

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200106



ΔΔ.
610
NET
2003

Δφ. 0105.....453.....2004. A

303





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙΝΙΚΗ
ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΔΙΒΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Β. ΤΣΙΑΝΟΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗΣ α ΣΤΟΝ ΘΥΡΕΟΒΙΑΗ ΑΔΕΝΑ.
ΡΟΛΟΣ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ.**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Π. ΛΕΤΣΛΕ
ΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2003



115/2003



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»



ΑΙΤΗΣΗ: 20-10-1997

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 21-10-1997

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Επιβλέπων:

Αγαθοκλής Τσατσούλης

Καθηγήτης Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Βασιλική Μαλάμου-Μήτση

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μαρία Φράγκου-Λαζαρίδη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ: 4-12-1997

ΚΑΤΑΘΕΣΗ: 26-5-2003

ΟΝΟΜΑ ΠΡΟΕΔΡΟΥ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ: Καθηγήτης Νίκη Αγκάντη

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Αγαθοκλής Τσατσούλης

Καθηγήτης Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Βασιλική Μαλάμου-Μήτση

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μαρία Φράγκου-Λαζαρίδη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Νίκη Αγκάντη

Καθηγήτης Παθολογικής Ανατομίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Νικόλαος Παυλίδης

Καθηγήτης Παθολογίας-Ογκολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Δημήτριος Στεφάνου

Αναπληρωτής Καθηγήτης Παθολογικής Ανατομίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ευστάθιος Φριλιγγος

Επίκουρος Καθηγήτης Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΒΑΘΜΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: Άριστα

Η Γραμματέας της Ιατρικής Σχολής

Ευαγγελία Τσαγγαλά



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η πρόλογος είναι μια μικρή, αλλά σημαντική, εισαγωγή στην εργασία. Η πρόλογος είναι μια μικρή, αλλά σημαντική, εισαγωγή στην εργασία. Η πρόλογος είναι μια μικρή, αλλά σημαντική, εισαγωγή στην εργασία.

**Στους γονείς μου
Παντελή και Γρηγορία**

Αυτή η εργασία είναι αφιερωμένη στους γονείς μου, Παντελή και Γρηγορία. Η εργασία είναι αφιερωμένη στους γονείς μου, Παντελή και Γρηγορία. Η εργασία είναι αφιερωμένη στους γονείς μου, Παντελή και Γρηγορία.

**Στον αδελφό μου
Γιώργο**

Η εργασία είναι αφιερωμένη στον αδελφό μου, Γιώργο. Η εργασία είναι αφιερωμένη στον αδελφό μου, Γιώργο. Η εργασία είναι αφιερωμένη στον αδελφό μου, Γιώργο.



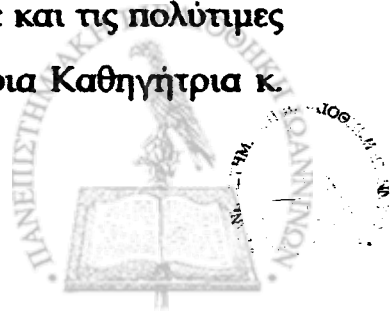
ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η προθυμοσίνη α είναι μια μικρή, όξινη, πυρηνική ογκο-πρωτεΐνη με ευρεία ιστική και φυλογενετική κατανομή, της οποίας ο βιολογικός ρόλος είναι στενά συνδεδεμένος με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και την αναστολή της αποπτωτικής διαδικασίας. Η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της προθυμοσίνης α βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο των μεταγραφικών παραγόντων c-myc, E2F-1 και p53. Η παραθυμοσίνη, μια πρωτεΐνη με σημαντικές ομοιότητες με την προθυμοσίνη α, εμπλέκεται επίσης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα επίπεδα των δύο πρωτεϊνών είναι αυξημένα σε ταχέως αναπτυσσόμενους φυσιολογικούς ιστούς και σε καρκινικούς ιστούς.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε για πρώτη φορά η έκφραση της προθυμοσίνης α και της παραθυμοσίνης σε ανθρώπινο θυρεοειδικό ιστό και πιο συγκεκριμένα σε καλοήγη και κακοήγη νεοπλασμάτα του αδένου. Η έκφραση της προθυμοσίνης α μελετήθηκε τόσο σε επίπεδο mRNA (RT-PCR) όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης (ELISA, ανοσοϊστοχημεία). Οι πιθανοί πολυμορφισμοί του γονιδίου της προθυμοσίνης α αναζητήθηκαν με την μέθοδο διαμόρφωσης μονής αλυσού του DNA (SSCP). Επιπρόσθετα διερευνήθηκε ανοσοϊστοχημικά ο ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων προθυμοσίνη α, E2F-1 και p53 και των αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bax στην ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης των θυλακιοδών κυττάρων του θυρεοειδούς. Η *in situ* ανίχνευση της απόπτωσης στα νοσήματα του θυρεοειδούς πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο TUNEL.

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα Εργαστήρια Βιολογικής Χημείας και Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών.

Άμεσος επιβλέπων της διατριβής ήταν ο Καθηγητής κ. Α. Τσατσούλης, τον οποίο ευχαριστώ για την συνεχή και ουσιαστική καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την διάρκεια της εργασίας. Ευχαριστώ την Καθηγήτρια κ. Β. Μαλάμου-Μήτση, επιβλέπουσα της διατριβής, για το αμείωτο ενδιαφέρον που επέδειξε και τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφερε. Ευχαριστώ θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ.



Μ. Φράγκου-Λαζαρίδη, επιβλέπουσα της διατριβής, η συμβολή της οποίας στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας ήταν καταλυτική και η πλέον σημαντική.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ε. Φριλίγγο, μέλος της επιταμελούς εξεταστικής επιτροπής, για τις εποικοδομητικές συζητήσεις και τις εύστοχες υποδείξεις κατά την διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και στα υπόλοιπα μέλη της επιταμελούς εξεταστικής επιτροπής και πιο συγκεκριμένα στην Καθηγητή κ. Ν. Αγνάντη, στον Καθηγητή κ. Ν. Παυλίδη και στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δ. Στεφάνου.

Θερμές ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στον Διδάκτορα κ. Γ. Βαρθολομάτο για τις εποικοδομητικές συζητήσεις και την βοήθεια που μου προσέφερε καθ' όλη την διάρκεια της διατριβής.

Οφείλω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Α. Αλετρά, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών, για την εκμάθηση της ενζυμοσύνδετης ανοσοπροσοφητικής μεθόδου (ELISA) και για την προσφορά του αντισώματος έναντι της προθυμοσίνης α.

Ευχαριστώ θερμά τον Διευθυντή της Παθολογικής Κλινικής του Γ. Ν. Νοσοκομείου Φιλιατών κ. Γ. Τσώνη για την κατανόηση που επέδειξε και τις διευκολύνσεις που μου παρείχε ώστε να ολοκληρωθεί η παρούσα εργασία.

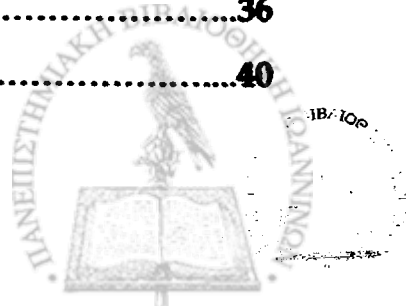
Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας για την άψογη, εποικοδομητική και ευχάριστη συνεργασία μας. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους Διδάκτορες Ι. Σαΐνη και Κ. Βαρέλη, τους Υποψήφιους Διδάκτορες G. Martić και Α. Σκύρλα και την συνάδελφο Ιατρό Μ. Ανδρικούλα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Βιοχημικό Χ. Τσέπη και στον Φυσικό Χ. Γρηγοριάδη για την συνεχή ηθική υποστήριξη που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ηθική και υλική υποστήριξη που μου παρείχε όλα τα χρόνια των σπουδών μου.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

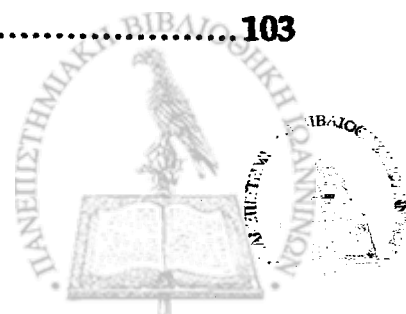
1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. 1.	Προθυμοσίνη α και θυμοσίνη α1. Απομόνωση και πρωτοταγής δομή.	1
1. 2.	Ιστική και φυλογενετική κατανομή της προθυμοσίνης α.	5
1. 3.	Η θέση της προθυμοσίνης α στο κύτταρο.	6
1. 4.	Δομή του γονιδίου της προθυμοσίνης α.	7
1. 5.	Εξωκυττάριος ρόλος της προθυμοσίνης α. Ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες της πρωτεΐνης.	11
1. 6.	Ενδοκυττάριος ρόλος της προθυμοσίνης α. Συμμετοχή στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.	12
1. 7.	Προθυμοσίνη α και απόπτωση.	16
1. 8.	Προθυμοσίνη α και καρκίνος.	17
1. 9.	Παραθυμοσίνη. Απομόνωση και πρωτοταγής δομή. Δομή του γονιδίου. Ενδοκυττάρια εντόπιση.	18
1. 10.	Ιστική και φυλογενετική κατανομή της παραθυμοσίνης.	20
1. 11.	Βιολογικός ρόλος της παραθυμοσίνης.	21
1. 12.	Θυρεοειδής αδένας.	22
1. 12. 1.	Εμβρυολογία.	22
1. 12. 2.	Ανατομία.	22
1. 12. 3.	Ιστολογία.	24
1. 12. 4.	Φυσιολογία.	24
1. 13.	Απλή οζώδης βρογχοκήλη. Αιτιοπαθογένεια.	26
1. 14.	Καρκίνος του θυρεοειδούς αδένος.	30
1. 15.	Διαγνωστική προσέγγιση των θυρεοειδικών όζων.	33
1. 16.	Ο ρόλος της απόπτωσης στην απλή οζώδη βρογχοκήλη και στα νεοπλάσματα του θυρεοειδούς αδένος.	36
1. 17.	Σκοπός της εργασίας.	40



2	ΑΣΘΕΝΕΙΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	43
2.1.	Ασθενείς. Δείγματα θυρεοειδικού ιστού.	43
2.2.1	Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από περιφερικό αίμα.	46
2.2.2	Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από το υλικό της παρακέντησης του αδένου (FNA).	50
2.3.	Ηλεκτροφόρηση γονιδιωματικού DNA.	50
2.4.	Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων με φορείς που περιέχουν ευκαριωτικό DNA (Transformation).....	52
2.5.	Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini preparation).....	52
2.6.1.	Απομόνωση ολικού RNA.....	53
2.6.2.	Απομόνωση RNA από περιφερικό αίμα.....	53
2.6.3.	Απομόνωση RNA από το υλικό της παρακέντησης του αδένου (FNA).	55
2.6.4.	Απομόνωση RNA από θυρεοειδικό ιστό.	56
2.6.5.	Απομόνωση RNA από ιστικά παρασκευάσματα παραφίνης.	57
2.7.	Ηλεκτροφόρηση RNA.	58
2.8.1.	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).	59
2.8.2.	Ανίχνευση του λειτουργικού γονιδίου της προθυμοσίνης α.	61
2.8.3.	Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης με ημι-ποσοτική αντίστροφη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Reverse Transcriptase -Polymerase Chain Reaction, RT-PCR).	64
2.9.	Πολυμορφισμοί διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP).	71
2.10.	Συναγωνιστική ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοροφητική μέτρηση (Competitive enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA).	74
2.11.	Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών προθυμοσίνη α, Ki-67, E2F-1, p53, Bcl-2 και Bax.	77
2.12.	In situ ανίχνευση της απόπτωσης (TUNEL).	80



3. 1. 1. Απομόνωση του λειτουργικού γονιδίου της προθυμοσίνης α από λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος και θυλακιώδη κύτταρα θυρεοειδούς αδένα (FNA).82
3. 1. 2. Μελέτη της έκφρασης της προθυμοσίνης α και της παραθυμοσίνης με ημι-ποσοτική RT-PCR σε δείγματα FNA με απλή οξώδη βρογχοκίλη και σε τομές παραφίνης με καλοήθειες και κακοήθειες παθήσεις του θυρεοειδούς.82
3. 2. Μέτρηση των επιπέδων της προθυμοσίνης α στον ορό και σε ιστικά εκχυλίσματα θυρεοειδικού ιστού με συναγωνιστική ανοσοπροσοροφητική μέθοδο (ELISA). 90
3. 3. Μελέτη των πολυμορφισμών του γονιδίου της προθυμοσίνης α. 97
3. 4. . Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης πρωτεϊνών προθυμοσίνη α, E2F-1, p53, Bcl-2, Bax και του πυρηνικού αντιγόνου Ki-67 σε ιστολογικές τομές παραφίνης. 98
3. 4. 1. Μελέτη της έκφρασης της προθυμοσίνης α. 99
3. 4. 2. Μελέτη της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα E2F-1. 100
3. 4. 3. Μελέτη της έκφρασης της ογκο-κατασταλτικής πρωτεΐνης p53.100
3. 4. 4. Μελέτη της έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2.100
3. 4. 5. Μελέτη της έκφρασης της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax.101
3. 4. 6. Μελέτη της έκφρασης του αντιγόνου Ki-67. Προσδιορισμός του δείκτη πολλαπλασιασμού των θυλακιωδών κυττάρων.102
3. 4. 7. In situ ανίχνευση της απόπτωσης σε καλοήθειες και κακοήθειες παθήσεις του θυρεοειδούς. Προσδιορισμός του αποπτωτικού δείκτη των θυλακιωδών κυττάρων.102
3. 4. 8. Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών προθυμοσίνη α, E2F-1, p53, Bcl-2, Bax και των δεικτών πολλαπλασιασμού και απόπτωσης.103



4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	112
5.	ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	129
5. 1.	Περίληψη στα Ελληνικά.	129
5. 2.	Περίληψη στα Αγγλικά.	134
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	139



ΣΧΗΜΑΤΑ

- Σχήμα 1: Πρωτοταγής δομή της προθυμοσίνης α ανθρώπου, επίμυος και βοός.
- Σχήμα 2: Διαγραμματική απεικόνιση της δομής του γονιδίου της προθυμοσίνης α ανθρώπου.
- Σχήμα 3: Διαγραμματική απεικόνιση της δομής του υποκινητή του λειτουργικού γονιδίου της προθυμοσίνης α.
- Σχήμα 4: Διαγραμματική απεικόνιση της δομής του γονιδίου της παραθυμοσίνης επίμυος.
- Σχήμα 5: Ρύθμιση της έκκρισης των θυρεοειδικών ορμονών.
- Σχήμα 6: Διαγραμματική απεικόνιση της ογκογένεσης των καρκινωμάτων του θυρεοειδούς.
- Σχήμα 7: Η αλληλουχία κάθε εκκινητή (sense και antisense) για τα γονίδια της προθυμοσίνης α και του p53 σχεδιάστηκε ώστε να είναι συμπληρωματική σε περιοχή του cDNA (RNA) που αντιστοιχεί σε δύο διαδοχικά εξόνια, με αποτέλεσμα να μην ενισχύεται το μεταξύ τους ιντρόνιο και κατά συνέπεια να μην ενισχύεται γενωμικό DNA.
- Σχήμα 8: Σχηματική ανάλυση της μεθόδου SSCP.
- Σχήμα 9: Σχηματική ανάλυση της ενζυμοσύνδετης ανοσοπροσοροφητικής μέτρησης (Competitive Inhibition ELISA).
- Σχήμα 10. Γραφική παράσταση των επιπέδων της β-ακτίνης, της προθυμοσίνης α και της παραθυμοσίνης σε δείγματα FNA ασθενών με απλή οζώδη βρογχοκίλη.
- Σχήμα 11. Επίπεδα mRNA της προθυμοσίνης α και της παραθυμοσίνης στον φυσιολογικό ιστό και στην απλή οζώδη βρογχοκίλη.
- Σχήμα 12. Πρότυπη καμπύλη αναστολής της προθυμοσίνης α.
- Σχήμα 13. Επίπεδα της προθυμοσίνης α (pmol/ml) στον ορό υγιών ατόμων και ασθενών με απλή οζώδη βρογχοκίλη.
- Σχήμα 14. Επίπεδα της προθυμοσίνης α (pmol/g) στον θυρεοειδικό ιστό ασθενών με απλή οζώδη βρογχοκίλη, θυλακιώδες αδένωμα και καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα.



Σχήμα 15. Επίπεδα της προθυμοσίνης α (pmol/g) στον θυρεοειδικό ιστό ασθενών με καλοήθεις και κακοήθεις παθήσεις.

Σχήμα 16. Επίπεδα της προθυμοσίνης α στον θυρεοειδικό ιστό σε σχέση με το φύλο.

Σχήμα 17. Μηχανισμοί ρύθμισης της απόπτωσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τους μεταγραφικούς παράγοντες προθυμοσίνη α, p53, E2F-1 και c-myc.

ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1: Ανατομία του θυρεοειδούς αδένος και των πέριξ ιστών.

Εικόνα 2: Τεχνική παρακέντησης του θυρεοειδούς αδένος (FNA).

Εικόνα 3: Παθολογικοί μηχανισμοί της απόπτωσης.

Εικόνα 4. Ηλεκτροφόρηση γονιδιωματικού DNA από λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος.

Εικόνα 5. Ηλεκτροφόρηση ολικού RNA από λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος.

Εικόνα 6. Απομόνωση του λειτουργικού γονιδίου της προθυμοσίνης α σε δείγματα περιφερικού αίματος.

Εικόνα 7. Απομόνωση του λειτουργικού γονιδίου της προθυμοσίνης α στον θυρεοειδή αδένος (FNA).

Εικόνα 8. Μελέτη της κινητικής της αντίδρασης

RT-PCR για τα γονίδια της προθυμοσίνης α, της παραθυμοσίνης και της β-ακτίνης.

Εικόνα 9. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης RT-PCR των γονιδίων της β-ακτίνης, της παραθυμοσίνης και της προθυμοσίνης α.

Εικόνα 10. Μελέτη της έκφρασης της προθυμοσίνης α στον καρκίνο του θυρεοειδούς αδένος σε δείγματα από ιστολογικές τομές παραφίνης, στις οποίες έγινε απομόνωση ολικού RNA.

Εικόνα 11. Μελέτη της κινητικότητας των αποδιαταγμένων μονόκλωνων αλύσεων του cDNA για την ανίχνευση πολυμορφισμών του γονιδίου της προθυμοσίνης α.

Εικόνα 12. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης της προθυμοσίνης α (α) σε φυσιολογικό θυρεοειδή αδένος και (β) σε απλή οζώδη βρογχοκήλη.



Εικόνα 13. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης της προθυμοσίνης α (α) σε θυλακιώδες αδένωμα και (β) σε καλά διαφοροποιημένο θυλακιώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς.

Εικόνα 14. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα E2F-1 (α) σε καλά διαφοροποιημένο θηλώδες καρκίνωμα και (β) σε καλά διαφοροποιημένο θυλακιώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς.

Εικόνα 15. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 (α) σε θυλακιώδες αδένωμα και (β) σε καλά διαφοροποιημένο θυλακιώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς.

Εικόνα 16. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 (α) σε απλή οζώδη βρογχοκήλη και (β) σε καλά διαφοροποιημένο θυλακιώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς.

Εικόνα 17. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax (α) σε θυλακιώδες αδένωμα και (β) σε καλά διαφοροποιημένο θυλακιώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς.

Εικόνα 18. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης του πυρηνικού αντιγόνου Ki-67 σε καλά διαφοροποιημένο θυλακιώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς.

Εικόνα 19. In situ ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων σε καλά διαφοροποιημένο θυλακιώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς με την μέθοδο TUNEL.

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1: Αιτιολογική ταξινόμηση της απλής οζώδους βρογχοκήλης.

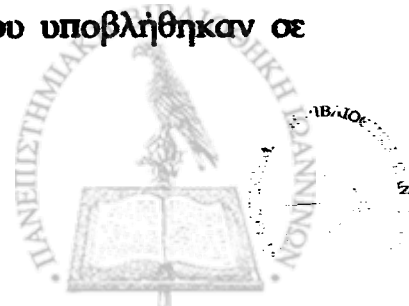
Πίνακας 2: Ταξινόμηση των κακοήθων νεοπλασμάτων του θυρεοειδούς.

Πίνακας 3: Γονίδια εμπλεκόμενα στην παθογένεια του καρκίνου του θυρεοειδούς.

Πίνακας 4: Αιτιολογική ταξινόμηση των μονήρων όζων του θυρεοειδούς αδένου.

Πίνακας 5: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με απλή οζώδη βρογχοκήλη που υποβλήθηκαν σε παρακέντηση με λεπτή βελόνη (FNA).

Πίνακας 6: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών που υποβλήθηκαν σε μερική ή ολική θυρεοειδεκτομή.



- Πίνακας 7:** Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών από τους οποίους ελήφθησαν ιστολογικές τομές παραφίνης του θυρεοειδούς αδένου.
- Πίνακας 8:** Μεταβλητές της αντίδρασης PCR που μελετήθηκαν για τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών ενίσχυσης του γονιδίου της προθυμοσίνης α.
- Πίνακας 9:** Συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR.
- Πίνακας 10:** Συνθήκες (θερμικό προφίλ) της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του λειτουργικού γονιδίου της προθυμοσίνης α.
- Πίνακας 11:** Τμήμα της αλληλουχίας του cDNA της προθυμοσίνης α ανθρώπου.
- Πίνακας 12:** Τμήμα της αλληλουχίας του cDNA του γονιδίου p53 ανθρώπου.
- Πίνακας 13:** Αλληλουχία του cDNA της παραθυμοσίνης ανθρώπου.
- Πίνακας 14:** Αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του cDNA των γονιδίων της προθυμοσίνης α, της παραθυμοσίνης, του p53 και της β-ακτίνης.
- Πίνακας 15:** Συνθήκες (θερμικό προφίλ) της ημι-ποσοτικής αντίδρασης RT-PCR για την ενίσχυση των γονιδίων της προθυμοσίνης α, της παραθυμοσίνης, του p53 και της β-ακτίνης.
- Πίνακας 16:** Συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της RT-PCR.
- Πίνακας 17:** Αραίωση, χρόνος και θερμοκρασία επώασης των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοϊστοχημική μελέτη.
- Πίνακας 18:** Ανοσοδραστικότητα-έκφραση της προθυμοσίνης α με βάση τον ιστολογικό τύπο.
- Πίνακας 19:** Ανοδραστικότητα-έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bax (%) και προσδιορισμός του λόγου Bcl-2/Bax με βάση τον ιστολογικό τύπο.
- Πίνακας 20:** Δείκτες απόπτωσης (TUNEL) και πολλαπλασιασμού (Ki-67) ανά ιστολογικό τύπο.
- Πίνακας 21:** Συσχετίσεις ανάμεσα στην έκφραση των πρωτεϊνών προθυμοσίνη α (ProTa), E2F-1, p53, Bcl-2, Bax και των δεικτών πολλαπλασιασμού (PI) και απόπτωσης (AI).
- Πίνακας 22:** Συγκριτική μελέτη των συγκεντρώσεων της προθυμοσίνης α και της θυμοσίνης α1 στον ορό και σε ιστικά παρασκευάσματα, όπως προσδιορίστηκαν με ανοσοπροσοροφητικές μεθόδους (ELISA, RIA).



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Προθυμοσίνη α και θυμοσίνη α1. Απομόνωση και πρωτοταγής δομή.

Η προθυμοσίνη α είναι μια μικρή, όξινη, πυρηνική πρωτεΐνη με ασυνήθιστη πρωτοταγή δομή, η οποία απομονώθηκε για πρώτη φορά σε θύμο αδένια επίμυος και θεωρήθηκε πρόδρομο μόριο του ανοσοενεργού πεπτιδίου θυμοσίνη α1 (Haritos et al., 1984).

Το 1975 απομονώθηκε από εκχύλισμα θύμου αδένια μόσχου ένα βιολογικά ανοσοενεργό παρασκεύασμα που ονομάστηκε θυμοσίνη κλάσμα 5 (thymosin fraction 5, TF-5), το οποίο περιελάμβανε 40-50 περίπου διαφορετικά πεπτιδία με μοριακά βάρη από 1000 έως 14000 kDa και ισοηλεκτρικά σημεία από 4 έως 8 (Hooper et al., 1975, Low and Goldstein, 1979). Το TF-5 πιστεύεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση, στην ωρίμανση και στην λειτουργικότητα των Τ λεμφοκυττάρων (Zatz et al., 1985).

Η θυμοσίνη α1 απομονώθηκε από το παρασκεύασμα TF-5 με συνδυασμό χρωματογραφιών ιοντοανταλλαγής και μοριακής διήθησης. Πρόκειται για ένα όξινο (pI: 4.2) 28-πεπτιδίο με μοριακό βάρος 3108 Da και ακετυλιωμένο αμινοτελικό άκρο (Goldstein et al., 1977). Η θυμοσίνη α1 ενισχύει την κυτταρική ανοσία και ήδη χρησιμοποιείται σε κλινικές μελέτες με ανοσοκατασταλμένους ασθενείς (Ancell et al., 2001).

Έρευνες που ακολούθησαν έδειξαν ότι η θυμοσίνη α1 είναι πιθανότατα πρωτεολυτικό παράγωγο ενός μεγαλύτερου πρόδρομου μορίου. Η απομόνωση ενός πεπτιδίου 16 kDa από τα προϊόντα της *in vitro* μετάφρασης mRNA θύμου αδένια μόσχου, περιείχε αλληλουχίες ομόλογες με την θυμοσίνη α1 (Freire et al., 1981). Σε μελέτη των Cardarella et al. (1983), απομονώθηκαν από το TF-5 δύο πεπτιδία ομόλογα με την θυμοσίνη α1. Το πρώτο περιείχε τα πρώτα 24 αμινοξέα της θυμοσίνης α1 [des-(25-28) θυμοσίνη α1] και το δεύτερο ήταν ένα 35-πεπτιδίο που περιελάμβανε όλη την αλληλουχία της θυμοσίνης α1 και ονομάστηκε θυμοσίνη α11.



Το πρόδρομο μόριο της θυμοσίνης α1, η προθυμοσίνη α, απομονώθηκε τελικά σε θύμο αδένια επίμυος με τεχνική μοριακής διήθησης και λαμβάνοντας ειδικές πορφυλάξεις έναντι της ενεργοποίησης των ενδογενών πρωτεασών. Η διαδικασία απομόνωσης περιελάμβανε αρχικά κονιορτοποίηση του ιστού σε υγρό άζωτο, βρασμό και οξίνιση του εκχυλίσματος και στη συνέχεια δύο στάδια χρωματογραφίας, μοριακής διήθησης και υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Η ανίχνευση της προθυμοσίνης α έγινε με ραδιοανοσολογική μέθοδο με την χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της θυμοσίνης α1. Το πολυπεπτίδιο που απομονώθηκε αποτελούνταν από 111 αμινοξέα, ήταν εξαιρετικά όξινο (pI: 3.55) και περιείχε την αλληλουχία της θυμοσίνης α1 στο αμινοτελικό άκρο του (Haritos et al., 1984).

