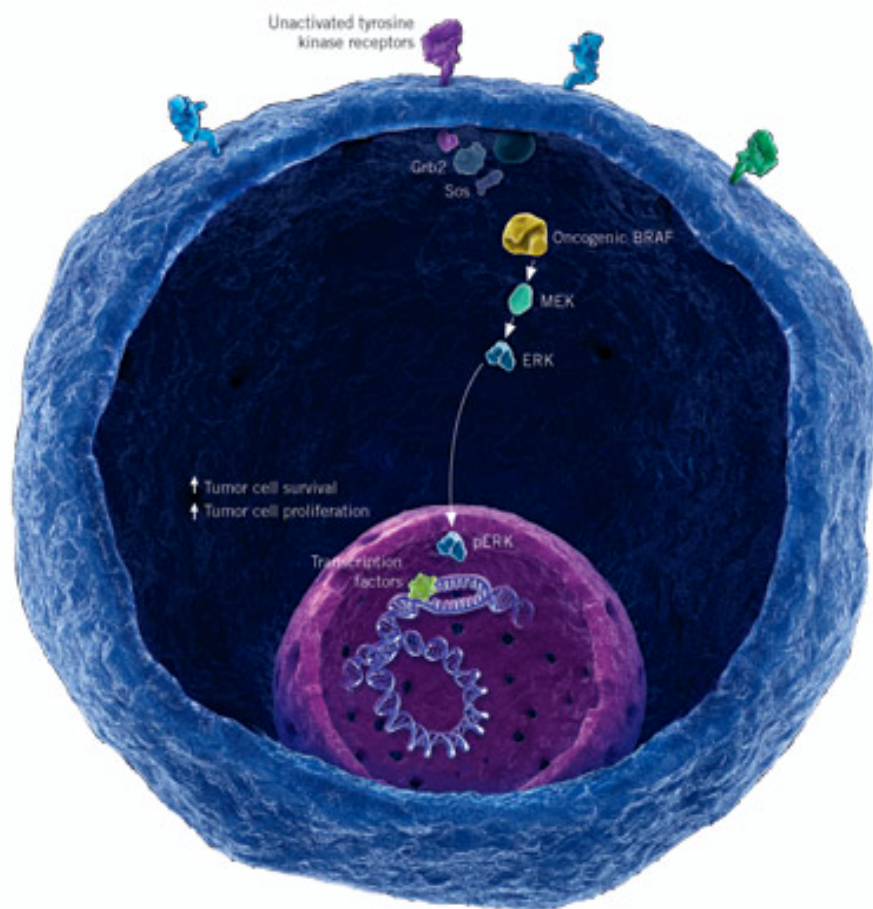


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ
(Διευθυντής: Καθηγητής Δημήτριος Α. Σπαντίδος)

ΣΤΑΥΡΟΣ Π. ΔΕΡΔΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΩΝ RAS
ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ RAF ΣΕ ΚΑΛΟΗΘΗΣ ΚΑΙ
ΚΑΚΟΗΘΗΣ ΟΓΚΟΥΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΗ ΑΔΕΝΑ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*Οι υψηλές θέσεις είναι σαν τα απότομα βράχια: μονάχα οι αετοί και τα ερπετά
μπορούν να φτάσουν στην κορυφή.*

Madame de Staël, 1766-1817
Γαλλίδα διανοούμενη

*.....στον πατέρα μου,
τη Χαρούλα, την Κατερίνα και τον Πέτρο*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική διατριβή μου θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όσους με βοήθησαν στην πραγματοποίησή της και κυρίως τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Δημήτρη Α. Σπαντίδο που η καθοδήγησή του και η ηθική του υποστήριξη αποτέλεσαν τον πιο σημαντικό παράγοντα στην ολοκλήρωσή της. Τον ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω δίπλα του.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη της επταμελούς επιτροπής για το χρόνο που διέθεσαν και τα θετικά τους σχόλια.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Χειρουργικής του Παν/μίου Αθηνών κ. Γεώργιο Σακοράφα για τη βοήθειά του στη συλλογή του υλικού της διατριβής.

Ευχαριστώ ακόμα τον ερευνητή του Πανεπιστημίου Κρήτης Ν. Σουλιτζή για την βοήθεια του στην στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, τα σχόλια του και τις κριτικές του.

Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη του εργαστηρίου Κλινικής Ιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης για τη συνεργασία τους.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου, τον πατέρα μου, τη μητέρα μου, τα αδέρφια μου, τη Χαρούλα, την Κατερίνα τον Πέτρο και τον Αναπληρωτή καθηγητή Γιώργο Σουρβίνο τον οποίο αισθάνομαι ως μέλος της οικογένειάς μου, για την ηθική και πρακτική υποστήριξή τους για να κάνω το όνειρό μου για γνώση πραγματικότητα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα Ras πρωτο-ογκογονίδια (H-Ras, K-Ras και N-Ras) είναι μέρος των ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών που παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη, τη ρύθμιση και τον κακοήγη μετασχηματισμό. Σε αυτή τη μελέτη ερευνήθηκε η παρουσία μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 των H-, K- και N-Ras ογκογονιδίων σε μια σειρά από 32 καλοηθών και κακοηθών όγκων του θυρεοειδούς, συνδυαζόμενα με φυσιολογικό γειτονικό ιστό, με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης PCR και της ανάλυσης πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων RFLP. Επιπροσθέτως, μετρήσαμε τα επίπεδα έκφρασης των τριών γονιδίων Ras χρησιμοποιώντας ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (qPCR) με SYBR Green I® χημεία. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο ελέγχου. Δεν ανιχνεύθηκαν H-Ras μεταλλάξεις στη σειρά των δειγμάτων του θυρεοειδούς. Επιπροσθέτως, το N-Ras μεταλλάχθηκε σε μόνο 1/32 (3,1%) κακοήγη δείγμα. Αντιθέτως, K-Ras μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν σε 10/32 (40,6%) δείγματα όγκων. Η ανάλυση της έκφρασης έδειξε ότι η K-Ras ήταν απορυθμισμένη στο 50% των όγκων του θυρεοειδούς, που παρουσιάζει υπερέκφραση σε 9/32 (28,1%) και υποέκφραση σε 7/32 (21,9%) δείγματα, αντίστοιχα. Ένα παρόμοιο μοτίβο παρατηρήθηκε για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου N-Ras, αφού σε 9/32 (28,1%) δείγματα τα επίπεδα του mRNA ήταν αυξημένα και σε 10/32 (31,3%) τα επίπεδα της έκφρασης ήταν μειωμένα. Ενδιαφέρον είναι, ότι σε 11/32 (34,4%) ζεύγη δειγμάτων το γονίδιο N-Ras δεν εκφράζεται ούτε στην νεοπλαστική ούτε στο δείγμα φυσιολογικού. Αντιθέτως, τα mRNA επίπεδα του γονιδίου H-Ras υποεκφράζεται σε 12/32 (37,5%) και βρέθηκαν αυξημένα σε 5/32 (15,6%) δείγματα, αντίστοιχα. Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι μόνο K-Ras μεταλλάξεις είναι ένα συχνό συμβάν σε κακοήθειες του θυρεοειδούς και ότι και οι τρεις ογκογονίδια Ras αποκλίνουν από το φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης, υποδηλώνοντας ένα σημαντικό ρόλο για αυτή την οικογένεια γονιδίων στην ογκογένεση του θυρεοειδούς.

Το γονίδιο B-Raf, είναι μέλος της οικογένειας Raf κινασών σερίνης / θρεονίνης, είναι ένα ενδιάμεσο μόριο στην μιτογόνο-ενεργοποιημένη πρωτεΐνη (MAP) κινάσης του μονοπατιού, που επάγει εξωκυτταρικά σήματα από την κυτταρική μεμβράνη προς τον πυρήνα μέσω ενός καταρράκτη γεγονότων φωσφορύλιωσης, με στόχο την προώθηση της ανάπτυξης του καρκίνου. Αυτή η οδός συνήθως ενεργοποιείται σε ανθρώπινες νεοπλασιές. Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να διερευνηθεί ο ρόλος του B-Raf στην παθολογία του θυρεοειδή. Ελέγξαμε για την παρουσία των μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 600 (VE) του B-Raf, χρησιμοποιώντας την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης PCR και την ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων RFLP. Σε

όγκους χωρίς μετάλλαξη (32 καλοήθεις και κακοήθεις όγκοι του θυρεοειδούς) και σε γειτονικό φυσιολογικό ιστό τους, μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του B-Raf γονιδίου, χρησιμοποιώντας ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR). Η B-Raf V600E έκφραση σε-αρνητικούς όγκους παρέκκλινε από το φυσιολογικό πρότυπο, δεδομένου ότι υπερεκφράζεται στο 42% των καλοήθων δειγμάτων και υποεκφράζεται στο 54% των κακοήθων δειγμάτων. Η θυρεοειδίτιδα Hashimoto επίσης φάνηκε να παίζει ένα σημαντικό ρόλο, δεδομένου ότι τα καλοήθη δείγματα με θυρεοειδίτιδα Hashimoto είχαν 2,2 φορές υψηλότερη B-Raf έκφρασης από τα δείγματα χωρίς θυρεοειδίτιδα ($1,71 \pm 0,63$ έναντι $0,78 \pm 0,13$). Η στατιστική ανάλυση αποκάλυψε ότι η B-Raf απορρύθμιση αναβάλλει την εκδήλωση της νόσου κατά περισσότερο από 10 χρόνια σε καλοήθεις και κακοήθεις όγκους του θυρεοειδούς. (καλοήθης: $55,6 \pm 3,9$ έναντι $45,3 \pm 3,3$, $p = 0,049$? κακοήθεις: $52,2 \pm 3,5$ έναντι $33,0 \pm 7,9$, $p = 0,020$). Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι στην απουσία της ενεργοποίησης της μετάλλαξης, B-Raf υπερέκφραση ή υποέκφραση είναι ένα προστατευτικό γεγονός, δεδομένου ότι καθυστερεί την ανάπτυξη τόσο των κακοήθων και καλοήθων όγκων του θυρεοειδούς.

ABSTRACT

The Ras p21 proto-oncogenes (H-Ras, K-Ras and N-Ras) are a part of intracellular signalling pathways that play an important role in cell growth, regulation and malignant transformation. In this study we investigated the presence of mutations at codon 12 of H-, K- and N-Ras oncogenes in a series of 32 benign and malignant thyroid tumours matched with normal adjacent tissue, using a PCR-RFLP technique. Additionally, we measured the expression levels of the three Ras genes using a quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) assay with SYBR® Green I chemistry. Beta-actin served as internal control. No H-Ras mutations were detected in our series of thyroid samples. Additionally, N-Ras was mutated in only 1/32 (3.1%) malignant specimen. On the contrary, K-Ras mutations were detected in 10/32 (31.3%) tumor samples. Expression analysis showed that K-Ras was deregulated in 50% of thyroid tumors, exhibiting overexpression in 9/32 (28.1%) and downregulation in 7/32 (21.9%) samples, respectively. A similar pattern was observed for N-Ras expression, since in 9/32 (28.1%) samples its mRNA levels were elevated and in 10/32 (31.3%) were reduced. Interestingly, in 11/32 (34.4%) sample pairs N-Ras was not expressed in neither the neoplastic nor the normal specimen. On the contrary, H-Ras mRNA levels were downregulated in 12/32 (37.5%) and elevated in 5/32 (15.6%) samples, respectively. From the above results we deduce that only K-Ras mutations are a frequent event in thyroid malignancies and that all three Ras oncogenes deviate from the normal expression pattern, suggesting an important role for this gene family in thyroid tumorigenesis.

B-Raf, a member of the Raf serine/threonine kinase family, is an intermediate molecule in the mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway, which relays extracellular signals from the cell membrane to the nucleus via a cascade of phosphorylation events, ultimately promoting cancer development. This pathway is usually activated in human neoplasias. The purpose of this study was to investigate the role of B-Raf in thyroid pathology. We scanned for the presence of mutations at codon 600 (V60E) of the B-Raf gene, using a PCR-RFLP assay. In tumors with no mutation (32 benign and malignant thyroid tumors) and in their adjacent normal tissue, we measured the expression levels of B-Raf gene, using a quantitative Real-Time PCR (qPCR) assay. B-Raf expression in V60E-negative tumors deviated from the normal pattern, since it was overexpressed in 42% of benign samples and downregulated in 54% of malignant specimens. Hashimoto's thyroiditis also seemed to play an important role, since benign specimens with Hashimoto's thyroiditis had a 2.2-fold higher B-Raf expression than samples

without thyroiditis (1.71 ± 0.63 vs. 0.78 ± 0.13). Statistical analysis revealed that B-Raf deregulation postponed disease onset by more than 10 years in both benign and malignant thyroid. (benign: 55.6 ± 3.9 vs. 45.3 ± 3.3 , $p=0.049$; malignant: 52.2 ± 3.5 vs. 33.0 ± 7.9 , $p=0.020$). From the above results we deduce that in the absence of mutation activation, B-Raf overexpression or downregulation is a protective event, since it delays the development of both malignant and benign thyroid tumors.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	I
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	II
SUMMARY	IV
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	VI

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ I. Ο ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑΣ	1
1.1 Ανατομία του θυρεοειδούς αδένος	1
1.2 Θυρεοειδικά νεοπλάσματα	2
1.2.1. Καλοήγη νεοπλάσματα	
1.2.2. Κακοήγη νεοπλάσματα	
1.3 Ταξινόμηση και Σταδιοποίηση	10
1.4 Διαταραχές του θυρεοειδικού μεταβολισμού	12
1.4.1. Καλοήγη θυρεοειδικές παθήσεις	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ II. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΗ	14
2.1 Γενικά	14
2.2 Παράγοντες καρκινογένεσης	17
2.3 Ογκογονίδια	17
2.4 Αυξητικοί και αγγειογενετικοί παράγοντες	19
2.5 Διαμεμβρανικοί υποδοχείς και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες	20
2.6 Μεταγραφικοί παράγοντες	20
2.7 Πολυλειτουργικά ογκογονίδια	20
2.8 Ογκοκατασταλτικά γονίδια	21
2.9 Γονιδιακή θεραπεία	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ III. ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ras	24
3.1 Γενικά	24
3.2 Δομή των γονιδίων ras	24
3.3 Ρύθμιση των ογκογονιδίων ras	25
3.4 Οι πρωτεΐνες Ras	26
3.5 Δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών Ras	27
3.6 Λειτουργία των πρωτεϊνών Ras	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV. ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ raf	31
4.1 Γενικά	31
4.2 Δομή των γονιδίων raf	31
4.3 Δομή των Raf πρωτεϊνών	32
4.4 Τα οογκογονίδια raf	33

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	34
--------------------------------------	----

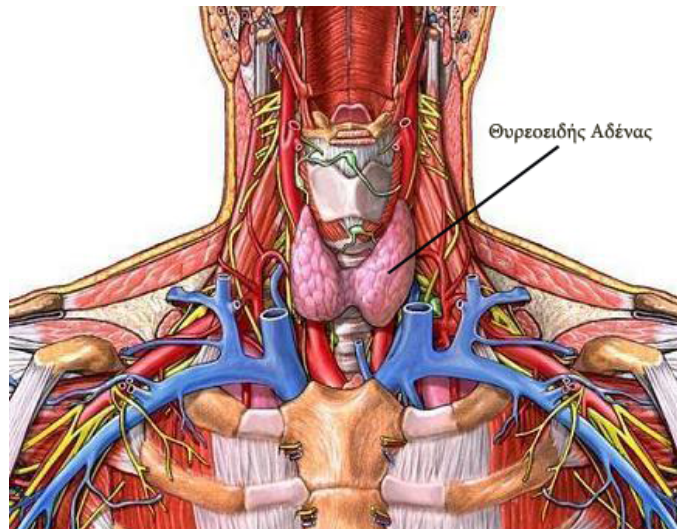
5.1	ΜΕΘΟΔΟΙ	34
5.1.1	Συλλογή Δειγμάτων	34
5.1.2	Εκχύλιση DNA από ιστούς	34
5.1.3	Έλεγχος της ποιότητας του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	34
5.1.4	Εκχύλιση RNA από ιστούς	34
5.1.5	Φωτομέτρηση RNA και DNA	35
5.1.6	Αντίστροφη Μεταγραφή	35
5.1.7	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	35
5.1.8	Συνθήκες αντιδράσεων PCR και εκκινητές	37
5.1.9	Ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων	37
5.1.10	Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης	38
5.1.11	Χρώση νουκλεϊκών οξέων με βρωμιούχο αιθίδιο	38
5.1.12	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)	38
5.1.13	Στατιστική ανάλυση	42
5.2	ΥΛΙΚΑ	42
5.2.1	Διαλύματα	42
5.2.1.1	Διαλύματα απομόνωσης DNA, RNA και πρωτεϊνών	42
5.2.1.2	Ηλεκτροφορητικά διαλύματα	43
5.2.2	Ένζυμα	43
5.2.3	Υλικά και εταιρείες προέλευσης	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		45
6.1	Δείγματα που αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης	45
6.2	Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στα γονίδια <i>ras</i>	45
6.3	Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων <i>ras</i> , σε δείγματα θυρεοειδούς αδένου	46
6.4	Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA του γονιδίου <i>B-Raf</i> , σε δείγματα θυρεοειδούς αδένου	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ		59
7.1	<i>Ras</i>	59
7.2	<i>B-Raf</i>	61
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		65
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ		71

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑΣ

1.1. Ανατομία του Θυρεοειδούς αδένος

Ο θυρεοειδής αδένος προέρχεται από το εμβρυϊκό ενδόδερμα και μεταναστεύει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης στη θέση που έχει στους ενήλικες στη βάση του λαιμού. Ενίοτε συμπληρωματικός θυρεοειδικός ιστός μπορεί να βρεθεί κατά μήκος αυτής της οδού της καθόδου, είτε στη βάση της γλώσσας ή κατά μήκος του θυρεογλωσσικού πόρου. Κατά την 12^η εβδομάδα της κύησης ο θυρεοειδής αδένος είναι μορφολογικά και λειτουργικά ακέραιος και τα θυρεοειδικά επιθηλιακά κύτταρα έχουν σχηματίσει μικρά, ακέραια θυλάκια περιέχοντα κολλοειδές. Ο θυρεοειδής επίσης περιέχει κύτταρα C γνωστά για την έκκριση καλσιτονίνης.



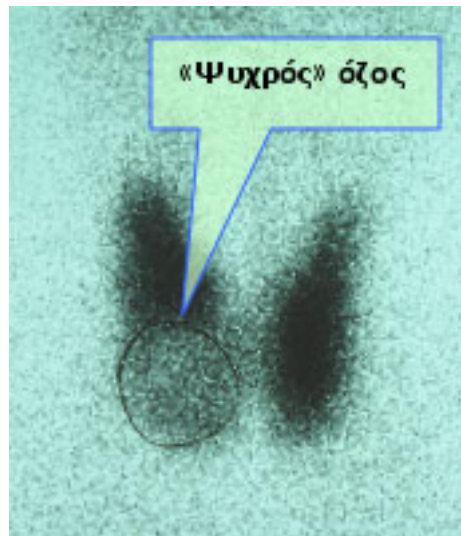
Σχήμα 1.1. Ο φυσιολογικός θυρεοειδής αδένος

Ο φυσιολογικός θυρεοειδής αδένος έχει βάρος περίπου 25 gr και αποτελείται από δύο πλευρικούς λοβούς και έναν ισθμό. Ο ισθμός κείται ακριβώς κάτω από τον κρικοειδή χόνδρο προσθίως της τραχείας και οι πλευρικοί λοβοί επεκτείνονται προς τα άνω μέσα στη σφαγιτιδική αύλακα περίπου 4-5 εκατοστά (Σχήμα 1.1). Εξέταση και ψηλάφηση του θυρεοειδή επιτρέπουν αναγνώριση συμμετρικής ή ασύμμετρης διόγκωσης των πλευρικών λοβών (βρογχοκήλη), ευδιάκριτων οζιδίων, σκληρότητας του θυρεοειδή ή μεταβολές στη σύσταση του φυσιολογικά σαρκώδους αδένος. Πολλές μέθοδοι έχουν προταθεί για τη σωστή ψηλάφηση του θυρεοειδούς, όμως καμιά τεχνική δεν είναι ανώτερη κάποιας άλλης και ο κάθε εξεταστής θα πρέπει να εφαρμόζει την προσπέλαση που τον διευκολύνει καλύτερα σε κάθε περίπτωση.

1.2. ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΑ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ

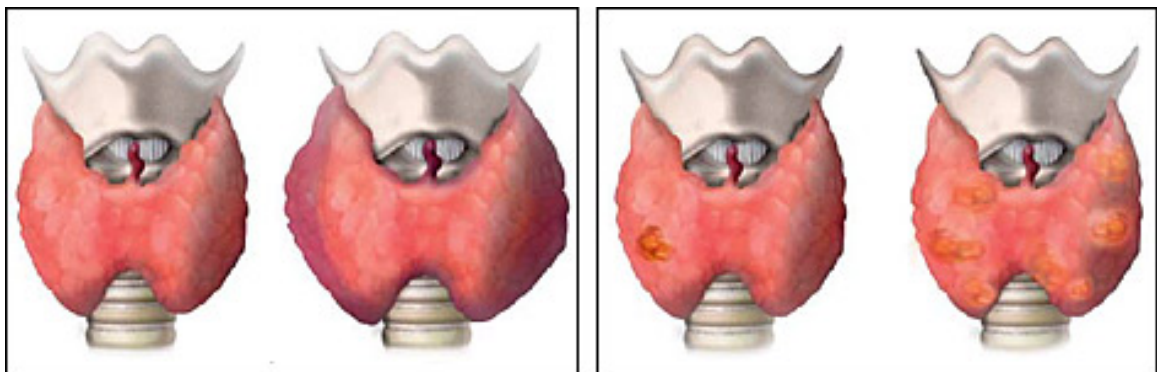
1.2.1. Καλοήγη νεοπλάσματα

Τα καλοήγη νεοπλάσματα του θυρεοειδούς ταξινομούνται ως αδενώματα. Τα περισσότερα αδενώματα φαίνονται σαν μη λειτουργικά (ψυχρός όζος) στο σπινθηρογράφημα του θυρεοειδούς (Σχήμα 1.2), αν και ενίοτε μπορεί να παρουσιάζουν φυσιολογική λειτουργία (αδιαφοροποίητος όζος) ή υπερλειτουργία (θερμός όζος) και επομένως να καταστέλλουν τον εναπομείναντα θυρεοειδικό ιστό προκαλώντας θυρεοτοξίκωση.



Σχήμα 1.2. Το σπινθηρογράφημα γίνεται με την χορήγηση ραδιενεργού ιωδίου, που προσλαμβάνεται από τον αδένα. Ανάλογα με τον βαθμό πρόσληψης, οι όζοι χωρίζονται σε **ψυχρούς** και **θερμούς**. Δεν μπορεί να μας διαχωρίσει εάν ένας όζος είναι καλοήγητος ή κακοήγητος αλλά μπορεί να μας δώσει την πληροφορία εάν ο όζος έχει αυξημένες πιθανότητες να έχει κακοήθεια. Είναι γνωστό ότι το 21% περίπου των ψυχρών είναι κακοήγητοι και αυτοί που δεν είναι ακόμα, έχουν μεγάλη πιθανότητα να γίνουν.

Σημαντική διαγνωστική πρόκληση για τον θεράποντα ιατρό αποτελεί η διαφοροδιάγνωση των θυρεοειδικών αδενωμάτων από τον θυλακιοδη καρκίνο του θυρεοειδούς. Το ιστορικό και η φυσική εξέταση παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες, αλλά όχι απόλυτες, για να βγει το συμπέρασμα εάν ή όχι ένας όζος είναι κακοήγητος.

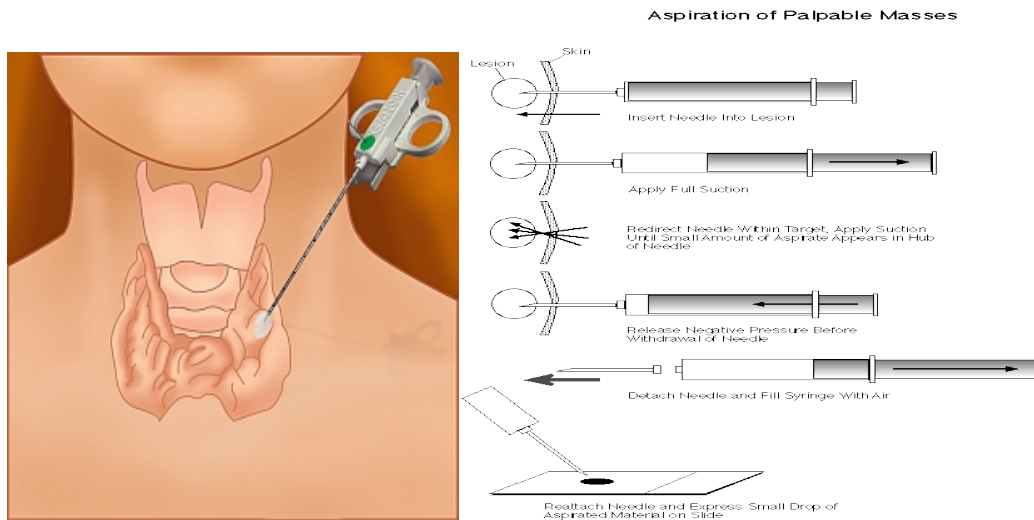


Σχήμα 1.3. Οι μορφολογικές παθήσεις: αφορούν στην αλλαγή της μορφής του θυρεοειδούς αδένα τόσο σε σχήμα όσο και σε μέγεθος, χωρίς να επηρεαστεί συνήθως η λειτουργία του. Η μορφή του αδένα μπορεί αν αλλάξει είτε από διόγκωση

του ίδιου του αδένου (διάχυτη βρογχοκήλη) είτε από την ανάπτυξη ενός όζου (μονήρης όζος) ή πολλαπλών όζων (πολυοζώδης βρογχοκήλη)

Το Σχήμα 1.3, παρουσιάζει ένα προτεινόμενο σχήμα για τη διαφοροποίηση των καλοήθων από τους κακοήθεις όζους. Ορισμένοι παράγοντες ενισχύουν την κλινική υποψία για κακοήθεια. Ιστορικό ακτινοβολίας του κρανίου, αυχένα ή του ημιθωρακίου κατά την παιδική ηλικία είναι ίσως το ένα και πιά σημαντικό εύρημα του ιστορικού. Οι όζοι που αναπτύσσονται σε νέους (<20 ετών) ή γηραιότερους ασθενείς (>60 ετών) ή σε άνδρες (οποιασδήποτε ηλικίας) είναι πιο πιθανό να είναι κακοήθειες. Η ταχεία ανάπτυξη του όζου, η σύμπτυξη με υποκείμενους ιστούς του αυχένα, η σκληρή πετρώδη υφή του και η λεμφαδενοπάθεια υπαινίσσονται θυρεοειδικό καρκίνο. Ενίοτε ασθενείς με διαγνωσμένο καρκίνο μπορεί να έχουν πρόσθια αυχενική αδενοπάθεια με απουσία ψηλαφητού θυρεοειδικού όζου. Το οικογενειακό ιστορικό δεν βοηθά, εκτός περιπτώσεων μυελώδους θυρεοειδικού καρκίνου παρουσιαζόμενου σαν μέρος του συνδρόμου της πολλαπλής ενδοκρινικής νεοπλασίας των τύπων 2A και 2B (MEN, multiple endocrine neoplasia).

Οι παραδοσιακές εργαστηριακές εξετάσεις που γίνονται για το θυρεοειδικό όζο δεν μπορούν να ξεχωρίσουν τις καλοήθειες από τις κακοήθειες βλάβες. Ένας κακοήθης θυρεοειδικός όζος είναι σχεδόν πάντα ψυχρός στο σπινθηρογράφημα και τα περισσότερα αδενώματα είναι ψυχροί όζοι. Εντούτοις, ένας όζος που είναι σαφώς λειτουργικός (θερμός) είναι σπάνια καρκίνος. Για το λόγο αυτό, το σπινθηρογράφημα έχει ένα επιλεκτικό ρόλο στις διαγνωστικές εξετάσεις. Το υπερηχογράφημα προσφέρει καλή πληροφορία για το μέγεθος και τα κυστικά στοιχεία αλλά δεν μπορεί να διαγνώσει σίγουρα μια κακοήθεια και δεν θα έπρεπε να χρησιμοποιείται στη ρουτίνα.



Σχήμα 1.4. Η βιοψία θυρεοειδή με λεπτή βελόνη

Η βιοψία θυρεοειδή με λεπτή βελόνη (FNA, fine needle aspiration) είναι η πιο αξιόπιστη και χρήσιμη διαγνωστική τεχνική για το συμπέρασμα εάν ένας όζος είναι καλοήθης ή κακοήθης. Η FNA έχει άριστη ευαισθησία και εξειδίκευση, επομένως μειώνει σημαντικά την αδιάκριτη αφαίρεση όλων των θυρεοειδικών όζων. Υπάρχει πολύ μικρή πιθανότητα ψευδώς καλοήθων όζων μετά από FNA βιοψία (<1-5%). Η FNA επίσης βοηθά στη διάκριση συμπαγών από κυστικούς όζους. Όταν η FNA αποκαλύψει μία κύστη, το υγρό της θα πρέπει να εξεταστεί

κυτταρολογικά, γιατί ένα μικρό ποσοστό κύστεων συνδέονται με θυρεοειδικό καρκίνο. Δυστυχώς, η τεχνική δεν ξεχωρίζει θυλακιώδη αδενώματα από θυλακιώδη καρκινώματα γιατί η διάγνωση του θυλακιώδους καρκινώματος βασίζεται κυρίως σε διήθηση της κάψας ή των αγγείων, που δεν μπορούν να διακριθούν σε μια κυτταρολογική εξέταση από FNA. Ευρήματα βιοψίας όζων που ερμηνεύονται ως κακοήθη πρέπει να αφαιρούνται χειρουργικά. Αποτελέσματα βιοψίας όπως «υποψία καρκινώματος», άτυπα κύτταρα ή αδιευκρίνιστα, παρουσιάζουν ένα περαιτέρω πρόβλημα. Ο όζος μπορεί να αξιολογηθεί με σπινθηρογράφημα ραδιενεργού ιωδίου και οι λειτουργικοί όζοι να παρακολουθούνται συν τω χρόνω ή, αν είναι ψυχροί, να αφαιρούνται.

1.2.2. Κακοήθη νεοπλάσματα

Ο θυρεοειδικός καρκίνος είναι ο πιο συχνός ενδοκρινικός καρκίνος. Εντούτοις, μέσα σ' όλους τους τύπους καρκίνου στο γενικό πληθυσμό είναι ευδιάκριτα ασυνήθης. Υπάρχουν περί τις 10.000-12.000 νέες περιπτώσεις και 1.100 θάνατοι ετησίως στις Η.Π.Α. Σε λανθάνουσα μορφή ο θυρεοειδικός καρκίνος είναι πολύ πιο συχνός διότι μελέτες αυτοψίας ρουτίνας δείχνουν ότι ποσοστό 5-20% φυσιολογικών θυρεοειδικών αδένων μπορεί να έχουν εστίες καρκινικού θυρεοειδικού ιστού, η κλινική σημασία των οποίων δεν είναι ακόμη ξεκάθαρη. Ο γενικός όρος «θυρεοειδικός καρκίνος» συμπεριλαμβάνει διάφορους τύπους καρκίνου από καλά διαφοροποιημένους, βραδέως αναπτυσσόμενους όγκους πολύ καλής προγνώσεως μέχρι επιθετικούς δύσκολα διαφοροποιημένους καρκίνους με κακή πρόγνωση. Τα δεδομένα ότι ο θυρεοειδικός καρκίνος αντιπροσωπεύει ποσοστό <1% των θανάτων από καρκίνο και <10% των ασθενών με θυρεοειδικό καρκίνο πεθαίνουν από την ασθένεια, έχουν προωθήσει τη φήμη πως ο καρκίνος του θυρεοειδή είναι αντιστοίχως καλοήθης νεοπλασία.

Οι διάφοροι τύποι των πρωτοπαθών θυρεοειδικών καρκίνων αναφέρονται στον πίνακα 1. Τρεις τύποι προέρχονται από θυλακιώδες επιθήλιο : θηλώδεις, θηλακιώδης και αναπλαστικός. Οι άλλοι πρωτοπαθείς καρκίνοι του θυρεοειδούς είναι το θυρεοειδικό λέμφωμα και το μυελώδες καρκίνωμα. Το τελευταίο προέρχεται από τα παραθυλακιώδη ή C κύτταρα και έχει χαρακτηριστικές βιοχημικές εκδηλώσεις.

πίνακας 1: Τύποι πρωτοπαθούς θυρεοειδικού καρκινώματος
Θηλώδεις
Θυλακιώδεις
Αναπλαστικό
Μυελοειδεις
Λέμφωμα

1.2.2.1. Θηλώδεις καρκίνωμα

Το θηλώδες καρκίνωμα είναι το πιο συχνό από τους πρωτοπαθείς θυρεοειδικούς καρκίνους και αντιπροσωπεύει το 60-70% όλων των θυρεοειδικών καρκίνων των ενηλίκων. Είναι συχνότερο

στις γυναίκες απ' ότι στους άνδρες (2:1 έως 3:1), έχει μια αύξηση στην Τρίτη και τέταρτη δεκαετία της ζωής, μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία και είναι πιο επιθετικό σε γηραιότερους ασθενείς. Οι περισσότεροι ασθενείς έχουν μια ασυμπτωματική μάζα στον τράχηλο ενίοτε υπάρχουν διάφοροι ψηλαφιτοί όζοι και στο 1/3 περίπου των ασθενών υπάρχουν τραχηλικοί λεμφαδένες. Οι ασθενείς με θηλώδες καρκίνωμα μπορεί να έχουν ιστορικό ακτινοβολίας κρανίου, του τραχήλου ή του άνω ημιθωρακίου κατά την παιδική ηλικία.

