβάδισμα στην παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο Braf σε ποσοστό 45% έναντι του Kras σε ποσοστό 10% (9). Αντίθετα, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δίνουν προβάδισμα στη παρουσία μεταλλάξεων στο Kras σε ποσοστό 18,75% και 28,5% για τα κωδικόνια 12 και 13 αντίστοιχα, έναντι του 3,5% για το Braf σε δείγματα παθολογικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα δείγματα στα οποία είχαμε μετάλλαξη για το γονίδιο Kras δεν εμφάνισαν μετάλλαξη για το Braf ενώ το δείγμα που ήταν θετικό για μετάλλαξη στο

γονίδιο Braf ήταν αρνητικό για Kras. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα για την ομάδα των φυσιολογικών δειγμάτων συμπίπτουν με τα αποτελέσματα της μελέτης καθώς είναι αρνητικά για οποιαδήποτε μετάλλαξη.

Η απόκλιση από τα στατιστικά δεδομένα των παθολογικών δειγμάτων μπορεί να αποδοθεί σε ποικίλους λόγους.

Ο αριθμός των δειγμάτων μελέτης είναι ένας από αυτούς. Σε παλαιότερες μελέτες τα παθολογικά δείγματα που μελετήθηκαν είναι πάνω από 180 ενώ ο αριθμός των παθολογικών δειγμάτων αυτής της μελέτης ανέρχεται στα 32, λόγω της περιορισμένης χρονικής έκτασης του συγκεκριμένου πειράματος. Επίσης, πρέπει να τονιστεί ότι τα στατιστικά αποτελέσματα με βάση την βιβλιογραφία δεν αφορούν τον ελληνικό πληθυσμό. Δεδομένου του ότι τα ποσοστά μεταλλαγών για τα γονίδια Kras και Braf εμφανίζουν απόκλιση από χώρα σε χώρα, θα μπορούσαμε να μιλάμε για μία γεωγραφική ετερογένεια λόγω της οποίας έχουμε μία τέτοια σημαντική απόκλιση (16,17,18). Τέλος θα πρέπει να τονιστεί ότι πολλές φορές διαφορετικοί παρατηρητές μερικές φορές προσδιορίζουν από ιστολογικής άποψης διαφορετικά τα είδη των καρκινωμάτων του θυρεοειδούς. Επομένως ένα όχι σίγουρα και καλά χαρακτηρισμένο ιστολογικά θηλώδες καρκίνωμα μέσα στην ομάδα των παθολογικών για θηλώδες καρκίνωμα δειγμάτων, θα μπορούσε να διαφοροποιήσει τα αποτελέσματα.

Συνοψίζοντας, το θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς αδένου αποτελεί την πιο κοινή κακοήθεια του ενδοκρινικού συστήματος (2), πράγμα που κρίνει απαραίτητη την ακριβή διεκκρίση των μοριακών μηχανισμών που συμμετέχουν σε αυτό με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη αξιόπιστων και γρήγορων τεχνικών διάγνωσης με τους κατάλληλους προγνωστικούς δείκτες, στα πλαίσια μίας στοχευόμενης θεραπείας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Schlumberger MJ. Papillary and follicular carcinoma. *N Engl J Med.* 1998;338: 297- 306.
2. Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, et al. A national cancer data base report on 53 856 cases of thyroid carcinoma treated in the US, 1985-1995. *Cancer* 1998;83:2638-2648
3. Cohen Y, Xing M, Mambo E, et al. Braf mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:625-627
4. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:245–262.
5. Ciampi R, Nikiforov YE. Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors. *Endocr Pathol* 2005;16:163–172.
6. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF–ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004;116:855–867.
7. Hou P, Liu D, Xing M. Functional characterization of the T1799–1801del and A1799–1816ins BRAF mutations in papillary thyroid cancer. *Cell Cycle* 2007;6:377–379.
8. Christopher D.M. Fletcher, third edition, vol2,998-1023
9. Yuri E. Nikiforov et al. Thyroid carcinoma: molecular pathways and the teheurapeutic targets. *Modern Pathology* 2008;21, S37-S43
10. Daves H, Graham R.Bignell, Cox C et al.Mutations of the Braf gene in human cancer. *Nature* vol 417,2002
11. Zhang, B. H. & Guan, K. L. Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *EMBO J.* 19 2000;5429–5439 .
12. Busca, R. et al. Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases(ERKs) in melanocytes. *EMBO J.* 19,2000 ; 2900–2910.
13. Ζίφα Α, Διακυτταρική Επικοινωνία Μεταγωγή Σήματος, ;2007286-300
14. Κουρέτας Δ, Τοξικολογία,2007

15. Peyssonnaud, C. & Eyche`ne, A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol. Cell* 2001;93,53–62
16. Avruch, J. A. et al. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog. Horm. Res.*2001; 56, 127–155.
17. Suarez HG, du Villard JA, Caillou B, Schlumberger M, Tubiana M, Parmentier C, et al. Detection of activated ras oncogenes in human thyroid carcinomas. *Oncogene* 1988;2:403–6
18. Namba H, Rubin SA, Fagin JA. Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 1990;4:1474–9.
19. Cohen Y, Rosenbaum E, Clark D.P, Zeiger M et al: Mutational Analysis of Fine Needle Aspiration Biopsies of th Thyroid Nodules *Clinical cancer research* 2004;2761-2765