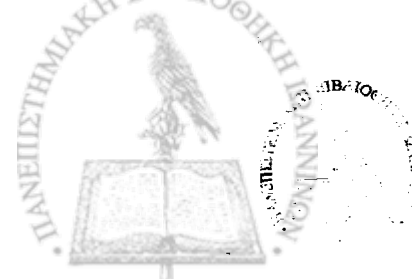
Η πρωτοταγής δομή της προθυμοσίνης α προσδιορίστηκε με χημικές μεθόδους ανάλυσης της αλληλουχίας των αμινοξέων σε θύμο αδένια επίμυος (Haritos et al., 1985), ανθρώπου (Pan et al., 1986), χοίρου (Economidou et al., 1988), βοός (Panneerselvam et al., 1989) και σπλήνα αίγας (Frillingos et al., 1991). Η αλληλουχία της πρωτεΐνης επιβεβαιώθηκε και ολοκληρώθηκε μετά από κλωνοποίηση του cDNA της προθυμοσίνης α από cDNA βιβλιοθήκες σπληνοκυττάρων επίμυος (Frangou-Lazarides et al., 1988), ανθρώπινων λεμφοκυττάρων και ινοβλαστών (Eschenfeldt et al., 1986, Gomez-Marquez et al., 1989). Οι ανωτέρω μελέτες οδήγησαν στα εξής αποτελέσματα:

- Η προθυμοσίνη α είναι μια μικρή όξινη πρωτεΐνη 109-111 αμινοξέων με συντηρημένη δομή (ομολογία μεγαλύτερη από 90%) στα είδη που μελετήθηκαν. Η προθυμοσίνη α ανθρώπου και βοός περιέχει 109 αμινοξέα διαφέροντας μόνο κατά δύο αντικαταστάσεις στις θέσεις 31 και 84. Η προθυμοσίνη α επίμυος περιέχει 111 αμινοξέα και διαφέρει από του ανθρώπου κατά δύο προσθήκες (θέσεις 39, 106) και τέσσερις αντικαταστάσεις (θέσεις 84, 85, 90, 100). Κύριο χαρακτηριστικό της δομής της πρωτεΐνης είναι η παρουσία όξινων αμινοξέων (Asp, Glu) σε ποσοστό 50%, τα οποία είναι τοποθετημένα στο κεντρικό τμήμα του μορίου. Οι όξινες αλληλουχίες δικαιολογούν το ιδιαίτερα χαμηλό ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης (pI: 3.55). Η προθυμοσίνη α στερείται αρωματικών και θειούχων αμινοξέων καθώς και ισχυρά υδρόφοβων αλληλουχιών (ΣΧΗΜΑ 1).



- Η ακετυλιωμένη αμινοτελική αλληλουχία της πρωτεΐνης (1-28) αντιστοιχεί στην θυμοσίνη α1 (Low and Goldstein, 1979) και εμφανίζει ομολογία 100% σε όλα τα είδη.
- Το καρβοξυτελικό άκρο, με την λιγότερο συντηρημένη δομή, εμφανίζει στις θέσεις 101-104 την αλληλουχία Lys-Lys-X-Lys που θεωρείται σήμα μετατόπισης των πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα (Gomez-Marquez and Segade, 1988, Watts et al., 1989). Μελέτη των Rubtsov et al. (1996) έδειξε ότι μια δεύτερη αλληλουχία στις θέσεις 87-88 (Lys-Arg) σχετίζεται με την μεταφορά της πρωτεΐνης στον πυρήνα. Αντικατάσταση της λυσίνης (θέση 87) με γλουταμικό δεν επιτρέπει την είσοδο της πρωτεΐνης στον πυρήνα.
- Η προθυμοσίνη α στερείται της αμινοτελικής σηματοδοτικής αλληλουχίας (signal sequence) που χαρακτηρίζει τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες.
- Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της προθυμοσίνης α in vivo αφορούν την φωσφορυλίωση των υπολειμμάτων γλουταμικού οξέως (Glu) (Trumbore et al., 1997, Wang et al., 1997) και όχι των υπολειμμάτων σερίνης (Ser) και θρεονίνης (Thr) όπως είχε υποστηριχτεί αρχικά (Barcia et al., 1993). Η φωσφορυλίωση επιτυγχάνεται μέσω του ενζύμου κινάση της προθυμοσίνης α, το οποίο εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και η ενεργότητά του εξαρτάται από τα ιόντα Mn^{2+} (Perez-Estevez et al., 2000).

Η δευτεροταγής δομή της προθυμοσίνης α προσδιορίστηκε αρχικά με βάση την αμινοξική αλληλουχία, με την χρήση ειδικού λογισμικού προγράμματος (Haritos et al., 1985). Σύμφωνα με την μελέτη αυτή, η πρωτεΐνη περιλαμβάνει πέντε περιοχές με διαμόρφωση α-έλικας οι οποίες συνδέονται με τρεις αλληλουχίες τυχαίου σπειράματος και μια περιοχή β-πτυχωτής επιφάνειας. Αντίθετα, μελέτες με κυκλικό διχρωισμό και πυρηνικό μαγνητισμό σε συνδυασμό με μετρήσεις σκέδασης φωτός και ακτίνων X έδειξαν ότι η πρωτεΐνη στερείται δευτεροταγούς δομής (Watts et al., 1990) και λαμβάνει τυχαία ελικοειδή διαμόρφωση σε υδατικό διάλυμα (Gast et al., 1995, Pombo et al., 2001). Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η διαμόρφωση του μορίου στο χώρο μεταβάλλεται παρουσία ιόντων Zn^{2+} , λαμβάνοντας μια σφαιρική συμπαγή δομή κάτι που δεν συμβαίνει σε περιβάλλον με ιόντα Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} και Cu^{2+} (Uversky et al., 2000).



	1	10	20	30	40	
ΑΝΘΡΩΠΟΥ	ACSDAA	VDTSSSEITTKDLKEKKEVVEEAE	ENGRDAPANGNA	-	NEENNGEQEAD	
ΕΠΙΜΥΟΣ	ACSDAA	VDTSSSEITTKDLKEKKEVVEEAE	ENGRDAPANGNA	Q	NEENNGEQEAD	
ΒΟΥΣ	ACSDAA	VDTSSSEITTKDLKEKKEVVEEAE	ENGREAPANGNA	-	NEENNGEQEAD	
	50	60	70	80	90	100
ΑΝΘΡΩΠΟΥ	NEVDEEEEEEGGEEEEEEEEEGDGEDEEEAE	SA	TGKR	A	A	EEDDEDVD
ΕΠΙΜΥΟΣ	NEVDEEEEEEGGEEEEEEEEEGDGEDEEEAE	AP	TGKR	V	A	EEDDEDVE
ΒΟΥΣ	NEVDEEEEEEGGEEEEEEEEEGDGEDEEEAE	AA	TGKR	A	A	EEDDEDVD
ΑΝΘΡΩΠΟΥ		110				
	TKKQK	-	TDEDD			109 AMINOΞΕΑ
ΕΠΙΜΥΟΣ	TKKQK	KK	TDEDD			111 AMINOΞΕΑ
ΒΟΥΣ	TKKQK	-	TDEDD			109 AMINOΞΕΑ

ΣΧΗΜΑ 1. Πρωτοταγής δομή της προθρομίνης α ανθρώπου, επίμυος και βούδ. Η υπογραμμισμένη αλληλουχία στο αμινοτελικό άκρο αντιστοιχεί στην θρομίνη α1 (1-28 αμινοξέα). Με έντονα γράμματα σημειώνεται η αλληλουχία που αποτελεί σήμα πυρηνικής εντόπισης της πρωτεΐνης. Οι διαφορές σημειώνονται με πλάισιο (Διδασκτορική διατριβή Κ. Βαρέλη, 1995).

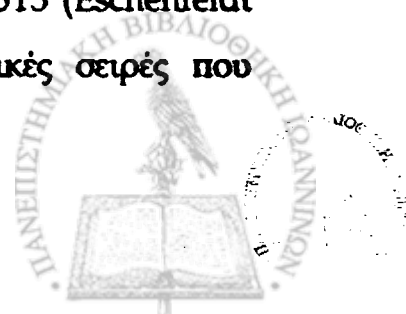
1.2 Ιστική και φυλογενετική κατανομή της προθυμοσίνης α.

Η προθυμοσίνη α είναι μια πρωτεΐνη με ευρεία ιστική και φυλογενετική κατανομή. Έχει ανιχνευθεί σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών που μελετήθηκαν καθώς και σε πλήθος κυτταρικών σειρών, είτε σε πρωτεϊνικό επίπεδο είτε σε επίπεδο mRNA.

Αρχικά απομονώθηκε στον επίμου (Haritos et al., 1984) και στην συνέχεια στον άνθρωπο (Pan et al., 1986), στον χοίρο (Economidou et al., 1988), στον μόσχο (Panneerselvam et al., 1988) και στην αίγα (Frillingos et al., 1991). Συναντάται επίσης σε πτηνά και ιχθύες (Yialouris et al., 1988). Πρόσφατα, η προθυμοσίνη α απομονώθηκε από κύτταρα όρχεων και δακρυϊκού αδένος βυτράχου, του είδους *Rana esculenta* (Aniello et al., 2002, De Rienzo et al., 2002). Έχει αναφερθεί η ύπαρξη μιας πρωτεΐνης στη ζύμη *Sacharomyces cerevisiae* με πολλές ομοιότητες με την προθυμοσίνη α (Macarona et al., 1989), γεγονός όμως που αμφισβητείται από άλλη ερευνητική ομάδα (Trumbore et al., 1998).

Σε ιστικό επίπεδο η προθυμοσίνη α απομονώθηκε αρχικά σε ιστούς επίμου. Υψηλότερη συγκέντρωση της πρωτεΐνης παρατηρήθηκε στον θύμο αδένος και ακολούθησαν ο σπλήνας, οι πνεύμονες, τα νεφρά, το ήπαρ και ο εγκέφαλος (Haritos et al., 1984β). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνει μελέτη σε επίπεδο mRNA (Clinton et al., 1989α). Στον χοίρο η πρωτεΐνη εμφανίζει την ίδια κατανομή με τον επίμου (Economidou et al., 1988) ενώ στην αίγα μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρείται στον σπλήνα και όχι στον θύμο (Frillingos et al., 1991). Στον άνθρωπο ο θύμος και ο σπλήνας είναι οι ιστοί με τις μεγαλύτερες ποσότητες προθυμοσίνης α (Tsitsiloni et al., 1993). Σε περιφερικό αίμα ανθρώπου η προθυμοσίνη α απαντάται σε ποσοστό 90% στα λευκά αιμοσφαίρια ενώ ένα 10% βρίσκεται στο πλάσμα σε συγκέντρωση 55-70 pmol/ml (Panneerselvam et al., 1987).

Το mRNA της προθυμοσίνης α ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στην κυτταρική σειρά ανθρώπινων ινοβλαστών WISH (Goodall et al., 1986), σε ανθρώπινα T και B λεμφοκύτταρα και στην κυτταρική σειρά ινοβλαστών ποντικού NIH3T3 (Eschenfeldt and Berger., 1986). Έκτοτε έχει απομονωθεί σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν.

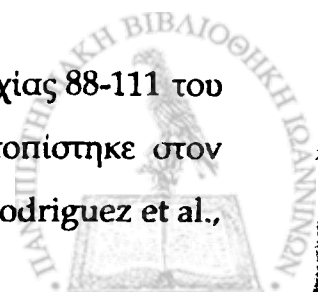


1. 3. Η θέση της προθυμοσίνης α στο κύτταρο.

Ο όξινος χαρακτήρας της προθυμοσίνης α, ο οποίος συναντάται σε γνωστές πυρηνικές πρωτεΐνες (νουκλεοπλασμίνη, HMG πρωτεΐνες) καθώς και το πυρηνικό σήμα εντόπισης που φέρει στο καρβοξυτελικό άκρο (Lys-Lys-Glu-Lys) συνηγορούν υπέρ της υπόθεσης ότι πρόκειται για μια πυρηνική πρωτεΐνη (Gomez-Marquez and Segade, 1988). Η παρατήρηση ότι η προθυμοσίνη α όταν ενεθεί στο κυτταρόπλασμα ωοκυττάρων *Xenopus* μετακινείται στον πυρήνα και υπεύθυνη για την μετακίνηση αυτή είναι η αλληλουχία Lys-Lys-Glu-Lys, ενισχύει την παραπάνω υπόθεση (Watts et al., 1989, 1990). Χιμαιρικές πρωτεΐνες που περιέχουν το μόριο της προθυμοσίνης α όταν ενεθούν σε κύτταρα HeLa S3 και COS μεταφέρονται και ανιχνεύονται στον πυρήνα (Clinton et al., 1991, Manrow et al., 1991).

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες με την χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της θυμοσίνης α1 οδήγησαν σε αντιφατικά αποτελέσματα σχετικά με την ενδοκυττάρια θέση της προθυμοσίνης α. Πυρηνική εντόπιση της πρωτεΐνης έχει αναφερθεί σε αστροκύτταρα εγκεφάλου (Su et al., 1989), σε κύτταρα λεπτού εντέρου ICE-6 (Conteas et al., 1990), σε σπερματοκύτταρα (Roson et al., 1990a), σε επιθηλιακά κύτταρα χοληφόρου πόρου και ηπατοκύτταρα (Fraga et al., 1993). Αντίθετα, οι Tsitsiloni et al (1989) μετά από κυτταρική κλασμάτωση παρασκευάσματος θύμου και ήπατος μόσχου, βρήκαν ότι η προθυμοσίνη α ανιχνεύεται στο κυτταροπλασματικό και όχι στο πυρηνικό κλάσμα. Πιθανότατα αυτό οφείλεται στην διαδικασία της κλασμάτωσης και στην διαφυγή της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα. Η κλασμάτωση ακέραιων πυρήνων με την χρήση κυτοχλασίνης Β είχε σαν αποτέλεσμα την ανίχνευση της προθυμοσίνης α αποκλειστικά στο πυρηνικό κλάσμα (Manrow et al., 1991). Κυτταροπλασματική εντόπιση της πρωτεΐνης έχει επίσης αναφερθεί σε ενδοεπιθηλιακά κύτταρα θύμου (Auger et al., 1987, Fabien et al., 1988) ενώ σε άλλη μελέτη η προθυμοσίνη α φέρεται να είναι συνδεδεμένη με μόρια tRNA στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων (Vartapetian et al., 1997, Lukashev et al., 1999).

Με ανοσοφθορισμό και την χρήση αντισώματος έναντι της αλληλουχίας 88-111 του καρβοξυτελικού άκρου της προθυμοσίνης α επίμυος, η πρωτεΐνη εντοπίστηκε στον πυρήνα των κυτταρικών σειρών NIH3T3 και HL-60 (Vareli et al., 1996, Rodriguez et al.,



Κ
β
κ
επ
επι
πυρ
Laza

1998). Με έμμεσο ανοσοφθορισμό και χρησιμοποιώντας αντίσωμα κατά της αλληλουχίας 90-109 της ανθρώπινης προθυμοσίνης α, η πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε στον πυρήνα των κυτταρικών σειρών HeLa, L929, IT-45R1, NIH3T3, σε θυμοκύτταρα ποντικού και σε επιθηλιακά κύτταρα θύμου ανθρώπου (Castro and Barcia, 1996). Με την ίδια τεχνική, η προθυμοσίνη α εντοπίστηκε στον πυρήνα των κυττάρων T24 (human bladder carcinoma cell line) σε θέσεις μεταγραφής του DNA (Vareli et al., 2000).

Η προθυμοσίνη α συνδέεται μέσω της κεντρικής όξινης περιοχής με την συνδετική ιστόνη H1, γεγονός που ενισχύει την απόψη ότι πρόκειται για πυρηνική πρωτεΐνη (Paramarcaki and Tsolas, 1994).

1.4 Δομή του γονιδίου της προθυμοσίνης α

Η πρώτη απομόνωση συμπληρωματικού DNA (cDNA) της προθυμοσίνης α έγινε από cDNA βιβλιοθήκη ανθρώπινων σπληνοκυττάρων με ανιχνευτή (probe) ένα μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων που σχεδιάστηκε με βάση την αλληλουχία της πεπτιδικής αλυσού (Goodall et al., 1986). Ο κλώνος που απομονώθηκε (503 bp) χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του mRNA της πρωτεΐνης, μεγέθους 1400 bp, στην κυτταρική σειρά ανθρώπινων ινοβλαστών WISH.

Η ερευνητική ομάδα της S. L. Berger απομόνωσε συμπληρωματικό DNA της προθυμοσίνης α (1198 bp) από cDNA βιβλιοθήκες ανθρώπινων ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων και μετασχηματισμένων με ιό SV-40 ινοβλαστών. Στην συνέχεια με βάση το συμπληρωματικό κλώνο ανιχνεύθηκε το mRNA της πρωτεΐνης μεγέθους 1200 bp σε ιστούς ανθρώπου και ποντικού (Eschenfeldt and Berger, 1986).

Το cDNA της προθυμοσίνης α απομονώθηκε από cDNA βιβλιοθήκη ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων και χρησιμοποιήθηκε για την υβριδοποίηση του mRNA σε ιστούς επίμυος. Το μέγεθος του προσδιορίστηκε στις 1300 bp (Gomez-Marquez et al., 1989).

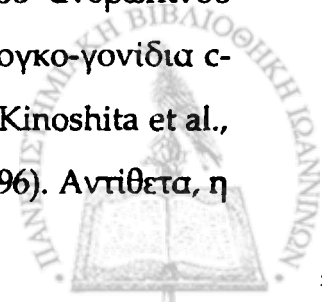
Ο κλώνος που αντιστοιχεί στην πλήρη κωδικοποιούσα περιοχή της προθυμοσίνης α επίμυος, απομονώθηκε από cDNA βιβλιοθήκη σπληνοκυττάρων επίμυος και παρουσιάζει ομολογία μεγαλύτερη από 90% με την ανθρώπινη αλληλουχία (Frangou-Lazaridis et al., 1988). Με την τεχνική αποτύπωσης κατά Northern ανιχνεύθηκε το

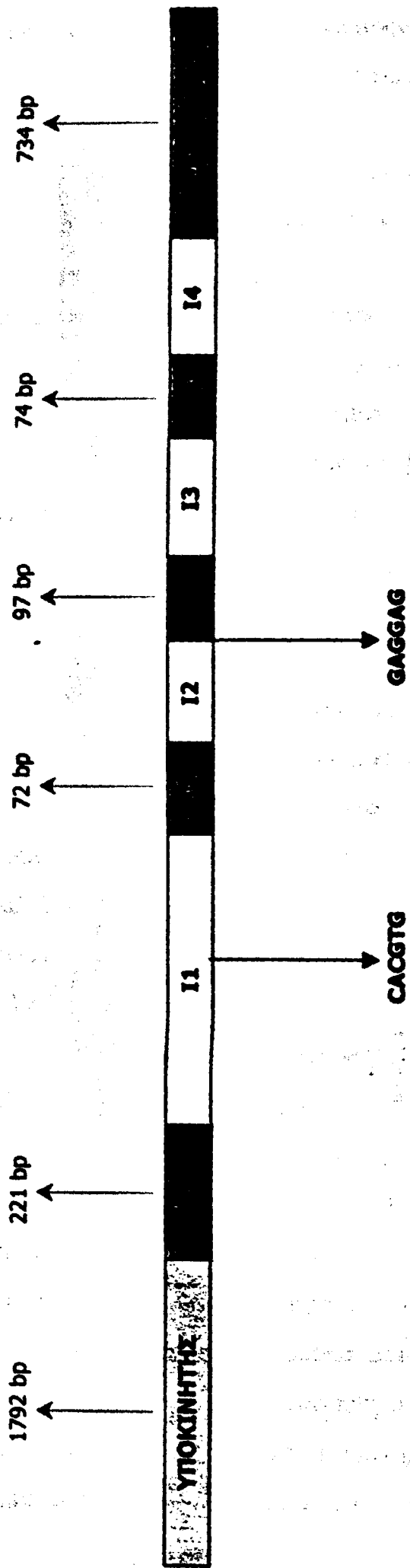
mRNA της πρωτεΐνης σε ιστούς επίμουσ (ήπαρ, πνεύμονες, νεφρά, εγκέφαλος) (Clinton et al., 1989). Το cDNA της προθυμοσίνης α έχει απομονωθεί σε κύτταρα ασκτικού υγρού ποντικού (Schmidt and Werner, 1991).

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα η προθυμοσίνη α κωδικοποιείται από μια οικογένεια έξι γονιδίων από τα οποία το ένα είναι λειτουργικό ενώ τα άλλα πέντε στερούνται ιντρονίων και χαρακτηρίζονται ως ψευδογονίδια. Το λειτουργικό γονίδιο αποτελείται από πέντε εξόνια που διακόπτονται από τέσσερα ιντρόνια (ΣΧΗΜΑ 2), έχει σήμα πολυαδενυλίωσης στο 3'-άκρο και περιλαμβάνει τις κλασσικές ρυθμιστικές αλληλουχίες μεταγραφής TATA και CAAT στην περιοχή του υποκινητή (Eschenfeldt et al., 1989, Manrow et al., 1992). Η πλήρης αλληλούχηση του υποκινητή (1792 bp) κατέδειξε την ύπαρξη πολλών πιθανών cis-ρυθμιστικών περιοχών όπως τις θέσεις δέσμευσης για τους παράγοντες μεταγραφής SP1, AP2, CREB και για το πρότο-ογκογονίδιο c-myc (Szabo et al., 1993). Στην θέση -315 bp του υποκινητή υπάρχει θέση δέσμευσης για τον παράγοντα μεταγραφής E2F-1 (Vareli et al., 1996) (ΣΧΗΜΑ 3).

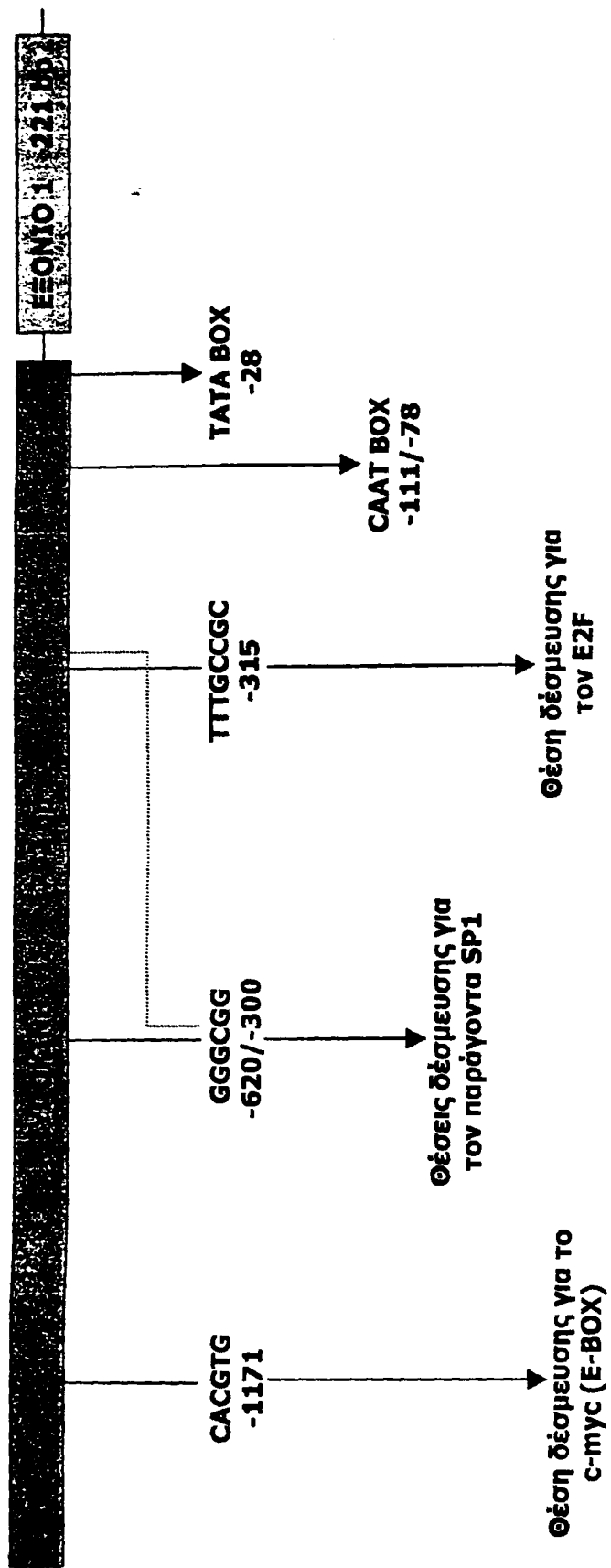
Η παρατήρηση ότι το cDNA των μετασχηματισμένων με τον ιο SV40 ανθρώπινων ινοβλαστών διαφέρει κατά ένα επιπλέον κωδικόνιο (GAG-γλουταμικό οξύ) στη θέση 39 σε σχέση με το cDNA των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων και σπληνοκυττάρων (Eschenfeldt and Berger., 1986) οδήγησε αρχικά στην υπόθεση ότι είναι αποτέλεσμα πολυμορφισμού του γονιδίου της προθυμοσίνης α. Στην συνέχεια διαπιστώθηκε ότι η ετερογένεια αυτή οφείλεται σε εναλλακτικό μάτισμα (alternative splicing). Η αλληλουχία GAGGAG, η οποία βρίσκεται στα όρια του δεύτερου ιντρονίου και του τρίτου εξονίου (ΣΧΗΜΑ 2), δύναται να κοπεί είτε στην πρώτη είτε στην δεύτερη AG ακολουθία, οδηγώντας σε δύο διαφορετικά mRNA σε αναλογία 9:1 (GAG:GAGGAG). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα ένα ποσοστό 10% της προθυμοσίνης α του κυττάρου να περιέχει ένα επιπλέον γλουταμικό οξύ. Αν και δεν έχει διευκρινιστεί μέχρι σήμερα η σημασία του φαινομένου αυτού, πιστεύεται ότι αποτελεί ένα μηχανισμό προστασίας του μορίου στην διαδικασία της εξέλιξης (Manrow and Berger., 1993).