Το θηλώδες καρκίνωμα είναι ο πιο βραδέως εξελισσόμενος θυρεοειδικός καρκίνος. Ο όγκος δεν περιβάλλεται από κάψακα και μπορεί να διαχέεται στον περιβάλλοντα ιστό, επεκτεινόμενος στους τραχηλικούς λεμφαδένες. Στο 5% των ασθενών μια τραχηλική μετάσταση (επίσημα γνωστή ως ετερόπλευρος ψευδοθυρεοειδής) μπορεί να είναι το κύριο εύρημα και ο θυρεοειδής αδένας μπορεί να είναι μόνο μια μικροσκοπική εστία μυελώδους καρκίνου. Αγγειακή διήθηση είναι σπάνια. Απομακρυσμένες μεταστάσεις υπάρχουν στο 10% των ενηλίκων και είναι συχνότερες στους πνεύμονες στα οστά και στον εγκέφαλο.

Ο όγκος παρουσιάζει μια χαρακτηριστική ιστοπαθολογική εικόνα συνιστάμενη από κυλινδρικό επιθήλιο, θηλώδεις προεκτάσεις (θάλλους) και διάσπαρτες συγκεντρικά τοποθετημένες εναποθέσεις ασβεστίου που ονομάζονται ψαμμώδη σωματίδια. Οι περισσότεροι όγκοι είναι μίγμα θηλωδών και θυλακιωδών καρκινικών στοιχείων. Αυτό το χαρακτηριστικό έχει σοβαρές θεραπευτικές επιπλοκές, διότι ο θυλακιώδης ιστός του όγκου συγκεντρώνει ραδιενεργό ιώδιο, ενώ ο θηλώδεις όχι.

Διάφοροι παράγοντες συνεργούν στην κακή πρόγνωση των ασθενών με θηλώδες καρκίνωμα, συμπεριλαμβανομένων της ηλικίας >50 ετών, του φύλου (ανδρικό), της τοπικής καρκινικής εξάπλωσης κατά την διάρκεια της επέμβασης και της παρουσίας απομακρυσμένης μετάστασης. Αντίθετα απ' ότι συμβαίνει σε πρωτοπαθείς καρκίνους άλλων οργάνων, η παρουσία τοπικής λεμφαδενικής μετάστασης δεν επηρεάζει δυσμενώς την πρόγνωση. Το γενικό ποσοστό θνησιμότητας στα θηλώδη καρκινώματα είναι αρκετά χαμηλό: ποσοστό επιβίωσης $\geq 90\%$ σε ηλικίες 20 ή 30 ετών είναι ο κανόνας που επηρεάζεται από τους παράγοντες επικινδυνότητας που αναφέρθηκαν. Η αιτία θανάτου που προέρχεται από αυτό τον όγκο είναι συνήθως τοπική εξάπλωση του όγκου συμπεριλαμβάνοντας την τραχεία και/ή τον οισοφάγο. Σε μερικούς ασθενείς ο όγκος υφίσταται αναπλαστική μετατροπή και γίνεται πιο επιθετικός με διάσπαρτες μεταστάσεις.

1.2.2.2. Θυλακιώδες καρκίνωμα

Το θυλακιώδες καρκίνωμα είναι ένας πρωτοπαθής θυρεοειδικός καρκίνος και αντιπροσωπεύει το 165% περίπου όλων των θυρεοειδικών καρκίνων. Είναι συνηθέστερος στις γυναίκες απ' ότι στους άνδρες (2:1 έως 3:1) και πιο συχνός σε ασθενείς >40 ετών. Πολλοί από τους ασθενείς έχουν ιστορικό ακτινοβολίας στο κρανίο, στον αυχένα ή στο άνω ημιθωράκιο. Υπάρχουν αρκετές σημαντικές διαφορές μεταξύ καλά διαφοροποιημένων θυλακιωδών και θηλωδών καρκινωμάτων. Τα θυλακιώδη καρκινώματα περιβάλλονται από κάψα και συνήθως μεθίστανται με αιματογενή διασπορά και σπάνια στους λεμφαδένες της περιοχής. Οι ασθενείς με θυλακιώδη

καρκίνο έχουν την τάση να έχουν μικρότερους θυρεοειδικούς όγκους και μπορεί να έχουν απομακρυσμένη μετάσταση. Μετάσταση στα οστά μπορεί να εμφανιστεί νωρίς, είναι πολύ καταστροφική και απαντά ελάχιστα στη θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο. Άλλα συχνά σημεία απομακρυσμένης μετάστασης είναι το ήπαρ και οι πνεύμονες. Ο ιστός του θυλακιώδους όγκου έχει την ικανότητα να συγκεντρώνει ραδιενεργό ή πολυοζώδη βρογχοκήλη. Έχει μια αύξηση στην 6^η και 7^η ιώδιο, αν και λιγότερο αποτελεσματικά απ' ότι ο φυσιολογικός θυρεοειδικός ιστός και να συνθέτει θυρεοειδική ορμόνη σε μικρότερα ποσά. Γι' αυτό διάσπαρτο μεταστατικό θυλακιώδες καρκίνωμα σημαντικής μάζας μπορεί ενίοτε να παράγει αρκετή θυρεοειδική ορμόνη η οποία να προάγει θυρεοτοξίκωση και μάλιστα πιο συχνά T3 τοξίκωση.

Το θυλακιώδες καρκίνωμα, όπως και το θηλώδες, είναι ένας βραδέως αναπτυσσόμενος καρκίνος. Εντούτοις, το θυλακιώδες καρκίνωμα έχει λιγότερο ευνοϊκή πρόγνωση. Την πρόγνωση επηρεάζουν η ηλικία του ασθενούς και ο βαθμός διήθησης της κάψας και των αγγείων. Στην περίπτωση μικρού βαθμού εξάπλωσης η 10ετής επιβίωση κυμαίνεται στο 85-90%. Με μεγαλύτερη εξάπλωση η 10ετής επιβίωση βρίσκεται περίπου στο 50%.

Μια σπάνια ποικιλία του θυλακιώδους καρκινώματος είναι το καρκίνωμα του κυττάρου Hurthle. Αυτός ο όγκος χαρακτηρίζεται από αυξημένα ποσά οξεόφιλου κυτταροπλάσματος, το οποίο σε ηλεκτρονική μικροσκοπία φαίνεται να περιέχει αφθονία μιτοχονδρίων. Και αυτοί οι όγκοι μπορεί να παρουσιάζουν ευρεία μετάσταση. Εντούτοις, σε αντίθεση με το θυλακιώδες καρκίνωμα, σπάνια προσλαμβάνουν ραδιενεργό ιώδιο.

1.2.2.3. Αναπλαστικό καρκίνωμα

Το 5% των θυρεοειδικών καρκίνων αποτελεί το αναπλαστικό καρκίνωμα. Είναι λίγο συχνότεροι στις γυναίκες απ' ότι στους άνδρες και μπορεί να προέρχεται από προϋπάρχον θηλώδες καρκίνωμα ή πολυοζώδη βρογχοκήλη. Έχει μια αύξηση στην 6^η και 7^η δεκαετία της ζωής, αν και έχει εμφανιστεί και σε άτομα <40 ετών έως και μερικά παιδιά. Η κλινική εικόνα είναι συνήθως αυτή της ταχέως αυξανόμενης θυρεοειδικής μάζας που μπορεί να συνδέεται με δυσφαγία, βραχνάδα, αιμόπτυση και αναπνευστικά προβλήματα. Η μάζα αυτή είναι σκληρή έως σανιδώτης στην ψηλάφηση και είναι ακινητοποιημένη στους περιβάλλοντες ιστούς. Αυτή η επιθετική κλινική εικόνα πρέπει να διαχωριστεί από αυτή του θυρεοειδικού λεμφώματος (συζητείται παρακάτω), που είναι περαπέυσιμο και γενικά έχει ευνοϊκότερη πρόγνωση. Οι περισσότεροι ασθενείς με αναπλαστικό καρκίνωμα πεθαίνουν εντός μηνών αφ' ότου έχει διαγνωστεί και λίγοι επιζούν για ένα χρόνο.

Η ιστοπαθολογική εξέταση μετά από FNA παρουσιάζει ατρακτοειδή και πολυπύρνα γιγαντιαία κύτταρα με πολλές μιτώσεις. Είναι έντονες σε περιοχές νέκρωσης και φλεγμονής. Νησίδια θηλώδους και/ή θυλακιώδους καρκινώματος μπορεί να υπάρχουν υποστηρίζοντας την ιδέα ενός προϋπάρχοντος ρόλου αυτών των καρκίνων σε μερικές περιπτώσεις. Η θεραπεία είναι ανακουφιστική. Η εγχείρηση χρειάζεται για ν' ανακουφιστεί η τραχεία και ο οισοφάγος. Η χημειοθεραπεία και η θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο είναι συνήθως μη δραστικές. Η ακτινοθεραπεία μπορεί σε μερικές περιπτώσεις να επιβραδύνει την εξέλιξη της νόσου.

1.2.2.4. Λέμφωμα

Το θυρεοειδικό λέμφωμα αποτελεί μόνο ένα μικρό ποσοστό των περιπτώσεων του θυρεοειδικού καρκίνου. Είναι συχνότερο στις γυναίκες απ' ό τι στους άνδρες (3:1) και έχει μια συχνότερη εμφάνιση κατά την 7^η ή 8^η δεκαετία της ζωής όμως μπορεί να συναντηθεί και νωρίτερα όπως στη 3^η δεκαετία. Είναι συνήθως μια ταχέως μεγεθυνόμενη μάζα στο θυρεοειδή συνδεδεμένη με πόνο και ευαισθησία διαφόρων βαθμών. Μπορεί να υπάρξουν βραχνάδα και αναπνευστικά προβλήματα. Ο όγκος είναι πολύ συμπαγής έως πετρώδης κατά την ψηλάφηση.

Το ιστοπαθολογικά ευρήματα συχνότατα συμφωνούν με το διάχυτο ιστιοκυτταρικό λέμφωμα. Είναι πολύ σημαντικό ότι σχεδόν πάντα υπάρχουν ιστολογικές ενδείξεις για θυρεοειδίτιδα Hashimoto και πολλοί ασθενείς είναι υποθυρεοειδικοί. Οι περισσότεροι ασθενείς με λέμφωμα έχουν χαρακτηριστικά αυξημένα επίπεδα θυρεοειδικών αντιμικροσωματικών και αντιθυρεοσφαιρινικών αντισωμάτων. Η σχέση της θυρεοειδίτιδας Hashimoto και του θυρεοειδικού λεμφώματος φαίνεται να είναι κάτι περισσότερο από συμπτωματική. Αν και ο πραγματικός αριθμός περιπτώσεων θυρεοειδικών λεμφωμάτων που αναπτύσσονται σε ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto είναι μικρός, ο κίνδυνος για ανάπτυξη θυρεοειδικού λεμφώματος είναι υψηλότερος σε ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto, όπως είναι ο κίνδυνος ανάπτυξης άλλων λεμφοβλαστικών ή μυελοβλαστικών συνδρόμων.

Η πρόγνωση είναι καλύτερη όταν η διάγνωση γίνει νωρίς. Όταν το λέμφωμα περιορίζεται στο θυρεοειδή η πενταετής επιβίωση κυμαίνεται από 75-85%. Σε επέκταση στον τράχηλο η πενταετής επιβίωση κυμαίνεται στο 35-40% και σε ευρέως διασπαρμένο λέμφωμα η πενταετής επιβίωση βρίσκεται στο 5% περίπου. Ασθενείς <65 ετών και σε άνδρες έχουν σημαντικά μεγαλύτερα όρια επιβίωσης.

Η θεραπεία του θυρεοειδικού λεμφώματος συνήθως συνίσταται σε ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία μόνες τους ή σε συνδιασμό. Η εγχείρηση γίνεται μόνο αν χρειάζεται ανακούφιση η τραχεία ή ενίοτε για πιο διάσπαρτη ασθένεια.

1.2.2.5. Μυελοειδές καρκίνωμα

Σχεδόν το 5-10% όλων των νέων περιπτώσεων θυρεοειδικού καρκίνου είναι μυελοειδή καρκινώματα. Ο όγκος προέρχεται από τα C κύτταρα που παράγουν την πολυπεπτιδική ορμόνη καλσιτονίνη. Είναι ελαφρώς πιο συχνό στις γυναίκες απ' ό τι στους άνδρες με μια έξαρση κατά την πέμπτη και έκτη δεκαετία της ζωής. Υπάρχουν τρεις μπρφές μυελοειδών καρκινωμάτων: η σποραδική, εκείνη που συνδέεται με πολλαπλή ενδοκρινική νεοπλασία (Multiple endocrine neoplasia, MEN), τύπος 2^A (σύνδρομο του Sipple) και αυτή που συνδέεται με MEN τύπος 2B. Οι ασθενείς συνήθως έχουν μια θυρεοειδική μάζα που είναι ψυχρή στο σπινθηρογράφημα. Όταν συνδέεται με MEN τύπο 2^A μπορεί να υπάρχει ιστορικό φαιοχρωμοκυττώματος ή υπερπαραθυρεοειδισμού. Όταν συνδέεται με τύπο 2B μπορεί να υπάρχει ιστορικό φαιοχρωμοκυττώματος και κλινική εικόνα με μαρφανοειδή χαρακτηριστικά και διάχυτου γαγγλιονευρώματος πιο εμφανούς στην γλώσσα.

Η σποραδική μορφή είναι συχνότερη (4:1), εμφανίζεται σε μεγαλύτερες ηλικίες (>40) και είναι συνήθως μονόπλευρη. Ο οικογενής τύπος είναι κληρονομούμενος με το αυτόσωμο επικρατούντα

χαρακτήρα, είναι συνήθως αμφιπλευρος και παρουσιάζεται σε νεότερες ηλικίες. Την πιο καλή πρόγνωση έχει το μυελοειδές καρκίνωμα που συνδέεται με MEN2A και τη χειρότερη αυτό που συνδέεται με MEN 2B. Η πρόγνωση για τη σποραδική μορφή είναι επιφυλακτική. Η πρόγνωση της νόσου συνδέεται ευθέως με το ποσό της καλσιτονίνης του όγκου μετρημένης με ανοσοϊστοχημική μέθοδο. Το μυελοειδές καρκίνωμα μεθίσταται μέσω λεμφαγγείων στους λεμφαδένες, στον τράχηλο και στο μεσοθωράκιο. Συχνά επίσης παρουσιάζει μεταστάσεις απομακρυσμένες ως επί το πλείστον στους πνεύμονες, στα οστά και στο ήπαρ.

Το μυελοειδικό καρκίνωμα έχει προσδιορισίμους βιοχημικούς δείκτες και μπορεί να συνδέεται με διάφορα παρανεοπλαστικά σύνδρομα. Ο βιολογικός δείκτης αυτού του όγκου είναι η καλσιτονίνη και αυτή είναι αυξημένη σαν βασική τιμή ή μετά απο διέγερση με πενταγαστρίνη ή έγχυση ασβεστίου στις περισσότερες περιπτώσεις. Το επίπεδο της καλσιτονίνης είναι ο μοναδικός δείκτης για την ανίχνευση αρχικών σταδίων μυελοειδούς καρκίνου σε ασθενείς που έχουν τις οικογενείς μορφές διότι η βασική και/ή η διεγερθείσα τιμή της καλσιτονίνης είναι αυξημένη όταν υπάρχει υπερπλασία των C κυττάρων, η οποία προηγείται του μυελοειδικού καρκινώματος. Το επίπεδο καλσιτονίνης στον ορό είναι το πιο χρήσιμο εργαλείο για την ανίχνευση ύπαρξης υπολειπόμενου καρκινικού ιστού μετά την εγχείρηση. Το μυελοειδές θυρεοειδικό καρκίνωμα συνδέεται επίσης με το κλασικό σύνδρομο Cushing ή με καρκινοειδές σύνδρομο οφειλόμενο στην έκτοπη παραγωγή ACTH ή σεροτονίνης απο τον όγκο. Η έκτοπη παραγωγή προσταγλανδινών, κινινών και αγγεοδραστικών εντερικών πεπτιδίων προκαλεί υδαρή διάρροια σε μερικούς ασθενείς. Ο όγκος παράγει επίσης ισταμινάση, που είναι χρήσιμος δείκτης για μεταστατική νόσο και το καρκινοεμβρυονικό αντιγόνοένας ακόμη καρκινικός δείκτης.

Η διάγνωση του μυελοειδούς καρκινώματος γίνεται συνήθως με τον προσδιορισμό της βασικής τιμής ή/και της μετά απο διέγερση καλσιτονίνης. Στους οικογενείς τύπους είναι απαραίτητη μια διαγνωστική διερεύνηση για φαιοχρωμοκύττωμα πριν την επέμβαση. Στους ασθενείς με MEN τύπου 2^A θα πρέπει να γίνονται προσδιορισμοί του ασβεστίου του ορού και των επιπέδων της παραθυρεοειδικής ορμόνης. Η ιστολογική διάγνωση γίνεται με παρακέντηση με βελόνα μεγάλης διαμέτρου ή ανοιχτή βιοψία κατά την διάρκεια της επέμβασης. Ο όγκος συνίσταται απο μεγάλες αθροίσεις κυττάρων C, επιθηλιακά κύτταρα, ινώδη ιστό και αποθέσεις αμυλοειδούς. Οι εναποθέσεις αλάτων ασβεστίου είναι υπεύθυνες για την ανέρευση πυκνών ομοιογενών αποτιτανώσεων ή μεταστατικού όγκου. Η θεραπεία του μυελοειδούς καρκινώματος του θυρεοειδούς συνίσταται σε θυρεοειδεκτομή με λεμφαδενικό καθαρισμό των κεντρικών τραχηλικών λεμφαδένων. Γίνεται δειγματοληψία απο τους πλευρικούς αυχενικούς λεμφαδένες και αν το αποτέλεσμα είναι θετικό, εκτελείται λεμφαδενεκτομή. Οι λεμφαδένες που φαίνονται φυσιολογικοί δεν αφαιρούνται συνήθως. Αναποτελεσματικές γενικά μέθοδοι είναι η ακτινοθεραπεία, η θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο και η χημειοθεραπεία. Στους οικογενείς τύπους ο προσδιορισμός της βασικής καλσιτονίνης και της μετά από διέγερση καλσιτονίνης είναι στοιχειώδης για την ανίχνευση της προϋπαρχούσης του μυελοειδούς καρκινώματος, υπερπλασίας των C κυττάρων, διότι η θυρεοειδεκτομή σ' αυτό το στάδιο είναι θεραπευτική. Στους παράγοντες επικινδυνότητας συνδεόμενους με κακή πρόγνωση

συμπεριλαμβάνονται το ανδρικό φύλο, η προσβολή λεμφαδένων, η επέκταση εκτός θυρεοειδούς και η σύνδεση με MEN τύπο 2B. Πέντε έως δέκα χρόνια επιβίωσης έχουν ποσοστό 67-80%, δεν είναι ασύνηθες στις διάφορες ανακοινούμενες σειρές σποραδικών όγκων και όγκων συνδεόμενων με MEN τύπο 2^A.

1.3. Ταξινόμηση και Σταδιοποίηση

Μετά την ιστολογική διάγνωση, η οποία γίνεται με την λήψη βιοψιακού υλικού, ακολουθεί η σταδιοποίηση της νόσου με στόχο την εκτίμηση της έκτασής της. Η σταδιοποίηση πραγματοποιείται με βάση το το σύστημα TNM των επιτροπών της UICC (**Διεθνής Ένωση κατά του Καρκίνου**) και είναι ιδιαίτερα σημαντική τόσο στην πρόγνωση όσο και στον καθορισμό της θεραπευτικής αγωγής.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ TNM ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ	
Πρωτοπαθής εστία (T)	
Tx	Η πρωτοπαθής εστία δεν μπορεί να εκτιμηθεί
To	Δεν ανευρίσκεται πρωτοπαθής εστία
T1	≤ 2 cm που περιορίζεται στον θυρεοειδή αδένα
	T1a ≤ 1 cm
	T1b > 1 cm αλλά ≤ 2 cm
T2	> 2 cm αλλά ≤ 4cm, που περιορίζεται στον θυρεοειδή αδένα
T3	> 4 cm που περιορίζεται στον θυρεοειδή αδένα ή οποιοσδήποτε όγκος με μικρή εξωθυρεοειδική εκτόπιση (επέκταση στον στερνοθυρεοειδή μυ ή στον περιθυρεοειδικό λιπώδη ιστό)
T4	
	T4a Προχωρημένη νόσος, όγκος ανεξαρτήτως μεγέθους που επεκτείνεται στο υποδόριο λίπος ή διηθεί τραχεία, λάρυγγα, οισοφάγο ή το παλίνδρομο λαρυγγικό νεύρο
	T4b Πολύ προχωρημένη νόσος, όγκος που διηθεί την προσπονδυλική περιτονία ή περικλείει την καρωτίδα ή αγγεία του μεσοθωρακίου
* Όλα τα αναπλαστικά καρκινώματα ταξινομούνται ως T4.	
T4a	Όλα τα αναπλαστικά καρκινώματα που περιορίζονται στον θυρεοειδή αδένα
T4b	Όλα τα αναπλαστικά καρκινώματα με εξωθυρεοειδική επέκταση
Περιοχικοί λεμφαδένες (N)	
Nx	Η ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων δεν μπορεί να εκτιμηθεί
No	Δεν υπάρχουν λεμφαδενικές μεταστάσεις
N1	Ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων
	N1a Μεταστάσεις σε λεμφαδένες του κεντρικού τραχηλικού διαμερίσματος
	N1b Μεταστάσεις σε λεμφαδένες του ομότιμου ή αντίπλευρου πλάγιου τραχηλικού διαμερίσματος ή σε λεμφαδένες του μεσοθωρακίου
Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M)	
Mo	Μη ανεύρεση απομακρυσμένων μεταστάσεων
M1	Ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων

Πίνακας 1.1. Ταξινόμηση TNM για τον καρκίνο του θυρεοειδούς

ΣΤΑΔΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ			
ΘΗΛΩΔΕΣ ή ΘΥΛΑΚΙΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ			
Ηλικίες < 45 ετών			
Στάδιο	T	N	M
I	κάθε T	κάθε N	Mo
II	κάθε T	κάθε N	M1
Ηλικίες ≥ 45 ετών			
Στάδιο	T	N	M
I	T1	No	Mo
II	T2	No	Mo
III	T3	No	Mo
IVA	T1-3	N1a	Mo
	T4a	N1b	
IVB	T4a	κάθε N	Mo
IVC	κάθε T	κάθε N	M1
ΜΥΕΛΟΕΙΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ			
Όλες οι ηλικίες			
Στάδιο	T	N	M
I	T1	No	Mo
II	T2,T3	No	Mo
III	T1-T3	N1a	Mo
IVA	T4a	No	Mo
	T4a	N1a	Mo
	T1	N1b	Mo
	T2	N1b	Mo
	T3	N1b	Mo
	T4a	N1b	Mo
	T4a	No, N1b	Mo
	T1-T4a	N1b	Mo
IVB	T4b	κάθε N	Mo
IVC	κάθε T	κάθε N	M1
ΑΝΑΠΛΑΣΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ			
Όλες οι ηλικίες			
Στάδιο	T	N	M
IVA	T4a	κάθε N	Mo
IVB	T4b	κάθε N	Mo
IVC	κάθε T	κάθε N	M1

Πίνακας 1.2. Σταδιοποίηση του θυρεοειδικού καρκίνου με βάση το σύστημα TNM των επιτροπών της UICC

Η σταδιοποίηση του θυρεοειδικού καρκίνου, γίνεται με βάση την εκτίμηση των αποτελεσμάτων της βιοψίας καθώς και των ευρημάτων μιας σειράς κλινικών και απεικονιστικών εξετάσεων, με τις οποίες εκτιμάται η έκταση της νόσου και η παρουσία μεταστάσεων.

1.4. ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ

1.4.1. Καλοήθειες θυρεοειδικές παθήσεις

1.4.1.1. Υποθυρεοειδισμός

Μια ευαίσθητη ισορροπία μεταξύ της κεντρικής παραγωγής και της περιφερικής δράσης της T_3 και T_4 απαιτείται για τη δημιουργία της ευθυρεοειδικής κατάστασης για την περιφέρεια. Ο κλινικός υποθυρεοειδισμός είναι συνήθως σχετιζόμενος με μειωμένη παραγωγή στον θυρεοειδή αδένα, αν και μπορούμε να επισημάνουμε και περιπτώσεις περιορισμένης δραστηριότητας των ορμονών στην περιφέρεια. Σε πολλές υπανάπτυκτες χώρες η έλλειψη του απαραίτητου ιωδίου εξηγεί το μεγάλο ποσοστό των υποθυρεοειδικών καταστάσεων. Σε αντιδιαστολή στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες, οι περισσότερες εκ των περιπτώσεων με υποθυρεοειδισμό οφείλονται σε θυρεοειδίτιδα Hashimoto, επιθετική θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο ή χειρουργική εξαίρεση του αδένα. Επίσης θα πρέπει να αναφερθούν γενετικές παρεκκλίσεις στην οργανογένεση του θυρεοειδούς στα παιδιά όπως η αγενεσία και η υποπλασία. Ανωμαλίες του κεντρικού νευρικού συστήματος, είναι δυνατό να οδηγήσουν είτε σε παθήσεις του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης ή υποθαλαμικές διαταραχές οι οποίες μπορούν να χαρακτηριστούν ως υπεύθυνες για έναν κεντρικής αιτίας υποθυρεοειδισμό σαν αποτέλεσμα της μειωμένης TSH ή TRH έκκρισης. Τέλος έχει περιφερική ιστική αντίσταση στη δράση των θυρεοειδικών ορμονών πιθανώς λόγω μεταβολής του μηχανισμού των υποδοχέων.

1.4.1.2. Ενδημική βρογχοκήλη

Η έλλειψη ιωδίου μπορεί να προκαλέσει μια αναστρέψιμη νόσο γνωστή ως ενδημική βρογχοκήλη στην οποία σοβαρότερο εκ των αποτελεσμάτων της είναι ο ενδημικός κρετινισμός. Η έλλειψη του ιωδίου μικρής ή συμπτωματικής μορφής απασχολεί το ένα τρίτο του παγκόσμιου πληθυσμού ειδικά σε υποανάπτυκτες χώρες και περίπου 12 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως υποφέρουν από ενδημικό κρετινισμό. Οι χώρες της νοτιανατολικής Ασίας, όπως η Ινδία, η ινδονησία και η κίνα συμπεριλαμβάνονται στις υψηλότερες θέσεις όσον αφορά το ρίσκο της έλλειψης του ιωδίου ενώ αρκετές ευρωπαϊκές χώρες όπως η Ιταλία, η Ισπανία, η Ουγγαρία, η Πολωνία και η Σερβία δεν απέχουν πολύ από την μέση της κατάταξης όσον αφορά την έλλειψη ιωδίου και το ρίσκο εμφάνισης ενδημικής βρογχοκήλης. Σε περιοχές τώρα που παρατηρείται σοβαρή έλλειψη ιωδίου τα κλινικά σημεία και συμπτώματα της βρογχοκήλης εμφανίζονται σε μικρότερες ηλικίες. Η επικράτηση της νόσου αυξάνεται δραματικά στην όψιμη παιδική ηλικία δημιουργώντας την κορυφή της καμπύλης (peak) στην εφηβεία. Η εμφάνιση της βρογχοκήλης μειώνεται κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής, με μια ελαφρά υπεροχή στις γυναίκες.

1.4.1.3. Θυρεοειδίτιδα Hashimoto

Μια από τις πιο σημαντικές αιτίες του υποθυρεοειδισμού στον ενήλικο πληθυσμό είναι η θυρεοειδίτιδα Hashimoto. Ένα σύνθετο ανοσολογικό φαινόμενο έχει σαν αποτέλεσμα την μετατροπή των άνοσων συμπλεγμάτων και του συμπληρώματος στη βασική μεμβράνη των θυλακιδίων κυττάρων. Η δέσμευση του συμπληρώματος έχει σαν αποτέλεσμα την μεταβολή

της λειτουργίας του θυρεοειδικού κυττάρου με άμεσο αποτέλεσμα την εξασθένηση της παραγωγής της T₃ και T₄. Ένας καταρράκτης αντιδράσεων με σκοπό την παραγωγή κυτοκινών έχει σαν αποτέλεσμα την επεξεργασία των προϊόντων τα οποία ευθέως ρυθμίζονται διαμέσου της θυρεοειδικής λειτουργίας ή την παρόξυνση της άνοσης απάντησης η οποία εν τέλει έχει και το ίδιο αποτέλεσμα. Αυτές οι κυτταρικές αντιδράσεις εν κατακλείδι έχουν αποτέλεσμα την διήθηση από λεμφοκύτταρα και την επακόλουθη ίνωση, η οποία μειώνει τον αριθμό και την αποτελεσματικότητα των ενήλικων θυλακίων. Όσο αυτό το αυτοάνοσο φαινόμενο διαρκεί μπορούμε να ανιχνεύσουμε την παρουσία αντισωμάτων δεσμευτικών της TSH. Τα θυρεοειδικά μικροσωματικά αντισώματα που παράγονται αποτελούν τους ενδιάμεσους μεσολαβητές για την αρχική πρόοδο της δέσμευσης του συμπληρώματος. Όσο αυτή η αυτοάνοση αντίδραση διαρκεί οι μεταβολές της θυρεοειδικής λειτουργίας θα μεταβάλλονται σε αναλογία με τα επίπεδα αυτών των αντισωμάτων. Στο τέλος μια υποθυρεοειδική κλινική κατάσταση θα εδραιωθεί στους ασθενείς με εμμένοντα δεσμευτικά της TSH αντισώματα.

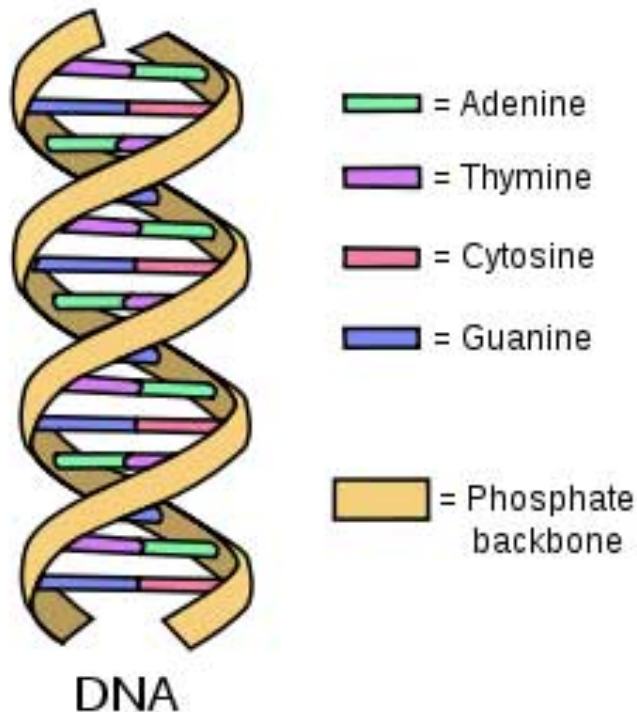
ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

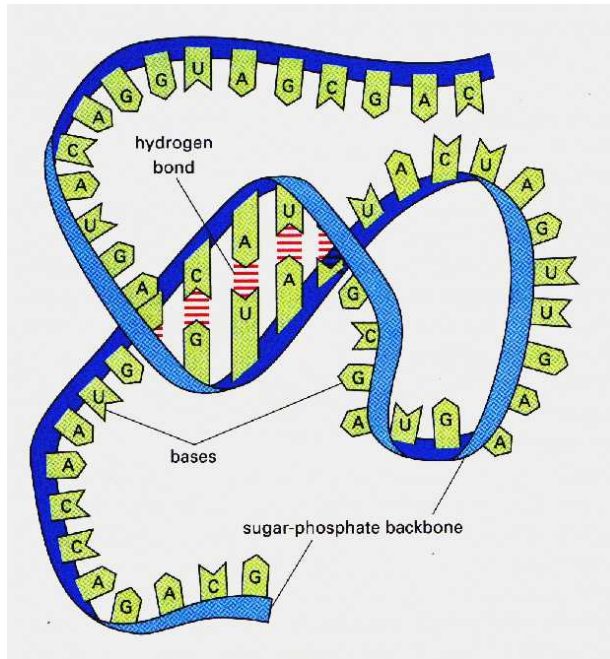
2.1 Γενικά

Το κύτταρο αποτελεί τη βασική δομική και λειτουργική μονάδα της ζωής. Ο ανθρώπινος οργανισμός αποτελείται από εκατομμύρια κύτταρα, η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των οποίων ρυθμίζεται με στόχο την ομαλή και αρμονική λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Η ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού επιτελείται μέσω γενετικών πληροφοριών που τα κύτταρα φέρουν στο γονιδίωμα τους (DNA).

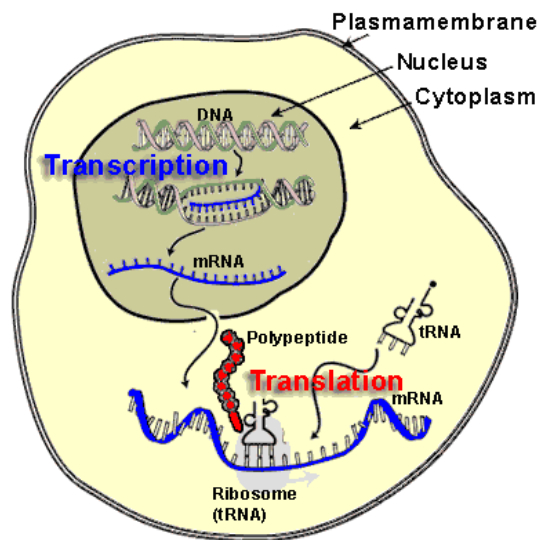
Στα σχήματα που ακολουθούν ανασκοπούνται η δομή του δίκλωνου μορίου του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέως (DNA), όπου είναι αποθηκευμένη η γενετική πληροφορία του κυττάρου (Σχήμα 2.1), η δομή του μονόκλωνου μορίου του ριβονουκλεϊκού οξέως (RNA), όπου μεταγράφεται η γενετική πληροφορία του μορίου DNA (Σχήμα 2.2), μέσω της διαδικασίας της μεταγραφής (Σχήμα 2.3), για να ακολουθήσει στη συνέχεια η διαδικασία της μετάφρασης, όπου συντίθενται τα πρωτεϊνικά μόρια του κυττάρου (Σχήμα 2.3).



Σχήμα 2.1. Το δίκλωνο μόριο δεοξυριβονουκλεϊκού οξέως



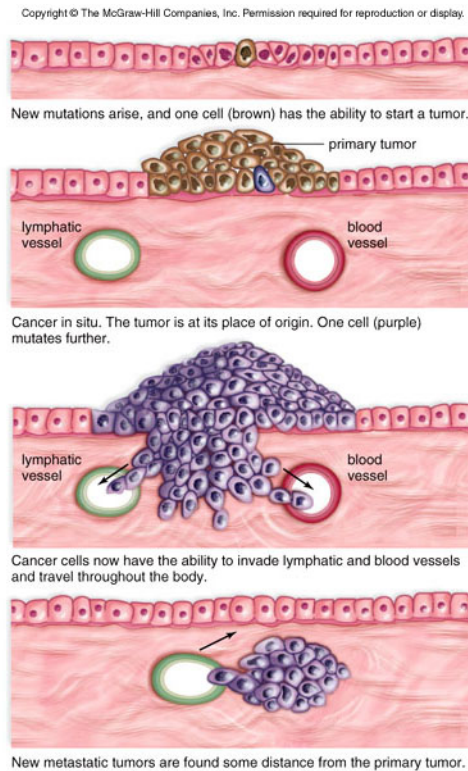
Σχήμα 2.2. Το μονόκλωνο μόριο ριβονουκλεϊκού οξέως



Σχήμα 2.3. Διαδικασία μεταγραφής και μετάφρασης

Η καρκινική εξαλλαγή ενός κυττάρου είναι το αποτέλεσμα μιας πολυσταδιακής και πολυπαραγοντικής διαδικασίας μετάβασης από την κατάσταση του φυσιολογικού ελέγχου της κυτταρικής ανάπτυξης σε μια κατάσταση φυσιολογικού ελέγχου της κυτταρικής ανάπτυξης σε μια κατάσταση απώλειας ελέγχου της [1].

Τα καρκινικά κύτταρα, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά, διπλασιάζονται ανεξέλεγκτα (αθανατοποίηση) και εισβάλλουν σε γειτονικούς ιστούς διασπώντας τη βασική μεμβράνη (διήθηση), όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.4 .



Σχήμα 2.4. Στάδια διήθησης της βασικής μεμβράνης

Με τον τρόπο αυτό στη συνέχεια, μέσω των λεμφικών και αιμοφόρων αγγείων, μεθίστανται σε απομακρυσμένα όργανα (μετάσταση).

Η διαδικασία της καρκινογένεσης είναι πολυσταδιακή. Διακρίνονται τρία στάδια καρκινογένεσης: το στάδιο έναρξης (initiation), το στάδιο προαγωγής (promotion) και το στάδιο μετεξέλιξης (progression), κατά την διάρκεια των οποίων πραγματοποιείται προοδευτικά η καρκινική εξαλλαγή των κυττάρων. Σε ορισμένες περιπτώσεις καρκίνου, υπάρχουν προκαρκινικές αλλοιώσεις, οι οποίες στην συνέχεια εξελίσσονται σε κακοήθη νεοπλάσματα.

Για τα στάδια της καρκινογένεσης στον θυρεοειδή αδένα, περισσότερα στοιχεία αναλύονται στο Κεφάλαιο I.

Η διαδικασία της καρκινογένεσης είναι πολυπαραγοντική. Μια σειρά από περιβαλλοντικούς, γενετικούς και επιγενετικούς παράγοντες επιδρούν στην μετατροπή του φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Οι γενετικές αλλοιώσεις που δημιουργούνται, αντιστρεπτές και μη, αυξάνουν το ογκογενετικό δυναμικό των κυττάρων και αθροιστικά τα ωθούν στην κακοήθη εξαλλαγή. Οι αλλοιώσεις αυτές αφορούν την ποιοτική και ποσοτική λειτουργία συγκεκριμένων γονιδίων, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της αύξησης και της διαφοροποίησης του κυττάρου. Τα γονίδια αυτά διακρίνονται σε δυο βασικές κατηγορίες : τα ογκογονίδια (oncogenes) και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια (onco-suppressor genes).

2.2. Παράγοντες καρκινογένεσης

2.2.1. Φυσικοί παράγοντες

Αν και η ευαισθησία των ιστών διαφέρει, η ιονίζουσα ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει όλες τις μορφές καρκίνου στον άνθρωπο, ενώ η υπεριώδης ακτινοβολία προκαλεί καρκίνο του δέρματος συμπεριλαμβανομένου και του μελανώματος. Η ακτινοβολία φαίνεται πως προκαλεί άμεσα γενετικές βλάβες, όπως απαλείψεις και μεταθέσεις χρωμοσωμικών τμημάτων και σπανιότερα σημειακές μεταλλάξεις. Η υπεριώδης ακτινοβολία προκαλεί επιπλέον αλλοώσεις στην δομή και τη λειτουργία γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την διόρθωση βλαβών που φυσιολογικά συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του DNA. Ο μηχανισμός αυτός συμβάλλει στη δημιουργία κακοήθων δερματικών όγκων σε πάσχοντες από το σύνδρομο της μελαγχρωστικής ξηροδερμίας (xeroderma pigmentosum).

Η έκθεση σε ίνες αμιάντου προκαλεί καρκίνο στους πνεύμονες και τον υπεζωκότα. Το καρκίνωμα του πλακώδους επιθηλίου της ουροδόχου κύστης είναι στενά συνδεδεμένο με την χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση που προκαλείται από μόλυνση της ουροδόχου κύστης από το *schistosoma haematobium*. Η μεταμόσχευση τεχνητού μέλους σπάνια συνδέεται με την ανάπτυξη σαρκώματος.

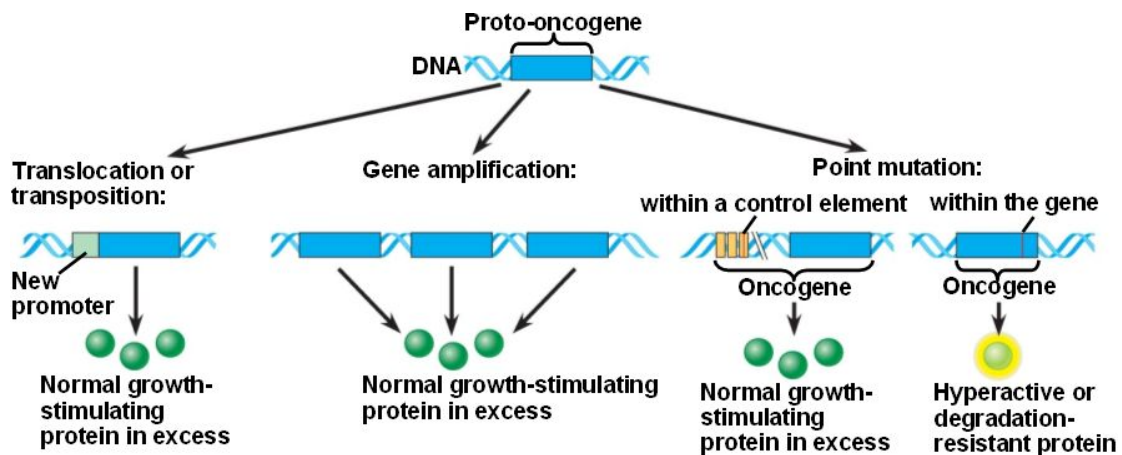
2.2.2. Χημικοί παράγοντες

Παρά το γεγονός πως οι περισσότερες χημικές ουσίες δεν είναι καρκινογόνες, τα χημικά καρκινογόνα ενέχονται στην καρκινογένεση των περισσότερων μορφών καρκίνου στον άνθρωπο. Οι ουσίες αυτές συνήθως μετατρέπονται από συγκεκριμένα ενζυμικά συστήματα του κυττάρου (π.χ. το κυτόχρωμα P-450) σε ενεργούς μεταβολίτες που δρουν άμεσα στο DNA του κυττάρου προκαλώντας από σημειακές γονιδιακές μεταλλάξεις έως μείζοντες χρωμοσωμικές ανωμαλίες [2].

Το αλκοόλ και το κάπνισμα έχουν συσχετιστεί με την εκδήλωση αρκετών τύπων καρκίνου, όπως ο καρκίνος της κεφαλής και του τραχήλου, του αναπνευστικού, ανώτερου γαστρεντερικού και της ουροδόχου κύστης. Σε λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα προκαλείται από αφλατοξίνες, οι οποίες παράγονται από μύκητες. Η σύγχρονη διατροφή αποτελεί βασικό πατάγοντα καρκινογένεσης. Η χαμηλή διατροφική πρόσληψη ινών έχει συσχετιστεί με τον καρκίνο του παχέος εντέρου, ενώ η χρήση συντηρητικών στα τρόφιμα έχει ενοχοποιηθεί για διάφορους τύπους καρκίνου. Παλιότερα ο κίνδυνος καρκινογένεσης από χημικές ουσίες σχετιζόταν με την έκθεση των ανθρώπων σε βιομηχανικά προϊόντα όπως διάφορες χρωστικές, το βενζόλιο και το χλωριούχο βινύλιο.

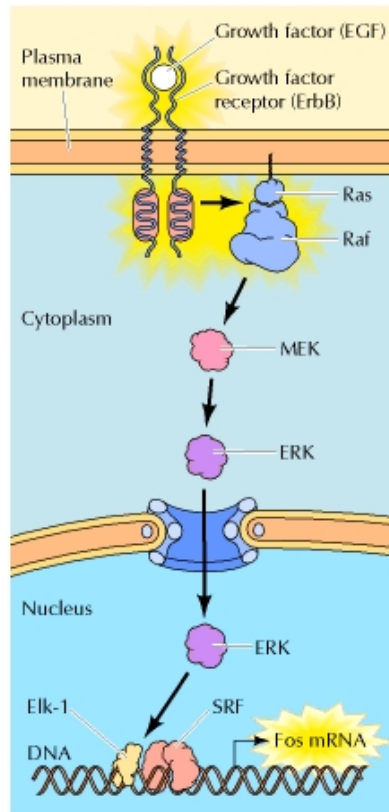
2.3. Ογκογονίδια

Τα ογκογονίδια είναι γονίδια, κυτταρικά ή ιικά, των οποίων η δράση συνεισφέρει στην κακοήθη εξαλλαγή του κυττάρου. Τα κυτταρικά ογκογονίδια ταυτοποιήθηκαν αρχικά ως ομόλογα ιικών γονιδίων ογκογόνων ρετρο-ιών, οι οποίοι εμφανίζουν την ικανότητα επαγωγής όγκων σε πειραματόζωα και μετασχηματισμού κυτταρικών σειρών *in vitro*. Στη συνέχεια όμως αποδείχτηκε ότι τα γονίδια των ρετροϊών είναι κυτταρικά γονίδια, τα οποία απέσπασαν εξελικτικά οι ρετρο-ιοί κατά την ενσωμάτωσή τους στο κυτταρικό γονιδίωμα των θηλαστικών. Αντίθετα, τα ογκογονίδια των DNA ιών δεν παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία με τα κυτταρικά ογκογονίδια.



Σχήμα 2.5. Τρόποι ενεργοποίησης ενός πρώτο-ογκογονιδίου σε ογκογονίδιο.

Τα ογκογονίδια προέρχονται από την ενεργοποίηση φυσιολογικών κυτταρικών ή ιικών γονιδίων (πρωτο-ογκογονίδια) λόγω της επίδρασης των παραγόντων καρκινογένεσης. Η ενεργοποίηση των πρωτο-ογκογονιδίων μπορεί να πραγματοποιηθεί με μια σειρά από αλλοιώσεις (Σχήμα 2.5), όπως οι σημειακές μεταλλάξεις, η γονιδιακή επέκταση, η μετάθεση χρωμοσωμικού τμήματος, η αύξηση του αριθμού των χρωμοσωμάτων, η ενσωμάτωση ιικών αλληλουχιών και η αύξηση της έκφρασης του γονιδίου λόγω μετεγραφικών, μετα-μεταγραφικών, μεταφραστικών και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Η ενεργοποίηση εντοπίζεται τόσο σε ποιοτικό όσο και σε ποσοτικό επίπεδο, με αποτέλεσμα είτε την απευθείας αλλοίωση του γονιδιακού προϊόντος και την παραγωγή μεταλλαγμένης πρωτεΐνης, είτε την παραγωγή σε υπερβολικές ποσότητες (υπερέκφραση) της φυσιολογικής πρωτεΐνης, ενώ είναι επίσης δυνατή η ενεργοποίηση και στα δύο επίπεδα.



Σχήμα 2.6. Κυτταρική εντόπιση πρωτεϊνικών προϊόντων διάφορων ογκογονιδίων

Τα πρώτο-ογκογονίδια στο φυσιολογικό κύτταρο κωδικοποιούν μια σειρά από πρωτεΐνες (Σχήμα 2.6), οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της σταθερότητας του DNA και της διαφοροποίησης σεμμετέχοντας σε ένα πολύπλοκο μηχανισμό επαγωγής σημάτων στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα πρωτεϊνικά προϊόντα των πρώτο-ογκογονιδίων, είναι κυρίως αυξητικοί και αγγειογενετικοί παράγοντες, διαμεμβρανικοί ή ενδοκυττάριοι υποδοχείς και πρωτεΐνες που ρυθμίζουν ως μεταγραφικοί παράγοντες τη μεταγραφή του κυττάρου.

2.4. Αυξητικοί και αγγειογενετικοί παράγοντες

Παραδείγματα αυξητικών παραγόντων που κωδικοποιούνται από ογκογονίδια αποτελούν ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF), ο οποίος παράγεται από το ογκογονίδιο *sis*, οι επιδερμοειδείς αυξητικοί παράγοντες (EGFs) και ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF), προϊόν του ογκογονιδίου *int-2* καθώς και διάφοροι αγγειογενετικοί παράγοντες όπως ο VEGF, οι οποίοι επάγουν τη διαδικασία της αγγειογένεσης. Η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων αυτών είναι κυρίως συνέπεια της μεταγραφικής τους απορύθμισης, με αποτέλεσμα την υπερέκφραση των φυσιολογικών πρωτεϊνών τους. Με τον τρόπο αυτό το κύτταρο δέχεται έναν μεγάλο αριθμό μιτογονικών σημάτων τόσο από το ίδιο (αυτοκτινής επαγωγή) ή το μικροπεριβάλλον του, όσο και από πλέον μακρινά σημεία, γεγονός που επιδρά στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του καρκινικού μετασχηματισμού του κυττάρου.

2.5. Διαμεμβρανικοί υποδοχείς και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες

Οι καλύτερα μελετημένοι υποδοχείς είναι αυτοί, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από μια εξωτερική περιοχή πρόσδεσης, μια διαμεμβρανική περιοχή και ένα κυτταροπλασματικό επίτοπο, ο οποίος παρουσιάζει ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης. Παραδείγματα ογκογονιδίων που κωδικοποιούν διαμεμβρανικούς υποδοχείς με δράση κινάσης της τυροσίνης αποτελούν τα γονίδια *erbB-1*, *erbB-2*, και *fms*, ενώ το γονίδιο *erbA* κωδικοποιεί έναν ενδοκυτταρικό υποδοχέα με δράση κινάσης της τυροσίνης. Άλλοι διαμεμβρανικοί υποδοχείς που ενοχοποιούνται για την καρκινογένεση είναι οι υποδοχείς που δεσμεύουν νουκλεοτίδια γουανίνης, υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης της σερίνης/θρεονίνης, υποδοχείς για λεμφοκίνες, κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες (π.χ. ιντερλευκίνη-1, ιντερλευκίνη-2, GM-CSF, ερυθροποιητίνη), υποδοχείς με ενεργότητα φωσφατάσης της φωσφοτυροσίνης, οι οποίοι δύνανται να αντιπροσωπεύουν ένα ανταγωνιστικό σύστημα έναντι των υποδοχέων της κινάσης της τυροσίνης καθώς και κανάλια ιόντων.

Παραδείγματα ογκογονιδίων που κωδικοποιούν κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που δεσμεύουν νουκλεοτίδια γουανίνης αποτελούν τα γονίδια *ras*, ενώ τα γονίδια *raf* και *mos* κωδικοποιούν κυτταροπλασματικές κινάσες της σερίνης/θρεονίνης. Τα γονίδια *scr*, *abl*, *yes* κωδικοποιούν κυτταροπλασματικές κινάσες της τυροσίνης. Οι πρωτεΐνες αυτές φαίνεται να συμμετέχουν στη μετάδοση σημάτων που δέχεται το κύτταρο μέσω των υποδοχέων του, τα οποία είναι απαραίτητα για τον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης και της κυτταρικής διαφοροποίησης. Στο κεφάλαιο .. παρουσιάζονται τα γονίδια της οικογένειας *ras*, καθώς και ο σημαντικός ρόλος τους στην καρκινική εξαλλαγή του κυττάρου.

2.6. Μεταγραφικοί παράγοντες

Μια σημαντική κατηγορία ογκογονιδίων κωδικοποιεί πρωτεΐνες που παρεμβαίνουν ρυθμιστικά στη διαδικασία μεταγραφής του γενετικού υλικού. Παραδείγματα αποτελούν τα γονίδια *myc*, *jun*, *fos*, *myb* και *ski*, τα προϊόντα των οποίων προσδένονται και αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA επιδρώντας ως μεταγραφικοί παράγοντες στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης του κυττάρου. Το γονίδιο *myc* κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη 62 kDa με ικανότητα πρόσδεσης στο DNA. Η έκφραση του γονιδίου εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Η απώλεια της γονιδιακής ρύθμισης του γονιδίου λόγω γονιδιακής επέκτασης, ανακατατάξεων στο 5' άκρο του, μετατοπίσεων οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του γονιός που θεωρείται βασικός παράγοντα καρκινογένεσης.

2.7. Πολυλειτουργικά ογκογονίδια

Πρόσφατα έχουν βρεθεί ογκογονίδια, πρωτεΐνες των οποίων έχουν την ικανότητα να εκτελούν πολλαπλές συγκεκριμένες λειτουργίες. Παράδειγμα αποτελεί το ογκογονίδιο bcr, η αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης του οποίου έχει δράση κινάσης της σερίνης, η καρβοξυτελική έχει δράση GTPάσης, ενώ η ενδιάμεση περιοχή παρουσιάζει ομολογία με τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων. Ο ακριβής ρόλος των πολυλειτουργικών ογκογονιδίων δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί, είναι ωστόσο πιθανό ότι οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν λειτουργούν ως γέφυρες σε συγκεκριμένα σημεία του μηχανισμού της ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

2.8. Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι κυτταρικά γονίδια, η απενεργοποίηση των οποίων οδηγεί στην καρκινική εξαλλαγή του κυττάρου. Στο φυσιολογικό κύτταρο τα προϊόντα των γονιδίων αυτών ασκούν αρνητικό έλεγχο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ παράλληλα εμπλέκονται και στη ρύθμιση των μηχανισμών του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση).

Σε αντίθεση με τα ογκογονίδια, τα οποία δρουν ως επικρατή, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια παρουσιάζουν υπολειπόμενη ογκογενετική δράση, υπό την έννοια ότι απαιτείται μετάλλαξη ή έλλειψη και στα δυο αλληλόμορφα (απώλεια ετεροζυγωτίας) του γονιδίου για την καταστολή της φυσιολογικής δράσης. Η απώλεια της ετεροζυγωτίας μπορεί να είναι το αποτέλεσμα των ενδιάμεσων ελλείψεων, απάλειψης χρωμοσώματος ή μη φυσιολογικών ανασυνδιασμών και αποτελεί σύνηθες χαρακτηριστικό πολλών νεοπλασιών όπου ενοχοποιείται η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Η απενεργοποίηση ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου δύναται να πραγματοποιηθεί και με την βοήθεια σημειακών μεταλλάξεων. Αυτές οι μεταλλάξεις έχουν συνήθως επικρατούντα αρνητικό χαρακτήρα, που σημαίνει πως η μετάλλαγμένη πρωτεΐνη μπορεί να προσδένεται με την φυσιολογική και την απενεργοποιεί.

Οι πιο γνωστοί αντιπρόσωποι της ομάδας ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος rb και το γονίδιο p53. Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος rb ήταν το πρώτο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε η αλληλουχία του. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί είναι μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη που προσδένεται στο DNA και παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση του κυττάρου. Η απενεργοποίηση του γονιδίου ευνοεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον καρκινικό μετασχηματισμό και παρατηρείται κυρίως στο ρετινοβλάστωμα καθώς και σε καρκίνους της ουροδόχου κύστεως και του πνεύμονα. Το γονίδιο p53 κωδικοποιεί μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη, που προσδένεται στο DNA και ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων, τα οποία συμμετέχουν στην αύξηση και τη διαφοροποίηση του κυττάρου. Η πρωτεΐνη αυτή εντοπίστηκε για πρώτη φορά αξιαιτίας της πρόσδεσης της στο μεγάλο T αντιγόνο του ιού SV40. Η πρόσδεση αυτή προκαλεί την απενεργοποίηση της p53 με άμεσες ογκογενετικές συνέπειες για το κύτταρο, το οποίο προσβάλλεται από το DNA του ογκογόνου ιού. Απενεργοποίηση του γονιδίου p53 εμφανίζεται

σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του οστεοσαρκώματος, ενώ κληρονομούμενες μεταλλάξεις του γονιδίου φαίνεται πως συνδέονται με το κληρονομικό σύνδρομο του καρκίνου Li-Fraumeni.

Άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι το γονίδιο WT-1, το οποίο είναι υπεύθυνο για μια ποικιλία όγκων του Wilms, το NF-1, το οποίο είναι υπεύθυνο για την νευροϊνωμάτωση τύπου I, το γονίδιο APC το οποίο σχετίζεται με την προδιάθεση για τον καρκίνο του παχέως εντέρου, το nm3, το οποίο εμπλέκεται στον καρκίνο του μαστού και του τραχήλου της μήτρας και το MTS1, η έλλειψη του οποίου εμφανίζεται συχνά σε κυτταρικές σειρές από όγκους του πνεύμονα, του μαστού, του δέρματος, των ωοθηκών και των λεμφοκυττάρων.

2.9. Γονιδιακή θεραπεία

Η κατανόηση της μοριακής και γενετικής βάσης της καρκινογένεσης αναζωπυρώνει την ελπίδα για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις εναντίον του καρκίνου. Η ανεύρεση μοριακών στόχων σε διάφορους καρκίνους στον άνθρωπο καθώς και η ανάπτυξη μεθόδων γονιδιακής μεταφοράς με υψηλή αποτελεσματικότητα οδήγησε στην διαμόρφωση της ιδέας ότι η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον για τη θεραπεία του καρκίνου [3]. Με τον όρο γονιδιακή θεραπεία αναφερόμαστε στην παρέμβαση στο γενετικό υλικό του ανθρώπου με στόχο τη διόρθωση των γενετικών αλλοιώσεων, οι οποίες ενοχοποιούνται για την εκδήλωση της νόσου. Αρχικό στόχο των πρώτων κλινικών μελετών γονιδιακής θεραπείας αποτέλεσαν κληρονομικές νόσοι που οφείλονται σε ελαττωματικά γονίδια, όπως ανοσοεπάρκειες π.χ. λόγω της έλλειψης της απαμινάσης της αδενοσίνης. Σήμερα, λόγω του συνεχούς αυξανόμενου ερευνητικού ενδιαφέροντος στο χώρο της ογκολογίας, η πλειοψηφία των κλινικών μελετών γονιδιακής θεραπείας αφορούν τον καρκίνο. Στην αντιστροφή αυτή συνέβαλε και το γεγονός ότι οι στρατηγικές που έχουν εφαρμοστεί για την γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου δεν επηρεάζονται σημαντικά από τεχνικές δυσκολίες, που συνδέονται με τη γονιδιακή θεραπεία κληρονομούμενων γενετικών νόσων, για την οποία απαιτείται μακροχρόνια και ρυθμιζόμενη έκφραση του μεταφερόμενου γονιδίου στα κύτταρα.

Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζονται οι στρατηγικές, οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί στη γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου. Βασική προϋπόθεση για την επιτυχία των στρατηγικών αυτών αποτελεί η ικανότητα των οχημάτων γονιδιακής μεταφοράς να αναγνωρίζουν μόνο τα κύτταρα-στόχους καθώς και η ασφάλεια τους με την πρόκληση όσο το δυνατόν λιγότερων ανεπιθύμητων ενεργειών.

Πίνακας 2.1. Προσεγγίσεις στη γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου

Αποκατάσταση λειτουργίας ογκοκατασταλτικών γονιδίων/ογκογονιδίων Αντικατάσταση μεταλλαγμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων, π.χ. p53, BRAC1 Αντικατάσταση μεταλλαγμένων ογκογονιδίων, π.χ. ras, myc
Γονιδιακή μεταφορά ως κυτταροτοξική θεραπεία Χρήση γονιδίων “αυτοκτονίας”, π.χ. απαμινάση της κυτοσίνης, κινάση της θυμιδίνης του ιού του έρπητα.
Γονιδιακή μεταφορά ως μέσο ανοσοθεραπείας Χρήση γονιδίων της ιντερλευκίνης-2 ή του αυξητικού παράγοντα GM-CSF
Γονιδιακή μεταφορά ως μέσο τροποποίησης της απόκρισης στη χημειοθεραπεία Τροποποίηση αιμοποιητικών κυττάρων με την εισαγωγή του γονιδίου MDR-1, που επιφέρει αντικατάσταση στη χημειοθεραπεία.

Στο μέλλον, η βελτίωση των οχημάτων γονιδιακής μεταφοράς όσο αφορά την αποτελεσματικότητα, την εκλεκτικότητα και την ασφάλεια τους αναμένεται να οδηγήσουν στη βελτίωση της κλινικής αποτελεσματικότητας της γονιδιακής θεραπείας. Επιπλέον, ο σχεδιασμός θεραπευτικών στρατηγικών που στοχεύουν σε συνδιασμό συγκεκριμένων μοριακών στόχων αναμένεται να συμβάλει σημαντικά στην αποτελεσματική θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με καρκίνο καθιστώντας τη γονιδιακή θεραπεία αναπόσπαστο εργαλείο της θεραπευτικής του μέλλοντος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

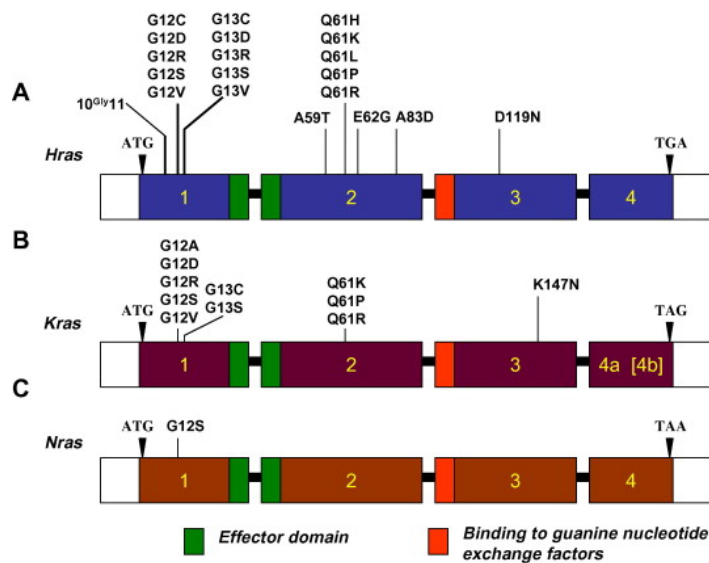
ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ *ras*

3.1. Γενικά

Τα ογκογονίδια της οικογένειας *ras* κατέχουν σημαντική θέση στη ρύθμιση βασικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση του κυττάρου και συγκαταλέγονται μεταξύ των κυριότερων γονιδίων με καθοριστικό ρόλο στην καρκινογένεση [4,5]. Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί τρία γονίδια *ras* : K-*ras* στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 12 (12p12.1-pter), το H-*ras* στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 11 (11p15.5), και το N-*ras* στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 1 (1p22-p32). Έχουν επίσης ταυτοποιηθεί και δυο ψευδογονίδια, H-*ras* 2 και K-*ras* 1, τα οποία όμως δεν είναι λειτουργικά.

3.2. Δομή των γονιδίων *ras*

Τα H-, K-, και N-*ras* έχουν παρόμοια δομή και αλληλουχίες (Σχήμα 3.1), με πέντε εξώνια, το πρώτο εκ των οποίων δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνη και σταθερές θέσεις ματίσματος (splicing) ακόμη και αν τα ιντρόνια έχουν ποικίλες διαστάσεις και αλληλουχίες [6]. Τα μήκη των αντίστοιχων εξωνίων είναι παρόμοια, ενώ τα μήκη των εσωνίων διαφέρουν αρκετά, με αποτέλεσμα τα συνολικά μήκη των τριών γονιδίων να είναι διαφορετικά: το K-*ras* φέρει δύο εναλλακτικά τέταρτα εξώνια, τα 4A και 4B. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα K-*ras*, H-*ras* και N-*ras* αποτελούνται από 189 αμινοξέα, ενώ του K-*ras* αποτελείται από 188 αμινοξέα, διότι το 4B εξώνιο έχει ένα κωδικόνιο λιγότερο.



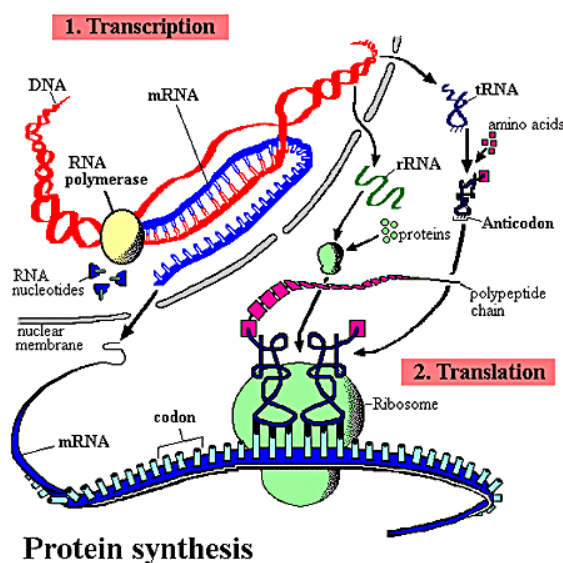
Σχήμα 3.1. Τα γονίδια H-*ras*, N-*ras* και K-*ras*

Οι υποκινητές των τριών *ras* γονιδίων έχουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά, που απορρέουν από τη συντηρητική συμπεριφορά τους κατά την εξελικτική διαδικασία. Έχουν υψηλή

περιεκτικότητα σε γουανίνη και κυτοσίνη (GC), ενώ δε διαθέτουν αλληλουχίες TATA ή CAT, χαρακτηριστικά που απαντώνται σε πολλά ακόμη ογκογονίδια.

3.3. Ρύθμιση των ογκογονιδίων *ras*

Στο Σχήμα 3.2 παρουσιάζεται η μεταγραφή και η μετάφραση της πρωτεΐνης Ras, η οποία ελέγχεται από μια σειρά από ρυθμιστικούς μηχανισμούς, με κυριότερο τον έλεγχο σε μεταγραφικό επίπεδο.



Σχήμα 3.2. Μεταγραφή και μετάφραση πρωτεΐνης Ras

Τα ρυθμιστικά μεταγραφικά στοιχεία των γονιδίων *ras* έχουν μελετηθεί εκτενώς. Φαίνεται πως υπάρχουν πολλές θέσεις έναρξης της μεταγραφής εντοπισμένες σε μια περιοχή 40bp μέσα στο εσώνιο-1. Στη ρύθμιση της έκφρασης των *ras* εμπλέκονται ρυθμιστικές περιοχές που έχουν τη δυνατότητα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων [7]. Τέτοια ρυθμιστικά στοιχεία έχουν αναγνωριστεί στην περιοχή του υποκινητή και στο πρώτο εσώνιο του H-*ras*. Τα στοιχεία του πρώτου εσωνίου τροποποιούν την έκφραση του γονιδίου σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, με θετικό και αρνητικό τρόπο. Στο ίδιο εσώνιο έχουν αναγνωριστεί δύο ακόμη θέσεις με λειτουργική σημασία για τη μεταγραφή, μια με ειδικότητα σύνδεσης της πρωτεΐνης p53 και η δεύτερη με ενεργότητα πρόσδεσης υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid response element-GRE). Παρόμοια περιοχή για οιστρογονικούς υποδοχείς (ERE) στο τέταρτο εσώνιο του H-*ras* [8].

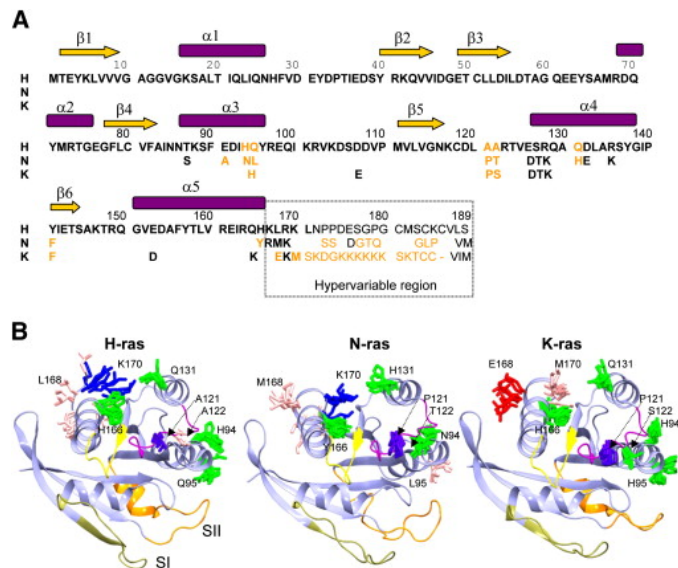
Στο μηχανισμό έκφρασης των γονιδίων *ras* εμπλέκονται επίσης ρυθμιστικές θέσεις της 3' περιοχής τους. Πρόκειται για επαναλαμβανόμενες μινιδουροφωρικές DNA αλληλουχίες (VTR) ευρισκόμενες 3' του πολυαδενυλικού σήματος, οι οποίες κατέχουν ενεργότητα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες της μεταγραφής *rel/NF-kB*

προσδένονται στη VTR περιοχή του H-ras [9] και προκαλούν την ικανότητα μετασχηματισμού κυττάρων μέσω υπερέκφρασης του γονιδίου [10]. Στη ρύθμιση, τέλος, της έκφρασης των *ras* υπεισέρχονται ακόμη η μεθυλίωση των υποκινητών τους και ο μηχανισμός του εναλλακτικού ματίσματος στις ρυθμιστικές αλληλουχίες του τέταρτου εσωνίου και της 3' VTR περιοχής του H-ras [11].