Το γονίδιο της προθυμοσίνης α εδράζεται στο χρωμόσωμα 2 του ανθρώπινου γονιδιώματος (Szabo et al., 1993) και η έκφρασή του επάγεται από τα ογκο-γονίδια c-myc (Gaubatz et al., 1994) και E6 του ιού του θηλώματος του τύπου 16 (Kinoshita et al., 1997) καθώς και από τον παράγοντα μεταγραφής E2F-1 (Vareli et al., 1996). Αντίθετα, η





ΣΧΗΜΑ 2. Διαγραμματική απεικόνιση της δομής του λειτουργικού γονιδίου της προδρομικής ανθρώπου. Το γονίδιο αποτελείται από 5 εξόνια (E1-E5), που διακόπτονται από 4 ιντρόνια (I1-I4). Το συνολικό μέγεθος, συμπεριλαμβανομένου και του υποκινητή είναι 6.9 kb. Σημειώνεται η θέση του εναλλακτικού ματίσματος στα όρια του δεύτερου ιντρονίου και τρίτου εξονίου καθώς και η θέση δέσμευσης του c-myc στο πρώτο ιντρόνιο (Enchenfeld et al., 1989, Mantow et al., 1993, Διδακτορική διατριβή Κ. Βαρέλη, 1995).



ΣΧΗΜΑ 3. Διαγραμματική απεικόνιση της δομής του υποκινητή του λειτουργικού γονιδίου της προθρομβίνης α (Szabo et al., 1993, Διδακτορική διατριβή Κ. Βαρέλη, 1995).

έκφραση του γονιδίου της προθυμοσίνης α ρυθμίζεται αρνητικά από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 (Zhao et al., 2000).

1. 5. Εξωκυττάριος ρόλος της πρωτεΐνης Ανοσορυθμιστικές ιδιότητες της προθυμοσίνης α .

Μετά την αρχική, *in vivo*, παρατήρηση ότι η προθυμοσίνη α προστατεύει ευαίσθητα στελέχη ποντικών από μόλυνση με τον μύκητα *Candida albicans* και επάγει την έκφραση του MIF (migration inhibitory factor) (Haritos et al., 1985, Pan et al., 1986), η έρευνα οδηγήθηκε στην μελέτη των ανοσολογικών ιδιοτήτων της πρωτεΐνης και στην πιθανή συμμετοχή της στην κυτταρική ανοσία.

Η προθυμοσίνη α ενισχύει την αυτόλογη και ετερόλογη μικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση (MLR) (Baxevanis et al., 1988), επάγει την έκφραση των μορίων ιστοσυμβατότητας τάξης II (MCH II) σε μονοπύρρηνα περιφερικού αίματος (Baxevanis et al., 1992) και την έκφραση του αντιγόνου HLA-DR σε μονοκύτταρα ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας (Baxevanis et al., 1990). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι επάγει την έκφραση της IL-2 και του υποδοχέα της (IL-2R) στα CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα, μέσω ενεργοποίησης των μονοκυττάρων (Baxevanis et al., 1988, 1990). Η προθυμοσίνη α προκαλεί αύξηση της κυτταροτοξικότητας των T-λεμφοκυττάρων και των NK-κυττάρων, πιθανότατα μέσω της έκφρασης του υποδοχέα της IL-2 (Cordero et al., 1991, 1992, 1995, Baxevanis et al., 1993). Πιστεύεται ότι η προθυμοσίνη α και η IL-2 δρούν συνεργικά επάγοντας την έκφραση του υποδοχέα της IL-2 (Lopez et al., 1994). Η ύπαρξη ειδικών υποδοχέων για προθυμοσίνη α σε μονοπύρρηνα και ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ενισχύει την υπόθεση ότι πρόκειται για ανοσοενεργό πεπτιδίο (Cordero et al., 1994, 1995, Pineiro et al., 2001). Επιμόλυνση των κυτταρικών σειρών MT-4 και MOLT-4 (T-λεμφοκύτταρα) με τον ιό HIV-1, οδήγησε σε μείωση της έκφρασης της προθυμοσίνης α (Ryo et al., 2000).

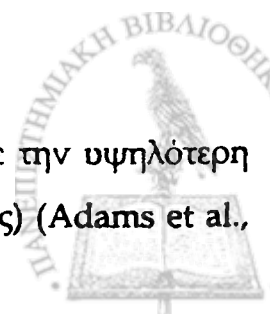
Κλινικές μελέτες με ανοσοκατασταλμένους ασθενείς (αυτοάνοσα νοσήματα, καρκίνος) έδειξαν ότι η προθυμοσίνη α αποκαθιστά σε μεγάλο βαθμό τις ανεπαρκείς ανοσολειτουργίες. Η αρχική παρατήρηση αφορούσε ασθενείς με συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο (SLE) (Baxevanis et al., 1987) και σκλήρυνση κατά πλάκας (Reclos et

al., 1987). Ειδικότερα, οι ασθενείς με SLE εμφανίζουν στον ορό ειδικά αυτοαντισώματα κατά της προθυμοσίνης α (Vlachoyianopoulos et al., 1989). Σε ασθενείς με καρκίνο του ορθού και μελάνωμα δέρματος, στους οποίους χορηγήθηκε συνδυασμός προθυμοσίνης α και IL-2, ενισχύεται η LAK κυτταροτοξικότητα μέσω της IFN-γ (Eckert et al., 1995, 1997). Η καλλιέργεια μονοκυττάρων περιφερικού αίματος υγιών ατόμων σε περιβάλλον με προθυμοσίνη α και IFN-γ οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής TNF-α και ενισχύει την κυτταροτοξική τους δράση απέναντι σε κύτταρα μελανώματος (Gabrin et al., 1994). Η μειωμένη ανοσοαπόκριση των μονοκυττάρων έναντι των καρκινικών συνδέεται με τα υψηλά επίπεδα της προσταγλανδίνης E2 (PGE2) και του παράγοντα TGF-β (transforming growth factor). Η καλλιέργεια μονοκυττάρων ασθενών με καρκίνο του ορθού παρουσία προθυμοσίνης α με ή χωρίς IFN-γ οδηγεί σε αύξηση της έκκρισης IL-1 και TNF-α και μείωση των επιπέδων PGE2 και TGF-β, ενισχύοντας την αντικαρκινική τους δράση (Gabrin et al., 1997). Η προθυμοσίνη α ενισχύει την επαγόμενη από την IL-2 κυτταροτοξικότητα των T-λεμφοκυττάρων σε σειρά αυτόλογων καρκινικών κυττάρων (Voutsas et al., 2000). Αυξημένα επίπεδα mRNA της προθυμοσίνης α ανιχνεύονται σε λεμφοκύτταρα ασθενών με λευχαιμία σε σχέση με τα λεμφοκύτταρα υγιών ατόμων γεγονός που πιθανότατα σχετίζεται με ανοσορρυθμιστικές λειτουργίες της πρωτεΐνης (Gomez-Marquez et al., 1989). Σε επίμυες στους οποίους έγινε ενδοπεριτοναϊκή έγχυση L1210 λευχαιμικών κυττάρων, η προθυμοσίνη α έδειξε αντικαρκινική δράση επιμηκύνοντας το προσδόκιμο επιβίωσης στο 40-60% των περιπτώσεων (Papanastasiou et al., 1992).

Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών ανοίγουν τον δρόμο για κλινικές δοκιμές της προθυμοσίνης α σε ασθενείς με καρκίνο. Ήδη αρκετές θυμοσίνες δοκιμάζονται με επιτυχία σε κλινικά πρωτόκολλα, χωρίς να έχουν αναφερθεί ιδιαίτερες παρενέργειες (Ancell et al., 2001).

1. 6. Ενδοκυττάριος ρόλος της προθυμοσίνης α. Συμμετοχή στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Η προθυμοσίνη α συμπεριλαμβάνεται ανάμεσα στις πρωτεΐνες με την υψηλότερη έκφραση μέσα στα κύτταρα (HPS 90, μυοσίνη, ριβοσωμικές πρωτεΐνες) (Adams et al.,

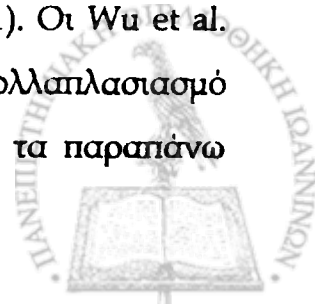


1995). Η ευρεία ιστική κατανομή (σε μη λεμφικούς ιστούς), η απουσία ειδικού σήματος χαρακτηριστικού των εκκρινόμενων πρωτεϊνών (Goodall et al., 1986, Eschenfeldt et al., 1986) και η μετάφραση του mRNA στα ελεύθερα και όχι στα μεμβρανικά ριβοσωμάτια όπως συμβαίνει με τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες (Eschenfeldt et al., 1989) οδήγησαν την έρευνα στη μελέτη του ενδοκυττάρου ρόλου της προθυμοσίνης α.

Μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα της προθυμοσίνης α είναι αυξημένα σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενους ιστούς. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης είναι ιδιαίτερα αυξημένα σε ιστούς επιμυος στην περίοδο ταχείας ανάπτυξης των πρώτων εβδομάδων της ζωής και στην συνέχεια παρουσιάζουν σταδιακή μείωση (Clinton et al., 1989, Dosil et al., 1990, Frillingos and Tsolas, 1992). Στον θύμο αδένα και στο σπλήνα ανθρώπου παρατηρείται μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης με την αύξηση της ηλικίας ενώ στο ήπαρ τα επίπεδα παραμένουν σταθερά (Tsitsiloni et al., 1993). Τα επίπεδα του mRNA της προθυμοσίνης α βρέθηκαν αυξημένα σε λεμφοκύτταρα ανθρώπου μετά από διέγερση με ποικιλία μιτογόνων καθώς και σε ινοβλάστες NIH3T3 μετά από επανατροφοδότηση θρεπτικού υλικού (Eschenfeldt et al., 1986). Σε συνθήκες κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η προθυμοσίνη α βρέθηκε αυξημένη σε T-λεμφοκύτταρα και σε ηπατοκύτταρα (Bustelo et al., 1991). Οι Rodriguez et al. (1998) έδειξαν ότι η πρωτεΐνη επάγει τον πολλαπλασιασμό HL-60 κυττάρων. Η προθυμοσίνη α επάγει την μεταγραφή του RNA σε κύτταρα COS-1 και NIH3T3 πιθανότατα μέσω ενεργοποίησης των RNA πολυμερασών (Trumbore and Berger, 2000). Η μιτωτική διαδικασία αναστέλλεται στην κυτταρική σειρά ανθρώπινου μυελώματος RPMI 8226 όταν προστεθεί στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας μίγμα από τέσσερα συνθετικά ολιγονουκλεοτιδία (antisense) συμπληρωματικά σε περιοχές του mRNA της προθυμοσίνης α (Sbularti et al., 1993). Αυξημένα επίπεδα της προθυμοσίνης α παρατηρήθηκαν σε καρκινικούς ιστούς μαστού, εντέρου, ήπατος και πνεύμονα (Tsitsiloni et al., 1993, Mori et al., 1993, Wu CG et al., 1997α, 1997β, Sasaki et al., 1997, 2001α). Η προθυμοσίνη α σε αντίθεση με την παραθυμοσίνη επάγει *in vivo* την διαδικασία της αγγειογένεσης (Koutrafuri et al., 2001). Πρόσφατη *in vitro* μελέτη χαρακτηρίζει την προθυμοσίνη α ως ογκο-πρωτεΐνη που επάγει την εξαλλαγή ινοβλαστικών κυττάρων (Orre et al., 2001). Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι η προθυμοσίνη α έχει ένα ζωτικό ρόλο στο κύτταρο, στενά συνδεδεμένο με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Το ογκο-γονίδιο *c-myc* που συμμετέχει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό επάγει την έκφραση της προθυμοσίνης α στις κυτταρικές σειρές ινοβλαστών RAT1A και BALB/c (Eilers et al., 1991). Η ρύθμιση της έκφρασης επιτυγχάνεται μέσω της αλληλουχίας CAGGTG (E box) που εντοπίζεται στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου της προθυμοσίνης α , στην οποία δεσμεύεται το ογκογονίδιο *c-myc*. Η ίδια αλληλουχία στην περιοχή του υποκινητή δεν μετέχει στη διαδικασία αυτή (Gaubatz et al., 1994). Σε *in vivo* πειράματα τα επίπεδα του mRNA της προθυμοσίνης α παραλληλίζονται με αυτά του *c-myc* σε αναπτυσσόμενους εμβρυϊκούς ιστούς ποντικού (Moll et al., 1996) και σε καρκινικούς ιστούς (Mori et al., 1993, Shibuta et al., 1997, Wu et al., 1997, Sasaki et al., 2001). Πρέπει να αναφερθεί ότι η προθυμοσίνη α εκφράζεται ανεξάρτητα από την έκφραση ή όχι του γονιδίου *c-myc* (Vareli et al., 1995). Τα αποτελέσματα αυτά αμφισβητεί μελέτη της ομάδας της S. L. Berger που δείχνει ότι το ογκογονίδιο *c-myc* δεν ενεργοποιεί την μεταγραφή της προθυμοσίνης α (Mol et al., 1995). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας E2F-1 επάγει την έκφραση της προθυμοσίνης α μέσω της ειδικής ρυθμιστικής αλληλουχίας που φέρει η τελευταία στον υποκινητή. Υποστηρίζεται ότι η προθυμοσίνη α εμπλέκεται στην φωσφορυλίωση του παράγοντα μεταγραφής E2F-1 (Vega et al., 1998), γεγονός όμως που τίθεται υπό αμφισβήτηση (Enkemann et al., 1999). Μελέτη με DNA μικροσυστοιχίες (microarrays) έδειξε ότι η έκφραση του γονιδίου της προθυμοσίνης α καταστέλλεται από την πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη p53 (Zhao et al., 2000).

Η μελέτη της έκφρασης της προθυμοσίνης α σε σχέση με τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου οδήγησε σε αντιφατικά αποτελέσματα. Αυξημένα επίπεδα mRNA της προθυμοσίνης α ανιχνεύονται στο τέλος της S φάσης στις κυτταρικές σειρές CV1, NIH3T3 και U937 και παραλληλίζονται με τα επίπεδα της κυκλίνης B (Vareli et al., 1996). Σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εμφανίζονται κατά την μετάβαση από την φάση G0 στην G1 φάση του κύκλου (Szabo et al., 1992). Σε καλλιέργειες T-λεμφοκυττάρων και ηπατοκυττάρων, τα υψηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης παρατηρούνται στην αρχή της S φάσης (Bustelo et al., 1991). Οι Wu et al. (1997) υποστηρίζουν ότι η προθυμοσίνη α συμμετέχει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μειώνοντας την διάρκεια της G1 φάσης του κύκλου. Σε αντίθεση με τα παραπάνω

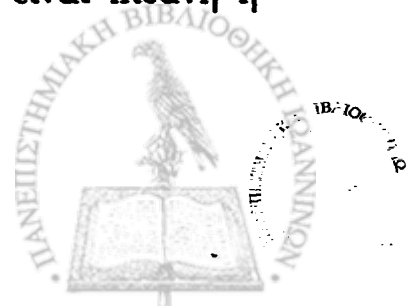


έρχεται μελέτη που υποστηρίζει ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης δεν μεταβάλλονται κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Zalvide et al., 1992).

Σε *in vitro* πειράματα η προθυμοσίνη α συνδέεται με την ιστόνη H1 του νουκλεοσώματος μέσω της κεντρικής όξινης περιοχής (Paramarcaki and Tsolas, 1994, Diaz-Julien et al., 1996). Η συνδυαστική ιστόνη H1 είναι υπεύθυνη για την οργάνωση της δομής της χρωματίνης. Η σύνδεση της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1 μεταβάλλει την στοιχειομετρία του δεσμού της τελευταίας με την χρωματίνη ώστε να είναι δυνατή η αντιγραφή και η μεταγραφή του DNA (Karetsou et al., 1998). Μελέτη με έμμεσο ανοσοφθορισμό έδειξε ότι η προθυμοσίνη α εντοπίζεται σε πυρηνικές θέσεις που σχετίζονται με την μεταγραφή του DNA (Vareli et al., 2000). Οι Boan et al. (2001) έδειξαν ότι η προθυμοσίνη α συμμετέχει στο «ξετύλιγμα» των χρωμοσωμάτων στη μετάφραση του κυτταρικού κύκλου. Με χρωματογραφία συγγένειας μελετήθηκαν σε εκχυλίσματα λεμφοκυττάρων NC37 οι πρωτεΐνες με την μεγαλύτερη δεσμευτική ικανότητα προς την προθυμοσίνη α. Η προθυμοσίνη α θεωρείται ότι μεταφέρεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα με το σύμπλοκο karyopherin beta 1-Rch 1, όπου και ανιχνεύεται συνδεδεμένη με τις ιστονικές πρωτεΐνες H2A, H2B, H3 και H4 (Freire et al., 2001).

Η προθυμοσίνη α σε κυττάρα Krebs 2 ποντικού, σε κύτταρα θύμου μόσχου και στον μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* είναι συνδεδεμένη στο κυτταρόπλασμα με μόρια RNA (Vartapetian et al., 1988, Macarova et al., 1989). Η ανασυνδυασμένη προθυμοσίνη α ποντικού που εκφράζεται στην *Escherichia coli* εμφανίζεται στο κυτταρόπλασμα ως σύμπλοκο με μόρια tRNA (tRNA^{Lys}, tRNA^{Ser}, tRNA^{Leu}, tRNA^{Met}) (Vartapetian et al., 1997) και παρουσιάζει τουλάχιστον τρεις θέσεις δέσμευσης tRNA, από τις οποίες μόνο η μία χρησιμοποιείται σε κάθε σύμπλοκο (Lukashev et al., 1999). Οι πρωτεΐνες Rev και Rex των ιών HIV και HTLV αντίστοιχα έχει αναφερθεί ότι συνδέονται *in vitro* με την προθυμοσίνη α. Πιστεύεται ότι η προθυμοσίνη α αλληλεπιδρά με ανάλογες πρωτεΐνες των θηλαστικών συμμετέχοντας στην έξοδο του RNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (Kubota et al., 1995). Σύμφωνα με τα παραπάνω είναι πιθανή η συμμετοχή της προθυμοσίνης α στην διαδικασία της μετάφρασης.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω καταλήγουμε στα εξής:

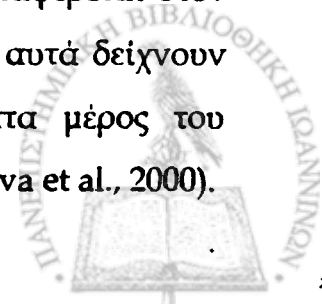


- Η προθυμοσίνη α επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με άγνωστο όμως μέχρι σήμερα μηχανισμό.
- Η πρωτεΐνη εμφανίζει χαρακτηήρες ογκο-πρωτεΐνης και μεταγραφικού παράγοντα.
- Η έκφραση του γονιδίου της προθυμοσίνης α επάγεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες c-myc και E2F-1, ενώ καταστέλλεται από την πρωτεΐνη p53.

1. 7. Προθυμοσίνη α και απόπτωση.

Ο ρόλος της προθυμοσίνης α στην απόπτωση είναι υπό διερεύνηση. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η πρωτεΐνη είναι ισχυρός αναστολέας της αποπτωτικής διαδικασίας. Πιο συγκεκριμένα, η προθυμοσίνη α αναστέλλει τον σχηματισμό του συμπλόκου μεταξύ του παράγοντα Araf-1 (apoptotic protease activator factor-1) και του κυτοχρώματος c (Jiang et al., 2003). Το σύμπλοκο αυτό, γνωστό και ως αποπτοσωμάτιο, είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση της πρωτεάσης-caspase 9, που οδηγεί μέσω ενεργοποίησης και των άλλων πρωτεασών στην καταστροφή του κυττάρου. Η αναστολή της σύνθεσης της προθυμοσίνης α οδήγησε τις κυτταρικές σειρές HeLa και HL-60 σε απόπτωση, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση της αντι-αποπτωτικής δράσης (Jiang et al., 2003, Rodriguez et al., 1999). Υψηλά επίπεδα mRNA της προθυμοσίνης α ανιχνεύονται στην απόπτωση και όχι στον πολλαπλασιασμό αδενικών κυττάρων του προστάτη (Furuya et al., 1993). Σε αυτό το συμπέρασμα καταλήγει και μελέτη στην οποία η επαγόμενη από το ρετινοϊκό οξύ απόπτωση των λεμφοκυτταρικών σειρών H9 και SR-786 χαρακτηρίζεται από αύξηση της έκφρασης της προθυμοσίνης α στα αρχικά στάδια της αποπτωτικής διαδικασίας (Wang et al., 2000).

Σε κύτταρα HeLa τα οποία οδηγούνται σε απόπτωση η προθυμοσίνη α υφίστανται πρωτεολυτική διάσπαση στη περιοχή DDVD (θέσεις 97-100) από τις κασπάσες (caspases) 3 και 7, με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός 10-14 πεπτιδίου που ανήκει στο καρβοξυτελικό άκρο και περιλαμβάνει το σήμα πυρηνικής εντόπισης (NLS). Αυτόματα η τεμαχισμένη (truncated) προθυμοσίνη α χάνει την ικανότητα να μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου και αδυνατεί να φωσφορυλιωθεί. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η διάσπαση-καταστροφή της προθυμοσίνης α είναι πιθανότατα μέρος του αποπτωτικού μηχανισμού του κυττάρου (Enkemann et al., 2000, Evstafieva et al., 2000).



Με βάση τα παραπάνω δεδομένα γίνεται φανερό ότι η προθυμοσίνη α συμμετέχει τόσο στην ρύθμιση κυτταρικού πολλαπλασιασμού όσο και της αποπτωτικής διαδικασίας, γεγονός που χαρακτηρίζει τους κλασσικούς μεταγραφικούς παράγοντες c-myc, E2F-1 και p53. Η αντι-αποπτωτική δράση της προθυμοσίνης α σε συνδυασμό με την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αποτελεί πιθανότατα μέρος του μηχανισμού της συνεχούς ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων.

1. 8. Προθυμοσίνη α και καρκίνος.

Η συμμετοχή της προθυμοσίνης α στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό οδήγησε τους ερευνητές στην μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης σε καρκινικούς ιστούς.

Αρχικές μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα της προθυμοσίνης α αυξάνονται σε καρκινικούς ιστούς του μαστού και του εντέρου (Tsitsiloni et al., 1993, Mori et al., 1993). Με ραδιοανοσολογική μέθοδο (RIA) μελετήθηκαν τα επίπεδα της προθυμοσίνης α σε κακοήθεις και καλοήθεις βλάβες του μαστού. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα στις καρκινικές βλάβες σε σχέση με τις καλοήθεις και συνδέονταν άμεσα με την σταδιοποίηση του όγκου και την παρουσία ή όχι μεταστάσεων στους επιχώριους λεμφαδένες (Tsitsiloni et al., 1998). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνει μελέτη στην οποία τα επίπεδα της πρωτεΐνης βρέθηκαν αυξημένα στον ορό και σε κυτταρικό εκχύλισμα σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού (Costopoulou et al., 1998). Υψηλά επίπεδα της προθυμοσίνης α στον καρκίνο του μαστού σχετίζονται με κακή πρόγνωση και χαμηλό προσδόκιμο επιβίωσης του ασθενούς (Magdalena et al., 2000). Οι Bianco et al. (2002) έδειξαν ότι η οιστραδιόλη επάγει την έκφραση της προθυμοσίνης α σε καρκινικά κύτταρα μαστού. Η αναστολή της σύνθεσης της προθυμοσίνης α (antisense μεθοδολογία) είχε σαν αποτέλεσμα την αναστολή του επαγόμενου από την οιστραδιόλη πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων.

Αυξημένα επίπεδα mRNA της προθυμοσίνης α, με συνοδό αύξηση των επιπέδων του ογκογονιδίου c-myc, ανιχνεύθηκαν στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο, στον καρκίνο του πνεύμονα και στο νευροβλάστωμα (Wu CG et al., 1997α, 1997β, Sasaki et al., 1997, 2001α, 2001β). Λεμφοκύτταρα ασθενών με λευχαιμία φέρουν υψηλά επίπεδα mRNA της προθυμοσίνης α σε σχέση με τα λεμφοκύτταρα υγιών ατόμων (Gomez-Marquez et

al., 1989). Με ραδιοανοσολογική μέθοδο μετρήθηκαν αυξημένα επίπεδα θυμοσίνης α1 στον ορό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα και του στομάχου (Sasaki et al., 1997, Mitani et al., 2000).

Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι κύτταρα που αναπτύσσονται παρουσία θυμοσίνης α1 ή στα οποία επάγεται η έκφραση της προθυμοσίνης α, δεν υφίστανται καρκινική εξαλλαγή (Naylor et al., 1996). Σε μελέτη γονιδιακής θεραπείας του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, η προθυμοσίνη α αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου και παρατείνει το προσδόκιμο επιβίωσης (Shiau et al., 2001).

1. 9. Παραθυμοσίνη.

Πρωτοταγής δομή.

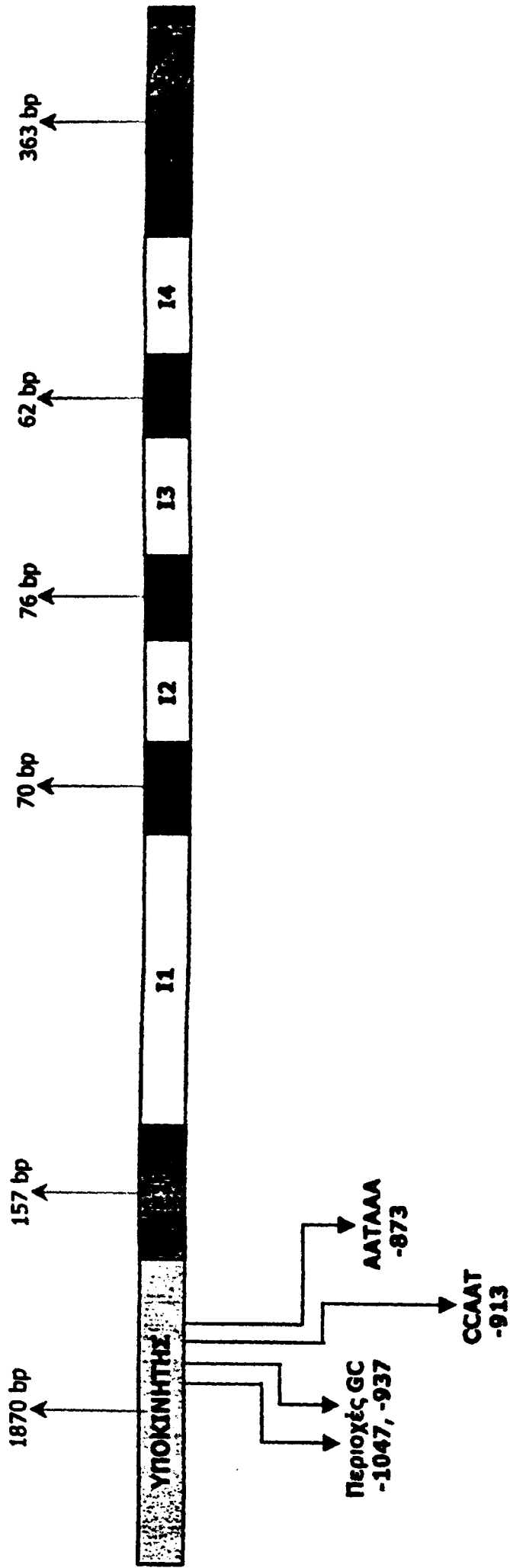
Δομή του γονιδίου.