Στη ρύθμιση πρωτεΐνης Ras εμπλέκονται τέλος μια σειρά από μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις του μορίου της, πριν αυτό μεταφερθεί και ενσωματωθεί στην κυτταρική μεμβράνη.

3.4. Οι πρωτεΐνες Ras

Οι τρεις κύριες Ras πρωτεΐνες παρουσιάζουν υψηλή ομολογία στα πρώτα 165 αμινοξέα αλλά παρουσιάζουν διαφορές στα 25 αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου που συνιστά την ετερογενή περιοχή. Όλες οι Ras πρωτεΐνες περιέχουν ένα τελικό CAAX τμήμα στη θέση 186-189. Στο τμήμα αυτό το "C" αντιπροσωπεύει την κυστεΐνη, το "A" αντιπροσωπεύει ένα αλιφατικό αμινοξύ (λευκίνη, ισολευκίνη, ή βαλίνη), και το "X" είναι μεθειονίνη, σερίνη, λευκίνη ή γλουταμίνη. Οι μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, με αμινοξύ 186, (πάντα κυστεΐνη) αυξάνουν την υδροφοβικότητα της καρβοξυτελικής περιοχής της πρωτεΐνης επιτρέποντας την «εσωτερίκευση» στην πλασματική μεμβράνη. Η μεμβρανική θέση των πρωτεϊνών αυτών είναι απαραίτητη για τη λειτουργία τους.



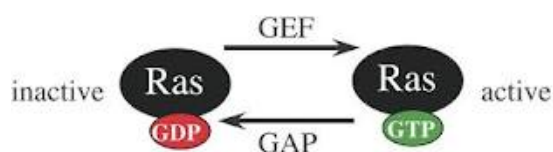
Σχήμα 3.3. Πρωτοταγής και τεταρτοταγής δομή των πρωτεϊνών H-, N- και K-ras. **(A)** Σύγκριση της ακολουθίας με τις μη συντηρητικές υποκαταστάσεις αμινοξέων, τονίζεται σε χρυσό. **(B)** Χαρτογράφηση των μεγάλων μη συντηρητικών υποκαταστάσεων και οι διαρθρωτικές περιοχές που εμπλέκονται στη λειτουργία των πρωτεϊνών *ras*.

Στην πραγματικότητα, οι μεταλλάξεις αυτές στην περιοχή 186-189 καθορίζουν την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, την ανενεργό Ras, και καταστέλουν την δράση μετασχηματισμού. Οι μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις είναι η φαρνεσυλίωση της C-186 μέσω αφαίρεσης των τριών καθοδικών αμινοξέων (AAX), που ακολουθείται από την μεθυλίωση της C-186 και τέλος με την παλμιτοϋλίωση των υπολειμάτων κυστεΐνης στην περιοχή 165-186. Η μετάλλαξη της κυστεΐνης στο τμήμα CAAX προλαμβάνει την φαρνεσυλίωση και την λειτουργία των Ras.

3.5. Δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών Ras

Η τρισδιάστατη δομή μιας πρωτεΐνης στο τέλος της διαδικασίας αναδίπλωσης αντιπροσωπεύει μια θερμοδυναμικώς σταθερότερη δομή. Γενικώς, η διάταξη αυτή εξαρτάται από την αλληλουχία των αμινοξέων της ή τουλάχιστον από εκείνα τα αμινοξέα από τις διατηρημένες περιοχές της τα οποία δεν μπορούν να αντικατασταθούν αφού φέρουν τις σημαντικότερες πληροφορίες για τον καθορισμό της σωστής τρισδιάστατης πρωτεϊνικής δομής. Οι πρωτεΐνες είναι ευέλικτες και ικανές για διακυμάνσεις της διάταξης τους. Η δομική αυτή κινητικότητα έχει μεγάλη λειτουργική σημασία. Οι μεταλλάξεις στις διατηρημένες περιοχές είναι υπεύθυνες για την λειτουργική τροποποίηση της πρωτεΐνης.

Πέντε μη γειτονικές περιοχές (5-63, 77-92, 109-123, 139-165, και 186-189) είναι απαραίτητες για την δράση των Ras και οι μεταλλάξεις στις περιοχές αυτές μπλοκάρουν την ικανότητα μετασχηματισμού της ογκογόνου πρωτεΐνης. Οι σημειακές μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12, 13, 59, 61 μπλοκάρουν την δράση GTPάσης, οδηγώντας σε δυνητικώς ογκογόνο πρωτεΐνη. Μεταλλάξεις σε άλλες θέσεις μπορούν να απαρεμποδίσουν την είσοδο της πρωτεΐνης στην μεμβράνη όπου εντοπίζονται οι ρυθμιστές και οι τελεστές της.



Σχήμα 3.4. Οι μορφές της πρωτεΐνης Ras. GAPs: πρωτεΐνες ενεργοποιητές GTPάσης (GTPase-activating proteins) GEFs: παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων της γουανίνης (guanine nucleotide exchange factors).

Η ανάλυση του συμπλέγματος της Ras με GTP ή GDP που πραγματοποιήθηκε με χρήση ακτίνων X παρέχει μια περιγραφή της εγγενούς πρωτεΐνης και της ογκογόνου μορφής, καταδεικνύοντας έτσι ότι αυτά τα αμινοξέα είναι σημαντικά για την λειτουργία της πρωτεΐνης. Η p21-Ras αποτελείται από έξι βήτα επιφάνειες και πέντε άλφα έλικες που συνδέονται με 10 αγκύλες. Η αγκύλη L1 περιέχει υπολλείματα γλυκίνης, Gly12 και Gly 13, τα οποία μεταλλάσσονται συχνότερα σε ανθρώπινους όγκους και οδηγούν σε ιδιοστατικώς ενεργό πρωτεΐνη. Τα σημαντικότερα υπολλείματα για τις αλληλεπιδράσεις της p21Ras με τους τελεστές της (θέση 32-40) βρίσκονται στην αγκύλη L2. Η αγκύλη L4 περιέχει γλουταμίνη 61 (Gln61) της οποίας η αντικατάσταση έχει ογκογονικό αποτέλεσμα. Τα υπολλείματα που εμπλέκονται σε πρωτεϊνική σύνδεση GAP/NF ενεργοποιούσα την GTPάση, βρίσκονται στην θέση 30-38 η οποία επίσης αποτελεί περιοχή αλληλεπίδρασης της Ras με τους τελεστές της. Τα αμινοξέα στις θέσεις 12, 59 και 61 είναι απαραίτητα για την ενεργοτητα GTPάσης της Ras μέσω διέγερσης του GAP/NF. Συγκεκριμένα η Gln61 σταθεροποιεί την εξωτερική φωσφορική ομάδα του GTP και φέρει ένα μόριο H₂O απαραίτητο για την πυρηνοφιλική πλήξη. Οι μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 και 59 παρεμποδίζουν την διορθωμένη θέση της Gln61 στο σύμπλεγμα μετάβασης κατά την GTP υδρόλυση. Το GAP/NF συμβάλλει στην τοποθέτηση της Gln61 στον σχηματισμό της καταλυτικής θέσης της Ras μέσω υπολλείματος αργινίνης που υπάρχει σε όλες τις GAPs. Το υπόλλειμα αυτό

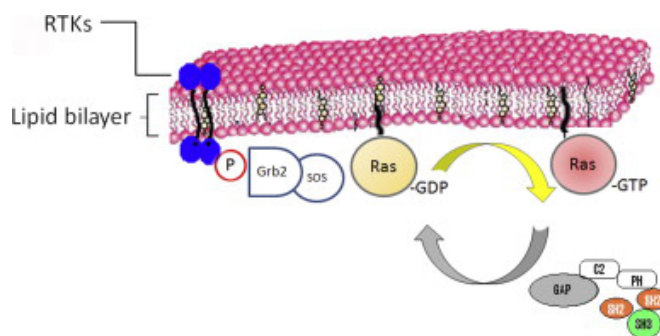
αλληλεπιδρά με φωσφορικά νουκλεοτίδια και εξουδετερώνει το αρνητικό φορτίο. Έτσι οι μεταλλάξεις στην Gly12 και Gln61, αναστέλλουν την υδρόλυση του GTP. Οι μεταλλάξεις της Ala59, μειώνουν το ανταλλασόμενο νουκλεοτιδικό φορτίο, μπλοκάρουν το Ras στο σύμπλεγμα που συνδέει το GTP, και οδηγούν σε ιδιοστατικός ενεργή πρωτεΐνη.

Η Ras ενεργοποιείται υπό φυσιολογικές συνθήκες ως απάντηση σε εξωκύτταρα σήματα, μέσω του αποτελέσματος που επιφέρει η αλληλεπίδραση της με παράγοντες ανταλλαγής γουανίνης (GEFs). Η κρυσταλλογραφική ανάλυση της Ras συνδεδεμένης με SOS (μια από τις πιο γνωστές GEF) αποκάλυψε ότι η GEF διεγείρει την απελευθέρωση. Η SOS επάγει την χωροταξική αλλαγή της Ras που ανοίγει τη θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου, και μπλοκάρει την αλληλεπίδραση με τα φωσφορικά του GDP και το Mg⁺⁺.

Η SOS διαχωρίζει το νουκλεοτίδιο από την Ras σε <1 sec. Σε απουσία της SOS το νουκλεοτίδιο αυτό απελευθερώνεται με kd=10⁻⁵ sec, μετά από περίπου 2 ώρες. Επιπρόσθετα, το σύμπλεγμα Ras/SOS δεν είναι πολύ σταθερό. Η θέση σύνδεσης του νουκλεοτιδίου παραμένει προσβάσιμη και το μόριο GTP, ιδιαιτέρως άφθονο στο κύτταρο, μετατοπίζει την SOS για να συνδεθεί με την Ras. Το σύμπλεγμα Ras/GTP δεν παραμένει ενεργό για πολύ αλλά ο ενδεδειγμένος έλεγχος που πραγματοποιείται από τις GAPs, απενεργοποιεί την Ras διεγείροντας την υδρόλυση του GTP [12].

3.6. Λειτουργία των πρωτεϊνών Ras

Η Πρωτεΐνη Ras τροποποιεί την κυτταρική απόκριση σε αρκετά μιτωγόνα ερεθίσματα και/ή παράγοντες διαφοροποίησης (π.χ. αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες, σήματα κυτταρικής προσκόλλησης) και σε εξωτερικά ερεθίσματα όπως η ακτινοβολία UV, και παράγοντες ώσμωσης μεταξύ άλλων.

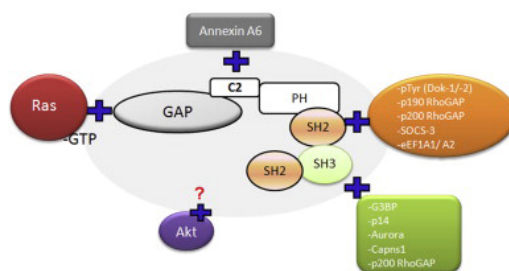


Σχήμα 3.5. Κύκλος Ras. Δέσμευση ανενεργού GDP και ενεργού GTP από Ras προκαλείται από υποδοχείς κίνησης τυροσίνης (RTK) και ελέγχεται από παράγοντα ανταλλαγής γουανίνης (GEF)

Τα ερεθίσματα αυτά ενεργοποιούν μια σειρά μονοπατιών μεταγωγής του σήματος που μπορούν να είναι είτε ανεξάρτητα είτε να συνδέονται μεταξύ τους σε διάφορα σημεία. Η Ras ενεργοποιείται μετά από αλληλεπίδραση αρκετών αυξητικών παραγόντων (EGF, PDGF και

άλλων) με τους υποδοχείς τους (τυροσινικής κινάσης) που αλληλοεπιδρώντας με προσδέτες τους αυτοφωσφορυλιώνουν στην τυροσίνη.

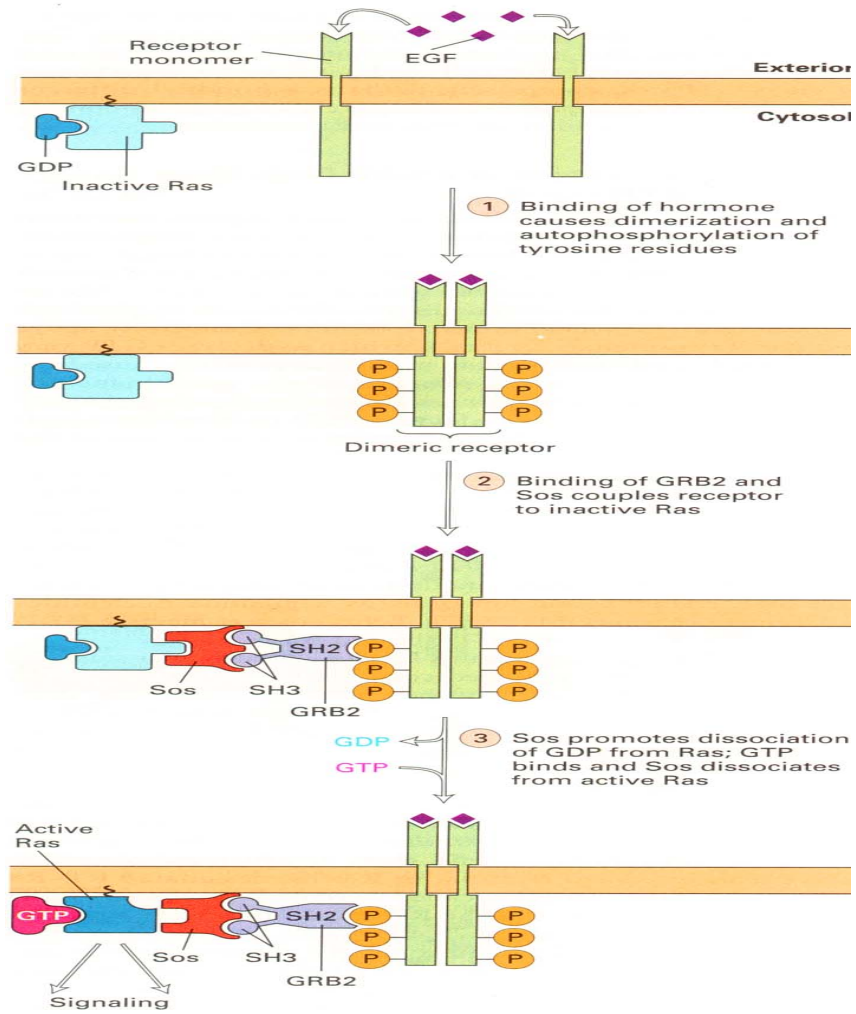
Οι πρωτεΐνες προσαρμοστές, όπως η προσδένουσα από το ν υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα πρωτεΐνη 2 (GRB2), αλληλεπιδρούν με τις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες του υποδοχέα μέσω των SH2 περιοχών και συνδέουν την Ras-GEF μέσω της SH3 περιοχής. Οι GEFs μεταφέρονται στη μεμβράνη όπου παράγουν την μετάπτωση της Ras στο ενεργό σύμπλεγμα Ras-GTP.



Σχήμα 3.6. Ras και GAP πρωτεΐνη δέσμευσης

Η Ras ταχέως απενεργοποιείται από τις GAPs που διεγείρουν την υδρόλυση του GTP. Αν και μεταβατική, η ενεργός πρωτεΐνη Ras είναι αρκετή για να διεγείρει την κυτταρική μεταγωγή του σήματος. Ο χρόνος και ο βαθμός της ενεργοποίησης της Ras εξαρτάται από την ένταση του πρωταρχικού σήματος και από την ειδική φύση. Η ενεργοποίηση της Ras θα μπορούσε να οδηγήσει σε διαφορετικά μονοπάτια μεταγωγής του σήματος υπεύθυνα για διαφορετικές κυτταρικές αποκρίσεις. Οι υποδοχείς σερπεντίνης (Serpetine receptors, STMR), που αλληλεπιδρούν με τριμερικές G πρωτεΐνες μπορούν επίσης να επάγουν την ενεργοποίηση της Ras.

Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras ενεργοποιεί μια σειρά από πρωτεϊνικά μόρια, μεταξύ των οποίων οι κινάσες Raf, η πρωτεΐνη Ral/GEF και η PI3K, που με τη σειρά τους ενεργοποιούν άλλα μόρια, με τελικό αποτέλεσμα τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, των μηχανισμών απόπτωσης, του κυτταροσκελετού ακτίνης και της κυτταρικής διαφοροποίησης [13-15]. Επιπλέον η πρωτεΐνη Ras ενεργοποιεί τη λειτουργία της πρωτεϊνικής κινάσης C και της αντλίας Na⁺/H⁺, το μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων και σε διάφορους τύπους κυττάρων τη μεταγραφή πολλών γονιδίων όπως ODC1, FOS, JUN, JUNB, MDR1, MYC, p2Ka/42A, TGFα και TGFβ, μυογενίνης, PDGF υποδοχέα και της φμπρονεκτίνης [16]. Δύο οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων, οι AP1/ATF και ETS, έχουν αναγνωριστεί ως βασικοί πυρηνικοί διαμεσολαβητές της λειτουργίας της πρωτεΐνης Ras. Η έκφραση του H-ras ενισχύει την ικανότητα ενεργοποίησης του NET, ενός παράγοντα που σχετίζεται με τον ETS και διαθέτει ομοιότητα αλληλουχίας με τρεις περιοχές του ELK1 και SAP1 [17].



Σχήμα 3.7. Ενεργοποίηση πρωτεΐνης Ras από τον EGF. Η πρόσδεση του EGF στον υποδοχέα του έχει ως αποτέλεσμα το διμερισμό του υποδοχέα, τη σύνδεση του με τον πρωτεϊνικό σύμπλεγμα GRB2-Sos και την επαγωγή από την πρωτεΐνη Sos της αποδέσμευσης του GDP από την πρωτεΐνη Ras

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

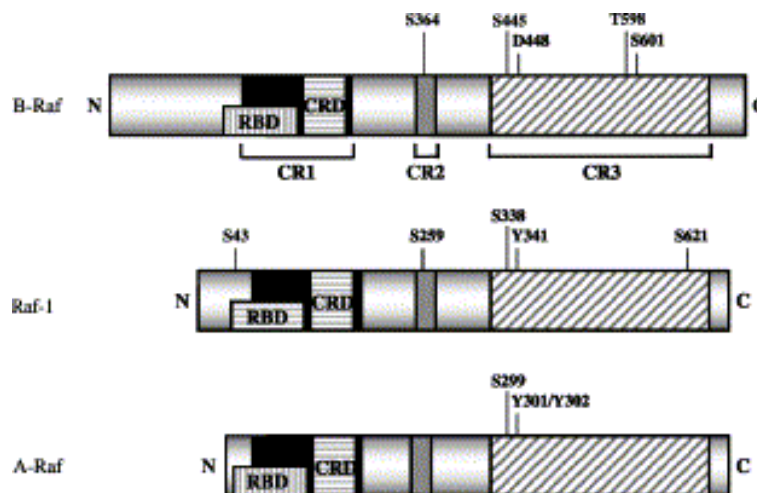
ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ *raf*

4.1. Γενικά

Τα γονίδια *raf* αναγνωρίστηκαν, αρχικά, σαν ογκογονίδια σε ρετροϊούς που προκαλούν όγκους σε ποντίκια και κοτόπουλα. Το πρώτο *raf* γονίδιο που αναγνωρίστηκε ήταν το *v-raf*, γονίδιο του ιού 3611 του σαρκώματος των ποντικών που προκαλεί ινοσάρκωμα και ερυθρολευχαιμία σε νεογέννητα ποντίκια, και το *C-raf* (ή *raf-1*) το οποίο είναι ομόλογο πρώτο-ογκογονίδιο του. Το *A-raf* βρέθηκε αργότερα εξετάζοντας cDNAs από τράπεζα δειγμάτων σπληνικού ιστού ποντικών. Μεταγενέστερα αναγνωρίστηκε το *v-Rmil* στον ρετροϊό των πτηνών Mill Hill no 2 (MH2) και βρέθηκε να είναι ομόλογο με το *v-raf*. Το *C-Rmill* αντιστοιχεί στο τρίτο *raf* γονίδιο των θηλαστικών, το *B-raf* και είναι ογκογονίδιο.

4.2. Δομή των γονιδίων *raf*

Η οικογένεια των *raf* γονιδίων Σχήμα 4.1., στα θηλαστικά περιλαμβάνει τα ακόλουθα τρία γονίδια: *A-raf*, *B-raf*, και *C-raf* [18], τα οποία εδράζουν στα χρωμοσώματα Xp11, 7q34, και 3q25, αντίστοιχα. Τα *raf* πρώτο-ογκογονίδια κωδικοποιούν τρεις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες ονομαζόμενες *A-raf*, *B-raf* και *C-raf* που μοιράζονται υψηλά διατηρημένες αμινο-τελικές ρυθμιστικές περιοχές και καταλυτικές καρβοξυ-τελικές περιοχές.



Σχήμα 4.1. Τα γονίδια *B-Raf*, *Raf-1* και *A-Raf*.

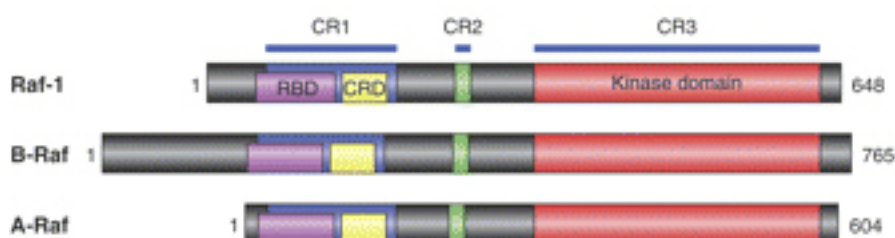
Οι *Raf* πρωτεΐνες ανήκουν στην κατηγορία πρωτεϊνών σερίνης-θρεονίνης κινάσης και έχουν ρυθμιστικό ρόλο στη μεταγωγή μιτωγόνων σημάτων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη στον πυρήνα. Κάθε είδος *Raf* πρωτεϊνών έχει διαφορετικό προφίλ έκφρασης στους ιστούς, γεγονός που συνηγορεί υπέρ του ότι οι διαφορετικές *Raf* πρωτεϊνικές ισομορφές έχουν

ξεκάθαρα ειδικές λειτουργίες. Οι C-Raf πρωτεΐνες εκφράζονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς. Οι A-Raf και B-Raf πρωτεΐνες έχουν πολύ πιο περιορισμένο προφίλ έκφρασης σε σχέση με την C-raf, με την A-Raf να υπερεκφράζεται σε ιστούς του ουρογεννητικού και την B-Raf να υπερεκφράζεται σε νευρικούς, σπληνικούς και αιμοποιητικούς ιστούς. Οι A-Raf και C-Raf ανευρίσκονται στα μιτοχόνδρια, γεγονός που στηρίζει το δεδομένο της αποπτωτικής δράσης τους αλλά δεν είναι ακόμη γνωστό σε ποιές ακριβώς ισομορφές εμπλέκονται.

Αν και οι Raf πρωτεΐνες ανήκουν στην κατηγορία πρωτεϊνών σερίνης-θρεονίνης και είναι ικανές να ενεργοποιήσουν τον καταρράκτη MAPK κινάσης, έχουν ειδικούς στόχους φωσφορυλίωσης στο μεταγωγικό μονοπάτι και παίζουν συγκεκριμένους ρόλους στην επαγωγή σήματος. Η διαφορετική λειτουργική δράση των μελών της Raf οικογένειας πρωτεϊνών στηρίζεται και από το γεγονός ότι είναι ετερογενείς οι απαντήσεις των B-Raf και C-Raf πρωτεϊνών σε όμοια ερεθίσματα, όπως εκείνα που προέρχονται, παραδείγματος χάρη, από τη Rap1, πρωτεΐνη με δράση GTPάσης. Η Rap1 ενεργοποιεί τη B-Raf μέσω μονοφωσφορικής κυκλικής αδενοσίνης (cAMP), η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την μιτωγόνα ενεργοποιούσα πρωτεϊνική κινάση (ERK) ενώ η ενεργοποίηση της C-Raf από τη Rap1 παρεμποδίζει τη φωσφορυλίωση της ERK.

4.3. Δομή των RAF πρωτεϊνών

Η δομή των Raf χαρακτηρίζεται από τα ακόλουθα στοιχεία: (1) ένα αμινοτελικό άκρο που περιέχει τη ρυθμιστική περιοχή; (2) μια αγκύλη ενεργοποίησης και (3) ένα καρβοξυτελικό άκρο που περιέχει την περιοχή της κινάσης.



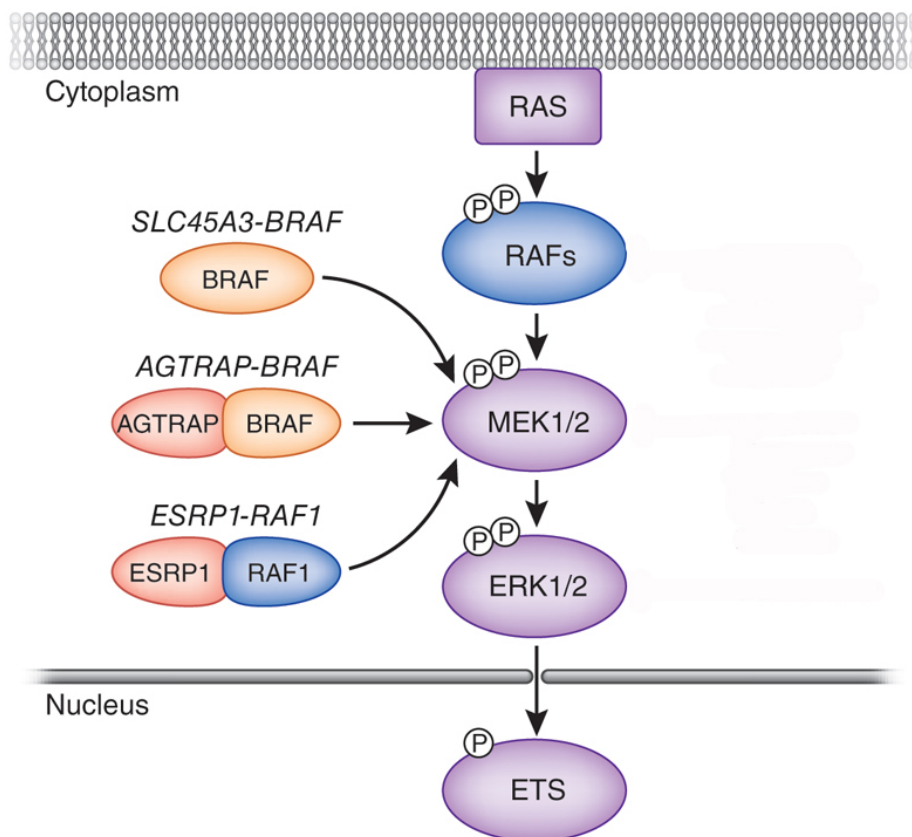
Σχήμα 4.2. Δομή πολυπεπτιδικής αλληλουχίας πρωτεΐνης Raf.

Όλες οι Raf κινάσες χαρακτηρίζονται από τρεις διατηρημένες περιοχές, την CR1 (προσκείμενη στο αμινοτελικό άκρο), την CR2, και CR3 (προσκείμενη στο καρβοξυτελικό άκρο). Η ρύθμιση της ενεργότητας της Raf κινάσης είναι πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει φωσφορυλίωση της ρυθμιστικής και καταλυτικής περιοχής της πρωτεΐνης καθώς και δια- ή ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Η αρχική διαδικασία της ενεργοποίησης της Raf περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση της ενεργά - συνδεδεμένης με GTP-Ras με την RBD της Raf και την γειτονική περιοχή, πλούσια σε κυστεΐνη και συνδέουσα ψευδάργυρο (CRD) της CR1, διευκολύνοντας την “στρατολόγηση” της Raf στην κυτταρική μεμβράνη για ενεργοποίηση. Ο ρόλος της CR2, η οποία είναι πλούσια σε υπολλείματα σερίνης και θρεονίνης, είναι λιγότερο σαφής. Ωστόσο, η φωσφορυλίωση των ομάδων εντός της CR2 και οι ποικίλες αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης επίσης

επηρεάζουν την θέση και την ενεργοποίηση της Raf. Έχουν βρεθεί απαλειφές των αμινοτελικών ρυθμιστικών περιοχών CR1 και CR2, παρόμοιες με την v-Raf σε αρκετούς τύπους ανθρώπινου καρκίνου με ενεργές μεταλλάξεις της Raf, προτείνοντας έτσι ότι οι περιοχές αυτές ρυθμίζουν αρνητικά την λειτουργία της Raf. Η CR3, η καταλυτική περιοχή της Raf, επίσης υπόκειται σε ρύθμιση μέσω φωσφορυλίωσης.

4.4. Τα ογκογονίδια *raf*

Τα ογκογονίδια *raf* συνιστούν μια οικογένεια γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν τις κινάσες σερίνης/θρεονίνης Raf-1, A-Raf και B-Raf [18]. Η φωσφορυλίωση των Raf κινάσων ενεργοποιεί έναν καταρράκτη αντιδράσεων με κύριους μεσολαβητές τις κινάσες MEK και MAP. Η ενεργοποίηση των Raf κινάσων συμβαίνει μετά την ενεργοποίηση των Ras, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.3 και η αλληλεπίδραση αυτή μεταξύ Ras-Raf φαίνεται πως είναι κυρίαρχη στην ενεργοποίηση του μονοπατιού της πρωτεΐνης Ras.



Σχήμα 4.3. Η ενεργοποίηση των Raf κινάσων από Ras GTP-άσες. Με τη σειρά τους οι Raf κινάσες ενεργοποιούν τις πρωτεϊνικές κινάσες MEK1 και MEK2 με φωσφορυλίωση σερίνης. MEK1 και MEK2 ενεργοποιούν τις MAP κινάσες ERK με φωσφορυλίωση μιας θρεονίνης και ενός υπολείμματος τυροσίνης στο τμήμα ενεργοποίησης του τομέα κινάσης. Ανάμεσα στην πληθώρα των ERK1/2 MAP κινάσης στόχοι είναι μια σειρά από μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας ETS, οι οποίοι εμπλέκονται στη καρκινογένεση

Τα ογκογονίδια raf έχουν αποκτήσει το τελευταίο διάστημα ιδιαίτερο ερευνητικό ρόλο, λόγω της ενεργοποίησης του B-Raf μέσω σημειακών μεταλλάξεων σε μια σειρά από καρκίνους συμπεριλαμβανομένων του μελανώματος και του καρκίνου του θυρεοειδούς [19,20].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

5.1. ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1.1. Συλλογή δειγμάτων

Για την παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα, χειρουργικώς εξαιρεθέντων ιστοτεμαχίων από καρκίνο του θυρεοειδούς. Τα δείγματα συλλέχθηκαν το χρονικό διάστημα από τον Ιούνιο του 2003 έως τον Μάιο του 2006 στην 1^η Χειρουργική κλινική του 251 Γενικού Νοσοκομείου Αεροπορίας, Αθηνών. Κάθε δείγμα εξετάστηκε παθολογοανατομικά για την επιβεβαίωση της ιστολογίας του. Κατεγράφησαν ατομικό και οικογενειακό ιστορικό των ασθενών, δημογραφικά και κλινικά στοιχεία. Μείζον κριτήριο αποτέλεσε η σποραδικότητα των όγκων. Δείγματα ιστών (φυσιολογικού και κακοήθου), τελικά, από 37 άτομα πληρούσαν κριτήρια υψηλής καταλληλότητας. Όλοι οι ασθενείς από τους οποίους προήλθαν τα δείγματα ήταν Έλληνες, λευκοί, με αρνητικό προηγούμενο ατομικό ή οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του θυρεοειδούς. Η μέση ηλικία ήταν 49,6 έτη. Οι ιστοί διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία μείον 80 °C, στο εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

5.1.2. Εκχύλιση DNA από τους ιστούς

Το DNA απομονώθηκε σύμφωνα με γνωστά πρωτόκολλα απομόνωσης DNA από συμπαγείς ιστούς. Ο ιστός τεμαχίζεται και ομογενοποιείται σε διάλυμα λύσης. Ο ομογενοποιημένος ιστός επωάζεται σε θερμοκρασία 60 °C για διάστημα 36-48 ωρών, προσθέτοντας ανά 12ωρο πρωτεΐνάση K σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml. Ακολουθεί εκχύλιση των νουκλεϊνικών οξέων με φαινόλη-χλωροφόρμιο, που συντελεί ταυτόχρονα στην απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης K. Στην υδατική φάση που παραμένει προστίθεται το 1/20 του όγκου 5M NaCl και 2,5 όγκοι ψυχρής (-20 °C) απόλυτης αιθανόλης για την κατακρήμνιση του DNA. Το DNA επανακτάται σαν ίζημα με φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C, πλένεται με ψυχρή αιθανόλη 70% για απομάκρυνση των αλάτων και αφήνεται μετά να στεγνώσει. Επαναδιαλύεται με 30-50 ml δισαπεσταγμένου-αποστειρωμένου ύδατος και διατηρείται σε θερμοκρασία 4 °C, ή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία -20 °C.

5.1.3. Έλεγχος της ποιότητας του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο έλεγχος της ποιότητας εκχύλισης του DNA γίνεται με την ανάλυση του σε πήκτωμα αγαρόζης παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου. Το DNA γίνεται ορατό κάτω από λάμπα υπεριώδους φωτός.