Ενδοκυττάρια εντόπιση της πρωτεΐνης.

Η παραθυμοσίνη είναι μια μικρή (11.5 kDa) όξινη πρωτεΐνη που απομονώθηκε για πρώτη φορά στο θύμο αδένα επίμυος ταυτόχρονα με την απομόνωση της προθυμοσίνης α (Haritos et al., 1985).

Η πλήρης πρωτοταγής δομή ταυτοποιήθηκε από κλώνους cDNA επίμυος και ανθρώπου (Frangou-Lazaridis et al., 1988, Trompeter et al., 1989, Clinton et al., 1989). Με χημική μέθοδο ανάλυσης της αλληλουχίας των αμινοξέων προσδιορίστηκε η πρωτοταγής δομή στον μόσχο (Panneerselvam et al., 1988). Η παραθυμοσίνη περιέχει 101 αμινοξέα σε όλα τα είδη που μελετήθηκαν με υψηλό ποσοστό ομολογίας (90%). Η πρωτεΐνη είναι ιδιαίτερα όξινη (pI: 4.15) και χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολλών όξινων αμινοξέων (Glu, Asp) σε ποσοστό 55%, που εντοπίζονται στην κεντρική περιοχή και θεωρούνται θέσεις δέσμευσης ιόντων Zn^{2+} (Zn^{2+} -binding protein, ZnBP). Οι αλληλουχίες PKRQKT (θέσεις 90-95) και RKR (θέσεις 78-80) θεωρούνται σήματα πυρηνικής εντόπισης της πρωτεΐνης (Trompeter et al., 1996). Η ομολογία της παραθυμοσίνης με την προθυμοσίνη α είναι περίπου 40% και εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο και στην κεντρική περιοχή.

Το γονίδιο της παραθυμοσίνης επίμυος (6031 bp) αποτελείται από πέντε εξόνια που διακόπτονται από τέσσερα ιντρόνια και φέρει στην περιοχή του υποκινητή τις



ΣΧΗΜΑ 4. Διαγραμματική απεικόνιση της δομής του γονιδίου της παραθροσίνης επίμυος. Το γονίδιο αποτελείται από 5 εξόνια (E1-E5), που διακόπτονται από 4 ιντρόνια (I1-I4). Το συνολικό μέγεθος, συμπεριλαμβανομένου και του υποκινητή είναι 6.3 kb. Στην αλληλουχία του υποκινητή σημειώνονται οι ιιθανές θέσεις δέσμευσης για τους παράγοντες μεταγραφής, κοιλί ΤΑΤΑ, κοιλί CCAAT και δύο περιοχές ιλιούσιες σε GC, στις οποίες δεσμεύεται ο παράγοντας SPI (Trompeter and Soling, 1992).

κλασσικές ρυθμιστικές αλληλουχίες μεταγραφής TATA και CAAT καθώς θέσεις δέσμευσης για τους παράγοντες SP1, ID (Trompeter and Soling, 1992) και SRF (serum response factor) (Βαρέλη, 1995) (ΣΧΗΜΑ 4). Το συνολικό μέγεθος του μεταγραφήματος (open reading frame) στον άνθρωπο είναι 306 bp (Clinton et al., 1989). Το γονίδιο της παραθυμοσίνης εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 (q12-q22) του ανθρώπινου γονιδιώματος (Szabo et al., 1989).

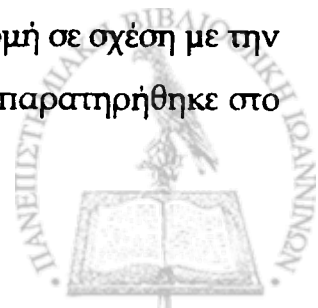
Οι πρώτες πληροφορίες για την ενδοκυττάρια θέση της πρωτεΐνης προήλθαν από ανοσοϊστοχημικές μελέτες. Η παραθυμοσίνη εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα επιθηλιακών κυττάρων του θύμου και ενδοθηλιακών κυττάρων του σπλήνα επίμυος (Roson et al., 1990). Οι Brand et al. (1991α) εντόπισαν την πρωτεΐνη στο κυτταρόπλασμα κυττάρων ήπατος, επινεφριδίων, σπλήνα και εγκεφάλου (Purkinje) και στον πυρήνα ανώριμων κυττάρων των κρυπών του λεπτού εντέρου. Λειτουργικές μελέτες έδειξαν ότι η παραθυμοσίνη μετακινείται στον πυρήνα ωοκυττάρων *Xenopus Laevis* και κυττάρων HeLa S3 και υπεύθυνη για την μετακίνηση αυτή είναι η αλληλουχία Lys-Arg-Gln-Lys (θέσεις 91-94) (Watts et al., 1990, Clinton et al., 1991). Οι Trompeter et al. (1996) έδειξαν ότι η παραθυμοσίνη μετακινείται στον πυρήνα κυττάρων COS και Reuber H35 ηπατοκυττάρων επίμυος ενώ σε περίπτωση απαλοιφής του σήματος PKRQKT, η πρωτεΐνη εντοπίζεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων.

Πρόσφατη μελέτη με έμμεσο ανοσοφθορισμό έδειξε ότι η παραθυμοσίνη εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα κυττάρων T24 (human bladder carcinoma cell line) (Vareli et al., 2000).

1. 10. Ιστική και φυλογενετική κατανομή της παραθυμοσίνης.

Η παραθυμοσίνη απομονώθηκε αρχικά στον επίμυ (Haritos et al., 1985) και στην συνέχεια στον άνθρωπο (Tsitsiloni et al., 1988), στον χοίρο (Economou et al., 1988), στον μόσχο (Panneerselvam et al., 1988), στον ποντικό (Clinton et al., 1989) και στην αίγα (Frillingos et al., 1991).

Σε ιστικό επίπεδο η παραθυμοσίνη εμφανίζει αντίστροφη κατανομή σε σχέση με την προθυμοσίνη α. Στον άνθρωπο υψηλή συγκέντρωση της πρωτεΐνης παρατηρήθηκε στο



ήπαρ και ακολούθησαν σε περιεκτικότητα οι πνεύμονες, ο θύμος και οι νεφροί (Tsitsiloni et al., 1988). Παρόμοια κατανομή παρατηρείται στον επίμυ, στον ποντικό και στον χοίρο (Haritos et al., 1985, Wada et al., 1988, Economou et al., 1988, Clinton et al., 1989). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνει μελέτη σε επίπεδο mRNA, όπου οι μη λεμφικοί ιστοί, το ήπαρ, ο εγκέφαλος, οι νεφροί και οι πνεύμονες παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα μεταγραφήματος σε σχέση με το σπλήνα και το θύμο (Clinton et al., 1989).

1. 11. Βιολογικός ρόλος της παραθυμοσίνης

Η αρχική παρατήρηση ότι η παραθυμοσίνη αναστέλλει την προστατευτική δράση της προθυμοσίνης α σε ευαίσθητοποιημένες σειρές ποντικών από ευκαιριακές λοιμώξεις με τον μύκητα *Candida albicans*, οδήγησε στην υπόθεση ότι πρόκειται για ανοσοενεργό πεπτιδίο (Haritos et al., 1985).

Η παραθυμοσίνη βρέθηκε να απενεργοποιεί αντιστρεπτά, παρουσία ιόντων Zn^{2+} , την φωσφοφρουκτοκινάση 1 και θεωρήθηκε ότι συμμετέχει στο μεταβολισμό των υδατανθράκων στο κυτταρόπλασμα (Brand and Soling, 1986). Η ανίχνευση χαμηλών επιπέδων της πρωτεΐνης στα ερυθροκύτταρα, τα οποία περιέχουν μεγάλα ποσά των ενζύμων που συμμετέχουν στη γλυκόλυση, έθεσε σε αμφισβήτηση την παραπάνω υπόθεση (Brand et al., 1991).

Μια σειρά από ερευνητικές μελέτες που ακολούθησαν έδειξαν ότι η πρωτεΐνη συμμετέχει στις διαδικασίες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Σε *in-vitro* πειραματική διαδικασία η παραθυμοσίνη συνδέεται, παρουσία ιόντων Zn^{2+} , με την ιστόνη H1 μέσω της κεντρικής όξινης περιοχής και πιθανότατα συμμετέχει στην οργάνωση της χρωματίνης όπως συμβαίνει και με άλλες όξινες πυρηνικές πρωτεΐνες (Kondili et al., 1996). Μελέτη με έμμεσο ανοσοφθορισμό έδειξε ότι η παραθυμοσίνη εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων T24 (human bladder carcinoma cell line), σε θέσεις αντιγραφής της χρωματίνης, κατά την έναρξη της S φάσης της μίτωσης (Vareli et al., 2000).

Η πιθανή συσχέτιση της παραθυμοσίνης με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μελετήθηκε σε καρκινικούς ιστούς εντέρου, μαστού (Tsitsiloni et al., 1993, 1994, 1998),



όπου τα επίπεδα της πρωτεΐνης βρέθηκαν αυξημένα σε σχέση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς. Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η παραθυμοσίνη επιταχύνει τις διαδικασίες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω αναστολής του συμπλέγματος του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε ηπατοκύτταρα επίμυος (Okamoto et al., 2000).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η παραθυμοσίνη φαίνεται να εμπλέκεται στις διαδικασίες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, χωρίς να έχει αποσαφηνιστεί μέχρι σήμερα ο ακριβής μηχανισμός.

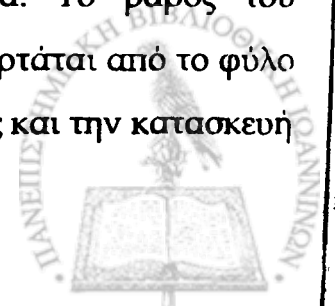
1. 12. Θυρεοειδής αδένας.

1. 12. 1 Εμβρυολογία.

Ο θυρεοειδής ανήκει στους ενδοκρινείς αδένες. Εμβρυολογικά προέρχεται από τρεις καταβολές, μια μέση από το φαρυγγικό έδαφος και δύο πλάγιες από τον 4^ο βραγχιακό θύλακο. Το τυφλό τμήμα της γλώσσας αποτελεί την αρχική θέση εντόπισης του αδένου, ο οποίος στην συνέχεια κατέρχεται σταδιακά προς τα κάτω, πίσω από το υοειδές οστό, για να λάβει την τελική θέση έμπροσθεν του 2^{ου} και 3^{ου} ημικρίκιου της τραχείας. Κατά την κάθοδο του αδένου δημιουργείται ο θυρεογλωσσικός πόρος, υπολείμματα του οποίου παραμένουν μερικές φορές σε ενήλικα άτομα (Σπαρούνης, 1989).

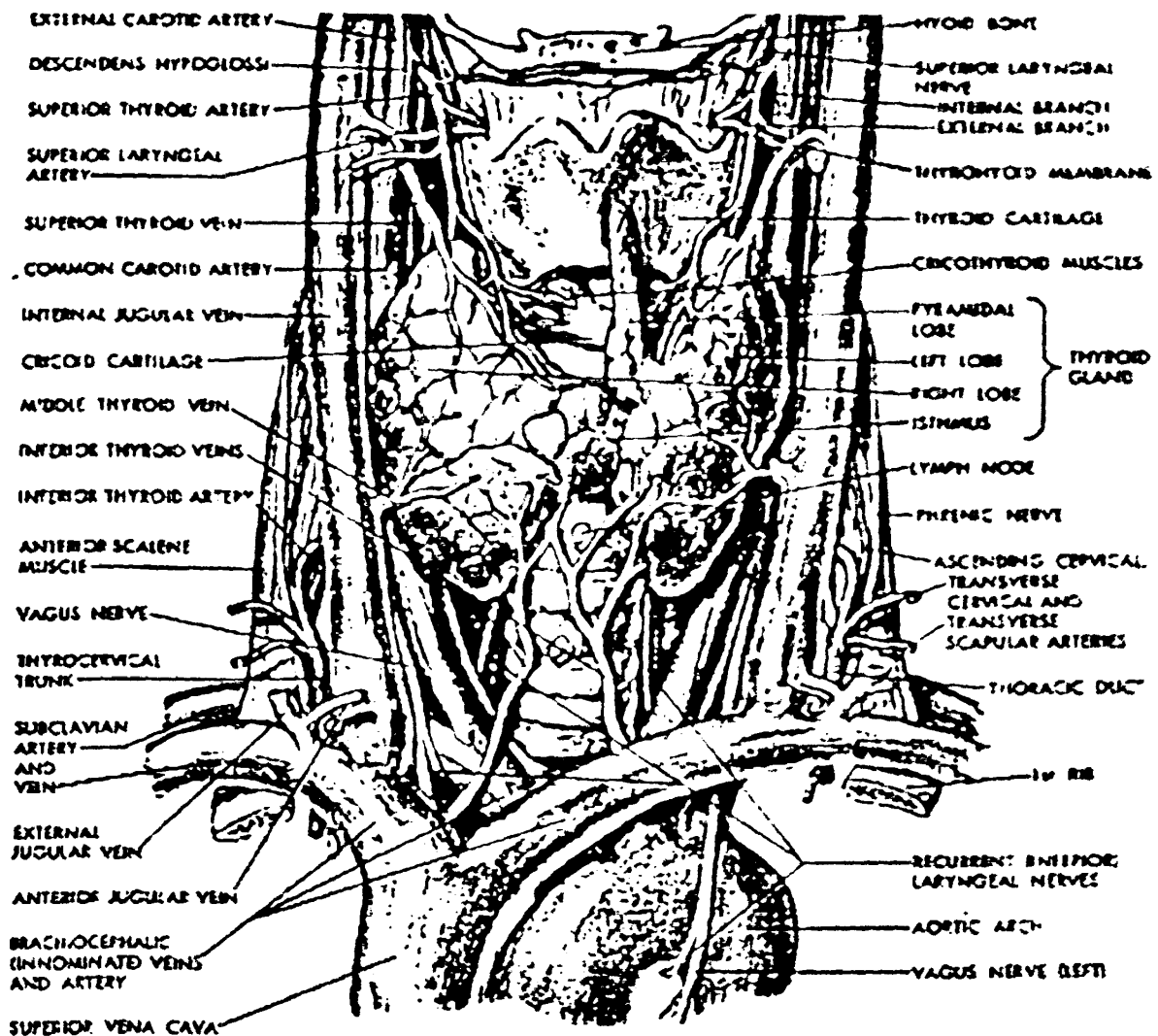
1. 12. 2 Ανατομία.

Ο θυρεοειδής αδένας φέρει σχήμα «δίκην πεταλούδας» αποτελούμενος από δύο πλάγιους λοβούς που συνδέονται μεταξύ τους στη μέση γραμμή με μια στενότερη μοίρα, τον ισθμό, ο οποίος βρίσκεται κάτω από το κρικοειδή χόνδρο (ΕΙΚΟΝΑ 1). Κάθε λοβός εμφανίζει σχήμα τρίπλευρης πυραμίδας της οποίας η κορυφή φέρεται προς τα έξω και συνδέεται με τον ισθμό. Ενίοτε υπάρχει και τρίτος λοβός, ο πυραμοειδής, ο οποίος εξορμάται από τον ισθμό και εκτείνεται προς το υοειδές οστόν, υποδηλώνοντας την εμβρυολογική οδό διάπλασης του αδένου. Το βάρος του φυσιολογικού αδένου στον ενήλικα κυμαίνεται από 18-25 gr και εξαρτάται από το φύλο (αυξάνεται στις γυναίκες κατά την κύηση), τις λειτουργικές ανάγκες και την κατασκευή

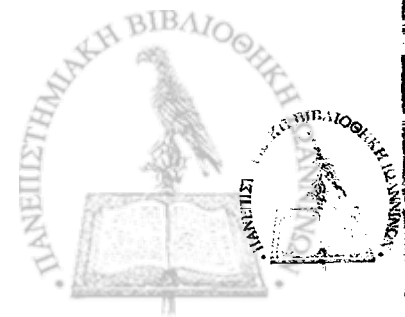


του ατόμου. Ο αδένας περιβάλλεται από την προτραχειακή περιτονία, η οποία τον καθλώνει στην τραχεία και στον λάρυγγα, με αποτέλεσμα να ακολουθεί τις κινήσεις της κατάποσης.

Η πλούσια αιμάτωση του αδένα (5 ml/min/gr) εξασφαλίζεται σε κάθε πλευρά από την άνω και κάτω θυρεοειδική αρτηρία, οι οποίες είναι κλάδοι της έξω καρωτίδας και του θυρεοασχενικού στελέχους αντίστοιχα. Επίσης υπάρχει και η μέση θυρεοειδική αρτηρία που εκφύεται από το αορτικό τόξο. Η απαγωγή του αίματος γίνεται από τις αντίστοιχες φλέβες.



ΕΙΚΟΝΑ 1. Ανατομία του θυρεοειδούς αδένα και των πέριξ ιστών (Gross Anatomy).



Τα λεμφαγγεία των δύο λοβών αναστομώνονται μεταξύ τους και φέρονται προς τους παρατραχειακούς, τους σφαγιτιδικούς και τους λεμφαδένες του ανώτερου μεσοθωρακίου.

Η νεύρωση του αδένος γίνεται από συμπαθητικούς κλάδους του μέσου και κάτω αυχενικού γαγγλίου και από παρασυμπαθητικές ίνες του άνω και παλίνδρομου λαρυγγικού νεύρου (Σάββας, 1989).

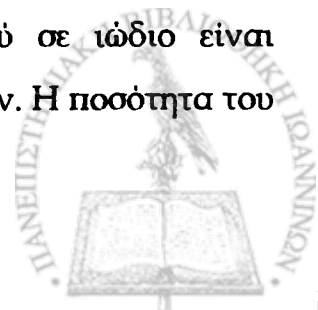
1. 12. 3 Ιστολογία.

Μικροσκοπικώς ο θυρεοειδής αδένος συγκροτείται από πολυάριθμα λόβια των 20-40 θυλακίων το καθένα, που διαχωρίζονται μεταξύ τους με ινώδη διαφραγμάτια. Κάθε θυλάκιο αποτελείται από ένα στοιχείο κυβοειδών αδενικών κυττάρων, τα οποία εκκρίνουν κολλοειδές έκκριμα (θυρεοσφαιρίνη) που γεμίζει την κοιλότητα των θυλακίων. Η διάμετρος των θυλακίων κυμαίνεται από 20-900 μm , ενώ το ύψος των κυβοειδών κυττάρων είναι 15 μm . Η κορυφαία επιφάνεια του κυττάρου φέρει μικρολάχνες, οι οποίες μέσω μηχανισμού πινοκύτωσης μεταφέρουν το κολλοειδές στο κυτταρόπλασμα, από το οποίο απελευθερώνονται οι θυρεοειδικές ορμόνες προς την βάση του κυττάρου και στην συνέχεια στη συστηματική κυκλοφορία.

Η χορήγηση θυρεοειδοτρόπου ορμόνης μεταβάλλει το σχήμα των κυττάρων από κυβοειδές σε σπηλιδωτό, προκαλεί αύξηση των μιτώσεων και του αριθμού των κυττάρων, απορρόφηση του κολλοειδούς και αύξηση της αιμάτωσης του αδένος. Όταν ο αδένος υπολειπουργεί το επιθήλιο των θυλακίων είναι αποπλατυσμένο (Παπαδημητρίου, 1990).

1. 12. 4 Φυσιολογία.

Ο θυρεοειδής παράγει δύο δραστικές ορμόνες την θυροξίνη (3,5,3,5-τετραϊώδοθυρονίνη, T_4) και την τριϊώδοθυρονίνη (3,5,3-τριϊώδοθυρονίνη, T_3), οι οποίες έχουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του βασικού μεταβολισμού και στην διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού. Η επάρκεια του οργανισμού σε ιώδιο είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών. Η ποσότητα του

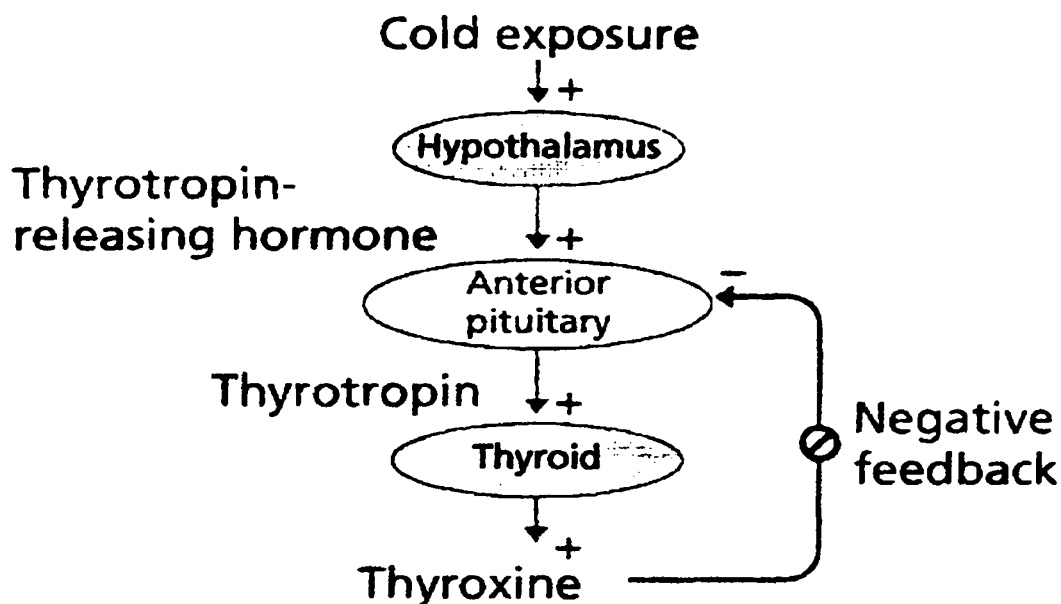


ιωδίου που προσλαμβάνεται καθημερινά με τις τροφές και το νερό κυμαίνεται ανάλογα με τις διαιτητικές συνθήκες και την γεωγραφική περιοχή μεταξύ 10-2000 μg, συνήθως όμως είναι 100-500 μg. Ο θυρεοειδής περιέχει 6-8 mg ιωδίου που αντιστοιχεί στο 90% της συνολικής περιεκτικότητας στον οργανισμό. Οι θυρεοειδικές ορμόνες είναι ιωδιωμένα παράγωγα της τυροσίνης και η βιοσύνθεσή τους ακολουθεί τα παρακάτω στάδια:

- Την σύνθεση της θυρεοσφαιρίνης. Η θυρεοσφαιρίνη (5496 αμινοξέα) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους (660 kDa) η οποία φέρει 110 μόρια τυροσίνης. Η θυρεοσφαιρίνη εκκρίνεται από τα θυλακιώδη κύτταρα στο εσωτερικό των θυλακίων και αποτελεί την μορφή με την οποία εναποθηκεύονται οι θυρεοειδικές ορμόνες.
- Την ενεργητική πρόσληψη του ανόργανου ιωδίου από την συστηματική κυκλοφορία.
- Την οξείδωση του ιωδίου από το ένζυμο υπεροξειδάση της τυροσίνης (TPO).
- Την ιωδίωση των τυροσινών του μορίου της θυρεοσφαιρίνης παρουσία του ενζύμου TPO.
- Την σύζευξη των ιωδοτυροσινών [μονοϊωδοτυροσίνη (MIT), διϊωδοτυροσίνη (DIT)] για το σχηματισμό των θυρεοειδικών ορμονών. Η σύζευξη ενός μορίου MIT και ενός μορίου DIT οδηγεί στο σχηματισμό της τριϊωδοθυρονίνης (T_3), ενώ η σύζευξη δύο μορίων DIT οδηγεί στο σχηματισμό της θυροξίνης (T_4).
- Την απελευθέρωση των θυρεοειδικών ορμονών στην συστηματική κυκλοφορία.

Η θυρεοειδοτρόπος ορμόνη (Thyroid-Stimulating Hormone, TSH) εκκρίνεται από πρόσθιο λοβό της υπόφυσης και διεγείρει την βιοσύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών. Η ρύθμιση της έκκρισης της TSH επιτυγχάνεται μέσω της θυρεοεκλυτίνης (Thyrotropin-Releasing Hormone, TRH), η οποία εκκρίνεται από νευρικές απολήξεις της μέσης προεξοχής του υποθαλάμου και μεταφέρεται στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης δια του υποθαμοϋποφυσιακού πύλαιου συστήματος. Η TRH επιδρά άμεσα στα αδενικά κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης αυξάνοντας τον ρυθμό έκκρισης της TSH. Η διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων των θυρεοειδικών ορμονών στο αίμα επιτυγχάνεται με μηχανισμό παλίνδρομης ρύθμισης (θετικής, αρνητικής) της έκκρισης της TSH και της TRH. Η αύξηση των θυρεοειδικών ορμονών T_3 και T_4 αναστέλλει, με

μηχανισμό αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης, την περαιτέρω έκκριση της TSH και της TRH (ΣΧΗΜΑ 5).



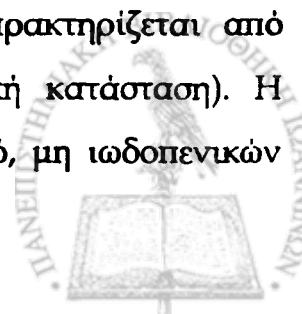
ΣΧΗΜΑ 5. Ρύθμιση της έκκρισης των θυρεοειδικών ορμονών. TRH: θυρεοεκλυτίνη, TSH: θυρεοειδοτρόπος ορμόνη, T_3 : τριωδοθυρονίνη, T_4 : θυροξίνη.

Οι θυρεοειδικές ορμόνες μεταφέρονται κατά το μεγαλύτερο μέρος συνδεδεμένες με πρωτεΐνες του πλάσματος και ειδικότερα με μια ειδική προλευκωματίνη σε ποσοστό 20-30% (Thyroxin-Binding Prealbumin, TBPA) και κυρίως με την θυρεοσφαιρίνη σε ποσοστό 70-80% (Thyroxin-Binding Globulin, TBG). Ένα μικρό ποσοστό της τάξεως του 0.05% της ολικής θυροξίνης και 0.5% της ολικής τριωδοθυρονίνης παραμένει ελεύθερο και επομένως είναι βιολογικά ενεργό (Αποστολάκης, 1986, Χαρσούλης, 1998, Μπατρίνος, 1999).

1. 13. Απλή οζώδης βρογχοκήλη.

Αιτιοπαθογένεια.