5.1.4. Εκχύλιση RNA από ιστούς

Σε όλους τους ιστούς έγινε εκχύλιση ολικού RNA με τη χρήση του πρωτοκόλλου του TRIzol (Invitrogen Corp). Οι ιστοί ομογενοποιούνται παρουσία του TRIzol και το RNA εκχυλίζεται με τη βοήθεια χλωροφορμίου, κατακρημνίζεται με τη χρήση ισοπροπανόλης, ξεπλένεται με απόλυτη αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε 50-100μl DEPC (diethyl pyrocarbonate) treated H₂O.

5.1.5. Φωτομέτρηση RNA και DNA

Για να προσδιοριστεί η ποσότητα και η καθαρότητα του RNA και του DNA κάθε δείγματος, έγινε φωτομέτρηση τους στα 260 και στα 280nm. Από την απορρόφηση στα 260nm προσδιορίζεται η συγκέντρωσή τους, ενώ ο λόγος 260/280 δίνει την καθαρότητα τους (κατά πόσο υπάρχουν υπολείμματα πρωτεϊνών ή και DNA στην περίπτωση του RNA). Λόγοι από 1.8 έως 2.0 είναι ιδανικοί για το RNA και από 1.5 έως 1.8 για το DNA.

5.1.6. Αντίστροφη Μεταγραφική

3 μg RNA από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του cDNA, με τη χρήση τυχαίων εκκινητών (random hexamers) και του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης Thermoscript. Αρχικά το RNA μαζί με τους τυχαίους εκκινητές και τα dNTPs θερμαίνονται στους 65°C για 5 λεπτά ώστε να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς δομές. Κατόπιν το μείγμα τοποθετείται στον πάγο, όπου προστίθεται η Thermoscript. Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται στους 25°C για 10 λεπτά ώστε να προσδεθούν οι τυχαίοι εκκινητές στην αλληλουχία στόχο και η αντίστροφη μεταγραφική τελείται στους 55°C για 50 λεπτά. Η αντίδραση τερματίζεται με την απενεργοποίηση του ενζύμου θερμαίνοντας τα δείγματα στους 85°C για 5 λεπτά. Το cDNA αποθηκεύεται στους -20°C μέχρι τη χρήση του.

5.1.7. Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

- **Αρχή μεθόδου:** Η αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR) επινοήθηκε το 1985 από τον Mullis και συν. και έφερε πραγματική επανάσταση στην μοριακή βιολογία με εφαρμογές από την μοριακή έρευνα στην κλινική πράξη. Η μέθοδος αυτή επιτυγχάνει σε ελάχιστο χρόνο, που δεν υπερβαίνει τις 2-3 h, την ενίσχυση με εκθετικό τρόπο, συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, ώστε να είναι δυνατή η μελέτη τους και ο περαιτέρω χειρισμός τους. Η τεράστια απόδοση της αντίδρασης κάνει δυνατή την ενίσχυση αλληλουχιών, ακόμα και όταν αυτές βρίσκονται σε ελάχιστο αριθμό αντιγράφων ή το DNA έχει υποστεί μία σχετική αποδιάταξη.

Το υπόστρωμα DNA επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει την θερμοανθεκτική *Taq* DNA πολυμεράση που προέρχεται από θερμοφιλά βακτήρια, μίγμα δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPS) και το ζεύγος των εκκινητών (primers). Αρχικά γίνεται θερμική αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 5min και ακολουθούν 30-40 κύκλοι 95°C (αποδιάταξη), 55-60°C (υβριδισμός των εκκινητών) και 72°C (πολυμερισμός), διάρκειας περίπου 30sec το κάθε βήμα. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του DNA σύμφωνα με την εξίσωση $N=N_0(1+e)^n$, όπου N η τελική ποσότητα του προϊόντος, N_0 η αρχική ποσότητα του υποστρώματος, e η απόδοση της αντίδρασης και n ο αριθμός των κύκλων της PCR αντίδρασης.

Παράγοντες που επιδρούν στην PCR: Οι κυριότεροι παράγοντες που συνεισφέρουν στην επίτευξη ικανοποιητικής αντίδρασης πολυμερισμού όσον αφορά την ευαισθησία, την εξειδίκευση αλλά και την απόδοση, περιγράφονται στην συνέχεια:

Επιλογή κατάλληλων εκκινητών: Η ειδικότητα της PCR αντίδρασης ως προς την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί εξαρτάται από τους εκκινητές. Ο καλός σχεδιασμός για την επιλογή εκκινητών αποτελεί σημαντικότατο παράγοντα για την επιτυχία της PCR. Στατιστικά, έχει βρεθεί ότι όταν μία αλληλουχία DNA έχει μήκος τουλάχιστον 20 bp, τότε είναι μοναδική στο γονιδίωμα και κατά συνέπεια, για να επιτευχθεί ειδική ενίσχυση αλληλουχιών πρέπει οι εκκινητές να είναι τουλάχιστον 20-μερή. Προτιμούνται εκκινητές που (α) έχουν περιεκτικότητα σε γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C) παρόμοια με το τμήμα DNA που θα ενισχυθεί, (β) δεν έχουν σημαντική δευτεροταγή δομή ούτε αλληλεπικάλυψη ειδικά στο 3' άκρο, (γ) δεν έχουν εκτάσεις από πολυουρίνες ή πολυπυριμιδίνες και (δ) το ζεύγος των εκκινητών δεν εμφανίζει συμπληρωματικότητα και δε σχηματίζει διμερή (primer dimers) με αποτέλεσμα την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων.

Επιλογή θερμοκρασίας υβριδοποίησης εκκινητών (annealing temperature): Η θερμοκρασία υβριτισμού ποικίλλει ανάλογα με το μήκος και τη σύσταση των εκκινητών σε βάσεις GC, και το είδος του υποστρώματος DNA. Ως ιδανική θερμοκρασία υβριτισμού T_m θεωρείται αυτή στην οποία το 50% των μορίων είναι αποδιατεταγμένο. Υψηλές θερμοκρασίες επιτυγχάνουν περισσότερο εξειδικευμένο υβριτισμό, χαμηλής όμως απόδοσης. Η επιλογή χαμηλότερης θερμοκρασίας αυξάνει την απόδοση σε βάρος της ειδικότητας, με αποτέλεσμα τον κίνδυνο δημιουργίας παραπροϊόντων της PCR.

Επιλογή συγκέντρωσης δεσόξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και ιόντων Mg: Τα ιόντα Mg^{2+} είναι μεταλλικός συμπαράγοντας της Taq πολυμεράσης και η μεν περίσσεια τους μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του μη ειδικού προϊόντος λόγω αύξησης της ενεργότητας της πολυμεράσης, η δε έλλειψή της οδηγεί σε μειωμένη απόδοση προϊόντος. Με δεδομένο ζεύγος εκκινητών, συνήθως η κανονικοποίηση των συνθηκών σε μία αντίδραση PCR, περιλαμβάνει πειράματα όπου σταδιακά μεταβάλλονται ανεξάρτητα μεταξύ τους η θερμοκρασία αναδιάταξης και η συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} .

Αριθμός κύκλων: Συνήθως ο βέλτιστος αριθμός κύκλων είναι 25-30 και προσδιορίζεται πειραματικά με βάση την καλύτερη δυνατή απόδοση προϊόντος με το λιγότερο μη ειδικό προϊόν. Μετά από έναν αριθμό κύκλων η αντίδραση φτάνει σε μια στατική φάση (plateau) κατά την οποία νέα αύξηση του αριθμού των κύκλων δεν οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης. Για ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR απαραίτητη προϋπόθεση είναι να τερματίσει η αντίδραση, ενώ ακόμα βρίσκεται στην εκθετική της φάση. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να γίνει γραμμική αντιστοίχιση της τελικής ποσότητας προϊόντος στην αρχική ποσότητα υποστρώματος. Συνήθως επιτελούνται προκαταρκτικά πειράματα με διαδοχικές αραιώσεις αρχικού υποστρώματος (δημιουργία πρότυπης καμπύλης), ώστε να βρεθούν οι συνθήκες εκείνες όπου διατηρείται η γραμμική αυτή σχέση. Ακόμα περισσότερο αξιόπιστη είναι η συνενίσχυση με την αλληλουχία στόχο, σταθερής ποσότητας υποστρώματος στο οποίο οι θέσεις αναγνώρισης των εκκινητών ταυτίζονται με αυτή της αλληλουχίας-στόχου. Με τον τρόπο αυτό επιτελείται συναγωνισμός ανάμεσα στις δύο αλληλουχίες που συνενισχύονται, οπότε η αφθονία των αρχικών αντιγραφών της αλληλουχίας στόχου εκφράζεται σαν ο λόγος της ως προς την ένταση της ζώνης που αντιστοιχεί στον συναγωνιστή.

Παρουσία ενισχυτών και αναστολέων: Αναστολείς μπορεί να υπάρχουν είτε στα βιολογικά δείγματα είτε στα χημικά αντιδραστήρια. Παράδειγμα αναστολέων είναι ιοντικά επιφανειοδραστικά όπως το SDS. Ουσίες-ενισχυτές της αντίδρασης αποτελούν το φορμαμίδιο (5%), πολυαιθανογλυκόλη (PEG) (5-15%) κ.α.

5.1.8. Συνθήκες αντιδράσεων PCR και εκκινητές

Gene	Primer pair sequence (5' – 3')	Tm	PCR product (bp)
K-ras (DNA)	ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT TCAAAGAATGGTCCTGGACC	58 °C	157
H-ras (DNA)	GAGACCCTGTAGGAGGACCC GGGTGCTGAGACGAGGGACT	60 °C	312
N-ras (DNA)	AACTGGTGGTGGTTGGACCA ATATTCATCTTACAAAGTGGTCCTGGA	60 °C	83
B-Raf (DNA)	CGGCATCGTCACCAACTG GGCACACGCAGCTCATTG	58 °C	224
β-actin (DNA)	CGGCATCGTCACCAACTG GGCACACGCAGCTCATTG	60 °C	70

Πίνακας 5.1. Συνθήκες αντιδράσεων Real Time PCR και εκκινητές

Μισό έως 2 µg του εκχυλίσματος DNA από κάθε δείγμα υφίσταται ενζυμική ενίσχυση σε τελικό όγκο 25 µl. Η αντίδραση περιλαμβάνει 3.0 mM µl ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης, 10 mM από κάθε dNTP, 0.5 mM από κάθε εκκινητή και 1.25 u πολυμεράσης. Το μίγμα αρχικά επωάζεται για 1 λεπτό στους 96 °C και ακολουθούν 39 κύκλοι ενίσχυσης με τις ακόλουθες συνθήκες:

K-Ras: για την ενίσχυση της περιοχής του κωδικονίου 12 και την ανίχνευση μεταλλάξεων σε αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές sense 5'ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3' και 5'-TCAAAGAATGGTCCTGGACC-3' antisense. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR είναι οι εξής: 94 °C για 30 sec, 58 °C για 30 sec και 72 °C για 30 sec. 5 µl από το κάθε προϊόν της PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η ενίσχυση της προς έλεγχο περιοχής 157bp.

N-Ras: για την ενίσχυση και την ανίχνευση μεταλλάξεων σε αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 5'-AACTGGTGGTGGTTGGACCA -3'sense 5'-ATATTCATCTTACAAAGTGGTCCTGGA -3' antisense. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR είναι οι εξής: 94 °C για 35 sec, 60 °C για 40 sec και 72 °C για 40 sec. 5 µl από το κάθε προϊόν της PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η ενίσχυση της προς έλεγχο περιοχής 83bp.

H-Ras: για την ενίσχυση και την ανίχνευση μεταλλάξεων σε αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 5'-GAGACCCTGTAGGAGGACCC -3'sense 5'-GGGTGCTGAGACGAGGGACT -3'antisense. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR είναι οι εξής: 94 °C για 35 sec, 60 °C για 40 sec και 72 °C για 40 sec. 5 µl από το κάθε προϊόν της PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η ενίσχυση της προς έλεγχο περιοχής 312bp.

B-Raf: για την ενίσχυση και την ανίχνευση μεταλλάξεων σε αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3' sense 5'-GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA-3' antisense. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR είναι οι εξής: 94 °C για 35 sec, 58 °C για 40 sec και 72 °C για 40 sec. 5 μl από το κάθε προϊόν της PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η ενίσχυση της προς έλεγχο περιοχής 224bp.

5.1.9. Ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (PCR-RFLP)

Gene	PCR product (bp)	RFLP products (bp)
K-ras	157	113, 29 and 15 (wt) 142 and 15 (mut)
H-ras	312	236, 55 and 21 (wt) 291 and 21 (mut)
N-ras	83	41, 19, and 23 (wt) 60 and 23 (mut)
B-Raf	224	V:124+87+13 E:211+13

Πίνακας 5.2. Προϊόντων PCR-RFLP

Η μέθοδος αυτή, η οποία είναι η πέψη δίκλωνων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών από περιοριστικά ένζυμα (restriction enzymes), χρησιμοποιείται συνήθως για την ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων και πολυμορφισμών στα γονίδια επιλογής. Η πέψη με το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού γίνεται μετά την ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου με τη μέθοδο της PCR, γι' αυτό και η μέθοδος είναι γνωστή ως PCR-RFLP. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό μεταλλάξεων. Μέρος των προϊόντων της PCR (10μl από κάθε προϊόν) υπέστησαν πέψη με 5U της περιοριστικής ενδονουκλεάσης για 16 ώρες στους 37°C, οπότε προέκυψαν τμήματα DNA διαφορετικού μήκους για τον κάθε γονότυπο (το ένζυμο κόβει την αλληλουχία στόχο). Τα προϊόντα της πέψης αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

5.1.10. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης και ακρυλαμιδίου

Το DNA ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης ή ακρυλαμιδίου, ανάλογα με το μέγεθος του DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί και τη διακριτική ικανότητα που προσδοκάται να επιτευχθεί. Το πήκτωμα ακρυλαμιδίου (συνήθως 8-10% με 29:1 μίγμα ακρυλαμιδίου/bis-ακρυλαμιδίου) επιλέγεται για μικρότερα τμήματα DNA και για μικρές διαφορές μεγέθους ανάμεσά τους. Η πήξη επιτυγχάνεται για την αγαρόζη με στερεοποίησή της με την πτώση θερμοκρασίας, ενώ για το ακρυλαμίδιο με την προσθήκη 50μl τετραμεθυλ-αιθυλενο-διαμίνης (TEMED) και 600μl υπερθειικού αμμωνίου 10% για κάθε 60ml διαλύματος ακρυλαμιδίου. Το δείγμα DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί, επαναιωρείται σε διάλυμα φόρτωσης που περιέχει 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανό του ξυλενίου και 40% γλυκερόλη. Και στις δύο περιπτώσεις η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε υδατικό μέσο με ρυθμιστικό διάλυμα 0.5× TBE (0.09 Tris-HCl, 0.09M Βορικό οξύ, 2.5mM EDTA, pH 8.3).

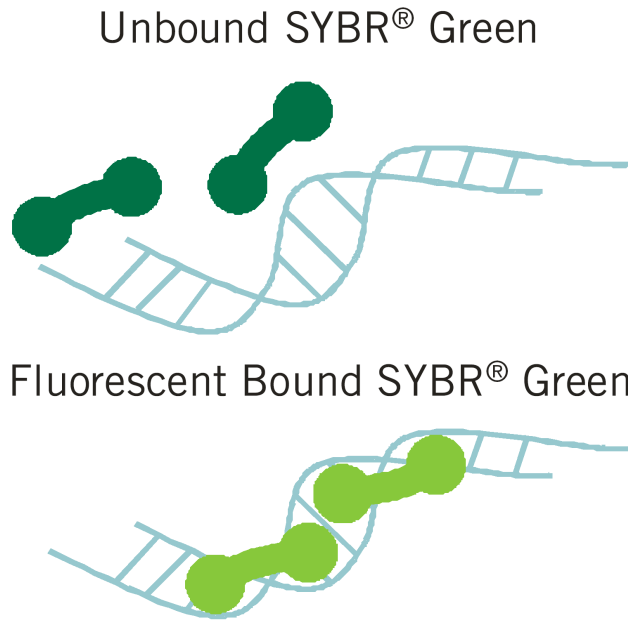
5.1.11. Χρώση νουκλεϊκών οξέων με βρωμιούχο αιθίδιο

Η χρώση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιείται με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου σε συγκέντρωση 10ng/mL κατά την παρασκευή του πηκτώματος. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές κατόπιν έκθεσης του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

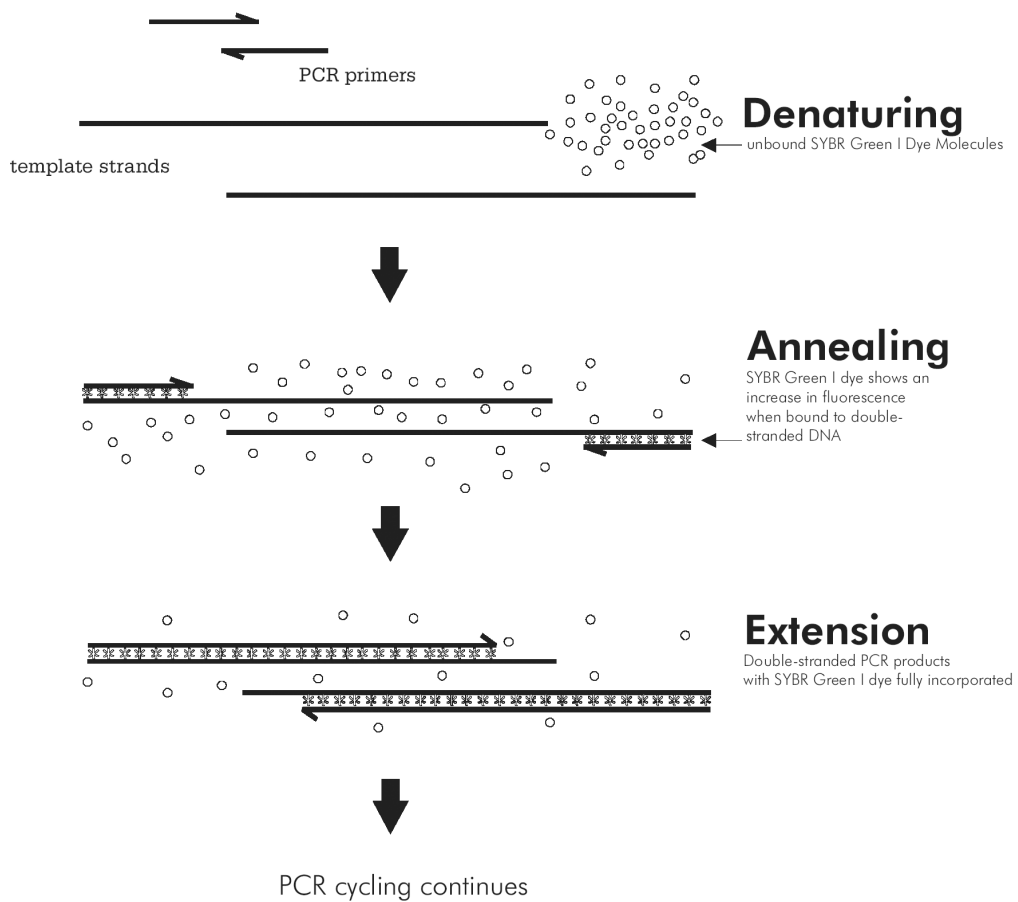
5.1.12. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του mRNA των γονιδίων, αντικαθιστώντας τη λιγότερο αξιόπιστη και χαμηλότερης ευαισθησίας και ακρίβειας μέθοδο της RT-PCR. Χρησιμοποιούνται κυρίως δύο χημείες, αυτή της SYBR Green I (Σχήμα 5.1 και Σχήμα 5.2) και των ιχνηθετών Taqman (Taqman probes) (Σχήμα 5.3), κάθε μία με τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της.

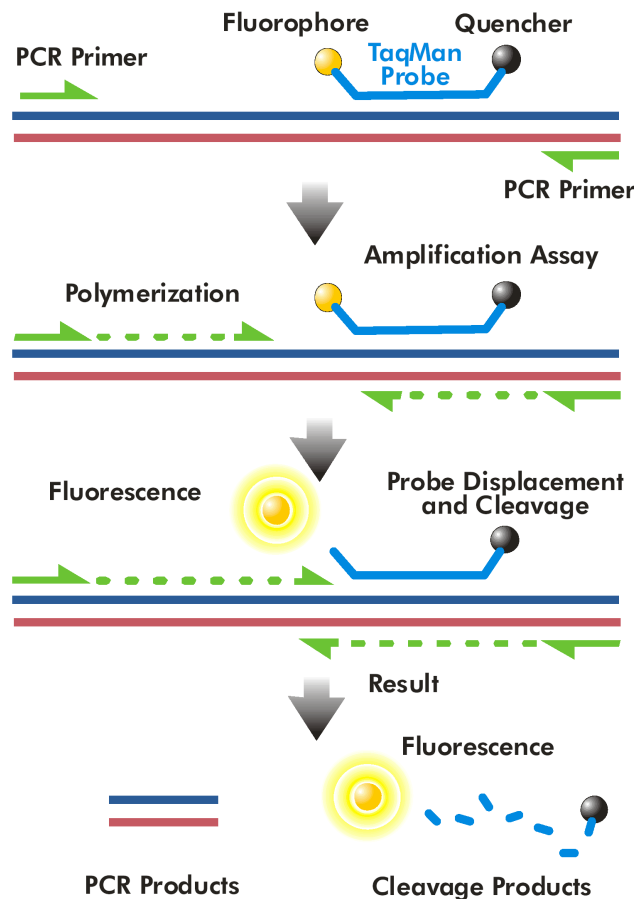
Η χρήση της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative Real-Time PCR) έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της παλαιότερης ημι-ποσοτικής RT-PCR μεθόδου. Κατά πρώτο και κύριο λόγο τα αποτελέσματά της είναι πιο αξιόπιστα, καθώς η ποσοτικοποίηση δεν πραγματοποιείται κατά τους τελευταίους κύκλους της αντίδρασης της PCR, όπου διάφοροι ανασταλτικοί παράγοντες (διμερή εκκινητών, εξάντληση του Mg^{2+} και των dNTPs, απώλεια ενζυμικής ενεργότητας της πολυμεράσης) μπορούν να τροποποιήσουν τη δημιουργία του PCR προϊόντος, αλλά κατά τους αρχικούς κύκλους της ποσοτικοποίησης, όπου τέτοιοι περιορισμοί δεν ισχύουν. Επιπλέον, στην RT-QPCR η συλλογή των δεδομένων γίνεται με λέιζερ, το οποίο είναι σαφώς πιο ευαίσθητο από το βρωμιούχο αιθίδιο ή τον Ag^+ , απεικονιστικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την εμφάνιση των προϊόντων στις κλασσικές PCR. Εξοικονομεί επίσης χρόνο, καθώς η όλη διαδικασία κρατάει λίγο περισσότερο από μια απλή PCR, ενώ η ημι-ποσοτική PCR απαιτεί την ανάλυση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδιου, διαδικασίες χρονοβόρες. Η ποσοτικοποίηση των δεδομένων γίνεται συνήθως αυτόματα στην Real-Time PCR από το λογισμικό του μηχανήματος, και δεν απαιτεί τη χρήση λογισμικού επεξεργασίας εικόνων, που και είναι ακριβά, αλλά και το μεγαλύτερο μέρος της δουλειάς γίνεται χειροκίνητα, κάτι που χρειάζονται οι παλαιές τεχνικές ποσοτικοποίησης. Υπάρχουν και μερικά μειονεκτήματα. Είναι πιο δαπανηρή τεχνική (μία παρενέργεια της αυξημένης ευαισθησίας του συστήματος), καθώς απαιτεί βελτιστοποιημένα υλικά. Οι αναλύσεις γίνονται σε τριπλέτες, κάτι που αυξάνει το κόστος δραματικά (περισσότερα PCR master mixes και επιπλέον κιτ αντίστροφης μεταγραφής, το οποίο σημαίνει ότι τα δείγματα ιστών, τα οποία συνήθως είναι η περιουσία ενός εργαστηρίου, εξαντλούνται πιο γρήγορα). Άλλα μειονεκτήματα είναι το υψηλό κόστος συντήρησης, εξαιτίας των εξαρτημάτων υψηλής τεχνολογίας που διαθέτει, όπως το λέιζερ, και το γεγονός ότι κατά τη διάρκεια της ποσοτικοποίησης δε βλέπει κανείς τα προϊόντα της PCR, ώστε να ξέρει κατά πόσο οι καμπύλες ποσοτικοποίησης είναι οι σωστές και δεν έχουν προέλθει από διμερή εκκινητών ή πάρα-προϊόντων. Αυτό απαιτεί, τουλάχιστον στα αρχικά πειράματα, την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της Real-Time PCR με την ανάλυσή τους σε πήκτωμα αγαρόζης ή ακρυλαμίδιου.



Σχήμα 5.1: Η δεσμευμένη στο δίκλωνο μόριο DNA χρωστική SYBR Green I φθορίζει 1000 φορές περισσότερο από την κυκλοφορούσα ελεύθερη στο διάλυμα χρωστική.



Σχήμα 5.2: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I.



Σχήμα 5.3: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου με τη χρήση ιχνηθετών της χημείας Taqman. Οι ιχνηθέτες αυτοί βασίζονται στην ιδιότητα της Taq DNA πολυμεράσης να δρα και ως 5'-3' εξωνουκλεάση, αποκόπτοντας τους κατά τη διάρκεια της υβριδοποίησης με τη συμπληρωματική αλληλουχία στόχο, ελευθερώνοντας τη φθορίζουσα ουσία.

Ο προσδιορισμός της έκφρασης του mRNA των γονιδίων που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή έγινε με ποσοτικό τρόπο με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction ή RT-QPCR). Ως γονίδιο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β-actin. Η ανίχνευση των σχηματιζόμενων προϊόντων έγινε με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I.

Αρχικά έγινε προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών της PCR (συγκέντρωση εκκινητών και θερμοκρασία πρόσδεσής τους στο cDNA, Πίνακας 5.3.). Το τελικό PCR για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων ήταν: 1× SYBR Green Master Mix, 300nM primers γονιδίου στόχου, 300nM primers γονιδίου αναφοράς (β-actin) και 100ng cDNA σε τελικό όγκο 20μl. Οι αντιδράσεις για τον προσδιορισμό της έκφρασης του γονιδίου στόχου και της β-actin έγιναν σε διαφορετικά 96-well plates. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο Mx3000 Real-Time Thermal Cycler (Stratagene) με το ακόλουθο πρόγραμμα: αρχική θέρμανση των δειγμάτων στους 95°C για 10 λεπτά για την αποδιάταξη τους και την ενεργοποίηση της hot-start πολυμεράσης, 40 κύκλοι με θέρμανση στους 95°C για 30sec, αναδιάταξη των εκκινητών (annealing) στους 60°C για 30sec και πολυμερισμός (extension) στους 72°C για 30sec. Μετά το πέρας των κύκλων του

πολυμερισμού, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας τους (0.2°C/sec) από τους 55°C στους 95°C ώστε να προσδιοριστεί η καμπύλη αποδιάταξης τους (Melting curve). Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, έγινε ανάλυση ενδεικτικά κάποιων δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογράφιση των PCR προϊόντων κάτω από υπεριώδες φως (UV).

Gene	Primer pair sequence (5' – 3')	Tm	PCR product (bp)
N-ras (RNA)	GCCATCAATAATAGCAAG ATAGGTACATCATCCGAGT	45° C	86
K-ras (RNA)	GGGGAGGGCTTTCTTTGTGTA GTCCTGAGCCTGTTTGTGTC	60 °C	174
H-ras (RNA)	GGGGCAGTCGGCCTGTGAA CCGGCGCCACCACCACCAG	65 °C	110
B-Raf (RNA)	GGGGCAGTCGGCCTGTGAA CCGGCGCCACCACCACCAG	60 °C	101
β-actin (RNA)	GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA GTCATTGATGGCAACAATATCCACT	60 °C	70

Πίνακας 5.3. Συνθήκες αντιδράσεων Real Time PCR και εκκινητές

Για κάθε δείγμα έγινε ο προσδιορισμός της σχετικής ποσότητας τόσο του γονιδίου στόχου όσο και της β-actin και υπολογίστηκε ο λόγος τους. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε ο μέσος όρος των λόγων για τα φυσιολογικά δείγματα και με βάση αυτή την τιμή πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση των καρκινικών δειγμάτων και των δειγμάτων καλοήθους υπερπλασίας προστάτη. Αναλογίες δειγμάτων ασθενών προς τα φυσιολογικά δείγματα μεγαλύτερες από 2 θεωρήθηκαν ως υπερέκφραση του γονιδίου στόχου, ενώ μικρότερες του 0.5 θεωρήθηκαν ως υποέκφραση.

5.1.13. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά στοιχεία των ασθενών έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS 11.5. Τα στατιστικά τεστ που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα Chi-square, Fisher's exact, Student's T, Mann-Whitney U, Kruskal-Wallis H, Spearman's rho και Kaplan-Meier. Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε όταν $P < 0.05$

5.2. ΥΛΙΚΑ

5.2.1. Διαλύματα

5.2.1.1. Διαλύματα απομόνωσης DNA, RNA και πρωτεϊνών

- Φαινολικό διάλυμα απομόνωσης RNA και πρωτεϊνών: TRIzol (Invitrogen)
- Ισοπροπανόλη 100% (Merck)
- EtOH 70% και 100% (Merck)
- dH₂O κατεργασμένο με DEPC (Invitrogen)

- 0.1M κιτρικό νάτριο σε 10% αιθανόλη
- 0.3M υδροχλωρική γουανιδίνη σε 95% αιθανόλη
- 1% SDS
- Reagent A: Tris-base (10mM), Sucrose (320mM), MgCl₂·6H₂O (5mM), Triton-X-100 (1% v/v). Ρύθμιση pH=8.0 χρησιμοποιώντας HCl 37%
- Reagent B: Tris-base (400mM), NaCl (150mM), EDTA (60mM), SDS (1% w/v). Ρύθμιση pH=8.0 χρησιμοποιώντας HCl 37%. Το SDS προστίθεται μετά την αποστείρωση του διαλύματος.

5.2.1.2. Ηλεκτροφορητικά διαλύματα

- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (0.5x TBE): 0.09 TrisHCl, 0.09M Βορικό οξύ, 2.5mM EDTA, pH 8.3
- Διάλυμα φόρτωσης DNA: 0.25% κυανούν της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανούν του ξυλενίου και 40% γλυκερόλη

5.2.2. Ένζυμα

- Platinum Taq DNA πολυμεράση (Invitrogen)
- Thermoscript αντίστροφη μεταγραφάση (Invitrogen)
- Rnase free Dnase I (Invitrogen)
- Rnase OUT (Invitrogen)
- XbaI (Fermentas)
- Πρωτεΐνάση K (Invitrogen)

5.2.3. Υλικά και εταιρείες προέλευσης

Υλικό	Εταιρία		Υλικό	Εταιρία
Αγαρόζη	Invitrogen		Μεθανόλη	Fluka
Αιθανόλη	Merck		MOPS	Sigma
Ακρυλαμίδιο	BDH		Οξεϊκό οξύ	BDH
Ανθρακικό νάτριο	Sigma		SDS	BDH
Βορικό οξύ	BDH		TEMED	Sigma
Bromophenol blue	Sigma		Tris base	BDH
Βρωμιούχο αιθίδιο	BDH		Tween 20	Sigma
CAPS	Sigma		Υδροξείδιο του Νατρίου	Sigma
Γλυκερόλη	Invitrogen		Υδροχλωρικό οξύ	BDH
Διθειοθρεΐτόλη	Sigma		Υδροχλωρική γουανιδίνη	BDH
dNTPS	Invitrogen		Φαινόλη	BDH
EDTA	BDH		Φορμαλδεύδη	BDH
Ισοπροπανόλη	BDH		Χλωριούχο νάτριο	Sigma
Κιτρικό νάτριο	BDH		Χλωροφόρμιο	Fluka
SYBR® Green I	Fermentas		R1881	PerkinElmer
Flutamide	LKT Labs		Bicalutamide	LKT Labs

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ

6.1. Δείγματα που αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης

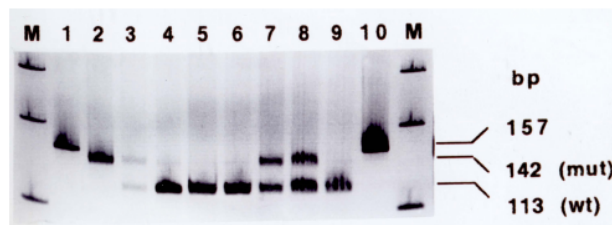
Στα πλαίσια της μελέτης του πρότυπου έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων K-Ras, N-Ras, H-Ras & B-Raf, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 32 ζεύγη δειγμάτων ιστού από θυρεοειδή αδένες (Πίνακας 6.1). Κάθε ζεύγος αποτελούνταν από καρκίνο του θυρεοειδούς και παρακείμενο φυσιολογικό ιστό από τον ίδιο ασθενή, ο οποίος εκτιμήθηκε παθολογοανατομικά ως φυσιολογικός-ελεύθερος κακοήθειας [βλέπε Κεφ. V, συλλογή δειγμάτων].

6.2. Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στα γονίδια *ras*

Στα πλαίσια της μελέτης της ενεργοποίησης των γονιδίων *ras* σε καλοήθους και κακοήθους όγκους του θυρεοειδούς αδένος έγινε αναζήτηση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 των γονιδίων *H-ras*, *K-ras* και *N-ras*. Το κωδικόνιο 12 είναι αυτό στο οποίο ανευρίσκονται συχνότερα μεταλλάξεις που ενεργοποιούν τα γονίδια *ras* [21]. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει αρχικά ενίσχυση του DNA της περιοχής του κωδικονίου με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR). Στη συνέχεια πέπτονται με περιοριστικές ενδονουκλεάσες τα προϊόντα της αντίδρασης και αναλύονται οι πολυμορφισμοί μήκους των περιοριστικών θραυσμάτων που προκύπτουν (RFLP). Η μελέτη εντοπίστηκε μόνο στο κωδικόνιο 12 των γονιδίων *ras* εξαιτίας της συχνότερης εμφάνισης μεταλλάξεων στο κωδικόνιο αυτό σε καρκίνους του ανθρώπου [22].