Ως απλή (μη τοξική) οζώδης βρογχοκήλη ορίζεται η διόγκωση του θυρεοειδούς αδένου που δεν οφείλεται σε νεοπλασματική εξεργασία και χαρακτηρίζεται από φυσιολογικά επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών (ευθυρεοειδική κατάσταση). Η συχνότητα της απλής οζώδους βρογχοκήλης στο γενικό πληθυσμό, μη ιωδοπενικών



περιοχών, είναι λιγότερο από 5%, με υπεροχή των γυναικών σε αναλογία 13:1 (Brix and Hegedus, 2000, Gaitan et al., 1991). Στην Ελλάδα τα επιδημιολογικά δεδομένα είναι περιορισμένα. Σε μελέτη 4000 παιδιών σχολικής ηλικίας στην Ήπειρο, η συχνότητα εμφάνισης της νόσου ανέρχεται στο 21% (Tsatsoulis et al., 1996).

Αιτιολογικά διακρίνονται δύο μορφές της νόσου, η ενδημική και η σποραδική (ΠΙΝΑΚΑΣ 1). Ως ενδημική χαρακτηρίζεται η βρογχοκήλη που απαντά σε ποσοστό μεγαλύτερο από 10% του πληθυσμού μιας περιοχής και οφείλεται κυρίως στην χαμηλή περιεκτικότητα του ιωδίου στο νερό και στις τροφές. Η ημερήσιες ανάγκες σε ιώδιο κυμαίνονται μεταξύ 100-500 μg και τιμές μικρότερες από 50 μg συνιστούν ιωδοπενία. Βρογχοκηλογόνες ουσίες που λαμβάνονται με την τροφή, όπως οι θειογλυκοσίδες στα λαχανικά αλλά και το ίδιο το ιώδιο σε μεγάλες ποσότητες, αποτελούν σπάνια αίτια βρογχοκήλης. Η σποραδική μορφή περιλαμβάνει πρακτικά κάθε άλλη αιτία πλην της ενδημικής ιωδοπενίας. Συνήθως οφείλεται σε διαταραχή της βιοσύνθεσης των θυρεοειδικών ορμονών (δυσορμονογένεση) λόγω συγγενούς έλλειψης (μερικής ή ολικής) ενός ή περισσότερων ενζύμων που μετέχουν στο βιοσυνθετικό κύκλο (Χαρσούλης, 1998, Μπατρίνος, 1999).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Αιτιολογική ταξινόμηση της απλής οξείδους βρογχοκήλης.

A. Ενδημική, οφειλόμενη σε:

- i. Έλλειψη ιωδίου
- ii. Περίσσεια ιωδίου
- iii. Βρογχοκηλογόνα διαίτης

B. Σποραδική, οφειλόμενη σε:

- i. Δυσορμονογένεση (συγγενείς διαταραχές στην βιοσύνθεση των ορμονών)
- ii. Φαρμακοκογενή αίτια (λίθιο, θειοκυανικά, φαινυλβουταζόνη, αμινοσαλκυλικό οξύ)
- iii. Έλλειψη ιωδίου
- iv. Αντισταθμιστική, μετά από υφολική θυρεοειδεκτομή ή ακτινοβολία

Διακρίνονται οι παρακάτω τύποι βιοσυνθετικών διαταραχών: α. πλημμελής μεταφορά του ιωδίου από τον εξωκυττάριο χώρο μέσα στο κύτταρο, β. ανεπάρκεια του ενζύμου υπεροξειδάση, με αποτέλεσμα την ατελή οξείδωση του ιωδίου και την

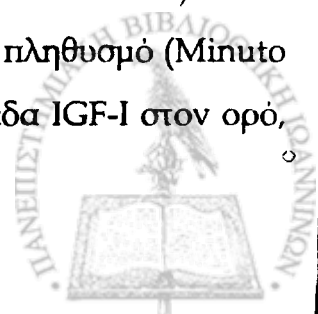
αδυναμία ενσωμάτωσης στο μόριο της τυροσίνης και γ. ανεπαρκής σύζευξη των ιωδιωμένων τυροσινών για τον σχηματισμό της θυροξίνης (T₄) και της τριϊωδοθυρονίνης (T₃). Η βλάβη ανεξάρτητα από το σημείο που εντοπίζεται, οδηγεί σε ελαττωμένη παραγωγή θυρεοειδικών ορμονών και κατά συνέπεια στην ανάπτυξη βρογχοκήλης. Φάρμακα όπως το λίθιο και η φαινυλβουταζόνη προκαλούν την εμφάνιση βρογχοκήλης. Η υφολική θυρεοειδεκτομή κυρίως όταν συνδυάζεται με πλημμελή θεραπεία υποκατάστασης των θυρεοειδικών ορμονών οδηγεί συχνά σε αύξηση της μάζας του αδένα και στην ανάπτυξη βρογχοκήλης (Σμπαρούνης, 1989).

Ο ρόλος της κληρονομικότητας στην απλή οζώδη βρογχοκήλη φαίνεται να είναι σημαντικός. Η οικογενής κατανομή και υψηλή συχνότητα εμφάνισης της νόσου στα μονοζυγωτικά δίδυμα σε σχέση με τα διζυγωτικά αποδεικνύουν την συμμετοχή γενετικών παραγόντων στην αιτιοπαθγένεια της νόσου. Σε μελέτη των Brix et al. (1999) σε πληθυσμό 5479 διδύμων του ίδιου φύλου στην Δανία, το ποσοστό της κληρονομικής προδιάθεσης της νόσου στις γυναίκες φτάνει το 82%.

Πρόσφατη μελέτη της αιτιοπαθγένειας της νόσου σε μοριακό επίπεδο έδειξε ότι τα θυρεοειδικά κύτταρα που διαμορφώνουν ένα θυλάκιο έχουν συχνά πολυκλωνική προέλευση, με αποτέλεσμα να υπάρχει γενετική ετερογένεια στην ανάπτυξη και την λειτουργία του θυρεοειδούς αδένα. Οι Studer et al. (1995) έδειξαν την ταυτόχρονη παρουσία μονοκλωνικών και πολυκλωνικών όζων σε πολυοζώδη βρογχοκήλη.

Σωματικές μεταλλάξεις που συνδέονται με την εμφάνιση βρογχοκήλης έχουν ανιχνευθεί στα εξόνια 9 και 10 του γονιδίου του υποδοχέα της TSH (TSHR), στο γονίδιο NIS (Na⁺/I⁻ symporter gene) και στο γονίδιο multinodular goiter marker 1 (MNG1) που εδράζεται στο χρωμόσωμα 14 (Brix and Hegedus, 2000). Σημειακή μετάλλαξη στο εξόνιο 10 του γονιδίου της θυρεοσφαιρίνης (thyroglobulin) έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με ενδημική και σποραδική απλή οζώδη βρογχοκήλη (Perez-Centeno et al., 1996).

Νεότερες μελέτες της παθογένειας της νόσου καταδεικνύουν την συμμετοχή διαφόρων αυξητικών παραγόντων στην ανάπτυξη της απλής οζώδους βρογχοκήλης. Τα επίπεδα του αυξητικού παράγοντα IGF-I (insulin-like growth factor-I) είναι αυξημένα σε ασθενείς με οζώδη βρογχοκήλη σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό (Minuto et al., 1989). Η ακρομεγαλία, που χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα IGF-I στον ορό,



συνδέεται με την βρογχοκίλη σε ποσοστό 70% (Wuster et al., 1991). Νεότερες μελέτες δείχνουν ότι υπάρχει συνεργική δράση του IGF-I και της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSH). Ασθενείς με ανεπάρκεια της υπόφυσης και υψηλά επίπεδα IGF-I στον ορό (μετά από χορήγηση αυξητικής ορμόνης) δεν παρουσιάζουν αύξηση της μάζας του θυρεοειδούς αδένου (Cheung et al., 1996). Σε καλλιέργειες θυρεοειδικών κυττάρων παρατηρείται υπερέκφραση του IGF-I, μετά από εξωγενή χορήγηση TSH (Tode et al., 1989, Hofbauer et al., 1995). Η έκφραση του γονιδίου του IGF-I μειώνεται σημαντικά από υψηλά επίπεδα του ενδοκυττάρου ιώδιου, γεγονός που δείχνει την πιθανή συμμετοχή του IGF-I στην παθογένεια της ενδημικής (ιωδοπενικής) βρογχοκίλης (Hofbauer et al., 1995).

Οι αυξητικοί παράγοντες FGF-1, FGF-2 (fibroblast growth factors) και ο υποδοχέας FGF-1 (FGFR-1) εκφράζονται στα θυλακιώδη κύτταρα σε απλή οξώδη βρογχοκίλη και τα επίπεδα έκφρασης είναι σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με τον φυσιολογικό αδένου (Thompson et al., 1998). Οι Hill et al. (1994) και οι Cocks et al. (2000) έδειξαν ότι ο FGF-2 υπερεκφράζεται μετά από εξωγενή χορήγηση TSH σε καλλιέργειες θυρεοειδικών κυττάρων.

Οι αυξητικοί παράγοντες της αγγειογένεσης PlGF (placenta growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor) και οι αντίστοιχοι υποδοχείς (Flt-1, Flk-1/KDR), υπερεκφράζονται σε καλλιέργειες θυρεοειδικών κυττάρων επίμυος (FRTL-5) μετά από εξωγενή χορήγηση TSH (Viglieto et al., 1997). Οι Schulte et al. (2000) έδειξαν ότι η έκφραση του υποδοχέα actRII της activin A, ενός αναστολέα της αγγειογένεσης, είναι μειωμένη στην απλή οξώδη βρογχοκίλη σε σχέση με τον φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό.

Ο ρόλος του αυξητικού παράγοντα HGF (hepatocytes growth factor) είναι υπό διερεύνηση. Οι Eccles et al. (1996) έδειξαν ότι ο HGF εκκρίνεται από τα φυσιολογικά θυρεοειδικά κύτταρα και αποτελεί ισχυρό μιτογόνο ερέθισμα για τα κύτταρα αυτά. Σε μελέτη των Tronato et al. (1998) διαπιστώθηκε υπερέκφραση του HGF σε μη νεοπλασματικούς όζους του αδένου και στο θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς.

Ανεξάρτητα από τον αιτιολογικό παράγοντα, ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός της μη τοξικής οξώδους βρογχοκίλης φαίνεται να είναι κοινός. Η ανεπαρκής σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών (T_3 , T_4) οδηγεί σε αυξημένη (αντιρροπιστική) έκκριση της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSH) από την υπόφυση, μέσω της υποθαλαμικής

θυρεοεκλυτίνης (TRH), η οποία διεγείρει τα θυρεοειδικά κύτταρα για την παραγωγή T_3 και T_4 , ώστε να αποκατασταθεί η ισορροπία. Η υπερέκκριση TSH οδηγεί σε αύξηση της λειτουργικής μάζας του αδένου (υπερπλασία, υπερτροφία) και στην δημιουργία βρογχοκήλης. Η αποκατάσταση των επιπέδων των θυρεοειδικών ορμονών στην περιφέρεια οδηγεί, με μηχανισμό αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης, στην σταδιακή μείωση της έκκρισης της TSH. Αν ο αιτιολογικός παράγοντας συνεχίζει και υφίστανται, ακολουθεί νέο εκκριτικό κύμα TSH και ο θυρεοειδής αδένου εισέρχεται σε νέα φάση υπερπλασίας και υπερτροφίας. Αποτέλεσμα της συνεχούς λειτουργικής μεταβολής και μορφολογικής αναδιαμόρφωσης του αδένου είναι η δημιουργία κυστικών και αδενωματοδών όζων (Αποστολάκης, 1986, Χαρσούλης, 1998, Μπατρίνος, 1999).

Η TSH στον ορό των ασθενών με απλή οζώδη βρογχοκήλη είναι φυσιολογική ή ελαφρά μειωμένη (Toft et al., 1976), γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι κάποιος άλλος μηχανισμός ενεργεί ταυτόχρονα με την υπερέκκριση της TSH και οδηγεί στη δημιουργία της βρογχοκήλης.

1. 14. Καλοήγη και κακοήγη νεοπλάσματα του θυρεοειδούς αδένου.

Το **θυλακιώδες αδένωμα** είναι το συχνότερο καλοήγη νεόπλασμα του θυρεοειδούς αδένου. Προσβάλλει και τα δύο φύλα, ανεξάρτητα από την ηλικία. Ιστολογικά διακρίνεται στους παρακάτω τύπους: απλό, δοκιδώδες, μικροθυλακιώδες, μακροθυλακιώδες, τύπος από οξύφιλα κύτταρα (Hurthle cell) και μικτός τύπος. Η διάκριση του θυλακιώδους αδενώματος από το αντίστοιχο καρκίνωμα είναι αρκετές φορές αδύνατη. Η ανεύρεση αποτιτανώσεων και αγγειακής διήθησης αποτελούν σημεία κακοήθειας (Παπαδημητρίου, 1990).

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αδένου αποτελεί την συχνότερη ενδοκρινική νεοπλασία (Robbins, 1991). Η συχνότητά του ανέρχεται στο 0.6% και 1.6% του συνόλου των νεοπλασμάτων στους άνδρες και στις γυναίκες αντίστοιχα (Sherman et al., 1998). Τα κακοήγη νεοπλάσματα του θυρεοειδούς αδένου προέρχονται από τα θυλακιώδη κύτταρα, τα παραθυλακιώδη κύτταρα και τα στοιχεία του συνδετικού υποστρώματος του αδένου (ΠΙΝΑΚΑΣ 2).



ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Ταξινόμηση των κακοήθων νεοπλασμάτων του θυρεοειδούς αδένα.

A. Καρκινώματα

α. Από τα κύτταρα των θυλακίων

ι. Διαφοροποιημένα

Θηλώδη

Θυλακιώδη

ιι. Αδιαφοροποίητα

Γιγαντοκυτταρικά

Μικροκυτταρικά

Ατρακτοκυτταρικά

β. Από τα παραθυλακιώδη κύτταρα

Μυελοειδή

γ. Μεταστατικά

Από νεφρούς, πνεύμονες, μαστό

Β. Όγκοι από στοιχεία του συνδετικού ιστού

Σαρκώματα

Λεμφώματα

Πλασμοκυττώματα

Το θηλώδες (papillary) καρκίνωμα είναι το πιο συχνό από τα νεοπλάσματα του θυρεοειδούς (70-80%), παρουσιάζεται συνήθως την 4^η-5^η δεκαετία, προσβάλλει συχνότερα τις γυναίκες (2-3:1), έχει βραδεία εξέλιξη και καλή πρόγνωση.

Το θυλακιώδες (follicular) καρκίνωμα (10-15%) εμφανίζεται την 5^η-6^η δεκαετία και είναι συχνότερο στις γυναίκες (6:1). Ανήκει μαζί με το θηλώδες καρκίνωμα στα διαφοροποιημένα νεοπλάσματα του θυρεοειδούς.

Το αδιαφοροποίητο (undifferentiated, anaplastic) καρκίνωμα (5-10%) αναπτύσσεται σε άτομα άνω των 60 ετών, είναι το πιο επιθετικό και παρουσιάζει την χειρότερη πρόγνωση από τα νεοπλάσματα του αδένα. Ιστολογικώς δεν εμφανίζει κανένα χαρακτηριστικό του θυρεοειδικού ιστού και παρουσιάζεται ως ανομοιομορφη μάζα με άφθονες πυρηνοκινησιές που διηθεί τους πέριξ ιστούς.

Το μυελοειδές (medullary) καρκίνωμα (7-10%) εξορμάται από τα παραθυλακιώδη κύτταρα (C cells), προσβάλλει και τα δύο φύλα με την ίδια αναλογία και δύναται να

παρουσιάζει ορμονοεκκριτική δραστηριότητα (έκκριση καλσιτονίνης). Διακρίνονται δύο μορφές, η σποραδική και η οικογενής. Η οικογενής μορφή μπορεί να συνυπάρχει με νεοπλασμάτα άλλων ενδοκρινών αδένων (σύνδρομα πολλαπλής ενδοκρινικής νεοπλασίας MEN IIα και IIβ) (Rosen et al., 1997).

Η αιτιολογία του καρκίνου του θυρεοειδούς αδένου παραμένει κατά το πλείστον αδιευκρίνιστη. Σήμερα πιστεύεται ότι περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες δρουν συνεργικά για την κακοήγη εξαλλαγή των θυλακιωδών κυττάρων του θυρεοειδούς αδένου.

Η έκθεση στην ιονίζουσα ακτινοβολία είτε για θεραπευτικούς σκοπούς (καλοήθεις και κακοήθεις παθήσεις του τραχήλου) είτε λόγω περιβαλλοντικής μόλυνσης (Νήσοι Marshall στην Ιαπωνία και Chernobyl στην Ουκρανία) προκαλεί αύξηση της συχνότητας του θυρεοειδικού καρκίνου. Μελέτες που έγιναν μετά το πυρηνικό ατύχημα του Chernobyl το 1986, έδειξαν αύξηση των κρουσμάτων του καρκίνου του θυρεοειδούς αδένου κατά 20-60 φορές, ιδίως σε άτομα νεαρής ηλικίας (Kazakov et al., 1992, Nikiforov and Gnepp, 1994, Becker et al., 1996). Στις περιπτώσεις αυτές η μεταλλαξιογόνος δράση της ακτινοβολίας οδηγεί με σωματικές μεταθέσεις του γονιδίου RET και μεταλλάξεις του γονιδίου p53 (Santoro et al., 2000). Τα θηλώδη καρκινώματα απαντώνται συνήθως σε μη-ιωδοπενικές περιοχές σε αντίθεση με τα θυλακιώδη τα οποία εμφανίζονται συχνότερα σε ιωδοπενικές περιοχές (Lind et al., 1998, Bakiri et al., 1998).

Τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει στραφεί στην μελέτη της καρκινογένεσης σε μοριακό επίπεδο. Ο καρκίνος του θυρεοειδή συνδέεται με μεταλλάξεις γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των θυλακιωδών κυττάρων (ΠΙΝΑΚΑΣ 3).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Γονίδια εμπλεκόμενα στην παθογένεια του καρκίνου του θυρεοειδούς αδένου.

Θηλώδες καρκίνωμα: RET, TRK, p53, PTEN, MET, ras, p16, mtDNA, c-erbB-2

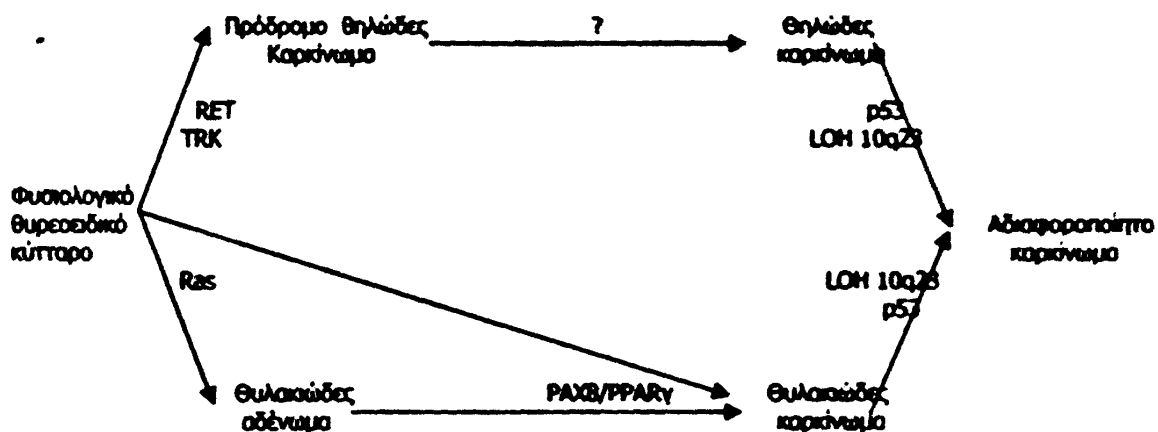
Θυλακιώδες καρκίνωμα: p53, ras, PPAR γ , PTEN

Αδιαφοροποιητο καρκίνωμα: p53, β -Catherin, PTEN

Μυελοειδές καρκίνωμα: RET, c-erbB-2



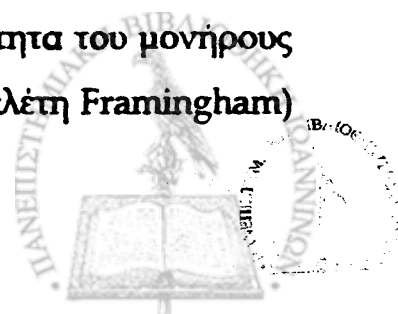
Το ογκο-κατασταλτικό γονίδιο PTEN (Cowden gene) απενεργοποιείται σε ποσοστό 5-10% στο θυλακιώδες καρκίνωμα (Halachmi et al., 1998). Μεταλλάξεις που οδηγούν σε απενεργοποίηση του ογκο-κατασταλτικού γονιδίου p53 ανευρίσκονται συχνά (70-80%) στα αδιαφοροποίητα καρκινώματα και σπανιότερα (0-12%) στα καλά διαφοροποιημένα νεοπλάσματα του αδένου (Ito et al., 1992, Fagin et al., 1993, Simon et al., 1994, Farid et al., 1995). Σημειακές μεταλλάξεις του ογκογονιδίου Ras ανιχνεύονται σε υψηλό ποσοστό (7-92%) σε καλοήγη (αδενώματα) και κακοήγη (θηλώδη, θυλακιώδη) νεοπλάσματα του θυρεοειδούς αδένου (Karga et al., 1991, Farid et al., 1995). Τα πρωτο-ογκογονίδια της κινάσης της τυροσίνης (RET, TRK, MET) εμπλέκονται στην παθογένεια του θηλώδους και του μυελοειδούς καρκινώματος (Farid et al., 1995). Ένα προτεινόμενο μοντέλο της ογκογένεσης στον θυρεοειδή απεικονίζεται στο ΣΧΗΜΑ 6.



ΣΧΗΜΑ 6. Διαγραμματική απεικόνιση της ογκογένεσης των καρκινωμάτων του θυρεοειδούς αδένου.

1. 15. Διαγνωστική προσέγγιση των θυρεοειδικών όζων.

Η παρουσία ψηλαφητού μορφώματος στον θυρεοειδή αδένου που εμφανίζει διαφορετική σύσταση από το υπόλοιπο παρέγχυμα αποτελεί την συχνότερη αιτία προσέλευσης του ενδοκρινολογικού ασθενούς στο ιατρείο. Η συχνότητα του μονήρους όζου του θυρεοειδούς ανέρχεται στο 4% του γενικού πληθυσμού (μελέτη Framingham)



με υπεροχή των γυναικών ενώ σε νεκροτομικό υλικό το ποσοστό είναι κατά πολύ υψηλότερο και φτάνει μέχρι και 12% (Χαρσούλης, 1998, Μπατρίνος, 1999).

Οι θυρεοειδικοί όζοι μπορεί να είναι μονήρεις ή πολλαπλοί, συμπαγείς ή κυστικοί και ανάλογα με την εικόνα που δίνουν στο σπινθηρογράφημα ψυχροί ή θερμοί. Η μονήρης διόγκωση του θυρεοειδούς αδένος μπορεί να οφείλεται σε ποικιλία παθολογικών καταστάσεων και η διαφορική διάγνωση επικεντρώνεται στην διάκριση μεταξύ καλοήθων και κακοήθων όζων (ΠΙΝΑΚΑΣ 4).

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς εμφανίζεται με την μορφή μονήρους όζου σε ποσοστό 95%, γεγονός που προσδίδει ιδιαίτερη βαρύτητα στην σωστή διάγνωση και θεραπευτική αντιμετώπιση της κατάστασης. Όπως φαίνεται στον πίνακα, το 90% περίπου των περιπτώσεων μονήρους όζου του αδένος οφείλεται σε καλοήθεις βλάβες του αδένος (Χαρσούλης, 1998, Μπατρίνος, 1999).

ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Αιτιολογική ταξινόμηση των μονήρων όζων του θυρεοειδούς αδένος.

A. Συμπαγής

Καρκίνωμα (10%)

Αδένωμα (30%)

Οζώδης βρογχοκήλη (40%)

B. Κυστικός

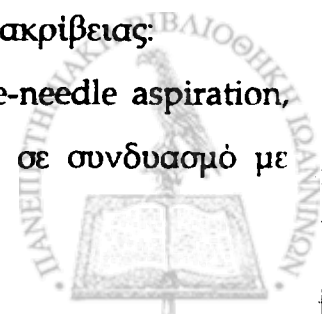
Καρκίνωμα (1-2%)

Εκφύλιση αδενώματος, οζώδης βρογχοκήλης (18%)

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς εμφανίζεται με την μορφή μονήρους όζου σε ποσοστό 95%, γεγονός που προσδίδει ιδιαίτερη βαρύτητα στην σωστή διάγνωση και θεραπευτική αντιμετώπιση της κατάστασης. Όπως φαίνεται στον πίνακα, το 90% περίπου των περιπτώσεων μονήρους όζου του αδένος οφείλεται σε καλοήθεις βλάβες του αδένος (Χαρσούλης, 1998, Μπατρίνος, 1999).

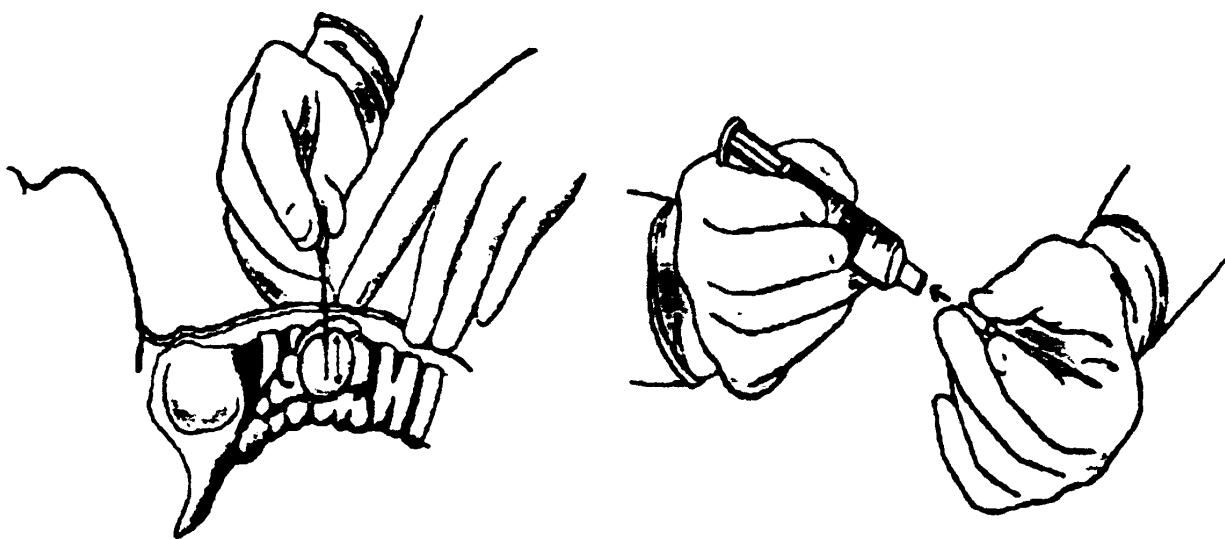
Η διαγνωστική προσέγγιση του ασθενούς με όζο του θυρεοειδούς περιλαμβάνει τις ακόλουθες εξετάσεις, οι οποίες παρατίθενται με σειρά διαγνωστικής ακρίβειας:

α. Παρακέντηση του θυρεοειδούς αδένος με λεπτή βελόνη (fine-needle aspiration, FNA). Η παρακέντηση του θυρεοειδούς αδένος με λεπτή βελόνη σε συνδυασμό με

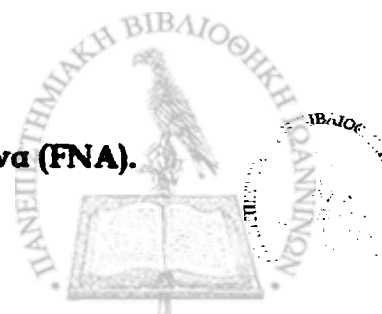


κυτταρολογική εξέταση του δείγματος αποτελεί μια αξιόπιστη προεγχειρητική μέθοδο διάγνωσης των θυρεοειδικών όζων (Gharib, 1994). Ο ασθενής τοποθετείται στην εξεταστική κλίνη σε ύπτια θέση με τον αυχένα σε πλήρη έκταση για να αποκαλυφθεί ο θυρεοειδής αδένας. Η παρακέντηση εκτελείται με βελόνη 22-gauge η οποία προσαρμόζεται σε πλαστική σύριγγα μιας χρήσεως με ή χωρίς τοπική αναισθησία (1% lidocaine) σε άσηπτες συνθήκες. Η βελόνη εισέρχεται εντός του όζου και δημιουργείται αρνητική πίεση ώστε το κυτταρικό υλικό να αναρροφηθεί εντός της σύριγγας. Ο ψηλαφητός όζος παρακεντείται 2-4 φορές σε διαφορετικές περιοχές ώστε να εξασφαλιστεί επαρκής και αντιπροσωπευτική ποσότητα δείγματος για την κυτταρολογική εξέταση (Werga et al., 2000) (ΕΙΚΟΝΑ 3).

Η ειδικότητα, η ευαισθησία και η διαγνωστική ακρίβεια της μεθόδου κυμαίνονται από 70-90%, 83-99% και αντίστοιχα (Ridgway, 1996). Ωστόσο σε ένα μεγάλο ποσοστό (10-25%) η κυτταρολογική εξέταση είναι μη-διαγνωστική, είτε λόγω ανεπαρκούς ποσότητας δείγματος είτε λόγω αδιευκρίνιστου ιστολογικού τύπου, συνήθως όταν πρόκειται για θυλακιώδες νεόπλασμα (αδένωμα, καρκίνωμα) (Baloch et al., 1998, Bakhos et al., 2000, Chow et al., 2001). Σε ορισμένες από αυτές τις περιπτώσεις η μοριακή ανάλυση των δειγμάτων μπορεί να οδηγήσει σε ακριβή διάγνωση (Winzer et al., 1998, Russo et al., 1999, Takano et al., 1999, 2000, Chiappetta et al., 2000).



Εικόνα 2. Τεχνική της παρακέντησης του θυρεοειδούς αδένος (FNA).



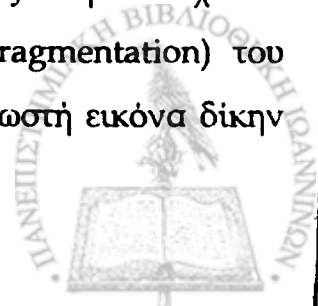
β. Η δεύτερη σε αξία διαγνωστική μέθοδος είναι το υπερηχογράφημα με το οποίο λαμβάνουμε πληροφορίες σχετικά με τις διαστάσεις και την σύσταση του όζου (συμπαγής, κυστικός). Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δεν μπορεί να διαχωρίσει με ακρίβεια την καλοήγη ή κακοήγη φύση του όζου (Χαρσούλης, 1998, Μπατρίνος, 1999).

γ. Το σπινθηρογράφημα έχει πλέον μικρή διαγνωστική αξία στην διερεύνηση της φύσης του μονήρους όζου του θυρεοειδούς. Ανάλογα με το ποσό του ραδιοϊσοτόπου που προσλαμβάνεται καθορίζεται και η λειτουργικότητα του όζου (θερμός, ψυχρός). Αυτό έχει ιδιαίτερη αξία στην περίπτωση του αυτόνομου αδενώματος (θερμός όζος) που αναστέλλει την λειτουργία του φυσιολογικού παρεγχύματος (Χαρσούλης, 1998, Μπατρίνος, 1999).

1. 16. Ο ρόλος της απόπτωσης στην απλή οζώδη βρογχοκήλη και στα νεοπλάσματα του θυρεοειδούς αδένα.

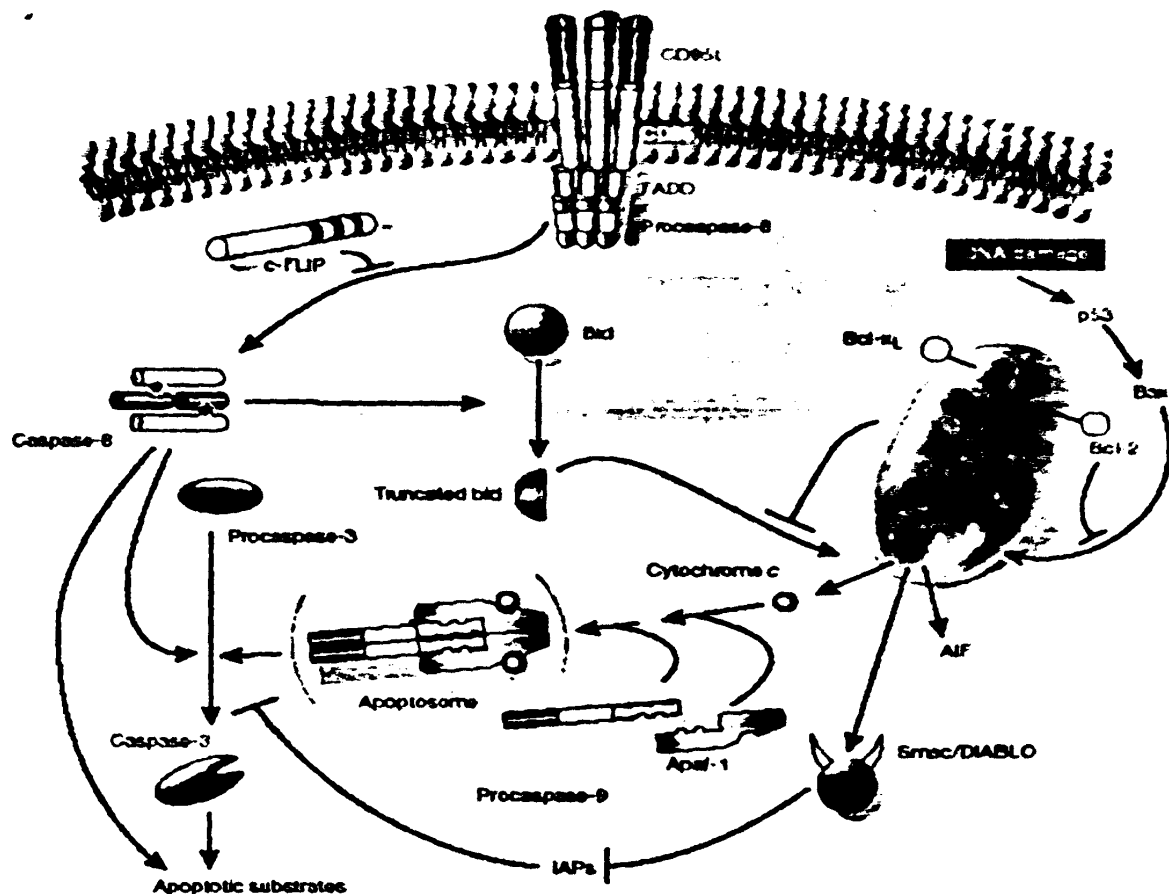
Η απόπτωση (apoptosis) ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (programmed cell death) είναι μια διαδικασία σημαντική για την ανάπτυξη και την διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού (Meier et al., 2000). Η αυτοκτονία του κυττάρου ως απάντηση σε ενδογενή ή εξωγενή ερεθίσματα είναι μια ελεγχόμενη και προγραμματισμένη διαδικασία, η οποία απαιτεί κατανάλωση ενέργειας για την σύνθεση RNA και πρωτεϊνών (κασπάσες) (Thompson, 1995). Η νέκρωση αντίθετα είναι παθολογικός κυτταρικός θάνατος που οφείλεται σε γενικευμένη έκπτωση των κυτταρικών ρυθμιστικών μηχανισμών λόγω επίδρασης σοβαρού κυτταρικού τραύματος (Ameisen, 1996).

Μορφολογικά τα κύτταρα που αποπίπτουν εμφανίζουν αρχικά απώλεια του κυτταρικού όγκου, πτύχωση των μεμβρανών, συμπύκνωση και περιφερική διάταξη της χρωματίνης προς την πυρηνική μεμβράνη. Τα μιτοχόνδρια και τα ριβοσωμάτια διατηρούν την βασική τους δομή και ένα μέρος της λειτουργίας τους. Στην συνέχεια ο κυτταροσκελετός καταστρέφεται και ακολουθεί η αποδόμηση (fragmentation) του γονιδιωματικού DNA σε μικρά κλάσματα τα οποία δίνουν την γνωστή εικόνα δικην

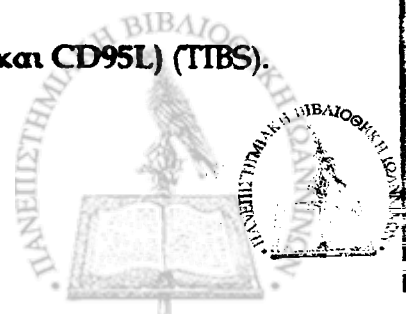


επιχρίσματος (smear) κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Kerr et al., 1972, 1995). Η *in situ* ανίχνευση της απόπτωσης με την μέθοδο TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxy uridine triphosphate nick end labeling) βασίζεται στην ενωμάτωση σημασμένων νουκλεοτιδίων στο 3'-OH άκρο των κλασμάτων του DNA παρουσία του ενζύμου TdT.

Διακρίνουμε δύο κύριους παθογενετικούς μηχανισμούς που οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση: α. την ενεργοποίηση της ογκο-κατασταλτικής πρωτεΐνης p53 που ρυθμίζει την έκφραση των αποιπωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bax και κατ' επέκταση την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και β. την ενεργοποίηση του συστήματος Fas/Fas ligand. Το τελικό αποτέλεσμα των μηχανισμών αυτών είναι η ενεργοποίηση ειδικών πρωτεολυτικών ενζύμων (κασπάσες) που καταστρέφουν το κύτταρο (ΕΙΚΟΝΑ 3).



ΕΙΚΟΝΑ 3. Παθογενετικοί μηχανισμοί της απόπτωσης (p53, Bcl-2/Bax και CD95L) (TIBS).



Το ογκο-κατασταλτικό (tumor suppressor) γονίδιο p53 κωδικοποιεί μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη με δράση μεταγραφικού παράγοντα, η οποία εμπλέκεται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου σε περίπτωση βλάβης του DNA, αναστέλλοντας την μετάβαση από την φάση G1 στην φάση S. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω επαγωγής της πρωτεΐνης p21 η οποία είναι ισχυρός αναστολέας των κινασών των κυκλινών (CDKs) με τελικό αποτέλεσμα να διατηρείται υποφωσφορυλιωμένη η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (retinoblastoma protein, Rb). Αντίθετα, η φωσφορυλίωση του Rb μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα E2F-1 οδηγεί στην μετάβαση από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου (Israels and Israels, 1999). Σε περίπτωση μη-επιδιορθώσιμης βλάβης του DNA, το γονίδιο p53 οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση μέσω του παθογενετικού μηχανισμού των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bax (Selvankumaran et al., 1994, Reed, 1998, Basu and Halder, 1998). Ο αποπτωτικός δρόμος μέσω της πρωτεΐνης p53 εμπλέκει και άλλους μεταγραφικούς παράγοντες με σημαντικότερο τον E2F-1. Η έκφραση του E2F-1 επάγει την απόπτωση είτε μέσω ενεργοποίησης του γονιδίου p53 (Kowalic et al., 1995, 1998) είτε μέσω καταστολής αντι-αποπτωτικών παραγόντων, όπως ο NF-κB (Tanaka et al., 2002).

Το γονίδιο bcl-2 ανήκει σε μια ευρύτερη οικογένεια γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με ανταγωνιστική δράση στην ρύθμιση της απόπτωσης (Adams and Cory, 2001, Strasser et al., 2000). Διακρίνονται σε αυτές που αναστέλλουν την αποπτωτική διαδικασία (αντι-αποπτωτικές: Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A-I) και σε εκείνες που την επάγουν (προ-αποπτωτικές: Bax, Bak, Bad, Bid, Bcl-xs) (Reed, 1997, Huang and Strasser, 2000, Antonsson et al., 2001). Οι πρωτεΐνες Bcl-2 και Bax σχηματίζουν ομοδιμερή και ετεροδιμερή στην μιτοχονδριακή μεμβράνη (Bcl-2/Bax, Bcl-2/Bcl-2 και Bax/Bax) και η σχετική αναλογία λειτουργεί σαν ένα είδος ενδοκυττάριου ρεοστάτη που ελέγχει την απόπτωση (Oltvai et al., 1993, Schendel et al., 1998). Η πρωτεΐνη Bcl-2 βρίσκεται κυρίως στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων συνδεδεμένη με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Araf-1 (apoptotic protease activating factor-1) και ρυθμίζει την διαπερατότητα της μεμβράνης για διάφορα ιόντα και για το κυτόχρωμα c (Gross et al., 1999). Όταν το κύτταρο υποστεί εσωτερική βλάβη διαταράσσεται η διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης και απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα ο παράγοντας που επάγει την απόπτωση (AIF, apoptosis-inducing

factor) και το κυτόχρωμα c. Ο παράγοντας AIF μετακινείται στον πυρήνα και ενεργοποιεί τις διαδικασίες για την αποδόμηση του DNA, ενώ το σύμπλοκο κυτόχρωμα c και Araf-1 (αποπτοσωμάτιο) ενεργοποιεί την πρωτεάση-caspase 9, που οδηγεί μέσω ενεργοποίησης και των άλλων πρωτεασών στην καταστροφή του κυττάρου (Hengartner, 2000). Η πρωτεΐνη Bcl-2 καταστέλλει την διαδικασία της απόπτωσης αναστέλλοντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια (Kluck et al., 1997, Gross et al., 1999), αντίθετα με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Bax η οποία προάγει την ενεργοποίηση των κασπασών μέσω απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c και οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση (Goldstein et al., 2000, Antonsson et al., 2001, Degenhardt et al., 2002).

Ένας από τους σημαντικότερους παθογενετικούς μηχανισμούς της απόπτωσης είναι αυτός του συστήματος Fas/Fas ligand. Ο υποδοχέας Fas (APO-1, CD-95L) που ανήκει στην οικογένεια του TNFR (tumor necrosis factor receptors) συνδέεται με το διαλυτό μόριο Fas ligand και οδηγεί αρχικά στην ενεργοποίηση της πρωτεάσης-caspase 8 και στην συνέχεια μέσω ενός καταρράκτη αντιδράσεων στην ενεργοποίηση και των άλλων πρωτεασών, με τελικό αποτέλεσμα την λύση του κυττάρου (Nagata, 1999, Pinkoski and Green, 1999, Reed et al., 2000).

Η βρογχοκήλη συνίσταται σε υπερπλασία και υπερτροφία των θυρεοειδικών κυττάρων σε συνδυασμό με αυξημένη αγγειογένεση. Ο ρόλος της απόπτωσης στην βρογχοκήλη αφορά κυρίως το στάδιο της αναδιαμόρφωσης (remodeling) του αδένου, μετά την άρση της βρογχοκηλογόνου αιτίας. Ο αυξημένος κυτταρικός θάνατος που παρατηρείται στην φάση αυτή, οδηγεί σε μείωση της μάζας του αδένου και επαναφορά στα φυσιολογικά επίπεδα.

Στα αρχικά στάδια της υποτροφίας της μάζας του αδένου αναπτύσσεται μια ισορροπία των φαινομένων του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης στα θυρεοειδικά κύτταρα. Στο τέλος της 1^{ης} εβδομάδας αναπτύσσεται έντονη αποπτωτική δραστηριότητα που οδηγεί σε επαναφορά της μάζας του αδένου στα φυσιολογικά επίπεδα (Riesco et al., 1998). Οι Tamura et al. (2000) μελέτησαν το ρόλο της απόπτωσης και την πιθανή συμμετοχή του Fas/Fas ligand συστήματος κατά την διάρκεια της αποκατάστασης της μάζας του αδένου σε επίμυες με βρογχοκήλη. Η διαδικασία της απόπτωσης μελετήθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία και με την μέθοδο TUNEL και η

έκφραση του Fas/Fas ligand συστήματος με ανοσοιστοχημεία. Διαπιστώθηκε υπερέκφραση του υποδοχέα Fas στα θυρεοειδικά κύτταρα κατά την διαδικασία της απόπτωσης. Οι Patel et al. (1998) προκάλεσαν βρογχοκήλη σε επίμυες με ειδική βρογχοκηλογόνο διαίτα. Κατά την διάρκεια της αύξησης της μάζας του αδένα τα επίπεδα της Bcl-2 ήταν σημαντικά υψηλά. Μετά την διακοπή της διαίτας και κατά την φάση της αναδιαμόρφωσης του αδένα διαπίστωσαν έντονη αποπτωτική δραστηριότητα με χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης.

Ο αποπτωτικός δείκτης όπως καθορίστηκε σε *in situ* μελέτες ανίχνευσης της απόπτωσης με την μέθοδο TUNEL, είναι ιδιαίτερα χαμηλός στον φυσιολογικό ιστό, στην οζώδη βρογχοκήλη, στα θυλακιώδη αδενώματα και στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα ενώ αυξάνεται σημαντικά στα αδιαφοροποίητα καρκινώματα (Basolo et al., 1997, Yoshida et al., 1999, Sreelenkha et al., 2000).

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη Bcl-2 εκφράζεται σε υψηλά ποσοστά στον φυσιολογικό θυρεοειδή και στα καλοήγη νεοπλάσματα του αδένα (οζώδη βρογχοκήλη, θυλακιώδες αδένωμα). Αντίθετα η έκφραση και η αντι-αποπτωτική δράση της πρωτεΐνης μειώνονται σημαντικά στα αδιαφοροποίητα καρκινώματα (Pollina et al., 1996, Puglisi et al., 2000, Sreelenkha et al., 2000). Ο υψηλός δείκτης απόπτωσης που παρατηρείται στα αδιαφοροποίητα καρκινώματα σχετίζεται με υψηλά επίπεδα έκφρασης της αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax (Manetto et al., 1997). Ανοσοϊστοχημικά το γονίδιο p53 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα κυρίως στα αδιαφοροποίητα καρκινώματα (Pollina et al., 1996, Puglisi et al., 2000) και συνήθως ανιχνεύεται η ανενεργός μεταλλαγμένη πρωτεΐνη η οποία εμφανίζει μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής σε σχέση με την φυσιολογική (Levine et al., 1991, Battifora et al., 1994).

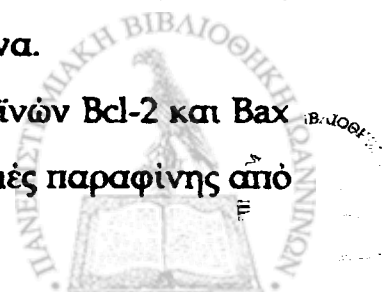
1. 16. Σκοπός της εργασίας.

Η προθυμοσίνη α είναι μια μικρή, όξινη, πυρηνική πρωτεΐνη με χαρακτηριστικές μεταγραφικού παράγοντα και ογκο-πρωτεΐνης που συμμετέχει ενεργά τόσο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όσο και στην απόπτωση. Η παραθυμοσίνη είναι μια πρωτεΐνη με σημαντικές ομοιότητες με την προθυμοσίνη α και πιθανό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στην εργασία αυτή μελετήθηκε για πρώτη φορά η



έκφραση της προθυμοσίνης α και της παραθυμοσίνης σε επίπεδο mRNA στον θυρεοειδή αδένα του ανθρώπου σε περιπτώσεις φυσιολογικού ιστού και απλής οζώδους βρογχοκήλης. Η έκφραση της προθυμοσίνης α μελετήθηκε επιπλέον σε πρωτεϊνικό επίπεδο σε καλοήγη και κακοήγη νεοπλασμάτα του αδένα. Επιπρόσθετα διερευνήθηκε ο ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων προθυμοσίνη α, E2F-1 και p53 και των αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bax στην ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης των θυλακιωδών κυττάρων του θυρεοειδούς. Αναλυτικά η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε τα ακόλουθα βήματα:

- Ανίχνευση του λειτουργικού γονιδίου της προθυμοσίνης α σε κύτταρα περιφερικού αίματος και σε θυλακιώδη κύτταρα από ασθενείς με απλή οζώδη βρογχοκήλη, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε διαγνωστική παρακέντηση με λεπτή βελόνη (FNA).
- Μελέτη της έκφρασης της προθυμοσίνης α, της παραθυμοσίνης και της φωσφοπρωτεΐνης p53 σε επίπεδο mRNA με ημι-ποσοτική αντίστροφη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (semi-quantitative RT-PCR) σε δείγματα FNA ασθενών με απλή οζώδη βρογχοκήλη.
- Μελέτη της έκφρασης της προθυμοσίνης α σε επίπεδο mRNA με ημι-ποσοτική RT-PCR σε ιστικά παρασκευάσματα παραφίνης από ασθενείς με κακοήγη νεοπλασμάτα του αδένα.
- Μελέτη της έκφρασης της προθυμοσίνης α σε πρωτεϊνικό επίπεδο με την ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοροφητική μέθοδο (competitive inhibition ELISA) σε ασθενείς με απλή οζώδη βρογχοκήλη, θυλακιώδες αδένωμα και καρκίνο του θυρεοειδούς αδένα, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε μερική ή ολική θυρεοειδεκτομή.
- Μελέτη των πολυμορφισμών του γονιδίου της προθυμοσίνης α με την τεχνική της διαμόρφωσης μονής αλυσίδας του DNA (single strand conformation polymorphism, SSCP).
- Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης των γονιδίων E2F-1, Ki-67 και p53 που συμμετέχουν στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και πιθανή συσχέτισή τους με την προθυμοσίνη α σε ιστολογικές τομές παραφίνης από ασθενείς με απλή οζώδη βρογχοκήλη, θυλακιώδες αδένωμα και καρκίνο του θυρεοειδούς αδένα.
- Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης των αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bax και πιθανή συσχέτισή τους με την προθυμοσίνη α σε ιστολογικές τομές παραφίνης από



ασθενείς με απλή οζώδη βρογχοκίλη, θυλακιώδες αδένωμα και καρκίνο του θυροειδούς αδένου.

- In situ μελέτη της απόπτωσης σε καλοήγη και κακοήγη νεοπλασμάτα του θυροειδούς αδένου με την μέθοδο TUNEL.



2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Ασθενείς.

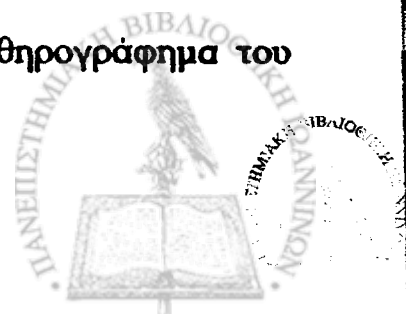
Στην παρούσα μελέτη έλαβαν μέρος 69 ασθενείς με καλοήθειες (απλή οξώδη βρογχοκήλη, θυλακιώδες αδένωμα) και κακοήθειες παθήσεις (θυλακιώδες και θηλώδες καρκίνωμα) του θυρεοειδούς αδένου, οι οποίοι διαχωρίστηκαν σε τρεις ομάδες ανάλογα με την φύση του θυρεοειδικού ιστού (κύτταρα, φρέσκος ιστός, ιστολογικά παρασκευάσματα παραφίνης) που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία.

Οι μετέχοντες ήταν άτομα και των δύο φύλων, ανεξαρτήτου ηλικίας και είχαν ελεύθερο ατομικό ιστορικό για άλλες παθήσεις πλην των συγκεκριμένων νόσων.

Η πρώτη ομάδα περιελάμβανε ασθενείς με απλή οξώδη βρογχοκήλη ($n = 18$) (2 άνδρες, 16 γυναίκες, ηλικία 24-78 χρόνια), οι οποίοι υποβλήθηκαν σε παρακέντηση του θυρεοειδούς αδένου με λεπτή βελόνη (fine-needle aspiration, FNA) για διαγνωστικούς σκοπούς. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών περιγράφονται στον ΠΙΝΑΚΑ 5.

Σε όλους τους ασθενείς ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο, κατά την πρώτη επίσκεψη στο τακτικό ενδοκρινολογικό ιατρείο του Π. Π. Γ. Ν. Ιωαννίνων:

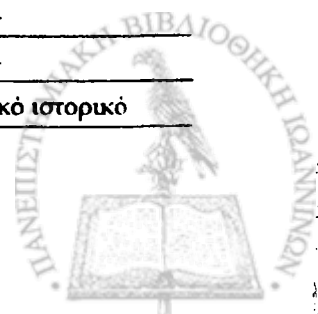
- Έγινε λήψη ατομικού και κληρονομικού ιστορικού.
- Έγινε λήψη περιφερικού αίματος με το οποίο ελέγχθησαν οι εξής παράμετροι: γενική αίματος, ΤΚΕ (ταχύτητα καθιζήσεως ερυθρών αιμοσφαιρίων), CRP (C-αντιδρώσα πρωτεΐνη), τριωδοθυρονίνη (T_3), θυροξίνη (T_4), θυρεοειδοτρόπος ορμόνη (TSH), αντιθυρεοσφαιρινικά αντισώματα (anti-TSH) και αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (anti-TPO). Οι εξετάσεις πραγματοποιήθηκαν στο Βιοχημικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Από κάθε ασθενή ελήφθησαν επιπλέον 10 ml αίματος για να χρησιμοποιηθούν στην πειραματική διαδικασία απομόνωσης γενωμικού DNA και ολικού RNA καθώς και στην ανοσοπροσοφητική μέτρηση (ELISA) της προθυμοσίνης α στον ορό. Δείγματα αίματος ($n = 20$) συλλέχθησαν επίσης από υγιή άτομα για να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες στην ELISA.
- Όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε υπερηχογράφημα και σπινθηρογράφημα του θυρεοειδούς αδένου.