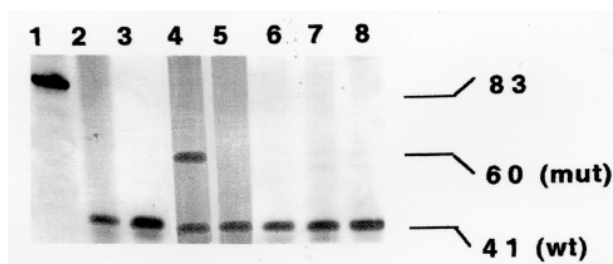
Μελετήθηκαν συνολικά 32 δείγματα (Πίνακας 6.2.1) σε καλοήθους και κακοήθους όγκους του θυρεοειδούς αδένος, με την ανάλυση αυτή. Μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *K-ras* ανευρέθησαν σε 10 περιπτώσεις (ποσοστό 31,25%) (Εικόνα 6.2.1).

Μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *N-ras* ανευρέθησαν σε 1 περίπτωση (Εικόνα 6.2.2). Δεν ανευρέθησαν μεταλλάξεις στο εν λόγω κωδικόνιο στο γονίδιο *H-ras*.



Εικόνα 6.2.1. Μεταλλάξεις του κωδικονίου 12 του γονιδίου *K-ras*, με τη μέθοδο PCR-RFLP. Οι ηλεκτροφορητικές στήλες 3, 7 και 8 αντιστοιχούν σε μεταλλαγμένα δείγματα, ενώ οι 4, 5, 6 και 9 σε

φυσιολογικό γονίδιο. Στη στήλη 2 ηλεκτροφορεύεται ο θετικός μάρτυρας για μετάλλαξη (SW 480 κυτταρική σειρά). Οι στήλες 1 και 10 περιέχει άπεπτο PCR προϊόν.



Εικόνα 6.2.2. Μεταλλάξεις του κωδικονίου 12 του γονιδίου *N-ras*, με τη μέθοδο PCR-RFLP. Οι ηλεκτροφορητική στήλη 4 αντιστοιχεί σε μεταλλαγμένο δείγμα, ενώ οι 2, 3, 5, 6, 7 και 8 στο φυσιολογικό γονίδιο. Η στήλη 1 περιέχει άπεπτο PCR προϊόν.

	K-Ras (%)	H-Ras (%)	N-Ras (%)	Total (%)
Benign	6/19 (31.6)	0/19 (0.0)	0/19 (0.0)	6/19 (42.1)
Malignant	4/13 (30.8)	0/13 (0.0)	1/13 (7.7)	4/13 (30.8)*
Total	10/32 (31.3)	0/32 (0.0)	1/32 (3.1)	10/32 (31.3)*

*N-Ras mutation at sample coded as 49 was concurrent with a K-Ras mutation

Πίνακας 6.2.1. Συχνότητα μεταλλάξεων των γονιδίων K-, H- και N-Ras σε καλοήθης και κακοήθης όγκους του θυρεοαειδούς.

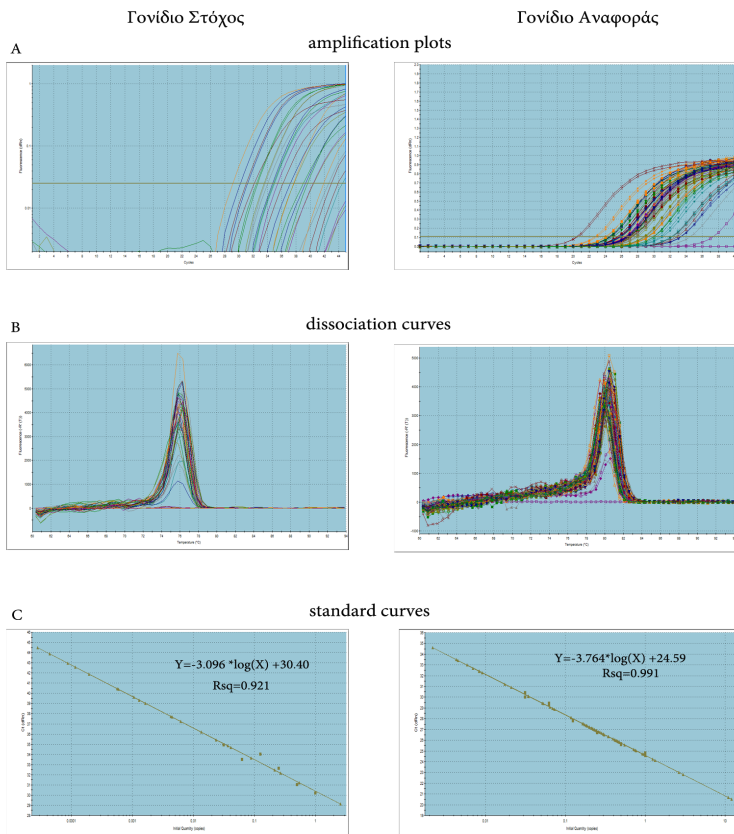
6.3. Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων *ras*, σε δείγματα θυρεοειδούς αδένων

Η παρούσα μελέτη διεξάχθηκε για να καθοριστούν τα επίπεδα mRNA έκφρασης των γονιδίων *ras* σε καλοήθης και κακοήθης όγκους του θυρεοειδούς αδένων χρησιμοποιώντας ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Πίνακας 5.3 Κεφ. V). χαρακτηριστικά παραδείγματα φαίνονται στην Εικόνα 6.3.1. Μετά την ενίσχυση των PCR προϊόντων, κατασκευάζονται καμπύλες αναφοράς (standard curves), από γνωστά δείγματα χρησιμοποιώντας διαδοχικές αραιώσεις, τόσο για το γονίδιο στόχο, όσο και για τον εσωτερικό μάρτυρα, ένα γονίδιο βασικών λειτουργιών (house-keeping gene), το οποίο χρησιμοποιείται για να κανονικοποιήσει τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στόχων (στην περίπτωση αυτή η *β-actin*). Στη συνέχεια για όλα τα δείγματα [εκτός από αυτά που δεν εμφανίζουν καμπύλη ενίσχυσης, ή εάν η καμπύλη αποδιάταξης τους (dissociation curve) έχει ενδείξεις παρουσίας διμερών των εκκινητών (primer-dimers) ή σχηματισμό παραπροϊόντων] η έκφραση τόσο του γονιδίου στόχου, όσο και του γονιδίου αναφοράς υπολογίζονται, προβάλλοντας, με την βοήθεια της καμπύλης αναφοράς, την τιμή Ct για όλα τα άγνωστα δείγματα σε μια ποσότητα mRNA

[στην περίπτωση αυτή της σχετικής ποσοτικοποίησης (relative quantification), εφόσον η ποσότητα του mRNA τόσο για το γονίδιο στόχος, όσο και για την β-actin δεν είχε προσδιοριστεί στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις διαδοχικές αραιώσεις]. Στη συνέχεια η έκφραση του mRNA κάθε δείγματος κανονικοποιείται διαιρώντας την τιμή του mRNA κάθε γονιδίου στόχος με την τιμή της β-actin. Οι κανονικοποιημένες τιμές των δειγμάτων καλοήθων και κακοήθων όγκων του θυρεοειδούς αδένος διαιρούνται με τον μέσο όρο των κανονικοποιημένων τιμών των φυσιολογικών δειγμάτων. Το αποτέλεσμα της διαίρεσης δίνει τη σχετική έκφραση των δειγμάτων με καλοήθη και κακοήθη όγκο σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα. Αύξηση ή μείωση της έκφρασης κατά 2-φορές (≥ 2 ή ≤ 0.5) θεωρείται υπερέκφραση ή υποέκφραση αντίστοιχα. Για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης, χαρακτηριστικά παραδείγματα από τα γονίδια αναφοράς και στόχου αναλύθηκαν σε πύκτωμα αγαρόζης, ώστε να εξακριβωθεί το σωστό μέγεθος των PCR προϊόντων(και η απουσία διμερών ή παραπροϊόντων).

Τα αποτελέσματα της παραπάνω ανάλυσης φαίνονται διαγραμματικά στην Εικόνα 6.3.2, ώστε να δει κανείς το μοτίβο έκφρασης όλων των γονιδίων στόχων που μελετήθηκαν σε όλα τα καλοήθη ή κακοήθη δείγματα.

Από τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνουμε ότι τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αποκλίνουν σημαντικά από το φυσιολογικό μοτίβο έκφρασης. Το γονίδιο K-Ras, υπερεκφράζεται στο 36,8% των καλοήθων δειγμάτων, ενώ υποεκφράζεται στο 15,8%, ενώ το 47,4% παραμένει σε φυσιολογικά επίπεδα στα αντίστοιχα δείγματα. Στα δείγματα με κακοήθους όγκους το K-Ras παραμένει σε φυσιολογικά επίπεδα 53,8%, ενώ η υπερέκφραση του και η υποέκφραση του είναι 15,4% και 30,8% αντίστοιχα. Στους καλοήθους όγκους το H-Ras υπερεκφράζεται σε 2/19 (10,5%) δείγματα, παραμένει σε φυσιολογικά επίπεδα η έκφραση του σε 9/19 (47,4%), ενώ εμφανίζει υποέκφραση σε 8/19 (42,1%) δείγματα. Στους κακοήθους όγκους παρατηρούμε μια αύξηση της υπερέκφρασης του 3/13 (23,1%) συγκριτικά με αυτήν στους καλοήθους όγκους, ενώ έχουμε μείωση των επιπέδων έκφρασης στα φυσιολογικά επίπεδα και στην υποέκφραση 6/13 (46,1%) και 4/13 (30,8%) αντίστοιχα. Το N-Ras στους ασθενείς με καλοήθη όγκο, εμφανίζει το ίδιο μοτίβο έκφρασης τόσο στα δείγματα με υπερέκφραση όσο και σε αυτά με υποέκφραση 6/19 (31,6%), ενώ εμφανίζεται οριακά υψηλότερη στο φυσιολογικό μοτίβο έκφρασης 7/19 (36,8%). Στους ασθενείς με κακοήθη όγκο, το N-Ras υπερεκφράζεται στο 23,1%, υποεκφράζεται στο 30,8% και παραμένει σε φυσιολογικά επίπεδα το μοτίβο της έκφρασης του στο 46,1%. Επιπλέον, όπως φαίνεται από τον **Πίνακα 6.3.1**, εκτός από τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της mRNA ανάλυσης, το μοτίβο έκφρασης μεταξύ καλοήθειας και κακοήθειας είναι διαφορετικό για τα γονίδια K-, H- & N-Ras (χ^2 test, $p=0,35$, $p=0,59$, $p=0,83$ αντίστοιχα), κάτι που δείχνει ένα διακριτό ρόλο για αυτά, στους όγκους του θυρεοειδούς αδένος.



Εικόνα 6.3.1: Χαρακτηριστικά παραδείγματα ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time Quantitative PCR) με τη χρήση της χρωστικής ανίχνευσης SYBR® Green I (A) Καμπύλες πολλαπλασιασμού τόσο για το γονίδιο στόχο όσο και για τον εσωτερικό μάρτυρα. (B) καμπύλες αναφοράς (Standard Curves) τόσο για το γονίδιο στόχο όσο και για τον εσωτερικό μάρτυρα (C) Καμπύλες τήξεως (Dissociation Curves) τόσο για το γονίδιο στόχο όσο και για τον εσωτερικό μάρτυρα.

Gene	Status	Benign (%)	Malignant (%)	Total (%)	P-Value*
K-Ras	↑	7/19 (36.8)	2/13 (15.4)	9/32 (28.1)	0.35
	—	9/19 (47.4)	7/13 (53.8)	16/32 (50.0)	
	↓	3/19 (15.8)	4/13 (30.8)	7/32 (21.9)	
H-Ras	↑	2/19 (10.5)	3/13 (23.1)	5/32 (15.6)	0.59
	—	9/19 (47.4)	6/13 (46.1)	15/32 (46.9)	
	↓	8/19 (42.1)	4/13 (30.8)	12/32 (37.5)	
N-Ras	↑	6/19 (31.6)	3/13 (23.1)	9/32 (28.1)	0.83
	—	7/19 (36.8)	6/13 (46.1)	13/32 (40.6)	
	↓	6/19 (31.6)	4/13 (30.8)	10/32 (31.3)	

*Benign vs. Malignant. Chi-square test df=2

↑: Overexpression; ↓: Downregulation; —: Normal expression

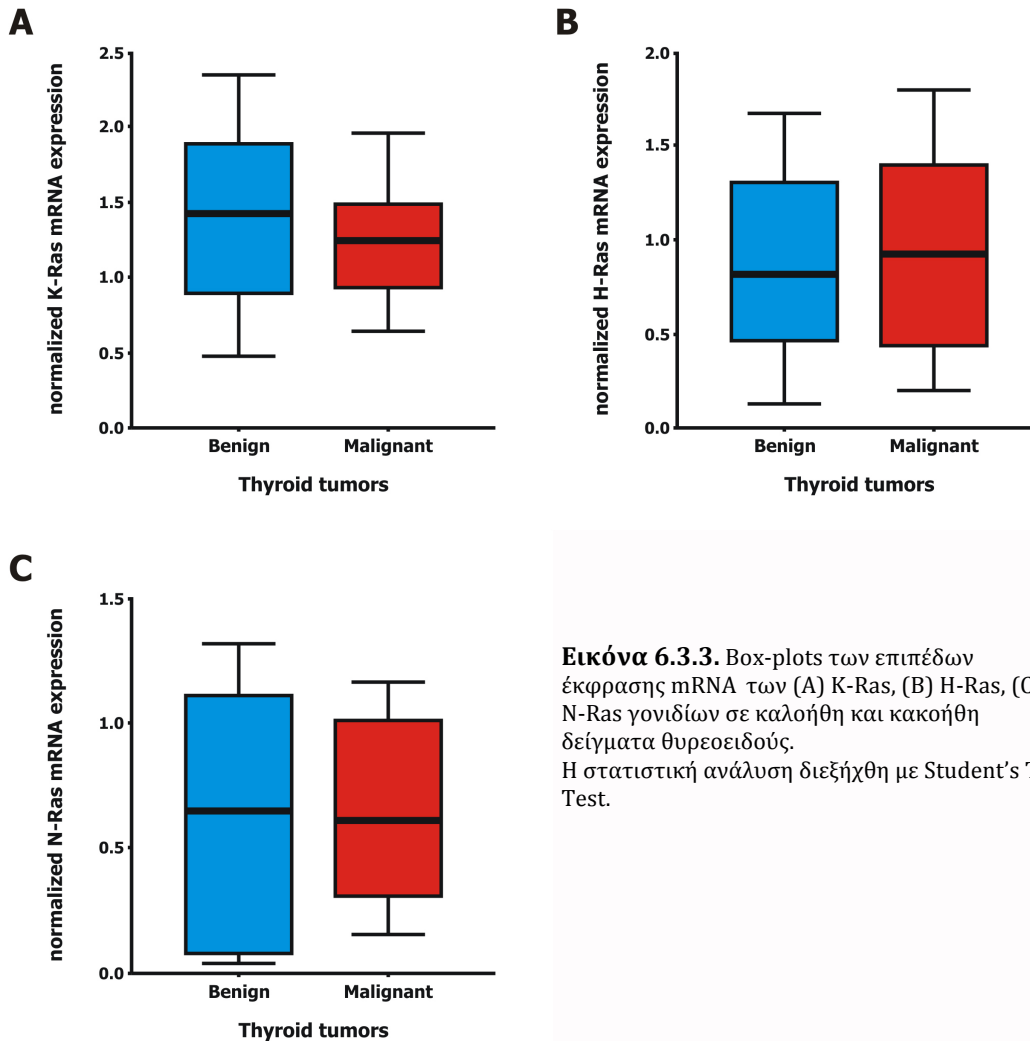
Πίνακας 6.3.1. Συχνότητα έκφρασης του mRNA των γονιδίων K-, H- και N-Ras σε καλοήθους και κακοήθους όγκους του θυρεοαειδούς.

No	Age	Sex	Hashimoto	K-Ras	H-Ras	N-Ras
40 61N	55	F	Yes	3.08	2.08	1.11
50 6N	53	F	No	1.03	0.26	0.04
670 8N	37	M	No	0.31	0.40	—
90 10N	43	F	Yes	0.34	1.54	—
160 15N	49	F	No	3.89	1.48	14.51
0 60N	48 (61)	F	No	0.93	0.20	—
180 19N	49	F	No	2.40	1.29	0.08
200 21N	59	F	No	0.76	0.58	—
220 23N	57??	F	No	1.42	0.50	—
250 24N	43	F	Yes	1.63	1.24	1868.02
700 26N	60	M	No	0.82	1.40	—
270 64N	38 (37)	M	No	0.94	0.74	—
280 29N	67	F	No	1.67	1.99	0.19
300 31N	30	F	No	0.67	12.84	—
330 32N	69	F	Yes	1.85	0.75	—
340 65N	55	F	No	1.80	0.06	—
350 36N	53	F	No	0.77	0.25	—
380 37N	61	F	Yes	5.93	0.44	—
690 39N	37	F	No	0.34	1.23	—
420 43N	58	F	Yes	1.00	0.47	—
440 45N	48	F	No	0.52	1.16	—
460 62N	37	F	No	2.82	0.51	0.001
660 47N	63	M	No	3.48	10.09	—
490 48N	39	F	No	0.13	0.42	1.01
680 50N	67	F	No	0.98	6.60	—
510 52N	39	M	No	1.33	0.46	—
530 53N	74	M	No	0.84	1.32	—
540 54N	43	F	Yes	1.92	1.28	—
560 56N	42	F	No	0.42	0.56	—
570 57N	60	F	No	1.45	0.82	—
580 58N	53	F	Yes	0.86	0.79	0.31
630 63N	58	F	Yes	0.13	0.42	—

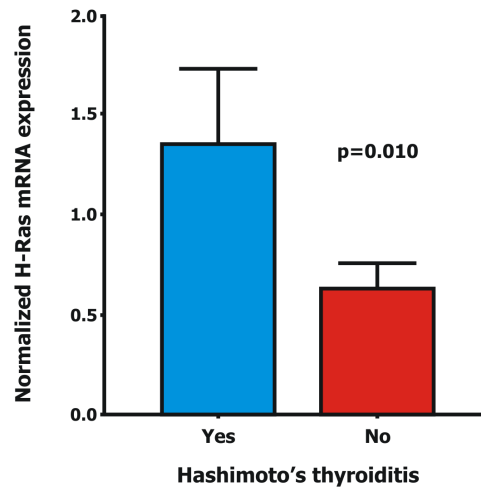
Εικόνα 6.3.2 Ανάλυση της έκφρασης του mRNA των γονιδίων *ras* σε καλοήθης και κακοήθης όγκους του θυρεοειδούς αδένου. Το μπλε χρώμα δηλώνει υπερέκφραση του mRNA, το κόκκινο δηλώνει υποέκφραση και το πράσινο φυσιολογική έκφραση.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων (Εικόνα 6.3.3) με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων ανέδειξε πολύ ενδιαφέρουσες συσχετίσεις. Η έκφραση του γονιδίου K-Ras στους καλοήθης όγκους ήταν ελάχιστα υψηλότερη από αυτής στους κακοήθης όγκους (1.56 ± 0.22 vs. 1.30 ± 0.45 , $p=0.58$). Αντιθέτως τα επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου H-Ras ήταν ελάχιστα

μειωμένη στους καλοήθεις όγκους από αυτής στους κακοήθεις (0.94 ± 0.14 vs. 1.14 ± 0.27 , $p=0.46$). Ενώ τα επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου N-Ras ήταν τα ίδια τόσο στους καλοήθεις όσο και στους κακοήθεις όγκους (0.68 ± 0.20 vs. 0.66 ± 0.14 , $p=0.97$).

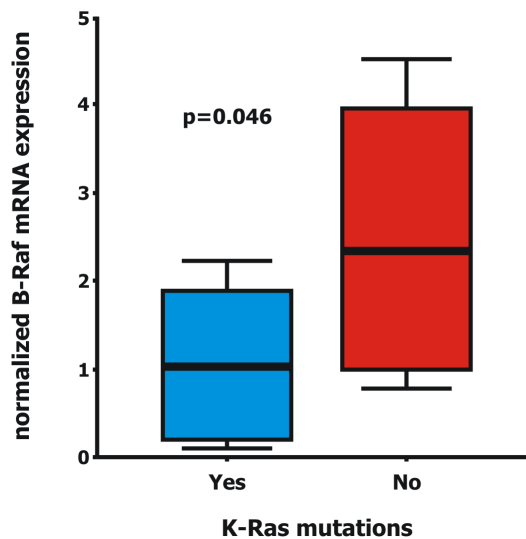


Περαιτέρω ανάλυση αποκάλυψε μια διαφορά έκφρασης ακόμη και εντός στους καλοήθεις όγκους: σε δείγματα με θυρεοειδίτιδα Hashimoto η έκφραση του H-Ras ήταν 2,1 φορές υψηλότερη από ότι στα δείγματα χωρίς θυρεοειδίτιδα (1.35 ± 0.20 vs. 0.63 ± 0.13 , $p=0.010$) Εικόνα 6.3.4.



Εικόνα 6.3.4. H-Ras έκφραση σε καλοήθεις όγκους του θυρεοειδούς με ή χωρίς θυρεοειδίτιδα Hashimoto. Τα δείγματα με θυρεοειδίτιδα Hashimoto έχουν 2,1-φορές υψηλότερα επίπεδα έκφρασης από ό, τι στα δείγματα χωρίς θυρεοειδίτιδα (1.35 ± 0.20 vs. 0.63 ± 0.13 , $p=0.010$).

Ενδιαφέρον, παρουσιάζει η έκφραση του B-Raf σε καλοήθη δείγματα με ή χωρίς K-Ras μετάλλαξη (Εικόνα 6.3.5). Τα δείγματα που εμφανίζουν K-Ras μεταλλάξεις έχουν 2-φορές χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου B-Raf σε σχέση με τα δείγματα που δεν εμφανίζουν σημειακή μετάλλαξη (1.42 ± 0.84 vs. 2.48 ± 1.25 , $p=0.046$). Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με Chi-square test.



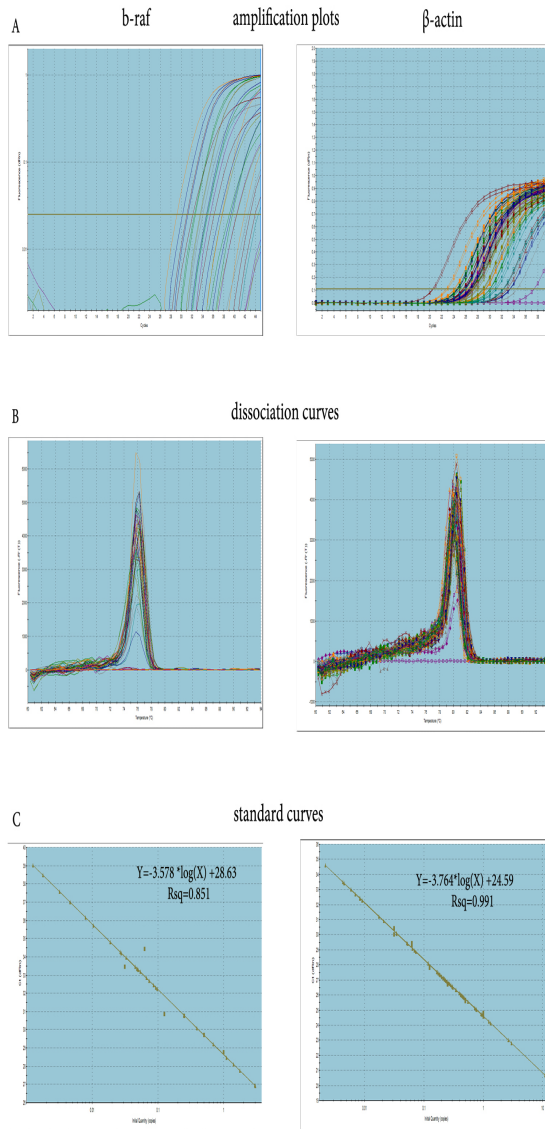
Εικόνα 6.3.5. Η έκφραση του B-Raf σε καλοήθη δείγματα με ή χωρίς K-Ras μετάλλαξη.

6.4. Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA του γονιδίου *B-Raf*, σε δείγματα θυρεοειδούς αδένια

Τα επίπεδα mRNA έκφρασης του γονιδίου *B-Raf* σε καλοήθης και κακοήθης όγκους του θυρεοειδούς αδένια χρησιμοποιώντας ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα φαίνονται στην Εικόνα 6.4.1. Μετά την ενίσχυση των PCR προϊόντων, κατασκευάζονται καμπύλες αναφοράς (standard curves), από γνωστά δείγματα χρησιμοποιώντας διαδοχικές αραιώσεις, τόσο για το γονίδιο στόχο, όσο και για τον εσωτερικό μάρτυρα, ένα γονίδιο βασικών λειτουργιών (house-keeping gene), το οποίο χρησιμοποιείται για να κανονικοποιήσει τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στόχων (στην περίπτωση αυτή η β -actin). Στη συνέχεια για όλα τα δείγματα [εκτός από αυτά που δεν εμφανίζουν καμπύλη ενίσχυσης, ή εάν η καμπύλη αποδιάταξης τους (dissociation curve) έχει ενδείξεις παρουσίας διμερών των εκκινητών (primer-dimers) ή σχηματισμό παραπροϊόντων] η έκφραση τόσο του γονιδίου στόχου, όσο και του γονιδίου αναφοράς υπολογίζονται, προβάλλοντας, με την βοήθεια της καμπύλης αναφοράς, την τιμή C_t για όλα τα άγνωστα δείγματα σε μια ποσότητα mRNA [στην περίπτωση αυτή της σχετικής ποσοτικοποίησης (relative quantification), εφόσον η ποσότητα του mRNA τόσο για το γονίδιο στόχος, όσο και για την β -actin δεν είχε προσδιοριστεί στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις διαδοχικές αραιώσεις]. Στη συνέχεια η έκφραση του mRNA κάθε δείγματος κανονικοποιείται διαιρώντας την τιμή του mRNA κάθε γονιδίου στόχος με την τιμή της β -actin. Οι κανονικοποιημένες τιμές των δειγμάτων καλοηθών και κακοηθών όγκων του θυρεοειδούς αδένια διαιρούνται με τον μέσο όρο των κανονικοποιημένων τιμών των φυσιολογικών δειγμάτων. Το αποτέλεσμα της διαίρεσης δίνει τη σχετική έκφραση των δειγμάτων με καλοήθη και κακοήθη όγκο σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα. Αύξηση ή μείωση της έκφρασης κατά 2-φορές (≥ 2 ή ≤ 0.5) θεωρείται υπερέκφραση ή υποέκφραση αντίστοιχα. Για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης, χαρακτηριστικά παραδείγματα από το γονίδιο αναφοράς και στόχου αναλύθηκαν σε πύκτωμα αγαρόζης, ώστε να εξακριβωθεί το σωστό μέγεθος των PCR προϊόντων (και η απουσία διμερών ή παραπροϊόντων).

Τα αποτελέσματα της παραπάνω ανάλυσης φαίνονται διαγραμματικά στην Εικόνα 6.4.2, ώστε να δεί κανείς το μοτίβο έκφρασης του γονιδίου *B-Raf* που μελετήθηκε σε όλα τα καλοήθη ή κακοήθη δείγματα.

Από τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνουμε ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αποκλίνει σημαντικά από το φυσιολογικό μοτίβο έκφρασης. Το *B-Raf* υπερεκφράστηκε σε 11/32 (34,4%) δείγματα, υποεκφράζεται σε 13/32 (40,6%), ενώ σε 8/32 (25,0%) δείγματα η έκφραση του είναι φυσιολογική.



Εικόνα 6.4.1. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time Quantitative PCR) με τη χρήση της χρωστικής ανίχνευσης SYBR® Green I (A) Καμπύλες πολλαπλασιασμού τόσο για το γονίδιο στόχο όσο και για τον εσωτερικό μάρτυρα. (B) καμπύλες αναφοράς (Standard Curves) τόσο για το γονίδιο στόχο όσο και για τον εσωτερικό μάρτυρα (C) Καμπύλες τήξεως (Dissociation Curves) τόσο για το γονίδιο στόχο όσο και για τον εσωτερικό μάρτυρα

No	Age	Sex	Hashimoto	b-Raf
40				
61N	55	F	Yes	—
50				
6N	53	F	No	—
67O				
8N	37	M	No	—
9O				
10N	43	F	Yes	0.20
16O				
15N	49	F	No	4.52
0				
60N	48 (61)	F	No	—
18O				
19N	49	F	No	0.34
20O				
21N	59	F	No	—
22O				
23N	5???	F	No	—
25O				
24N	43	F	Yes	1.76
70O				
26N	60	M	No	—
27O				
64N	38 (37)	M	No	—
28O				
29N	67	F	No	11.17
30O				
31N	30	F	No	—
33O				
32N	69	F	Yes	0.18
34O				
65N	55	F	No	—
35O				
36N	53	F	No	0.78
38O				
37N	61	F	Yes	—
69O				
39N	37	F	No	0.19
42O				
43N	58	F	Yes	1.88
44O				
45N	48	F	No	—
46O				
62N	37	F	No	1.21
66O				
47N	63	M	No	—
49O				
48N	39	F	No	0.50
68O				
50N	67	F	No	—
51O				
52N	39	M	No	—
53O				
53N	74	M	No	—
54O				
54N	43	F	Yes	—
56O				
56N	42	F	No	—
57O				
57N	60	F	No	—
58O				
58N	53	F	Yes	0.07
63O				
63N	58	F	Yes	0.06

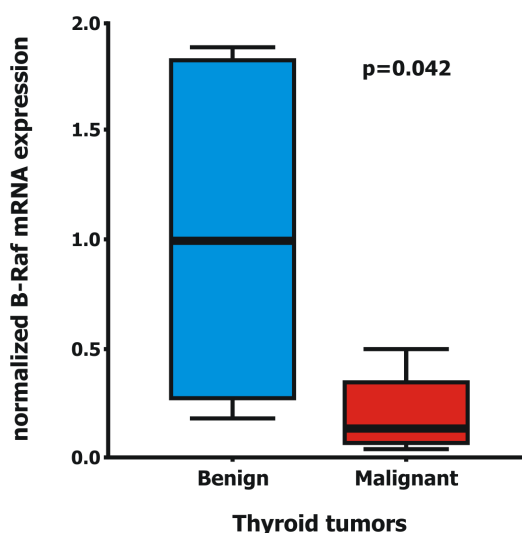
Εικόνα 6.4.2. Ανάλυση της έκφρασης του mRNA του γονιδίου B-Raf σε καλοήθης και κακοήθης όγκους του θυρεοειδούς αδένα. Το μπλε χρώμα δηλώνει υπερέκφραση του mRNA, το κόκκινο δηλώνει υποέκφραση και το πράσινο φυσιολογική έκφραση.

Προκειμένου να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στα δείγματα ιστών του θυρεοειδούς αδένα, πραγματοποιήθηκαν δυο διαφορετικές ομαδοποιήσεις σε καλοήθη (benign) και κακοήθη (malignant) όγκους του θυρεοειδούς αδένα. Στα καλοήθη δείγματα το B-Raf ενώ υπερεκφράζεται σε 8/19 (42,1%), υποεκφράζεται σε 6/19 (31,6%), ενώ σε 5/19 (26,3%) η έκφραση του ήταν φυσιολογική. (Πίνακας 6.4.2.)

	Overexpression	Normal expression	Downregulation
Benign (n=19)	8 (42.1%)	5 (26.3%)	6 (31.6%)
Malignant (n=13)	3 (23.1%)	3 (23.1%)	7 (53.8%)
Total (n=32)	11 (34.4%)	8 (25.0%)	13 (40.6%)

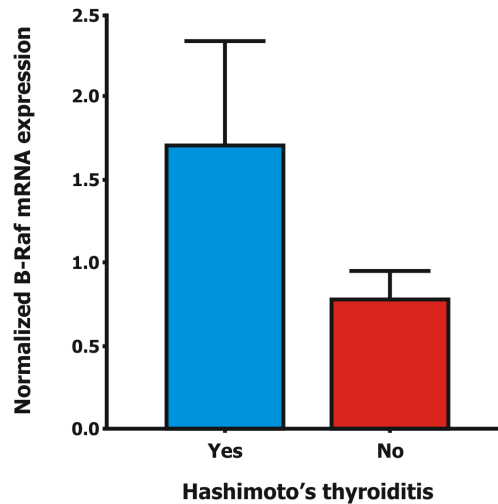
Πίνακας 6.4.2. Αποτελέσματα της έκφρασης του του B-Raf σε καλοήθεις και κακοήθεις όγκους του θυρεοειδούς

Ενδιαφέρον, παρουσιάζει η μέση έκφραση του B-Raf σε κακοήθη δείγματα ήταν μόνο το ~ 15% της έκφρασης του γονιδίου σε καλοήθη δείγματα (0.21 ± 0.06 vs. 1.36 ± 0.33 , $p=0.042$; 2-tailed Mann-Whitney U test) Εικόνα 6.4.3.



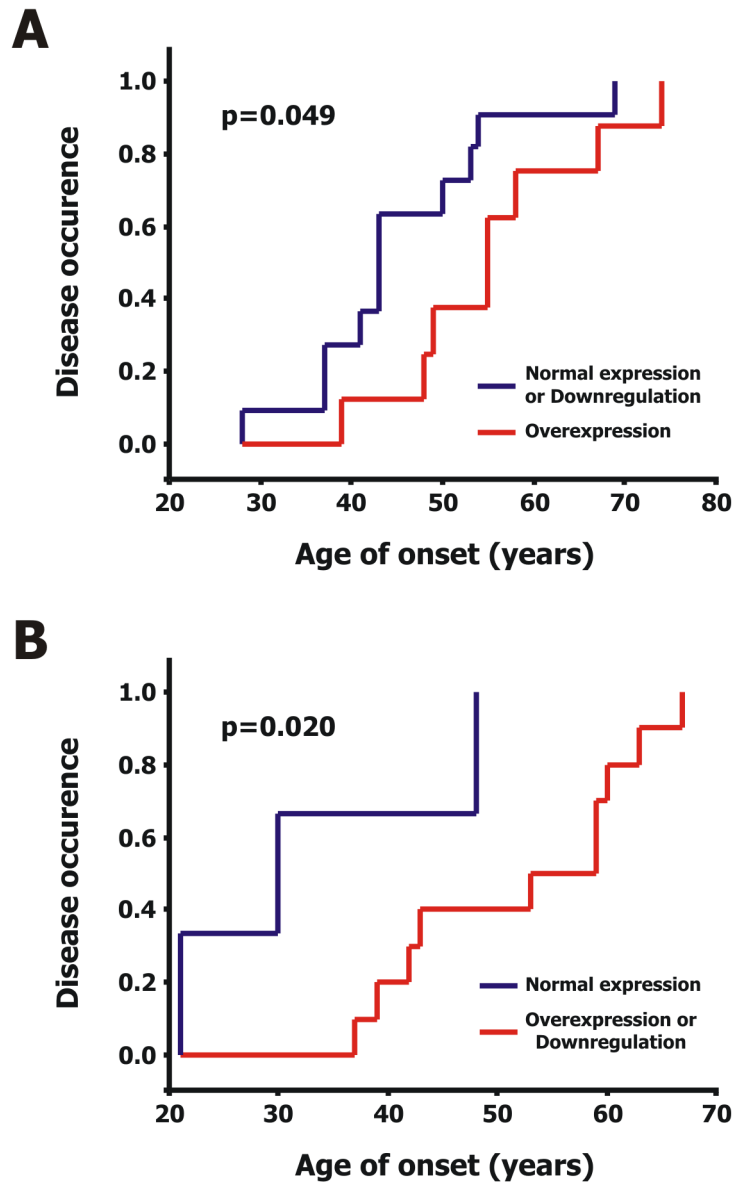
Εικόνα 6.4.3. Box-plots των επιπέδων έκφρασης mRNA του B-Raf V600E σε αρνητικά καλοήθη και κακοήθη δείγματα θυρεοειδούς. Η έκφραση στα καλοήθη δείγματα ήταν 6,5 φορές υψηλότερη από ό, τι στα κακοήθη δείγματα ($1,36 \pm 0,51$ έναντι $0,21 \pm 0,10$, $\rho = 0,042$). Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με 2-tailed Mann-Whitney U test.

Περαιτέρω ανάλυση αποκάλυψε μια διαφορά έκφρασης ακόμη και εντός στους καλοήθεις όγκους: σε δείγματα με θυρεοειδίτιδα Hashimoto η έκφραση του B-Raf ήταν 2,2 φορές υψηλότερη από ότι στα δείγματα χωρίς θυρεοειδίτιδα (1.71 ± 0.63 vs. 0.78 ± 0.13) Εικόνα 6.4.4.



Εικόνα 6.4.4. B-Raf έκφραση σε καλοήθεις όγκους του θυρεοειδούς με ή χωρίς θυρεοειδίτιδα Hashimoto. Τα δείγματα με θυρεοειδίτιδα Hashimoto έχουν 2,2-φορές υψηλότερα επίπεδα έκφρασης από ό, τι στα δείγματα χωρίς θυρεοειδίτιδα ($1,71 \pm 0,63$ έναντι $0,78 \pm 0,13$).

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης του B-Raf στα καλοήθη δείγματα συσχετίζεται με την ηλικία, αφού οι ασθενείς που υπερεκφράζεται το γονίδιο ήταν κατά μέσο όρο 10 χρόνια μεγαλύτεροι από εκείνους με φυσιολογική ή μειωμένη έκφραση του γονιδίου ($55,6 \pm 3,9$ έναντι $45,3 \pm 3,3$ $p=0.049$; Kaplan-Meier Breslow test) (Εικόνα 6.4.5A). Αντίστοιχα ευρήματα ανακαλύφθηκαν σε κακοήθη δείγματα, σε ασθενείς που υπερεκφράζεται ή υποεκφράζεται το γονίδιο B-Raf ήταν κατά μέσο όρο 19 χρόνια μεγαλύτεροι από ασθενείς με φυσιολογικά επίπεδα έκφραση του γονιδίου B-Raf ($52,2 \pm 3,5$ έναντι $33,0 \pm 7,9$ $p=0,020$; (Kaplan-Meier Breslow test) (Εικόνα 6.4.5B). Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά ευρήματα της mRNA έκφρασης σε καλοήθεις ή κακοήθεις όγκους του θυρεοειδούς αδέννα, σε σχέση με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά (φύλο, TNM, το στάδιο του καρκίνου).



Εικόνα 6.4.5. Kaplan-Meier καμπύλη αρνητικής επιβίωσης της B-Raf έκφραση και της ηλικίας έναρξης της νόσου στο (A) καλοήθη και (B) κακοηθών δειγμάτων θυρεοειδούς. (A) Η υπερέκφραση του B-Raf καθυστερεί την εκδήλωση της νόσου κατά ~ 10 χρόνια στα καλοήθη δείγματα, σε σύγκριση με τα δείγματα που έχουν κανονική ή μειωμένη B-Raf έκφραση ($55,6 \pm 3,9$ έναντι $45,3 \pm 3,3$, $p = 0,049$). (B) Η απορρύθμιση της B-Raf έκφρασης (υπερέκφραση ή προς τα κάτω ρύθμιση) καθυστερεί την έναρξη της νόσου στα κακοήθη δείγματα κατά ~ 19 ετών, σε σύγκριση με τα δείγματα που έχουν κανονική B-Raf έκφραση ($52,2 \pm 3,5$ έναντι $33,0 \pm 7,9$, $p = 0,020$). Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με τη δοκιμή Breslow.

	Benign (n=19)	Malignant (n=13)
Age, years (mean ±SD)	49.6±11.9	47.8±13.9
Gender		
Male	4 (21.1%)	2 (15.4%)
Female	15 (78.9%)	11 (84.6%)
Hashimoto thyroiditis		
Yes	8 (42.1%)	—
No	11 (57.9%)	—
TNM		
T1-T2	—	9 (69.2%)
T3-T4	—	4 (30.8%)
Cancer Stage		
I	—	8 (61.5%)
II-IV	—	5 (38.5%)

Πίνακας 6.1. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ομάδων της μελέτης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο θυρεοειδής είναι ο σημαντικότερος αδένας του ανθρώπινου σώματος. Διαχειρίζεται με απόλυτη ακρίβεια τις σπουδαιότερες λειτουργίες του οργανισμού, ρυθμίζοντας τις καύσεις, την ανάπτυξη, το μεταβολισμό και έμμεσα την ψυχική μας υγεία και ισορροπία. Ο προσδιορισμός των γενετικών και μοριακών συμβάντων που μπορούν να βοηθήσουν στην έγκαιρη διάγνωση της καλοήθους υπερπλασίας και του καρκίνου του θυρεοειδούς, θα μπορούσαν να αποτελέσουν χρήσιμους θεραπευτικούς στόχους, και είναι πρώτη προτεραιότητα των ερευνητών που δουλεύουν στο συγκεκριμένο ερευνητικό πεδίο.

7.1. Ras

Η οικογένεια των γονιδίων *ras* (K-Ras, H-Ras, & N-Ras) κωδικοποιούν πρωτεΐνες συνδέουσες GTP. Από πρώιμες παρατηρήσεις βρέθηκε ότι αυτά τα πρωτεϊνικά μόρια έχουν επίδραση στον κυτταρικό μετασχηματισμό και στην ογκογένεση. Υπάρχει συσσώρευση ενδείξεων που υποστηρίζουν την εμπλοκή των ενεργοποιημένων γονιδίων *ras* σε ποικίλες κακοήθειες του ανθρώπου [21,8,23]. Τα γονίδια *ras* συμβάλλουν στην ογκογένεση μέσω συσσώρευσης μεταλλάξεων που προκαλούν αλλαγές στην ενεργότητα GTPάσης της πρωτεΐνης [24]. Η σημειακή μετάλλαξη του γονιδίου K-Ras στο κωδικόνιο 12 είναι ένα πρώιμο γεγονός στην καρκινογένεση του καρκίνου του θυρεοειδούς, που κατά κύριο λόγο συμβαίνει κατά την μετατροπή ενός μικρού σε ενδιάμεσου μεγέθους αδένωμα [25].

Επιπρόσθετα, οι μεταλλάξεις του K-Ras στο κωδικόνιο 12, περιγράφηκαν μόνο σε B-Raf αρνητικά μεταλλάξεων καλοήθων και κακοήθων όγκων του θυρεοειδούς αδένου, υποδηλώνοντας ότι η ενεργοποιούσες K-Ras/B-Raf μεταλλάξεις πιθανόν να αποτελούν εναλλακτικά γεγονότα στον καρκίνο του θυρεοειδούς.

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήσαμε ανάλυση των μεταλλάξεων του κωδικονίου 12 του γονιδίου K-Ras σε καλοήθους και κακοήθους όγκους του θυρεοειδούς. Τα αποτελέσματα μας αποκάλυψαν εντοπισμό της μετάλλαξης σε ποσοστό 31,6 % και 30,8 % αντίστοιχα. Οι μεταλλάξεις του *ras* στο συγκεκριμένο καρκίνο σημειώνονται κύρια στο κωδικόνιο 12 του K-Ras [26]. Χωρίς να αγνοήσουμε την αναφερθείσα συσχέτιση μεταξύ συγκεκριμένων μεταλλάξεων του K-Ras εντός του κωδικονίου 13 και της έκβασης της νόσου [27], εστίασαμε στον έλεγχο του κωδικονίου 12, το οποίο παραδοσιακά παρουσιάζει την υψηλότερη επίπτωση των μεταλλάξεων του K-Ras.

Η ανάλυση των μεταλλάξεων του γονιδίου N-Ras σε καλοήθους και κακοήθους όγκους του θυρεοειδούς, μας αποκάλυψε τον εντοπισμό μιας μετάλλαξης σε ποσοστό 7,7 % σε δείγμα κακοήθους όγκου, στο οποίο είχε ανιχνευθεί και μετάλλαξη του K-Ras.

Σε αυτή την μελέτη, έχουμε αποδείξει ότι τα επίπεδα της mRNA έκφρασης του K-Ras ήταν απορυθμισμένη στο 50 % των όγκων του θυρεοειδούς, παρουσιάζοντας υπερέκφραση σε 7 και υποέκφραση σε 2 δείγματα αντίστοιχα. Η απορύθμιση που παρατηρήθηκε είναι συνεπής με τα ευρήματα μας της ενεργοποίησης της K-Ras μετάλλαξης. Επιπλέον, η έλλειψη της μετάλλαξης H-Ras, και ο χαμηλός εντοπισμός N-Ras μετάλλαξης παίζει έναν κρίσιμο ρόλο στους κακοήθους όγκους του θυρεοειδούς. Αυτή η υπόθεση μας ενισχύεται από την διαπίστωση μας ότι τα K- και H- Ras επίπεδα μεταγραφώματος συσχετίζονται θετικά στα κακοήθη δήγματα του θυρεοειδή. Το τελευταίο αποτέλεσμα υποδηλώνει πιθανή συνεργιστική δράση στο ρόλο του K-&H-Ras στις κακοήθη διαδικασίες μετασχηματισμού του θυρεοειδούς [28].

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά της μελέτης μας βρήκαμε ότι υπάρχει σχέση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του mRNA και της μέσης έκφρασης σε δείγματα με θυρεοειδίτιδα Hashimoto. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες, που δείχνουν μια υψηλότερη συχνότητα των χειρουργικά εξαιρεθέντων όγκων του θυρεοειδούς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto από ότι σε αδένες ανεπηρέαστους από αυτήν την ασθένεια [29]. Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου που έχει αναφερθεί σε διάφορες μελέτες θα μπορούσε να ερμηνευθεί ως απόδειξη για την σχέση μεταξύ των δύο ασθενειών, αλλά αυτό δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί κατά πόσο αυτή μας η υπόθεση είναι περιστασιακό ή συμπτωματικό γεγονός. Το εύρημα της αναδιάταξης των RET/PTC μονοπατιών στο θυρεοειδή αδένα θα μπορούσε να παρέχει μια ισχυρή παθολόγο σύνδεση μεταξύ των καλοήθων και κακοήθων όγκων.

Στην έρευνα μας το γονίδιο H-Ras είναι μεταγραφικός απορυθμισμένο σε κακοήθους όγκους του θυρεοειδούς, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν σημειακές μεταλλάξεις, υποδεικνύοντας την απώλεια των ιδιοτήτων των *ras* ογκοκαταστατικών γονιδίων, που οδηγούς στον σχηματισμό κακοήθων του θυρεοειδούς. Ενώ η έκφραση του H-Ras ήταν αυξημένη σε καλοήθους όγκους και σε γυναίκες κάτω των 50 η οποίες εμφάνιζαν θυρεοειδίτιδα Hashimoto, γεγονός που μας επιτρέπει να κάνουμε την υπόθεση ότι υπάρχει συσχέτιση της μεταγραφής του γονιδίου σε ασθενείς με HT. Τα *ras* γονίδια έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζουν διπλό ρόλο στις κακοήθειες του ανθρώπου [30-33]. Μπορούν να ενεργούν ως ογκογονιδιακότα ενεργοποιούνται ή μπορεί να έχουν ογκοκαταστατικές λειτουργίες. Η έκφραση του αγρίου τύπου του των *ras* έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τη δράση του μεταλλαγμένου ομολόγου του [31], αντιστρέφοντας έτσι τον κακοήθη φαινότυπο του κυττάρου. Τα ευρήματα μας ενισχύουν προηγούμενες εκθέσεις που υποστηρίζουν τον ογκο-καταστατικό ρόλο του γονιδίου *ras*. Ο μηχανισμός, μέσω του οποίου ο αγρίου τύπου *ras* μπορεί να δράσει ως καταστολέας, είναι η ενεργοποίηση ορισμένων σηματοδοτικών μονοπατιών που μπορεί να οδηγήσουν σε απόπτωση και γήρανση. Τα αποπτωτικά και προ-αποπτωτικά αποτελέσματα των μελών της οικογένειας *ras* αναφερθεί σε διάφορες μελέτες η οποίες αποδεικνύουν την εμπλοκή αρκετών εξωτερικών σημάτων [34,35] ή της ενεργοποίησης μονοπατιών όπως αυτό της Raf/MAP κινάσης [36].

Επιπλέον η *ras* ενεργοποιεί σηματοδότησης Raf κινάσης, με αποτέλεσμα την προώθηση της γήρανσης, που θέτει σε κίνδυνο έναν εναλλακτικό μηχανισμό για την αποτροπή του πολλαπλασιασμού εκείνων των κυττάρων που έχουν αποκτήσει κακοήθη φαινότυπο [37]. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου ο αγρίου τύπου *ras* μπορεί να ενεργοποιήσει ορισμένα μονοπάτια

σηματοδότησης τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε απόπτωση και γήρανση, αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο τη δράση του μεταλλαγμένου ομολόγου του, παραμένει να διευκρινιστεί.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα μας αποδεικνύουν την σχέση του K-Ras και H-Ras γονιδίου στην καρκινογένεση του θυρεοειδούς μέσω της μεταγραφικής απορύθμισης, ενώ οι μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 προωθούν την ενεργοποίηση του K-Ras γεγονός που μας επιτρέπει να υποθέσουμε ότι θα μπορούσε να παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της ασθένειας. Τα επίπεδα της έκφρασης του N-Ras καθώς και ο μικρός αριθμός μεταλλάξεων μας δείχνει ότι παίζει λιγότερο σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των όγκων του θυρεοειδούς. Τα επίπεδα της έκφρασης των γονιδίων *gas* δεσπαρουσίασαν συσχέτιση με την εμφάνιση σημειακών μεταλλαγών, δείχνοντας ότι αυτές οι δύο διαφορετικές γενετικές τροποποιήσεις, δεν είναι αμοιβαία εξαρτημένες. Πιθανώς, η εμφάνιση ταυτόχρονα υπερέκφρασης των *gas* και των σημειακών μεταλλαγών στο κωδικόνιο 12, να παρέχουν τις απαραίτητες γενετικές μεταβολές για τον σχηματισμό του καρκίνου του θυρεοειδούς. Επιπλέον, μεταλλαγές στους υποκινητές των γονιδίων *gas*, σε συνδιασμό με την έκφραση του mRNA, θα μπορούσαν πιθανώς να εξηγήσουν την ενεργοποίηση των γονιδίων *gas*, στους καλοήθεις και κακοήθεις όγκους του θυρεοειδούς, χωρίς να αποκλείουμε άλλους πιθανούς μηχανισμούς που θα μπορούσαν να δράσουν συνεργικά, όπως είναι η γονιδιακή ανισορροπία (έχοντας ως αποτέλεσμα την γονιδιακή επέκταση).

Περισσότερες εις βάθος μελέτες απαιτούνται, καθώς επίσης και ένας μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων, για να διασαφηνιστεί ο ακριβής ρόλος των μεταλλαγών και των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *gas* στον θυρεοειδή.

7.2. B-Raf

Σε αυτή την μελέτη, έχουμε αποδείξει ότι σε V600E αρνητικούς όγκους, το B-Raf υπερεκφράζεται σε καλοήθεις όγκους (ιδιαίτερα εκείνους με θυρεοειδίτιδα Hashimoto) και υποεκφράζεται σε κακοήθεις, αυτή η απόκλιση από το φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης, απουσία των μεταλλαξέων καθυστερεί την ανάπτυξη και την εμφάνιση του όγκου.

Δεδομένου ότι το B-Raf είναι μεταγενέστερος μεσολαβητής της σηματοδότησης Ras και δεδομένου ότι η μεταλλακτικά ενεργοποιημένες μορφές των Ras πρωτεϊνών είναι παρούσες, περίπου στο ένα τρίτο των ανθρώπινων καρκίνων [37], η ανίχνευση των μεταλλαγμένων B-Raf αλληλίων, δρά ως βασικό στοιχείο για την υποστήριξη του ρόλου του Ras/Raf/MEK/ERK μονοπατιού σηματοδότησης στην ογκογένεση. Ωστόσο, ο ρόλος της μετάλλαξης B-Raf V600E στην πρόοδο του θυρεοειδικού καρκίνου παραμένει ασαφής. Ενώ πολλές εκθέσεις δείχνουν ότι οι μεταλλάξεις του B-Raf σχετίζονται με την θυρεοειδική νόσο, μεταστάση στους λεμφαδένες, προχωρημένο στάδιο του όγκου και υποτροπή του όγκου [38, 39-42], διάφορες άλλες μελέτες απέτυχαν στο να εντοπίσουν τέτοιες συνδέσεις. Το γεγονός ότι το 30-60% των όγκων του θυρεοειδούς, δεν έχουν ενεργοποίηση των B-Raf μεταλλάξεων, υποδεικνύει ότι υπάρχουν και άλλα μονοπάτια από αυτό του Ras/Raf/MEK/ERK που συμβάλλουν στην ανάπτυξη και την εξέλιξη αυτών των όγκων. Επιπλέον, αν και έχουν ογκογόνες γενετικές αλλοιώσεις, όπως οι μεταλλάξεις Ras, έχουν αναφερθεί κάποιες σε καλοήθη αδενώματα του θυρεοειδούς, ο ειδικός

ρόλος τους παραμένει ασαφής [45]. Κλινικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι υπάρχει μόνο μια μικρή πιθανότητα κακοήθους μετασχηματισμού των καλοηθών όγκων [46].

Πολλές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την χαμηλότερη έκφραση γονιδίων ειδικών στο θυρεοειδή, όπως, TPO, NAK, AIT-B, TSH-R, PAX8, Glut1, και T g, σε B-Raf V600E ενεργοποιημένη σε PTCs [47, 48], ενώ άλλες μελέτες αποδεικνύουν ότι τα γονίδια αυτά υπερκφράζονται σε καρκινώματα του θυρεοειδούς [49, 50]. Ωστόσο, η μελέτη μας είναι η πρώτη που εξετάζει B-Raf έκφραση σε καλοήθεις και κακοήθεις όγκους του θυρεοειδούς που δεν ενεργοποιούνται από την μετάλλαξη V600E, δείχνοντας ότι και στις δυο νόσους τα επίπεδα μεταγραφής του αποκλίνουν από το φυσιολογικό πρότυπο. Επίσης αξιοσημείωτο είναι ότι η μέση έκφραση του B-Raf σε κακοήθη δείγματα ήταν μόνο το 1/6 της έκφρασης του σε καλοήθη δείγματα. Η βιβλιογραφία στερείται στοιχείων σχετικά με την έκφραση του mRNA ή την έκφραση πρωτεΐνης των γονιδίων του μονοπατιού Ras/Raf/MEK/ERK. Μόνο η έκφραση των upstream γονιδίων Ras έχει εξετασθεί μέχρι τώρα σε όγκους του λάρυγγα και τα επίπεδα της έχουν ανιχνευθεί αυξημένα [51]. Φυσικά η απορρύθμιση της έκφρασης του B-Raf ή η μετάλλαξη του δεν είναι οι μόνες περιπτώσεις που μπορεί να συμβούν στον θυρεοειδικό καρκίνο. RET/PTC αναδιατάξεις είναι επίσης συχνό γεγονός και φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του καρκίνου [52]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το B-Raf είναι ο κύριος μεσολαβητής της επαγόμενης RET/PTC ενεργοποίησης MARK σε κύτταρα του θυρεοειδούς [53], υποδηλώνοντας ένα συνεργηστικό ρόλο μεταξύ αυτών των δύο μοριακών γεγονότων στην καρκινογένεση του θυρεοειδούς, παρότι έχουν διακριτά προφίλ έκφρασης, επίσης έχουν ταυτοποιηθεί σε B-Raf σε RET/PTC ή ενεργοποιημένη μορφή Ras σε όγκους [54].

Σποραδικές RET/PTC αναδιατάξεις έχουν επίσης παρατηρηθεί σε μη-κακοήθη αδενώματα, όπως η θυρεοειδίτιδα Hashimoto και καλοήθη θυλακώδη αδενώματα του θυρεοειδούς [55, 56]. Η θυρεοειδίτιδα Hashimoto (HT) είναι μακράν η πιο κοινή μορφή θυρεοειδίτιδας, με συχνότητα εμφάνισης γυναίκα:άνδρας 20:1. Η πλειοψηφία των ασθενών έχουν υποθυρεοειδισμό με αυξημένα τα επίπεδα του ορού της θυρεοτροπίνης. Η θυρεοειδίτιδα Hashimoto μπορεί να συμβεί με μεταβλητό προφίλ ιστομορφολογίας συμπεριλαμβανομένης της HT με κλασικά χαρακτηριστικά χρόνιας αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας. Η HT σχετίζεται με υπερπλαστικές/αδενωματώδεις βλάβες ή με μονοσήμαντα καρκινώματα του θυρεοειδούς [57]. Μερικοί ασθενείς με HT αναπτύσσουν οζίδιατα οποία μικροσκοπικά μοιράζονται χαρακτηριστικά πυρηνικής μορφολογίας και ανοσοϊστοχημικά πρότυπα με PTC [58]. Ενδιαφέρον, παρουσιάζει στην μελέτη μας η μέση έκφραση του B-Raf στους καλοήθεις όγκους με θυρεοειδίτιδα Hashimoto ήταν 2,2 φορές υψηλότερη από δείγματα αρνητικά σε HT. Αν και αυτό το αποτέλεσμα θα μπορούσε να ενισχύσει περαιτέρω τη σχέση μεταξύ θυρεοειδίτιδας Hashimoto και του υπερπλαστικού μετασχηματισμού αυτών των αλλοιώσεων, η σημασία του παραμένει ασαφής [59], δεδομένου ότι μόνο ένα κλάσμα των περιπτώσεων με θυρεοειδίτιδα Hashimoto θα εξελιχθεί σε κλινικά σημαντικά θηλώδες καρκίνωμα [60].

Παρατηρήσαμε επίσης ότι απουσία της V600E ενεργοποιημένης μετάλλαξης, η έκφραση του B-Raf καθυστερεί την έναρξη των όγκων του θυρεοειδούς για τουλάχιστον 10 έτη, στα καλοήθη και κακοήθη δείγματα. Τέτοια γεγονότα που συνδέονται τόσο με την πρώιμη όσο και την όψιμη

έναρξη της νόσου έχουν παρατηρηθεί σε διάφορες κακοήθειες, όπως του ορθοκολικού [61], του παγκρέατος [62], του προστάτη [63], του μαστού [64], του πνεύμονα [65], καθώς και του μελανώματος [66], αυτή είναι η πρώτη φορά που αυτό αναφέρεται σε όγκους του θυρεοειδούς. Γονίδια τα οποία συχνά συνδέονται με πρόωμη έναρξη της νόσου είναι το p53, BRCA1/2 και όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα αποτοξίνωσης. Το μόνο μόριο του μονοπατιού Ras/Raf/MEK/ERK που έχει συσχετιστεί με πρόωμη νόσο είναι το K-Ras, του οποίου οι μεταλλάξεις έχουν συνδεθεί με την πρόωμη εκδήλωση καρκίνου του πνεύμονα σε ποντικούς [67]. Συνεπώς, αυτή είναι η πρώτη μελέτη για να συνδέσει το γονίδιο B-Raf με οποιαδήποτε έναρξη της νόσου. Φυσικά απαιτούνται μεγάλες ομαδοποιημένες μελέτες για την επαλήθευση των προκαταρκτικών αποτελεσμάτων μας.

Εν κατακλείδι, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η έκφραση του B-Raf παίζει σημαντικό ρόλο στους καλοήθεις ή κακοήθεις όγκους του θυρεοειδούς αδένος, καθυστερώντας την ανάπτυξη και την εξέλιξη τους στην απουσία ενεργοποιημένων μεταλλάξεων. Φυσικά, οι ακριβείς μοριακές οδοί που εμπλέκονται, καθώς και ο εν δυνάμει ρόλος του ως θεραπευτικός στόχος ή ως βιοδείκτης για την έγκαιρη ανίχνευση της νόσου πρέπει ακόμα να διερευνηθεί.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Spandidos, D. A. (2004). "The cancer story." *Cancer Biol Ther* 3(11): 1184-6.
2. Smith, G., L. A. Stanley, et al. (1995). "Metabolic polymorphisms and cancer susceptibility." *Cancer Surv* 25: 27-65.
3. Mulligan, R. C. (1993). "The basic science of gene therapy." *Science* 260(5110): 926-32.
4. Bar-Sagi D (2001) A Ras by Any Other Name *Mol Cell Biol.* 21(5): 1441-1443.
5. Rebollo A, Martínez-A C. (1999) Ras proteins: recent advances and new functions. *Blood.* 94(9):2971-80.
6. Ishii S, Merlino GT, Pastan I. (1985) Promoter region of the human H-Ras proto-oncogene: similarity to the EGF receptor proto-oncogene promoter. *Science* ; 230:1378-81
7. Lowndes NF, Paul J, Wu J, Allan M. (1989) c-Ha-ras gene bidirectional promoter expressed in vitro: location and regulation. *Mol. Cell Biol.* 9:3758-70
8. Zachos G, Spandidos D. Expression of ras proto-oncogenes: regulation and implications in the development of human tumors. *Crit Rev Oncol Hematol.* 26:65-75
9. Trepicchio WL, Krontiris TG. (1992) Members of the rel/NF-kappa B family of transcriptional regulatory proteins bind HRAS1 minisatellite DNA sequence. *Nucleic Acid Res.* 20; 2427-34
10. Krontiris TG, Devlin B, Karp DD, Robert NJ, Risch N. (1993) An association between the risk of cancer and mutations in the HRAS1 minisatellite locus. *N Engl J Med.* 329;517-23
11. Hwang DY, Cohen JB. (1997) A splicing enhancer in the 3'-terminal c-H-ras exon influences mRNA abundance and transforming activity. *J Virol.* 71:6416-26
12. Wittinghofer F. (1998) Ras signalling. Caught in the act of the switch-on. *Nature* 394:317, 319-20
13. Mamas I, Zafiropoulos A, Spandidos D. (2005) Involvement of ras genes in the female genital tract cancer. *Int J Oncol.* 26:1241-55 Review
14. Rusanescu G, Gotoh T, Tian X, Feig LA. (2001) Regulation of Ras signalling specificity by protein kinase C *Mol Cell Biol* 21:2650-8

15. Xing J, Ginty DD, Greenberg ME. (1996) Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor regulated CREB kinase. *Science* 273:959-63
16. Sistonen L, Holtta E, Makela TP, Keski-Oja J, Alitalo K. (1989) The cellular response to induction of the p21 c-Ha-ras oncoprotein includes stimulation of jun gene expression. *EMBO* 8:815-22
17. Giovane A, Pintzas A, Maira SM, Sobieszczuk P, Wasyluk B. (1994) Net, a new ets transcription factor that is activated by Ras. *Genes Dev* 8:1502-13
18. Chong H, Vikis HG, Guan KL. (2003) Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* 15:463-69
19. Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, Beller U, Westra W, Ladenson P, Sidransky D. (2003) BRAF mutation in PTC *J Nat Cancer Inst* 95:625-27
20. Davies H, et. al., (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949-54
21. Kiaris H, Spandidos D. (1995) Mutations of ras genes in human tumours. *Int J Oncol* 7:413-21
22. Yanez L, Groffen J, Valenzuela DM. (1987) c-K-ras mutations in human carcinomas occur preferentially in codon 12. *Oncogene*. 1(3):315-8.
23. Zauber NP, Sabbath-Solitare, Marotta SP, Bishop DT. (1999) K-Ras mutation and loss of heterozygosity of the adenomatous polyposis coli gene in patients with colorectal adenomas with in situ carcinoma. *Cancer* 86:31-6.
24. Spandidos DA, Sourvinos G, Tsatsanis C, Zafiroopoulos A. (2002) Normal ras gene: their onco-suppressor and pro-apoptotic functions (review). *Int J Oncol*. 21:237-41.
25. Melillo RM, Castellone MD, Guarino V, De Falco V, Cirafici AM, Salvatore G, Caiazzo F, Basolo F, Giannini R, Kruhoffer M, et al. (2005). The RET/PTC- RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic pheno- type of thyroid cancer cells. *J Clin Invest* 115, 1068–1081
26. Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, Pollan M, Herrero A, Pardo J, Wu R, Carcangiu ML, Costa J, Tallini G. (2003) ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol*. ;21(17):3226-35.
27. Esapa CT, Johnson SJ, Kendall-Taylor P, Lennard TW, Harris PE (1999) Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 50(4):529-35.

28. Alex A. Adjei (2001) Blocking Oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy JNCI J Natl Cancer Inst 93(14): 1062-1074
29. Dailey ME, Lindsay S, Skahen R. (1955) Relation of thyroid neoplasms to Hashimoto disease of the thyroid gland. AMA Arch Surg 70:291-297.
30. Spandidos DA, Wilkie NM. (1988) The normal human Hras1 gene act as an onco-suppressor. Brit J Cancer Suppl 9:67-71
31. Spandidos DA, Frame M, Wilkie NM. (1990) Expression of the normal H-ras1 gene can suppress the transformed and tumourigenic phenotypes induced by mutant ras genes. Anticancer Res 10:1543-54.
32. Zhang Z, Wang Y, Vikis HG, et al. (2001) Wild-type Kras2 can inhibit lung carcinogenesis in mice. Nat Genet 29:25-33.
33. Wyllie AH, Rose KA, Morris RG, Steel CM, Foster E, Spandidos DA. (1987) Rodent fibroblast tumours expressing human myc and ras genes: growth, metastasis and endogenous oncogene expression. Brit J Cancer 56:251-9.
34. Vater GA, Bartle LM, Dionne CA, Littlewood TD, Goldmacher VS. (1996) Induction of apoptosis by tamoxifen-activation of p53-estrogen receptor protein expressed in E1A and T24 H-ras transformed p53-/- mouse embryo fibroblasts. Oncogene 13:739-48.
35. Kauffman-Zeh A, Rodriguez-Viciano P, Ulrich E, et al. (1997) Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. Nature 385:544-8.
36. Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM. (1998) Sequence of human fibroblast induced by oncogenic Raf. Genes Dev 12:2997-3007.
37. Malumbres M, Barbacid M. (2003) RAS oncogenes: the first 30 years. Nat Rev Cancer. ; 3:459-65.
38. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, et al. (2003) BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. J Clin Endocrinol Metab. ;88:5399-404.
39. Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, et al. (2005) BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab. ;90:6373-9.
40. Vasko V, Hu S, Wu G, Xing JC, Larin A, Savchenko V, et al. (2005) High prevalence and possible de novo formation of BRAF mutation in metastasized papillary thyroid cancer in lymph nodes. J Clin Endocrinol Metab. ;90:5265-9.

41. Sedliarou I, Saenko V, Lantsov D, Rogounovitch T, Namba H, Abrosimov A, et al. (2004) The BRAFT1796A transversion is a prevalent mutational event in human thyroid microcarcinoma. *Int J Oncol.* 25:1729-35.
42. Fugazzola L, Puxeddu E, Avenia N, Romei C, Cirello V, Cavaliere A, et al. (2006) Correlation between B-RAFV600E mutation and clinico-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature. *Endocr Relat Cancer.* 13:455-64.
43. Liu RT, Chen YJ, Chou FF, Li CL, Wu WL, Tsai PC, et al. (2005) No correlation between BRAFV600E mutation and clinicopathological features of papillary thyroid carcinomas in Taiwan. *Clin Endocrinol (Oxf).* 63:461-6.
44. Kim TY, Kim WB, Song JY, Rhee YS, Gong G, Cho YM, et al. (2005) The BRAF mutation is not associated with poor prognostic factors in Korean patients with conventional papillary thyroid microcarcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 63:588-93.
45. Moretti F, Nanni S, Pontecorvi A. (2000) Molecular pathogenesis of thyroid nodules and cancer. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 14:517-39.
46. Mazzaferri EL. (1993) Management of a solitary thyroid nodule. *N Engl J Med.* 328:553-9.
47. Durante C, Puxeddu E, Ferretti E, Morisi R, Moretti S, Bruno R, et al. (2007) BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 92:2840-3.
48. Ambroziak M, Pachucki J, Stachlewska-Nasfeter E, Nauman J, Nauman A. (2005) Disturbed expression of type 1 and type 2 iodothyronine deiodinase as well as *titf1/nkx2-1* and *pax-8* transcription factor genes in papillary thyroid cancer. *Thyroid.* 15:1137-46.
49. Huang Y, Prasad M, Lemon WJ, Hampel H, Wright FA, Kornacker K, et al. (2001) Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:15044-9.
50. Rodrigues R, Roque L, Espadinha C, Pinto A, Domingues R, Dinis J, et al. (2007) Comparative genomic hybridization, BRAF, RAS, RET, and oligo-array analysis in aneuploid papillary thyroid carcinomas. *Oncol Rep.* 18:917-26.