• Η επιβεβαίωση της διάγνωσης έγινε με παρακέντηση του θυρεοειδούς αδένος σε συνδυασμό με κυτταρολογική εξέταση του δείγματος. Η διαδικασία της FNA, όπως εκτελείται στο τακτικό Ενδοκρινολογικό Ιατρείο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων από τον Καθηγητή κ. Α. Τσατσούλη είναι η ακόλουθη: Ο ασθενής τοποθετείται στην εξεταστική κλίνη σε ύπτια θέση με τον αυχένα σε πλήρη έκταση ώστε να αποκαλυφθεί ο θυρεοειδής και να εντοπιστεί η θέση του οζιδίου. Η παρακέντηση εκτελείται με ή χωρίς τοπική αναισθησία (1% lidocaine) υπό άσηπτες συνθήκες με βελόνη 22-gauge η οποία είναι προσαρμοσμένη σε σύριγγα 10 ml μιας χρήσεως ή σε πιστόλι βιοψίας (Cameco Ltd, London, UK). Ο ψηλαφητός όζος παρακεντείται 2-4 φορές ώστε να εξασφαλιστεί επαρκής ποσότητα δείγματος (θυλακιώδη κύτταρα) για την κυτταρολογική εξέταση. Μέρος του υλικού της παρακέντησης τοποθετήθηκε άμεσα σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκε στους -80°C για να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση γενωμικού DNA και ολικού RNA από τα θυλακιώδη κύτταρα του αδένος.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με απλή οζώδη βρογχοκήλη που υποβλήθηκαν σε παρακέντηση με λεπτή βελόνη (FNA). Όπου Α: άνδρας, Γ: γυναίκα.

	Ηλικία	Φύλο	T ₃	FT ₄	TSH	Σχόλια
1	67	Γ	1.00	1.24	0.48	-
2	40	Γ	1.30	-	0.80	-
3	30	Γ	1.10	1.45	0.40	-
4	59	Γ	1.67	1.90	0.9	-
5	55	Γ	-	-	0.74	-
6	78	Γ	1.62	1.38	1.06	-
7	41	Γ	1.24	1.46	0.71	-
8	24	Γ	0.87	0.90	1.70	-
9	38	Γ	-	-	1.02	-
10	27	Α	1.8	0.45	1.12	-
11	26	Γ	1.9	1.28	0.40	Οικογενειακό ιστορικό
12	27	Γ	-	-	0.87	Οικογενειακό ιστορικό
13	40	Γ	1.22	0.90	0.90	Οικογενειακό ιστορικό
14	41	Γ	1.88	1.29	0.05	-
15	57	Γ	1.10	0.56	0.51	-
16	40	Γ	1.04	0.90	0.80	-
17	38	Α	1.17	0.70	0.60	-
18	30	Γ	1.07	1.00	0.41	Οικογενειακό ιστορικό



Από την ανωτέρω ομάδα αποκλείστηκαν ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto (θετικοί για anti-TPO αντισώματα) και νόσο του Graves (θετικοί για anti-TSH αντισώματα) καθώς και αυτοί με κακοήγη νεοπλασμάτα του αδένου. Τέσσερα χειρουργικά παρασκευάσματα ($n = 4$) φυσιολογικού θυρεοειδικού ιστού παρακεντήθηκαν και αποτέλεσαν τους μάρτυρες για αυτή την κατηγορία των ασθενών.

Η δεύτερη ομάδα περιελάμβανε 20 ασθενείς (7 άνδρες, 13 γυναίκες, ηλικία 35-75 χρόνια) οι οποίοι υποβλήθηκαν σε μερική ή ολική θυρεοειδεκτομή στην Χειρουργική Κλινική του Γενικού Νομαρχιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων «Χατζηκώστα» από τους κ. Τσιμογιάννη και Νίκα. Τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών περιγράφονται στον ΠΙΝΑΚΑ 6.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών που υποβλήθηκαν σε μερική ή ολική θυρεοειδεκτομή. Όπου Α: άνδρας και Γ: γυναίκα.

	Ηλικία	Φύλο	Ιστολογική διάγνωση
1	60	Γ	Οξώδης βρογχοκήλη
2	75	Γ	Οξώδης βρογχοκήλη
3	62	Γ	Οξώδης βρογχοκήλη
4	38	Γ	Οξώδης βρογχοκήλη
5	71	Γ	Οξώδης βρογχοκήλη
6	35	Α	Οξώδης βρογχοκήλη
7	46	Α	Οξώδης βρογχοκήλη
8	50	Γ	Οξώδης βρογχοκήλη
9	47	Α	Οξώδης βρογχοκήλη
10	38	Γ	Θυλακιώδες αδένωμα
11	39	Α	Θυλακιώδες αδένωμα
12	43	Α	Θυλακιώδες αδένωμα
13	64	Γ	Θυλακιώδες αδένωμα
14	62	Γ	Θυλακιώδες αδένωμα
15	70	Γ	Θυλακιώδες αδένωμα
16	47	Γ	Θηλώδες καρκίνωμα
17	39	Α	Θηλώδες καρκίνωμα
18	50	Γ	Θηλώδες καρκίνωμα
19	40	Γ	Θυλακιώδες καρκίνωμα
20	38	Α	Θυλακιώδες καρκίνωμα

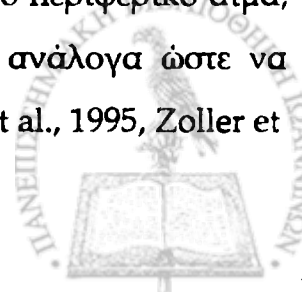
Σε όλους τους ασθενείς ακολουθήθηκε το πρωτόκολο που αναφέρθηκε στην πρώτη ομάδα ασθενών. Σύμφωνα με την ιστοπαθολογική έκθεση οι ασθενείς διαχωρίστηκαν σε αυτούς με απλή οζώδη βρογχοκήλη ($n = 9$), θυλακιώδες αδένωμα ($n = 6$), θηλώδες καρκίνωμα ($n = 3$) και θυλακιώδες καρκίνωμα ($n = 2$). Τμήμα του εξαιρεθέντος ιστού αποστέλλει για ιστολογική και κυτταρολογική εξέταση και το υπόλοιπο τοποθετήθηκε σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκε στους -80°C έως ότου χρησιμοποιηθεί στην συναγωνιστική ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφορική μέτρηση (ELISA) των επιπέδων της προθυμοσίνης α.

Η τρίτη ομάδα περιελάμβανε 31 ασθενείς (9 άνδρες, 22 γυναίκες, ηλικία 16-78 χρόνια), οι οποίοι υποβλήθηκαν σε μερική ή ολική θυρεοειδεκτομή στην Χειρουργική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Μετά από έλεγχο των αρχείων του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομίας και σε συνεργασία με την Καθηγήτρια κ. Β. Μαλάμου-Μήτση, αναζητήθηκαν και βρέθηκαν τα ιστολογικά παρασκευάσματα των παραπάνω ασθενών από τα οποία ελήφθησαν τομές παραφίνης. Σύμφωνα με την ιστοπαθολογική έκθεση οι ασθενείς διαχωρίστηκαν σε αυτούς με απλή οζώδη βρογχοκήλη ($n = 10$), θυλακιώδες αδένωμα ($n = 10$) και καλά διαφοροποιημένο καρκίνωμα του θυρεοειδούς ($n = 11$). Οι ασθενείς με καλά διαφοροποιημένο καρκίνωμα του θυρεοειδούς διαχωρίστηκαν σε αυτούς με θηλώδες καρκίνωμα ($n = 7$) και σε αυτούς με θυλακιώδες καρκίνωμα ($n = 4$). Τα χαρακτηριστικά αυτής της ομάδας των ασθενών παρατίθενται στον ΠΙΝΑΚΑ 7. Ο περίξ φυσιολογικός ιστός σε πέντε ($n = 5$) περιπτώσεις απλής οζώδους βρογχοκήλης χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για την σύγκριση των αποτελεσμάτων. Οι ιστολογικές τομές παραφίνης επιστρώθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και αποτέλεσαν το υλικό για την ανοσοϊστοχημική μελέτη και την μέθοδο TUNEL. Επιπλέον 3-5 τομές από κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση ολικού RNA.

2.2.1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από περιφερικό αίμα.

Μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι απομόνωσης DNA από περιφερικό αίμα, με βάση τα αντίστοιχα πρωτόκολλα, τα οποία τροποποιήθηκαν ανάλογα ώστε να μπορούν να συγκριθούν μεταξύ τους (Miller et al., 1998, Siafacas et al., 1995, Zoller et



ΠΙΝΑΚΑΣ 7. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών από τους οποίους ελήφθησαν ιστολογικές τομές παραφίνης του θυρεοειδούς αδένα. Όπου Α: άνδρας και Γ: γυναίκα.

	Ηλικία	Φύλο	Ιστολογική διαγνώση
1	63	Γ	Οξείης βρογχοκίλη
2	56	Α	Οξείης βρογχοκίλη
3	35	Γ	Οξείης βρογχοκίλη με μικρή λεμφοκυτταρική διήθηση
4	61	Γ	Οξείης βρογχοκίλη
5	51	Γ	Οξείης βρογχοκίλη με αλλοιώσεις χρόνιας μη ειδικής θυρεοειδίτιδας
6	34	Γ	Οξείης βρογχοκίλη
7	46	Α	Οξείης βρογχοκίλη
8	55	Γ	Οξείης βρογχοκίλη με κυστική εκφόλιση
9	54	Γ	Οξείης βρογχοκίλη
10	37	Γ	Οξείης βρογχοκίλη με αλλοιώσεις χρόνιας μη ειδικής θυρεοειδίτιδας
11	46	Α	Οξείης βρογχοκίλη
12	42	Α	Θυλακίωδες αδένωμα
13	27	Γ	Θυλακίωδες αδένωμα
14	32	Γ	Θυλακίωδες αδένωμα
15	30	Γ	Θυλακίωδες αδένωμα
16	16	Γ	Θυλακίωδες αδένωμα
17	38	Γ	Θυλακίωδες αδένωμα
18	32	Γ	Θυλακίωδες αδένωμα
19	31	Γ	Θυλακίωδες αδένωμα
20	19	Γ	Θυλακίωδες αδένωμα
21	33	Γ	Θηλώδες καρκίνωμα με κυστική εκφόλιση
22	31	Γ	Θηλώδες καρκίνωμα
23	27	Γ	Θηλώδες καρκίνωμα
24	40	Γ	Θηλώδες καρκίνωμα με κυστική εκφόλιση
25	37	Α	Θηλώδες καρκίνωμα
26	55	Α	Ενκαλωμένο θηλώδες καρκίνωμα με ογκοκυτταρικούς χαρακτήρες
27	72	Γ	Θηλώδες καρκίνωμα
28	78	Γ	Θυλακίωδες καρκίνωμα
29	54	Α	Θυλακίωδες καρκίνωμα με διήθηση της κάψας
30	52	Α	Θυλακίωδες καρκίνωμα
31	72	Α	Θυλακίωδες καρκίνωμα με χαρακτήρες Hurthle cell



al., 1994). Η ποσότητα του εξαγόμενου DNA υπολογίστηκε φωτομετρικά με μέτρηση στα 260 nm και με βάση τον τύπο: οπτική πυκνότητα (O.D.)=1 αντιστοιχεί σε 50 µg/ml διπλοελικωμένου DNA, ενώ η καθαρότητα προσδιορίστηκε από τον λόγο $O.D._{260nm}/O.D._{280nm}$ και τιμές 1.8-2 θεωρήθηκαν ότι αντιστοιχούν σε υψηλής καθαρότητας δείγμα.

Η επιλογή της μεθόδου Miller et al. έγινε με βάση τα εξής κριτήρια: α. το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης, β. την συγκέντρωση και γ. την καθαρότητα του εξαγόμενου DNA.

Παρακάτω παρατίθενται τα πρωτόκολλα των μεθοδολογιών που μελετήθηκαν:

α. Το πρωτόκολλο της μεθόδου Miller et al. έχει ως εξής:

- Σε 10 ml περιφερικού αίματος (4°C) προστίθενται 15 ml διαλύματος LB I (155 mM NH_4Cl , 10 mM $KHCO_3$, 1 mM EDTA) και το διάλυμα που προκύπτει τοποθετείται σε πάγο για 30 min.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση (15 min, 3000 rpm, 4°C) και το υπερκείμενο απομακρύνεται.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 10 ml διαλύματος LB I, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και το υπερκείμενο απομακρύνεται.
- Προστίθενται 2.5 ml διαλύματος LB I, γίνεται ανακίνηση και φυγοκεντρείται στις ίδιες συνθήκες.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 3 ml διαλύματος LB II (10 mM Tris, pH: 8.2, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA)
- Προστίθενται 75 µl πρωτεΐνάσης K (10 mg/ml) και 200 µl sodium dodesyl sulfate (SDS) 10% και ακολουθεί επώαση στους 55°C για 1 h.
- Προστίθενται 2 ml διαλύματος NaCl 6 M, γίνεται ανακίνηση και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες.
- Λαμβάνεται το υπερκείμενο σε καινούργιο σωλήνα και το DNA καταβυθίζεται με την προσθήκη δύο όγκων αιθανόλης.
- Το DNA ανασύρεται με την βοήθεια γυάλινης ράβδου, διαλύεται σε 500 µl διαλύματος TE και αποθηκεύεται στους -20°C.

β. Το πρωτόκολλο της μεθόδου Siefert et al. είναι το παρακάτω:



- 4 ml φρέσκου αίματος συλλέγονται σε σωλήνα SST (serum separator tube) και φυγοκεντρώνται για 10 min στις 10000 rpm ώστε να διαχωριστεί το πλάσμα από τα έμμορφα συστατικά του αίματος. Ο θρόμβος αίματος που δημιουργείται μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα και τεμαχίζεται με νυστέρι.
- Προστίθενται 0.2 g οξινομένης άμμου (acid washed sand) και ακολουθεί ομογενοποίηση με νυστέρι και γουδί.
- Προστίθενται 10 ml διαλύματος LSHB (10 mM Tris-HCl, pH: 7.6, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM EDTA) και το ομογενοποιημένο διάλυμα μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα.
- Προστίθενται 125 μl Novidet P-40 (Sigma) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στις 1200 rpm.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 5 ml διαλύματος LSHB. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα και προστίθενται 800μl διαλύματος HSHB (10 mM Tris-HCl, pH: 7.6, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA).
- Προστίθενται 50 μl sodium dodesyl sulfate, pH: 7.2 (SDS 100 g/l, Sigma Chemical Co.) και ακολουθεί επώαση στους 55°C για 10 min.
- Προστίθενται 300 μl διαλύματος NaCl 6 M και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στις 13000 rpm, σε θερμοκρασία 4°C.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα. Το DNA καταβυθίζεται με την προσθήκη δύο όγκων αιθανόλης, λαμβάνεται με την βοήθεια γυάλινης ράβδου και αποθηκεύεται σε 250 μl Tris-HCl 10 mM, pH: 8 στους -20°C.

γ. Το πρωτόκολλο της μεθόδου Zoller et al. (Factor V Gene Mutation Assay, ViennaLab) χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την απομόνωση DNA για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Το πρωτόκολλο της μεθόδου είναι το παρακάτω:

- 100 μl περιφερικού αίματος προστίθενται σε 1 ml LS (Lysis Solution) σε σωλήνα erpendorf. Το περιεχόμενο ανακινείται καλά για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στις 3000 rpm και το υπερκείμενο απομακρύνεται.
- Προστίθενται 1ml LS και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στις 12000 rpm.

- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 200 μ l GEN xTRACT Resin, γίνεται ανάμιξη σε Vortex για 10 sec και το διάλυμα επωάζεται για 20 min στους 56°C.
- Το διάλυμα ανακινείται σε Vortex για 10 sec και ακολουθεί νέα επώαση για 10 min στους 98°C.
- Μετά από ανακίνηση σε Vortex για 10 sec, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στις 12000 rpm, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα και αποθηκεύεται στους -20°C.

2.2.2. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από το υλικό της παρακέντησης του αδένου (FNA).

Η απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τα θυλακιώδη κύτταρα της παρακέντησης (FNA) πραγματοποιήθηκε με το πακέτο υλικών της HYBAID (Hybaid Recovery™ Amplification Reagent). Η μέθοδος χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την απομόνωση DNA για PCR. Το πρωτόκολλο της μεθόδου περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- Το υλικό της παρακέντησης μεταφέρεται από τους -80°C σε καθαρό σωλήνα Eppendorf 1.5 ml και εκχυλίζεται με 25 μ l διαλύματος 1x TE pH: 8. Ακολουθεί ομογενοποίηση του ιστού με γουδι για 10-20 φορές.
- Λαμβάνεται 1 μ l από το ομογενοποίημα και μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα Perkin-Elmer 0.5 ml. Προστίθενται 20 μ l διαλύματος Hybaid Recovery Amplification Reagent και γίνεται ανάμιξη σε Vortex.
- Τα δείγματα τοποθετούνται σε ειδική θερμοάντοχη βάση και επωάζονται για 5 min σε φούρνο μικροκυμάτων (900 Watt).
- Το τελικό διάλυμα (21 μ l) αποθηκεύεται στους -20°C έως ότου χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο DNA (5-10 μ l) για την αντίδραση PCR.

2.3. Ηλεκτροφόρηση DNA.

Η συνήθης μέθοδος διαχωρισμού και αναγνώρισης τμημάτων DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Η μετακίνηση του DNA καθορίζεται από τους

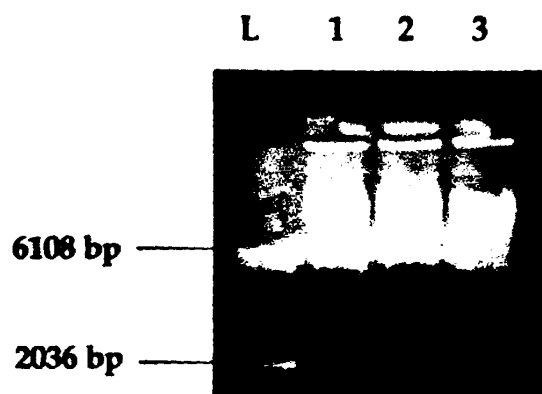


παρακάτω παράγοντες: α. το μοριακό βάρος του DNA, β. τη συγκέντρωση της αγαρόζης, γ. τη διαφορά δυναμικού, δ. τη στεροδιάταξη του DNA και ε. τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης.

Η ηλεκτροφόρηση του DNA γίνεται σε επίπεδη πηκτή αγαρόζης 0.8-1.2% (GIBCO BRL) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1x (TBE 5x/l: 54 gr Tris, 27.5 gr Boric acid, 20 ml EDTA 0.5 M, pH: 8). Μετά τον βρασμό της αγαρόζης προστίθενται βρωμιούχο αιθίδιο 10 μg/ml και αφήνεται να πήξει σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης για 45 min. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ισχυρό μεταλλαξιογόνο και πρέπει να χρησιμοποιείται σύμφωνα με τους θεσμοθετημένους κανόνες ασφαλείας. Στην συνέχεια η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα TBE 1x και τοποθετούνται στις υποδοχές τα δείγματα του DNA αφού πρώτα αναμιχθούν με διάλυμα 6x Type III (Loading buffer: 30% γλυκερόλη, 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανό της ξυλόλης) σε αναλογία 6:1.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε σταθερή τάση 98 Volt (Τροφοδοτικό: EC 105 E-C Apparatus Corporation, Florida) για 45 min και ακολουθεί η παρατήρηση και η φωτογράφιση της πηκτής σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (ΕΙΚΟΝΑ 4). Τα μοριακά βάρη των υπό μελέτη τμημάτων του DNA υπολογίζονται προσεγγιστικά με βάση γνωστά κλιμακούμενα μοριακά βάρη (1Kb DNA Ladder, GIBCO BRL).

Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ισχυρό μεταλλαξιογόνο και πρέπει να χρησιμοποιείται σύμφωνα με τους θεσμοθετημένους κανόνες ασφαλείας.



ΕΙΚΟΝΑ 4. Ηλεκτροφόρηση γονιδιωματικού DNA από λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος (μέθοδος απομόνωσης Miller et al.,1998). Όπου L: 1 Kb DNA Ladder.



2.4. Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων με φορείς που περιέχουν ευκαριωτικό DNA (Transformation).

Η εισαγωγή των πλασμιδιακών φορέων, στα επιδεκτικά προς μετασχηματισμό βακτηριακά στελέχη, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Hanahan et al. (1983):

- 10-50 ng (20 μ l) του πλασμιδίου που φέρει το εξωγενές DNA προστίθενται σε 200 μ l βακτηρίων, ακολουθεί ανάδευση και επώαση στους 4°C για 20 min.
- Τα βακτήρια υπόκεινται σε θερμικό shock στους 42°C για 90 sec και μεταφέρονται στους 4°C.
- Προστίθενται 800 μ l διαλύματος LB και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 30 min.
- Τα μετασχηματισμένα βακτήρια επιλέγονται ως εξής: ποσότητες 10, 20, 50, 100 μ l από το εναιώρημα των βακτηρίων επιστρώνονται σε τριβλία LB που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 37°C και αναπτύσσονται αποικίες μόνο από τα βακτηριακά στελέχη που φέρουν τον πλασμιδιακό φορέα που τα καθιστά ανθεκτικά στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

2.5. Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini preparation).

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA έγινε με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης των βακτηρίων:

- 5-10 αποικίες από την επιφάνεια του τριβλίου ενοφθαλμίζονται, κάθε μια ξεχωριστά, σε 5 ml θρεπτικού υλικού LB παρουσία αμπικιλίνης.
- Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 2 h.
- 1.5 ml από κάθε καλλιέργεια μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα Eppendorf και το υπόλοιπο διατηρείται στους 4°C.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στις 12000 rpm για 2 min και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 100 μ l διαλύματος A (50mM γλυκοζη, 25mM Tris, pH: 8, 10mM EDTA) στο οποίο έχουν διαλυθεί 2 mg/ml λυσοζύμη.
- Προστίθενται 200 μ l διαλύματος B (1% SDS σε 0.2 M NaOH) και γίνεται ανάμιξη σε Vortex.



- Προστίθενται 150μl διαλύματος Γ (3 M οξικό κάλιο, pH: 4.8) και ακολουθεί επώαση στους 4°C για 5 min.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούργιο σωλήνα, όπου εκχυλίζεται διαδοχικά με φαινόλη και χλωροφόρμιο. Το δείγμα φυγοκεντρείται, οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η οργανική φάση απομακρύνεται.
- Το πλασμιδιακό DNA καταβυθίζεται με προσθήκη δύο όγκων αιθανόλης.

Ο έλεγχος του πλασμιδιακού DNA γίνεται μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Το πλασμιδιακό DNA θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο (template) ώστε να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση του γονιδίου της προθυμοσίνης α.

2.6.1. Απομόνωση ολικού RNA.

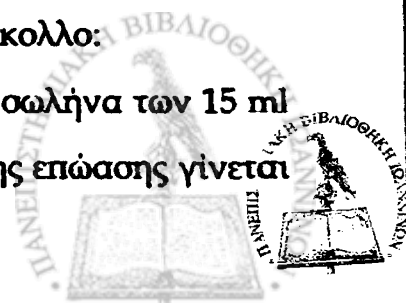
Η απομόνωση άθικτου RNA απαιτεί άσηπτες συνθήκες εργασίας γιατί είναι εξαιρετικά ευαίσθητο μόριο στην δράση των ριβονουκλεασών και αποδομείται εύκολα. Τα χημικά αναλώσιμα που χρησιμοποιούνται είναι υψηλής καθαρότητας ενώ τα γυαλικά και τα διαλύματα αποστειρώνονται για 90 min στους 120°C. Τα διαλύματα που είναι ευαίσθητα στην θερμοκρασία αποστειρώνονται με διήθηση σε φίλτρα 0.2 μm Nalgene (Nalgen Rochester).

Η ποσότητα του εξαγόμενου RNA υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 260 nm και με βάση την σχέση: οπτική πυκνότητα (O.D.) = 1 αντιστοιχεί σε 40 μg/ml RNA. Η καθαρότητα του RNA σε σχέση με τις πρωτεΐνες προσδιορίζεται επίσης φωτομετρικά από τον λόγο $O.D._{260nm} / O.D._{280nm}$ και τιμές μεγαλύτερες από 1.7 αντιστοιχούν σε υψηλής καθαρότητας δείγμα.

2.6.2. Απομόνωση ολικού RNA από περιφερικό αίμα.

Απομονώθηκε ολικό RNA από κύτταρα περιφερικού αίματος με το πακέτο υλικών της QIAGEN (RNA Blood mini kit) σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- 1.5 ml ολικού αίματος αναμιγνύεται με 7.5 ml διαλύματος EL σε σωλήνα των 15 ml και ακολουθεί επώαση για 10-15 min σε πάγο. Κατά την διάρκεια της επώασης γίνεται



ανάμιξη με Vortex 2 φορές. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στις 400 rpm στους 4°C και το υπερκείμενο απομακρύνεται.

- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 3 ml διαλύματος EL, γίνεται ανάμιξη με Vortex και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στις 400 rpm στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται.

- Προστίθενται 600 μl διαλύματος RLT και το ίζημα επαναδιαλύεται με ανακίνηση σε Vortex. Πριν την χρήση του διαλύματος RLT προστίθενται β-μερκαπτοαιθανόλη (10 μl ανά 1 ml διαλύματος RLT).

- Το διάλυμα (600 μl) μεταφέρεται σε στήλη QIA shredder, η οποία είναι τοποθετημένη επάνω σε σωλήνα 2 ml και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 min στις 14000 rpm. Η στήλη απομακρύνεται και προστίθενται 1 όγκος αιθανόλης 70%. Το περιεχόμενο αναδεύεται με πιπέτα.

- Λαμβάνονται 700 μl διαλύματος και μεταφέρονται σε στήλη QIAamp η οποία είναι τοποθετημένη επάνω σε σωλήνα 2 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 15 sec και ο σωλήνας με το διάλυμα απομακρύνονται.

- Η στήλη μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα 2 ml και προστίθενται 700 μl διαλύματος RW 1. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 15 sec και ο σωλήνας με το διάλυμα απομακρύνονται.

- Η στήλη μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα 2 ml και προστίθενται 500 μl διαλύματος RPE. Πριν την χρήση του διαλύματος RPE προστίθενται 4 όγκοι αιθανόλη 100%. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 15 sec και ο σωλήνας με το διάλυμα απομακρύνονται.

- Η στήλη μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα 2 ml και προστίθενται 500 μl διαλύματος RPE. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 3 min και ο σωλήνας με το διάλυμα απομακρύνονται.

- Η στήλη μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα Eppendorf και προστίθενται 40 μl RNase free H₂O. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 1 min. Η εκχύλιση επαναλαμβάνεται με άλλα 40 μl H₂O και το διάλυμα με το εξαγόμενο RNA αποθηκεύεται στους -80°C.



2.6.3. Απομόνωση ολικού RNA από το υλικό της παρακέντησης του αδένου (FNA).