51. Kiaris H, Spandidos D. (1995) Analysis of h-ras, k-ras and N-ras genes for expression, mutation and amplification in laryngeal tumors. *Int J Oncol.* 7:75-80.
52. Salvatore G, Giannini R, Faviana P, Caleo A, Migliaccio I, Fagin JA, et al. (2004) Analysis of BRAF point mutation and RET/PTC rearrangement refines the fine-needle aspiration diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 89:5175-80.
53. Mitsutake N, Miyagishi M, Mitsutake S, Akeno N, Mesa C, Jr., Knauf JA, et al. (2006) BRAF mediates RET/PTC-induced mitogen-activated protein kinase activation in thyroid cells: functional support for requirement of the RET/PTC-RAS-BRAF pathway in papillary thyroid carcinogenesis. *Endocrinology.* 147:1014-9.
54. Giordano TJ, Quirk R, Thomas DG, Misk DE, Vinco M, Sanders D, et al. (2005) Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. *Oncogene.* 24:6646-56.
55. Ishizaka Y, Kobayashi S, Ushijima T, Hirohashi S, Sugimura T, Nagao M. (1991) Detection of retTPC/PTC transcripts in thyroid adenomas and adenomatous goiter by an RT-PCR method. *Oncogene.* 6:1667-72.
56. Nikiforova MN, Caudill CM, Biddinger P, Nikiforov YE. (2002) Prevalence of RET/PTC rearrangements in Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid carcinomas. *Int J Surg Pathol.* 10:15-22.
57. Arif S, Blanes A, Diaz-Cano SJ. (2002) Hashimoto's thyroiditis shares features with early papillary thyroid carcinoma. *Histopathology.* 41:357-62.
58. Rhoden KJ, Unger K, Salvatore G, Yilmaz Y, Vovk V, Chiappetta G, et al. (2006) RET/papillary thyroid cancer rearrangement in nonneoplastic thyrocytes: follicular cells of Hashimoto's thyroiditis share low-level recombination events with a subset of papillary carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 91:2414-23.
59. Nikiforov YE. (2006) RET/PTC Rearrangement--a link between Hashimoto's thyroiditis and thyroid cancer...or not. *J Clin Endocrinol Metab.* 91:2040-2.
60. Chiappetta G, Toti P, Cetta F, Giuliano A, Pentimalli F, Amendola I, et al. (2002) The RET/PTC oncogene is frequently activated in oncocytic thyroid tumors (Hurthle cell adenomas and carcinomas), but not in oncocytic hyperplastic lesions. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:364-9.

61. Perea J, Alvaro E, Rodriguez Y, Gravalos C, Sanchez-Tome E, Rivera B, et al. (2010) Approach to early-onset colorectal cancer: clinicopathological, familial, molecular and immunohistochemical characteristics. *World J Gastroenterol.* 16:3697-703.
62. Raimondi S, Maisonneuve P, Lohr JM, Lowenfels AB. (2007) Early onset pancreatic cancer: evidence of a major role for smoking and genetic factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16:1894-7.
63. Lange EM, Salinas CA, Zuhlke KA, Ray AM, Wang Y, Lu Y, et al. (2012) Early onset prostate cancer has a significant genetic component. *Prostate.* 72:147-56.
64. Lalloo F, Varley J, Moran A, Ellis D, O'Dair L, Pharoah P, et al. (2006) BRCA1, BRCA2 and TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to relatives. *Eur J Cancer.* 42:1143-50.
65. Rosenberger A, Illig T, Korb K, Klopp N, Zietemann V, Wolke G, et al. (2008) Do genetic factors protect for early onset lung cancer? A case control study before the age of 50 years. *BMC Cancer.* 8:60.
66. Anderson WF, Pfeiffer RM, Tucker MA, Rosenberg PS. (2009) Divergent cancer pathways for early-onset and late-onset cutaneous malignant melanoma. *Cancer.* 115:4176-85.
67. Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, Bronson RT, Crowley D, Tuveson DA, et al. (2001) Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature.* 410:1111-6.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Expression analysis of B-Raf oncogene in V600E-negative benign and malignant tumors of the thyroid gland: correlation with late disease onset

Stavros P. Derdas¹, Nikolaos Soultzizis¹, Vasileios Balis¹,

Georgios H. Sakorafas² and Demetrios A. Spandidos^{1,*}

¹ Laboratory of Clinical Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion,
Greece

² 4th Department of Surgery, Medical School, University of Athens, Greece

*** Corresponding Author:** Professor Demetrios A. Spandidos

Laboratory of Clinical Virology

Medical School, University of Crete

P.O. Box 2208, Heraklion 71003, Crete

GREECE

Tel: +30 210 722 7809, Fax: +30 210 725 2922

E-mail: spandidos@spandidos.gr

ABSTRACT

1
2
3
4 B-Raf, a member of the Raf serine/threonine kinase family, is an intermediate
5
6 molecule in the mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway, which relays
7
8 extracellular signals from the cell membrane to the nucleus via a cascade of
9
10 phosphorylation events, ultimately promoting cancer development. This
11
12 pathway is usually activated in human neoplasias. The purpose of this study
13
14 was to investigate the role of B-Raf in thyroid pathology. We scanned for the
15
16 presence of mutations at codon 600 (V→E) of the B-Raf gene, using a PCR-
17
18 RFLP assay. In tumors with no mutation (32 benign and malignant thyroid
19
20 tumors) and in their adjacent normal tissue, we measured the expression levels
21
22 of B-Raf gene, using a quantitative Real-Time PCR (qPCR) assay. B-Raf
23
24 expression in V600E-negative tumors deviated from the normal pattern, since it
25
26 was overexpressed in 42% of benign samples and downregulated in 54% of
27
28 malignant specimens. Hashimoto's thyroiditis also seemed to play an important
29
30 role, since benign specimens with Hashimoto's thyroiditis had a 2.2-fold higher
31
32 B-Raf expression than samples without thyroiditis (1.71 ± 0.63 vs. 0.78 ± 0.13).
33
34 Statistical analysis revealed that B-Raf deregulation postponed disease onset by
35
36 more than 10 years in both benign and malignant thyroid. (benign: 55.6 ± 3.9
37
38 vs. 45.3 ± 3.3 , $p=0.049$; malignant: 52.2 ± 3.5 vs. 33.0 ± 7.9 , $p=0.020$). From the
39
40 above results we deduce that in the absence of mutation activation, B-Raf
41
42 overexpression or downregulation is a protective event, since it delays the
43
44 development of both malignant and benign thyroid tumors.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58

59 **Keywords:** mutation; mRNA; real-time PCR; Hashimoto's thyroiditis; disease onset
60
61
62
63
64
65

INTRODUCTION

1
2
3
4 Although thyroid cancer is the most common endocrine malignancy, it is a
5
6 relatively rare disease, accounting for ~1% of new cancer cases each year, with
7
8 a male:female ratio 1:3. The most prominent histological type is papillary
9
10 thyroid carcinoma (PTC), with 80% frequency among malignant thyroid tumors
11
12 [1]. The medical treatment for PTC is thyroidectomy, followed by radioiodine
13
14 ablation. 10-year survival rates are ~89% [2].
15
16

17
18
19 The Raf serine/threonine kinase family has three members, A-Raf, B-Raf
20
21 and C-Raf, which share three conserved regions, CR1, CR2, and CR3. Raf is
22
23 activated when phosphorylated Ras binds to the Ras binding domain (RBD) and
24
25 cysteine rich domain (CRD) of CR1 [3, 4]. After its activation, which can also
26
27 occur by Ras-independent elements, Raf relays the upstream signals, ultimately
28
29 mediating cell proliferation and migration, and thus playing a significant role in
30
31 angiogenesis, tumorigenesis and metastasis [5].
32
33
34

35
36
37 Somatic B-Raf mutations are observed in 60%-70% of melanomas,
38
39 colorectal carcinomas and ovarian malignancies [6, 7], and at lower rates in
40
41 gliomas, sarcomas, lymphomas, leukemias, and neoplasms of the breast and
42
43 lung [8, 9]. The most common mutation, accounting for 80% of all B-Raf
44
45 mutations, is a single base substitution which changes the amino acid Valine (V)
46
47 with Glutamic acid (E) at codon 600 of the B-Raf coding region (V600E) at exon
48
49 15, and leads to the activation of B-Raf, independently of the upstream signal
50
51 from Ras [6].
52
53
54

55
56
57 B-Raf mutations have been also detected in PTCs [10]. The V600E
58
59 mutation in particular, with a frequency between 35%-55% [11-13], has been
60
61
62

1 linked to disease aggressiveness and progression, frequent recurrences and
2 poor patient survival [14, 15].
3

4
5 Since no data exist regarding B-Raf expression, especially in tumors with
6 no mutations, we aimed to investigate the role of the B-Raf oncogene, by
7 evaluating its mRNA expression in benign and malignant thyroid tumors that
8 have not been activated by the V600E mutation, and to correlate the results
9 with patients' clinical and pathological characteristics.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

METHODS

Study Subjects

Benign or malignant and adjacent normal tissue samples were collected from patients that underwent surgery for thyroid tumors at the 1st Department of Surgery, 251 Hellenic Air Force Hospital, Athens, Greece. Specimens were immediately frozen after surgical removal and stored at -80°C until used. All tumors were located only on one thyroid lobe, and normal tissues were obtained from the other, unaffected lobe. Histopathological analysis revealed that all malignant tumors were papillary thyroid carcinomas (PTCs). The clinical and histopathological characteristics of the patients used, after excluding those with V600E mutations, are listed in Table 1. The Ethics Committees of the University of Crete and the 251 Hellenic Air Force Hospital approved this study and written informed consent was obtained from all participants.

DNA Extraction

DNA extraction was performed using the Genomic DNA Purification Kit (Genomed, Löhne, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA was stored at -20°C until use.

PCR-RFLP Analysis

The primers used for the identification of the V600E mutation, are listed in Table 2. PCR reaction was carried out at an annealing temperature of 58°C, using *Pfu* polymerase for higher accuracy (Fermentas, Vilnius, Lithuania).

1 PCR products (10 μ l) were incubated at 37°C with 20units of XbaI
2 endonuclease (Fermentas) for 16h (Table 2). Restriction fragments were
3 resolved on 2% (w/v) agarose gels and stained with ethidium bromide. Results
4 were confirmed in representative samples by direct sequencing.
5
6
7
8
9

10 ***RNA Extraction and cDNA Synthesis***

11 RNA was isolated from the 32 B-Raf V600E-negative tumors using the
12 PARIS™ Protein and RNA Isolation System (Ambion, Austin, TX) according to
13 the manufacturer's protocol. RNA concentration and purity was determined by
14 measuring its absorption rate at 260/280 nm with a ND1000D
15 spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE).
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

26 cDNA was synthesized by reverse transcription (RT) with the
27 RETROscript® Kit (Ambion) according to the manufacturer's manual. cDNA was
28 stored at -20°C until used.
29
30
31
32
33
34
35
36

37 ***Quantitative Real Time PCR***

38 B-Raf mRNA expression was measured using a real-time qPCR assay with
39 SYBR® Green I dye, with β -actin as internal control (Table 2). cDNA (1 μ l) was
40 amplified in a PCR reaction (final volume 20 μ l) containing 2 \times Maxima™ SYBR
41 Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas) and 300nM of each primer. A
42 representative pool of all samples was diluted in a series of six 2 \times dilutions, and
43 was run in the same plate, in order to construct a standard curve for the
44 quantification process. After initial denaturation at 95°C for 10min, samples
45 were subjected to 45 cycles of amplification, comprised of denaturation at 95°C
46 for 20s, annealing at 60°C for 30s and elongation at 72°C for 20s, followed by a
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 melt curve analysis, in which the temperature was increased from 60°C to 95°C
2 at a linear rate of 0.2°C/sec. Data was collected during annealing (two
3 measurements), and at all times during melt curve analysis. Experiments were
4 conducted on Mx3000P real-time PCR thermal cycler using the software version
5 4.1 (Stratagene, La Jolla, CA). To normalize the mRNA expression of B-Raf, its
6 value was divided by the same sample's β -actin mRNA value. The normalized
7 values of benign and malignant thyroid tumor samples were divided by the
8 normalized values of their adjacent normal samples. 2-fold increased (a value
9 ≥ 2) or decreased (a value ≤ 0.5) expression was considered biologically
10 significant (overexpression or downregulation respectively).
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

28 ***Statistical Analysis***

29
30 Pearson's correlation or the non-parametric Spearman rank correlation
31 was used to examine the association of B-Raf mRNA levels with continuous
32 variables (age). Additionally, their association with categorical data (gender,
33 cancer Stage and TNM, Hashimoto thyroiditis) was examined using Student's T-
34 test or its non-parametric equivalents Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis H
35 tests. Moreover, the Chi-square (χ^2) test, using Fisher's exact test when
36 indicated by the analysis, was used to examine B-Raf expression status with the
37 various clinicopathological parameters after stratification. Finally one-minus-
38 survival plots were created with Kaplan-Meier, using the Breslow test to compare
39 the equality of survival distributions in each one. All statistical analyses were 2-
40 sided and performed with SPSS 11.5 (SPSS, Chicago, IL). Statistical significance
41 was set at the 95% level (p-value <0.05).
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

RESULTS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

In this study we measured the mRNA expression levels of B-Raf gene in 32 benign and malignant thyroid tumors, matched with normal adjacent tissue, in which no mutations at codon 600 (V→E) were detected.

B-Raf was overexpressed in 8/19 (42.1%) benign samples, downregulated in 6/19 (31.6%) while in 5/19 samples (26.3%) its expression was normal. On the contrary, B-Raf was overexpressed in 3/13 (23.1%) malignant samples, downregulated in 7/13 (53.8%), while in 3/13 (23.1%) its expression was normal (Table 3). Interestingly, the mean average expression of B-Raf in malignant samples was only ~15% of its expression in benign samples (0.21 ± 0.06 vs. 1.36 ± 0.33 , $p=0.042$; 2-tailed Mann-Whitney U test) (Figure 1). Further analysis revealed an expression difference even within benign tumors: in specimens with Hashimoto's thyroiditis B-Raf expression was 2.2-fold higher than in samples without thyroiditis (1.71 ± 0.63 vs. 0.78 ± 0.13) (Figure 2).

Statistical analysis showed that B-Raf expression correlated with age in benign samples, since patients that overexpressed B-Raf were on average 10 years older than those with normal or reduced B-Raf expression (55.6 ± 3.9 vs. 45.3 ± 3.3 , $p=0.049$; Kaplan-Meier Breslow test) (Figure 3A). A similar phenomenon was observed in malignant samples, since patients that overexpressed or downregulated B-Raf were on average 19 years older than patients with normal B-Raf mRNA expression (52.2 ± 3.5 vs. 33.0 ± 7.9 , $p=0.020$; Kaplan-Meier Breslow test) (Figure 3B). No other statistically significant findings were observed in benign or malignant samples in comparison with the other clinicopathological characteristics (gender, TNM, cancer stage).

DISCUSSION

1
2
3
4 In this study, we demonstrated that in V600E-negative tumors, B-Raf was
5
6 predominately overexpressed in benign specimens (especially those with
7
8 Hashimoto's thyroiditis) and downregulated in malignant samples, and that this
9
10 deviation from the normal expression pattern in the absence of mutations
11
12 delays tumor development and onset.
13
14
15

16 Since B-Raf is a downstream mediator of Ras signaling, and since mutant
17
18 Ras proteins are present in ~33% of all human neoplasias [16], the detection
19
20 of mutant B-Raf alleles supports the involvement of the Ras/Raf/MEK/ERK
21
22 signaling pathway in tumorigenesis. However, the role of B-Raf V600E mutation
23
24 in thyroid cancer progression remains unclear. While numerous reports suggest
25
26 that B-Raf mutations are associated with thyroidal invasion, lymph node
27
28 metastases, advanced tumor stage, and tumor recurrence [14, 17], several
29
30 studies have failed to detect such an association [18, 19]. Since 40%-60% of
31
32 thyroid tumors don't have B-Raf mutations, other genetic events, such as
33
34 RET/PTC rearrangements [20], contribute to the development and progression
35
36 of these tumors. Additionally, although oncogenic alterations, such as Ras
37
38 mutations, have been observed in benign thyroid adenomas, their role is
39
40 unclear, as the probability of malignant transformation of these benign tumors
41
42 is low [21].
43
44
45
46
47
48
49
50
51

52 Our study is the first to examine B-Raf expression in benign and malignant
53
54 thyroid tumors not activated by the V600E mutation, and to find that in both
55
56 diseases its transcription levels deviate from the normal pattern. The fact that
57
58 the average B-Raf expression in malignant samples was only 1/6th of its
59
60
61
62
63
64
65

1 expression in benign samples is also noteworthy. The literature lacks data
2 regarding mRNA or protein expression of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway genes.
3
4 Only the expression of the upstream Ras genes has been examined thus far in
5 laryngeal tumors. Expression levels were elevated [22].
6
7

8
9
10 Interestingly, in our study the average B-Raf expression of benign tumors
11 with Hashimoto's thyroiditis (HT) was 2.2-fold higher than in samples without
12 thyroiditis. Hashimoto thyroiditis is the most common form of thyroiditis, with a
13 female:male ratio 20:1. The majority of patients is hypothyroid and with
14 elevated thyrotropin serum levels. Some patients with HT develop nodules that
15 share morphological features and immunohistochemical patterns with PTC [23].
16
17 Although our results could enhance the link between Hashimoto's thyroiditis
18 and the neoplastic transformation of these lesions, their significance remains
19 unclear, since only a fraction of HT cases evolve into clinically significant
20 papillary carcinomas [24].
21
22

23
24
25 We also observed that, in the absence of V600E-activating mutations, B-
26 Raf expression deregulation is associated with delayed benign and malignant
27 thyroid tumor onset by at least 10 years. Although genetic events associated
28 with both early and late disease onset have been observed in several
29 malignancies, such as colon [25], prostate [26] and breast [27], this is the first
30 report for thyroid tumors. The only molecule of the Ras/RAf/MEK/ERK pathway
31 that has been associated with early disease is K-Ras, whose mutations have
32 been linked to early lung cancer onset in mice [28]. Therefore, this is the first
33 study to associate B-Raf with any disease onset. Large cohort studies are
34 needed to verify our preliminary results.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

In conclusion, we deduce that B-Raf expression plays an important role in both benign and malignant thyroid disease, by delaying their development and progression in the absence of activating mutations. Nevertheless, the precise molecular pathways that are involved, as well as B-Raf's potential role as a therapeutic target or as a biomarker for early disease detection still need to be investigated.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA*. 2006;295:2164-7.
2. Samaan NA, Schultz PN, Hickey RC, Goepfert H, Haynie TP, Johnston DA, et al. The results of various modalities of treatment of well differentiated thyroid carcinomas: a retrospective review of 1599 patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992;75:714-20.
3. Morrison DK, Cutler RE. The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9:174-9.
4. Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal*. 2003;15:463-9.
5. Joneson T, Bar-Sagi D. Ras effectors and their role in mitogenesis and oncogenesis. *J Mol Med (Berl)*. 1997;75:587-93.
6. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417:949-54.
7. Pollock PM, Meltzer PS. A genome-based strategy uncovers frequent BRAF mutations in melanoma. *Cancer Cell*. 2002;2:5-7.
8. Davies H, Hunter C, Smith R, Stephens P, Greenman C, Bignell G, et al. Somatic mutations of the protein kinase gene family in human lung cancer. *Cancer Res*. 2005;65:7591-5.
9. Stephens P, Edkins S, Davies H, Greenman C, Cox C, Hunter C, et al. A screen of the complete protein kinase gene family identifies diverse patterns of somatic mutations in human breast cancer. *Nat Genet*. 2005;37:590-2.
10. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:5399-404.
11. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res*. 2003;63:1454-7.
12. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene*. 2003;22:4578-80.

- 1
2 13. Fukushima T, Suzuki S, Mashiko M, Ohtake T, Endo Y, Takebayashi Y, et al. BRAF
3 mutations in papillary carcinomas of the thyroid. *Oncogene*. 2003;22:6455-7.
- 4
5 14. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, et
6 al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid
7 cancers. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:4393-7.
- 8
9 15. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular
10 bases, and clinical implications. *Endocr Rev*. 2007;28:742-62.
- 11
12 16. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*.
13 2003;3:459-65.
- 14
15 17. Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, et al. BRAF
16 mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin*
17 *Endocrinol Metab*. 2005;90:6373-9.
- 18
19 18. Liu RT, Chen YJ, Chou FF, Li CL, Wu WL, Tsai PC, et al. No correlation between
20 BRAFV600E mutation and clinicopathological features of papillary thyroid
21 carcinomas in Taiwan. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005;63:461-6.
- 22
23 19. Kim TY, Kim WB, Song JY, Rhee YS, Gong G, Cho YM, et al. The BRAF mutation
24 is not associated with poor prognostic factors in Korean patients with
25 conventional papillary thyroid microcarcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*.
26 2005;63:588-93.
- 27
28 20. Salvatore G, Giannini R, Faviana P, Caleo A, Migliaccio I, Fagin JA, et al. Analysis
29 of BRAF point mutation and RET/PTC rearrangement refines the fine-needle
30 aspiration diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*.
31 2004;89:5175-80.
- 32
33 21. Moretti F, Nanni S, Pontecorvi A. Molecular pathogenesis of thyroid nodules and
34 cancer. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2000;14:517-39.
- 35
36 22. Kiaris H, Spandidos D. Analysis of h-ras, k-ras and N-ras genes for expression,
37 mutation and amplification in laryngeal tumors. *Int J Oncol*. 1995;7:75-80.
- 38
39 23. Arif S, Blanes A, Diaz-Cano SJ. Hashimoto's thyroiditis shares features with early
40 papillary thyroid carcinoma. *Histopathology*. 2002;41:357-62.
- 41
42 24. Nikiforov YE. RET/PTC Rearrangement--a link between Hashimoto's thyroiditis
43 and thyroid cancer...or not. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:2040-2.
- 44
45 25. Perea J, Alvaro E, Rodriguez Y, Gravalos C, Sanchez-Tome E, Rivera B, et al.
46 Approach to early-onset colorectal cancer: clinicopathological, familial, molecular
47 and immunohistochemical characteristics. *World J Gastroenterol*. 2010;16:3697-
48 703.
- 49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2 26. Lange EM, Salinas CA, Zuhlke KA, Ray AM, Wang Y, Lu Y, et al. Early onset
3 prostate cancer has a significant genetic component. *Prostate*. 2012;72:147-56.
- 4 27. Lalloo F, Varley J, Moran A, Ellis D, O'Dair L, Pharoah P, et al. BRCA1, BRCA2 and
5 TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to
6 relatives. *Eur J Cancer*. 2006;42:1143-50.
- 7 28. Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, Bronson RT, Crowley D, Tuveson DA, et al.
8 Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice.
9 *Nature*. 2001;410:1111-6.
- 10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 1. Clinicopathological characteristics of the study subjects

	Benign (n=19)	Malignant (n=13)
Age, years (mean ±SD)	49.6±11.9	47.8±13.9
Gender		
Male	4 (21.1%)	2 (15.4%)
Female	15 (78.9%)	11 (84.6%)
Hashimoto thyroiditis		
Yes	8 (42.1%)	—
No	11 (57.9%)	—
TNM		
T1-T2	—	9 (69.2%)
T3-T4	—	4 (30.8%)
Cancer Stage		
I	—	8 (61.5%)
II-IV	—	5 (38.5%)

Table 2. Primers sequences used for PCR-RFLP & quantitative Real-Time PCR

Gene	Primer pair sequence (5' – 3')	Tm	PCR product (bp)	V ⁶⁰⁰ E XbaI RFLP
B-Raf (DNA)	TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA	58°C	224	V:124+87+13 E:211+13
B-Raf (RNA)	GGGGCAGTCGCGCCTGTGAA CCGGCGCCCACCACCACCAG	60°C	101	—
β-actin (RNA)	CGGCATCGTCACCAACTG GGCACACGCAGCTCATTG	60°C	70	—

Table 3. mRNA expression status of B-Raf in benign and malignant thyroid tumors

	Overexpression	Normal expression	Downregulation
Benign (n=19)	8 (42.1%)	5 (26.3%)	6 (31.6%)
Malignant (n=13)	3 (23.1%)	3 (23.1%)	7 (53.8%)
Total (n=32)	11 (34.4%)	8 (25.0%)	13 (40.6%)

FIGURE LEGENDS

1
2
3
4
5 **Fig. 1** Box and whisker plots depicting the mRNA expression of B-Raf gene in
6
7 V600E-negative benign and malignant thyroid samples. Expression in benign
8
9 samples was 6.5-fold higher than in malignant specimens (1.36 ± 0.51 vs.
10
11 0.21 ± 0.10 , $p=0.042$). Statistical analysis was conducted with 2-tailed Mann-
12
13 Whitney U test.
14
15

16
17
18
19
20 **Fig. 2** B-Raf expression in benign thyroid tumors with or without Hashimoto's
21
22 thyroiditis. Samples with Hashimoto's thyroiditis have a 2.2-fold higher
23
24 expression than samples without thyroiditis (1.71 ± 0.63 vs. 0.78 ± 0.17).
25
26

27
28
29
30 **Fig. 3** Kaplan-Meier one minus survival plots of B-Raf expression and age of
31
32 disease onset in **(A)** benign and **(B)** malignant thyroid samples. **(A)** B-Raf
33
34 overexpression delays benign disease onset by ~10 years, when compared to
35
36 samples that have normal or reduced B-Raf expression (55.6 ± 3.9 vs. 45.3 ± 3.3 ,
37
38 $p=0.049$). **(B)** B-Raf expression deregulation (overexpression or
39
40 downregulation) delays malignant disease onset by ~19 years, when compared
41
42 to samples that have normal B-Raf expression (52.2 ± 3.5 vs. 33.0 ± 7.9 ,
43
44 $p=0.020$). Statistical analysis was conducted with the Breslow test.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 1

[Click here to download high resolution image](#)

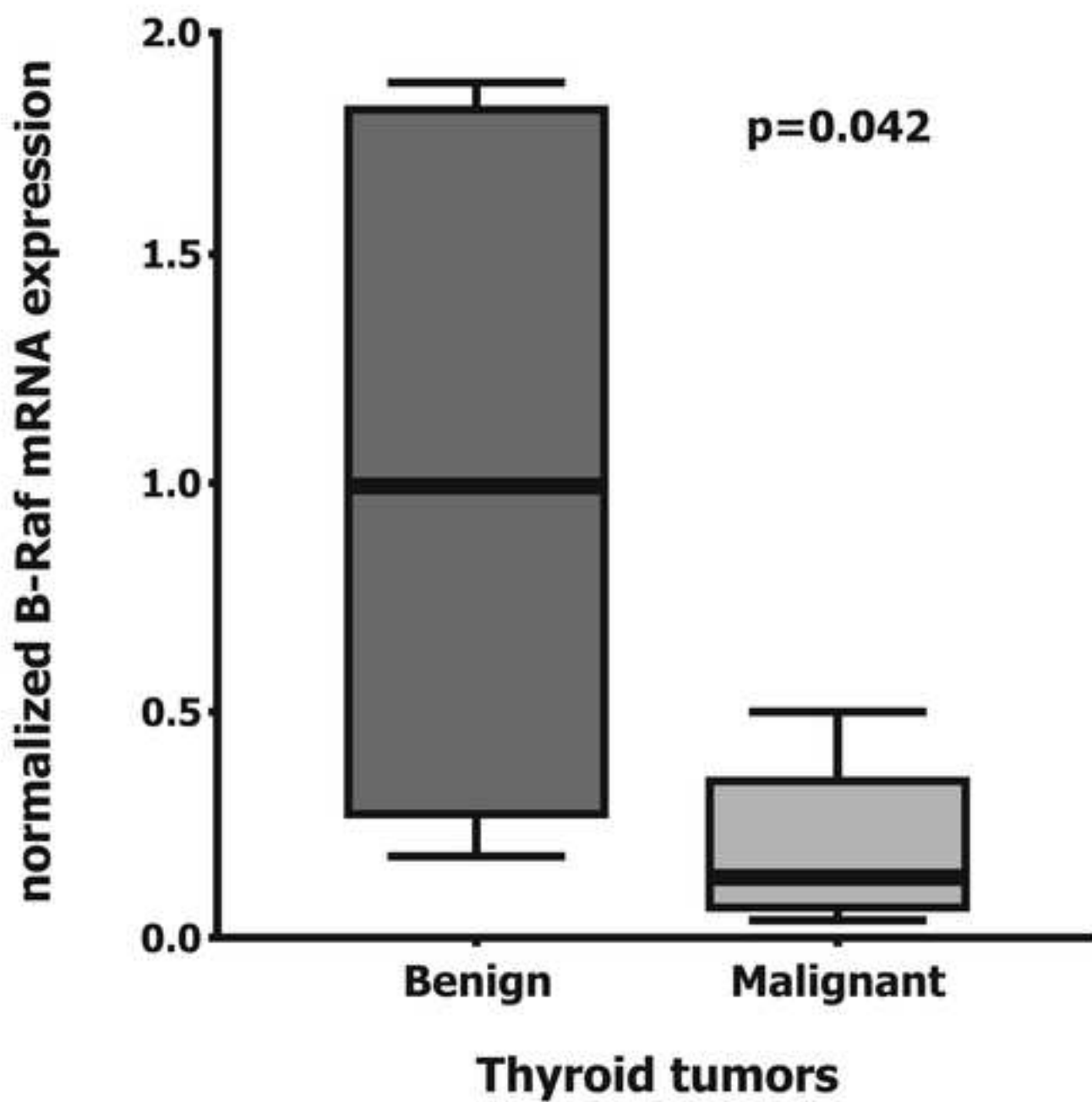


Figure2

[Click here to download high resolution image](#)

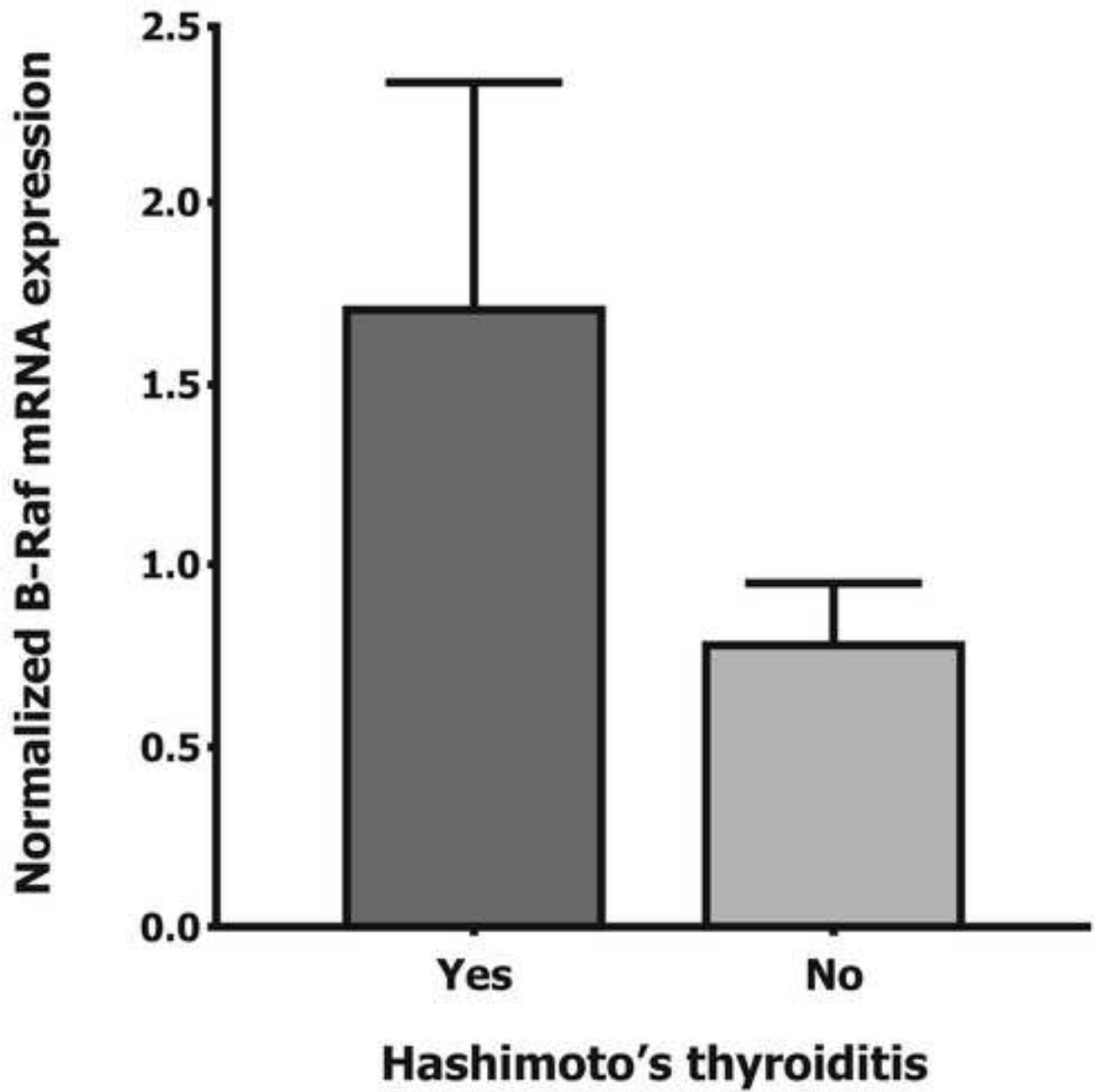


Figure3

[Click here to download high resolution image](#)