Η απομόνωση ολικού RNA από τα θυλακιώδη κύτταρα της παρακέντησης (FNA) πραγματοποιήθηκε με το πακέτο υλικών της QIAGEN (RNeasy mini kit) σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Το δείγμα μεταφέρεται από τους -80°C σε καθαρό σωλήνα Eppendorf και εκχυλίζεται με 600 μl διαλύματος RLT, στο οποίο έχει προηγουμένως προστεθεί β -μερκαπτοαιθανόλη (10 μl ανά 1 ml διαλύματος RLT). Ακολουθεί ανάδευση με σύριγγα 20G για 20-30 φορές. Η ομογενοποίηση ολοκληρώνεται με φυγοκέντρηση του δείγματος (600 μl) σε στήλη QIA shredder, η οποία είναι τοποθετημένη επάνω σε σωλήνα 2 ml, στις 14000 rpm για 2 min. Η στήλη απομακρύνεται και προστίθενται 1 όγκος αιθανόλης 70% στον σωλήνα των 2 ml. Το περιεχόμενο αναδεύεται με πιπέτα.
- Λαμβάνονται 700 μl διαλύματος και μεταφέρονται σε στήλη QIAamp, η οποία είναι τοποθετημένη επάνω σε σωλήνα 2 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 15 sec και ο σωλήνας με το διάλυμα απομακρύνονται.
- Η στήλη μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα 2 ml και προστίθενται 700 μl διαλύματος RW 1. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 15 sec και ο σωλήνας με το διάλυμα απομακρύνονται.
- Η στήλη μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα 2 ml και προστίθενται 500 μl διαλύματος RPE. Πριν την χρήση του διαλύματος RPE προστίθενται 4 όγκοι αιθανόλη 100%. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 15 sec και ο σωλήνας με το διάλυμα απομακρύνονται.
- Η στήλη μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα 2 ml και προστίθενται 500 μl διαλύματος RPE. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 3 min και ο σωλήνας με το διάλυμα απομακρύνονται.
- Η στήλη μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα Eppendorf και προστίθενται 40 μl απεσταγμένου-απιονιομένου νερού. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 1 min. Η εκχύλιση επαναλαμβάνεται με άλλα 40 μl H_2O και το διάλυμα με το εξαγόμενο RNA αποθηκεύεται στους -80°C .



2.6.4. Απομόνωση ολικού RNA από θυρεοειδικό ιστό.

Μελετήθηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι απομόνωσης ολικού RNA από χειρουργικό παρασκεύασμα θυρεοειδικού ιστού.

Το πρωτόκολλο της μεθόδου των **Chomczynski and Sacchi (1987)** περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

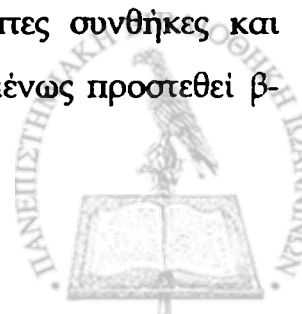
- Εκχύλιση του ιστού με διάλυμα D (4 M ισοθειοκυανιούχος γουανιδίνη, 25 mM κιτρικό νάτριο, pH: 7, 0.5% Sarkosyl, 0.1 M 2-μερκαπτοαιθανόλη), σε αναλογία 1 ml διαλύματος ανά 100 mg ιστού.
- Ομογενοποίηση του ιστού σε ομογενοποιητή Polytron στις μέγιστες στροφές.
- Απομάκρυνση του DNA και των πρωτεϊνών. Το εκχύλισμα μεταφέρεται σε σωλήνα Corex και για 1 όγκο διαλύματος D προστίθενται κατά σειρά με ανάδευση 0.1 όγκοι οξικό νάτριο 2 M, pH: 4, 1 όγκος φαινόλη και 0.2 όγκοι χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης 49/1 v/v.

Το ομογενοποιημένο διάλυμα μεταφέρεται στους 4°C και μετά από 15 min ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min στις 12000 rpm στην ίδια θερμοκρασία. Διαχωρίζονται τρεις φάσεις εκ των οποίων η υδατική περιέχει το RNA ενώ οι άλλες δύο το DNA και τις πρωτεΐνες.

- Καταβύθιση του RNA. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα Corex και το RNA καταβυθίζεται με προσθήκη ίσου όγκου ισοπρανολόλης στους -20°C για 2 h. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (20 min, 12000 rpm), το ίζημα επαναδιαλύεται σε 0.5 ml διαλύματος D και μεταφέρεται σε σωλήνα Eppendorf. Το RNA καταβυθίζεται για δεύτερη φορά με προσθήκη δύο όγκων αιθανόλης στους -20°C για δύο ώρες. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (20 min, 12000 rpm) και το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη. Η αιθανόλη απομακρύνεται με ξήρανση στο Speed Vac και το RNA διαλύεται σε απεσταγμένο-απιονισμένο νερό σε τελικό όγκο 300-500 μl.

Απομόνωση ολικού RNA έγινε επίσης με το πακέτο υλικών της **QIAGEN (RNeasy mini kit)** ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία:

- 30 mg θυρεοειδικού ιστού τεμαχίζονται με νυστέρι σε άσηπτες συνθήκες και εκχυλίζονται με 600 μl διαλύματος RLT, στο οποίο έχει προηγουμένως προστεθεί β-



μερκαπτοαιθανόλη (10 μl ανά 1 ml διαλύματος RLT). Ο ιστός ομογενοποιείται σε ομογενοποιητή Πολύτρον στις μέγιστες στροφές.

- Στην συνέχεια ακολουθείται το πρωτόκολο όπως περιγράφεται στη παράγραφο 2. 6. 3.

2. 6. 5. Απομόνωση ολικού RNA από ιστικά παρασκευάσματα παραφίνης.

Η απομόνωση ακέραιου RNA από ιστολογικές τομές παραφίνης είναι εξαιρετικά δύσκολη. Συνήθως το εξαγόμενο RNA είναι κατακερματισμένο σε τμήματα των 100-200 bp, δίνοντας την εικόνα επιχρίσματος (smear) κατά την ηλεκτροφόρηση. Η αποπαραφινοποίηση των δειγμάτων έγινε με δύο πρωτόκολα ώστε να επιλεγεί η αποδοτικότερη μέθοδος.

α. Το πρωτόκολλο της μεθόδου *Coombs et al.* (1999) έχει ως εξής

- Ανά τομή παραφίνης (20 μm) προστίθενται 100 μl Tween-20 0.5%, σε καθαρό σωλήνα Eppendorf.
- Ακολουθεί επώαση στους 90°C για 10 min και στη συνέχεια τα δείγματα ψύχονται στους 55°C.
- Προστίθενται 2 μl πρωτεϊνάσης K (10 mg/ml) και επώαση στους 55°C για 3 h.
- 100 μl διαλύματος TE (Tris, EDTA) pH: 7.5
- Αδρανοποίηση της πρωτεϊνάσης K με επώαση στους 99°C για 10 min.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10500 rpm για 15 sec και ο σωλήνας με το διάλυμα απομακρύνονται.
- Το δείγμα ψύχεται σε πάγο και αφαιρείται η παραφίνη.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10500 rpm για 15 sec και ο σωλήνας με το διάλυμα απομακρύνονται.
- Λαμβάνεται το υπερκείμενο και ακολουθεί καθαρισμός του δείγματος με το πακέτο υλικών RNeasy mini kit (Qiagen) με βάση το πρωτόκολο όπως περιγράφεται όπως περιγράφεται στη παράγραφο 2. 6. 3.

β. Το πρωτόκολο της μεθόδου *Goelz et al.* (1985) περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:



- Ανά τομή παραφίνης (20 μm) προστίθενται 1 ml ξυλένιο, γίνεται ανάμιξη με Vortex και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται.
- Προστίθενται 1ml 100% αιθανόλη, γίνεται ανάμιξη με Vortex και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται.
- Το ίζημα εκχυλίζεται με 600 μl διαλύματος RLT (Qiagen), στο οποίο έχει προηγουμένως προστεθεί β -μερκαπτοαιθανόλη (10 μl ανά 1 ml διαλύματος RLT). Ακολουθεί ανάδευση με σύριγγα 20 G για 20-30 φορές.
- Προστίθενται 10 μl πρωτεΐνάσης K (10 mg/ml) και ακολουθεί επώαση στους 55°C για 15 min.
- Προστίθενται 1 όγκος αιθανόλη και ακολουθεί η απομόνωση του RNA με το πακέτο υλικών RNeasy mini kit (Qiagen) όπως περιγράφεται στη παράγραφο 2. 6. 3.

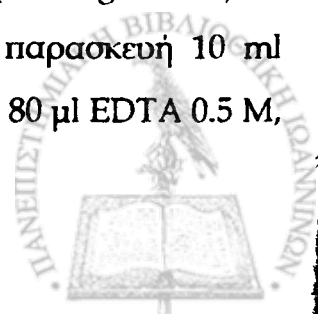
Μετά από επαναλαμβανόμενα πειράματα, η μέθοδος αποπαραφινποίησης των Coombs et al. (1999) επελέγη ως η αποδοτικότερη. Το εξαγόμενο RNA αποδομείται πολύ εύκολα και πρέπει να χρησιμοποιείται απευθείας για αντίδραση RT-PCR.

2. 7. Ηλεκτροφόρηση RNA.

Η ηλεκτροφόρηση του RNA γίνεται σε επίπεδη πηκτική αγαρόζης-φορμαλδεύδης, λαμβάνοντας όλες τις ειδικές προφυλάξεις για την προστασία του μορίου από την δράση των ριβονουκλεασών. Οι συσκευές ηλεκτροφόρησης απολυμαίνονται σε διάλυμα NaOH 0.1 N, τουλάχιστον για 2 h πριν την χρήση.

Η αγαρόζη (1.4% w/v) προστίθενται σε 10 ml διαλύματος FA 1x (FA 10x: 200 mM MOPS, 50 mM οξικό νάτριο, 10 mM EDTA και ρύθμιση του pH στο 7 με NaOH) και τήκεται υπό ανάδευση στους 100°C (microwave). Ακολούθως το διάλυμα ψύχεται μέχρι τους 65°C και προστίθενται 1.8 ml φορμαλδεύδης 37% (12.3 M) και 1 μl βρωμιούχο αιθίδιο (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Το μίγμα αναδεύεται και δημιουργείται οριζόντια πηκτή.

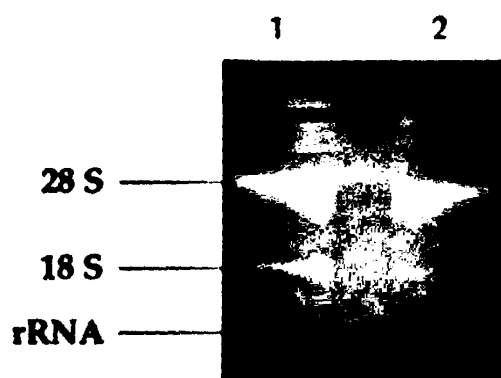
Τα δείγματα RNA αναμιγνύονται με διάλυμα φόρτωσης 5x (loading buffer) σε αναλογία 5:1 και επωάζονται στους 65°C για 5 λεπτά. Για την παρασκευή 10 ml διαλύματος φόρτωσης απαιτούνται 20 mg μπλέ της βρωμοφαινόλης, 80 μl EDTA 0.5 M,



720 ml φορμαλδεύδη 37%, 2 ml γλυκερόλη 100%, 3.1 ml φορμαμίδιο, 4 ml FA 10x και απεσταγμένο-απιονισμένο H₂O μέχρι τα 10 ml.

Η ηλεκτροφόρηση εκτελείται σε ρυθμιστικό διάλυμα (running buffer), (1000ml: 100 ml FA 10x, 20 ml φορμαλδεύδη 37% και 880 ml απεσταγμένο-απιονισμένο H₂O) σε σταθερή τάση 90V για 1 h (Τροφοδοτικό: EC 105 E-C Apparatus Corporation, Florida). Ακολουθεί παρατήρηση και φωτογράφιση της ηλεκτικής σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (ΕΙΚΟΝΑ 5).

Όταν η ποσότητα του απομονωμένου RNA που ηλεκτροφορείται είναι μικρότερη από 10 μg, το βρωμιούχο αιθίδιο δεν προστίθενται στην ηλεκτική αλλά σε κάθε δείγμα ξεχωριστά πριν την μετουσίωση στους 65°C.



ΕΙΚΟΝΑ 5. Ηλεκτροφόρηση ολικού RNA από λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος. Δείγμα 1: 6.4 μg και δείγμα 2: 4 μg RNA.

2. 8. 1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) επινοήθηκε το 1985 από την ερευνητική ομάδα του Mullis (Saiki et al., 1985) και έκτοτε καθιερώθηκε ως η σημαντικότερη τεχνική της μοριακής βιολογίας με ευρύτατο φάσμα εφαρμογών.

Η τεχνική PCR εκμεταλλεύεται τον ημισυντηρητικό τρόπο διπλασιασμού του DNA και παρέχει την δυνατότητα ταχείας και εκλεκτικής απομόνωσης ενός επιθυμητού κλάσματος DNA με εκθετική ενίσχυση (amplification). Ουσιαστικά πρόκειται για μια *in vitro* αντιγραφή και ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας-στόχου DNA σε πολλά

αντίγραφα. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι τόσο μεγάλη ώστε να απαιτείται ελάχιστη ποσότητα αρχικού εκμαγείου DNA, η οποία δύναται να φτάσει και στο επίπεδο ενός μορίου. Το μίγμα των αντιδραστηρίων μιας τυπικής αντίδρασης πολυμεράσης περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

- το θερμοάντοχο ένζυμο Taq DNA πολυμεράση (*Thermus aquaticus*), του οποίου η ενεργότητα εξαρτάται από την παρουσία ιόντων μαγνησίου.
- το ζεύγος των εκκινητών (primers), που είναι συνθετικές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες των 15-25 βάσεων, συμπληρωματικές (complementary) προς το 5' άκρο του κωδικεύοντος και αντικωδικεύοντος τμήματος του DNA που πρόκειται να ενισχυθεί και χρησιμεύουν ως αφετηρία για την έναρξη της αντιγραφής.
- τα τέσσερα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- το εκμαγείο DNA (template).
- και το ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα με τα ιόντα μαγνησίου (PCR buffer) στο οποίο θα αναμιχθούν τα παραπάνω.

Κάθε αντίδραση εκτελείται σε θερμικό κυκλοποιητή σε 30-40 κύκλους, καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει τρεις φάσεις:

- **Αποδιάταξη (μετουσίωση, αποελίκωση, denaturation) του DNA** η οποία συνήθως επιτελείται στους 94°C για 30-60 sec. Η θερμοκρασία μπορεί να αυξηθεί στους 97°C όταν η αλληλουχία-στόχος είναι πλούσια σε βάσεις G+C.
- **Αναδιάταξη και υβριδισμός των εκκινητών (annealing)** στις αντίστοιχες συμπληρωματικές αλληλουχίες του εκμαγείου DNA σε θερμοκρασία που υπολογίζεται με βάση το σημείο τήξης (melting point, T_m) των ολιγονουκλεοτιδίων για 30-60 sec.
- **Επιμήκυνση (πολυμερισμός, extension, elongation) των εκκινητών** από την θερμοάντοχη πολυμεράση στους 68-72°C για χρόνο που υπολογίζεται ανάλογα με το μέγεθος (bp) του προϊόντος που πρόκειται να ενισχυθεί (1 min για 1000 bp).

Η εκθετική ενίσχυση του αριθμού των αντιγράφων του DNA καθορίζεται από την εξίσωση: $N = n(1+e)^c$, όπου N: η τελική ποσότητα του προϊόντος, n: η αρχική ποσότητα του εκμαγείου, e: η απόδοση (efficiency) της αντίδρασης και c: ο αριθμός των κύκλων PCR.



Η επίτευξη ικανοποιητικής αντίδρασης πολυμερισμού τόσο ως προς την απόδοση όσο και ως προς την ειδικότητα, εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τους παρακάτω παράγοντες:

- i. την επιλογή των κατάλληλων εκκινητών.
- ii. την συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου (Mg^{2+}).
- iii. την ακριβή θερμοκρασία υβριδισμού (annealing), η οποία είναι η σημαντικότερη παράμετρος για την επιτυχία της αντίδρασης και καθορίζεται από το σημείο τήξης των εκκινητών. Η θερμοκρασία υβριδισμού είναι συνήθως $5^{\circ}C$ χαμηλότερη από το σημείο τήξης των εκκινητών, το οποίο μπορεί να υπολογιστεί με τους ακόλουθους τύπους

α. $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ και

β. $T_m = 81.5 + 16.6 [\log_{10}(Na^+)] + 0.41(\% G+C) - 675 / L$

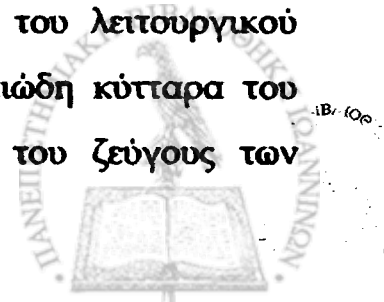
όπου L: μήκος του ολιγονουκλεοτιδίου σε βάσεις, A: αδενίνη, T: θυμίνη, G: γουανίνη και C: κυτοσίνη (Innis et al., 1990).

Οι εφαρμογές της μεθόδου PCR περιλαμβάνουν ένα ευρύ πεδίο της βασικής έρευνας και της μοριακής διαγνωστικής. Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την άμεση κλωνοποίηση και αλληλούχιση ενός συγκεκριμένου κλάσματος DNA. Στην ιατρική χρησιμοποιείται στην μοριακή διάγνωση λοιμώξεων και γενετικά καθορισμένων νοσημάτων. Τέλος η εντυπωσιακή ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου βρίσκουν πολλές εφαρμογές στην ιατροδικαστική έρευνα.

2.8.2 Ανίχνευση του γονιδίου της προθυμοσίνης α με PCR

Η προθυμοσίνη α κωδικοποιείται από μια οικογένεια έξι γονιδίων από τα οποία το ένα είναι λειτουργικό ενώ τα άλλα πέντε στερούνται ιντρονίων και χαρακτηρίζονται ως ψευδογονίδια (Manrow et al., 1992). Το λειτουργικό γονίδιο αποτελείται από πέντε εξόνια που διακόπτονται από τέσσερα ιντρόνια και φέρει τις κλασσικές ρυθμιστικές αλληλουχίες μεταγραφής TATA και CAAT στην περιοχή του υποκινητή (Szabo et al., 1993, Eschenfeldt et al., 1989, Manrow et al., 1992).

Βασικός σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η απομόνωση του λειτουργικού γονιδίου της προθυμοσίνης α σε περιφερικό αίμα και σε θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς αδένος (FNA) με αντίδραση PCR. Ο σχεδιασμός του ζεύγους των



εκκινητών (primers) έγινε με βάση την χαρτογράφηση του cDNA και του υποκινητή της προθυμοσίνης α (Manrow et al., 1992). Το 5'-άκρο του κωδικεύοντος (sense) εκκινητή περιλαμβάνει τμήμα του υποκινητή του λειτουργικού γονιδίου, του οποίου η αλληλουχία διαφέρει και στα πέντε ψευδογονίδια. Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε είναι η ακόλουθη:

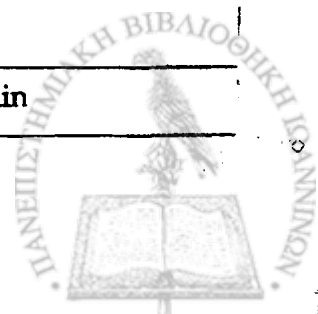
sense: 5'-TGA GTC CCC CAC TGG CT-3' (-9 έως +7) και

antisense: 5'-GTT AGA ACA ACT CAG CAA AAT-3' (1212 έως 1232)

Στις παρενθέσεις αναφέρονται οι θέσεις των εκκινητών με βάση το cDNA (εξόνια) της προθυμοσίνης α. Οι συγκεκριμένοι εκκινητές με εκμαγείο γενωμικό DNA ενισχύουν τμήμα μεγέθους 5 Kb που αντιστοιχεί στο λειτουργικό γονίδιο της προθυμοσίνης α (5 εξόνια και 4 ιντρόνια) και με εκμαγείο πλασμιδιακό DNA ενισχύουν τμήμα μεγέθους 1240 Kb που αντιστοιχεί στο cDNA της προθυμοσίνης α (5 εξόνια).

Με εκμαγείο το πλασμιδιακό DNA προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες ενίσχυσης του γονιδίου της προθυμοσίνης α, μετά από επαναλαμβανόμενες αντιδράσεις, στις οποίες μελετήθηκαν οι σημαντικότερες μεταβλητές της αντίδρασης PCR (ΠΙΝΑΚΑΣ 8).

ΠΙΝΑΚΑΣ 8. Μεταβλητές της αντίδρασης PCR που μελετήθηκαν για τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών ενίσχυσης του γονιδίου της προθυμοσίνης α.	
Μεταβλητές της αντίδρασης	Έυρος τιμών
Ποσότητα εκμαγείου DNA	100-1000ng
Συγκέντρωση των εκκινητών	0.25-0.5 μ M κάθε εκκινητής
Συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου (Mg^{2+})	1.5-3 mM
Θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών	55-69°C
Χρονική διάρκεια της φάσης υβριδισμού των εκκινητών	30-60 sec
Χρονική διάρκεια της φάσης επιμήκυνσης	1-3 min



Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν της GIBCO BRL. Οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων και η σειρά με την οποία τοποθετούνται στον μικροφυγοκεντρικό σωλήνα 0.2 ml (Perkin Elmer) παρατίθενται στον ΠΙΝΑΚΑ 9.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9. Συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR.		
Αντιδραστήριο	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Απεσταγμένο-αποστειρωμένο νερό	31.75 μ l	-
10x PCR Buffer	5 μ l	1x
dNTPs mix (10 mM κάθε dNTP)	4 μ l	0.2 mM (κάθε dNTP)
Primers mix (10 μ M κάθε primer)	2.5 μ l	0.5 μ M (κάθε primer)
MgCl ₂ (50mM)	1.5 μ l	1.5 mM
Έκτραγχο DNA (50 ng/ μ l)	5 μ l	250 ng
Taq DNA πολυμεράση (5 U/ μ l)	0.25 μ l	2.5 U

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer). Το θερμικό προφίλ για την ενίσχυση του γονιδίου της προθυμοσίνης α παρατίθενται στον ΠΙΝΑΚΑ 10.

ΠΙΝΑΚΑΣ 10. Συνθήκες (θερμικό προφίλ) της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του λειτουργικού γονιδίου της προθυμοσίνης α .	
Κύκλοι	Θερμοκρασία και χρόνος
1 x	Αποδιάταξη (preliminary denaturation): 94°C για 5 min
34 x	Αποδιάταξη (denaturation): 94°C για 1 min Υβριδισμός (annealing): 62°C για 1 min Επιμήκυνση (extension): 72°C για 3 min
1 x	Τελική επιμήκυνση (final extension): 72°C για 7 min



2. 8. 3. Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης με ημι-ποσοτική αντίστροφη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR).

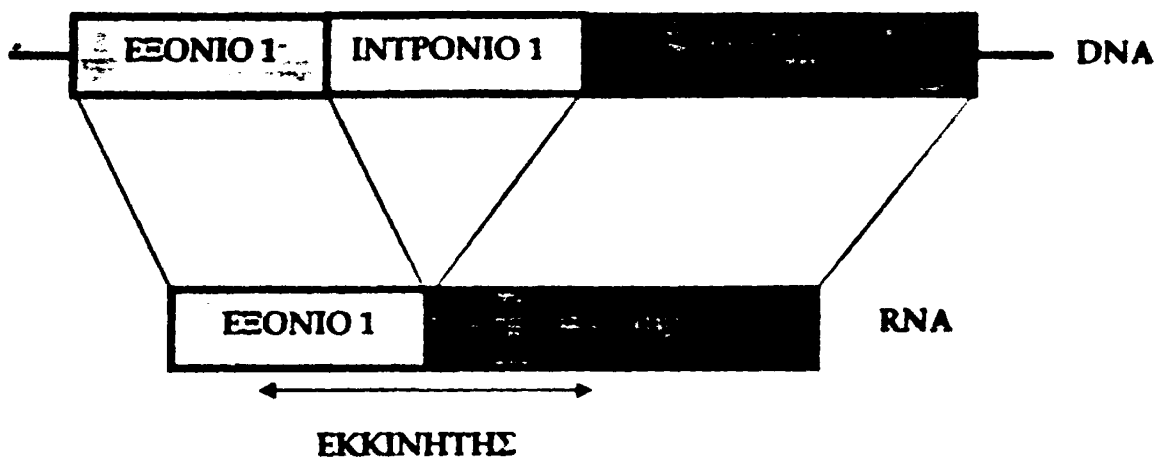
Η αντίστροφη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) είναι μια παραλλαγή της κλασσικής PCR που χρησιμοποιεί ως αρχικό υπόστρωμα (εκμαγείο) RNA, το οποίο με την βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase) μετατρέπεται σε συμπληρωματικό DNA (cDNA). Η αντίδραση RT-PCR, υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις, επιτρέπει την μελέτη και ποσοτικοποίηση της έκφρασης ενός γονιδίου σε επίπεδο mRNA.

Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων της προθυμοσίνης α , της παραθυμοσίνης και του ογκο-κατασταλτικού γονιδίου p53 πραγματοποιήθηκε με ημι-ποσοτική αντίδραση RT-PCR ενός βήματος (one step) με την χρήση του πακέτου υλικών της Roche (Titan One Tube RT-PCR Kit) σε δείγματα FNA με απλή οζώδη βρογχοκήλη και σε ιστολογικές τομές παραφίνης με καλοήθη και κακοήθη νεοπλασμάτα του αδένου. Η έκφραση του γονιδίου της β -ακτίνης αποτέλεσε τον εσωτερικό μάρτυρα της αντίδρασης. Στην αντίδραση RT-PCR ενός βήματος, η σύνθεση του cDNA (αντίστροφη μεταγραφή) και η αντίδραση PCR εκτελούνται διαδοχικά στον ίδιο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα χωρίς να αλλάζει το ρυθμιστικό διάλυμα. Το μίγμα των ενζύμων της αντίδρασης περιλαμβάνει την αντίστροφη μεταγραφάση AMV για την σύνθεση του cDNA και την Expand High Fidelity πολυμεράση για την αντιγραφή και ενίσχυση του cDNA, η οποία έχει υψηλή επιδιορθωτική ικανότητα. Κύρια πλεονεκτήματα της RT-PCR ενός βήματος είναι η εξαιρετική ευαισθησία ακόμα και με ελάχιστη ποσότητα εκμαγείου RNA (Winzer et al., 1998), η ελαχιστοποίηση του απαιτούμενου χρόνου και η ελάττωση του κινδύνου επιμόλυνσης των δειγμάτων.

Η ταυτόχρονη ενίσχυση cDNA (RNA) και γονιδιωματικού DNA λόγω επιμόλυνσης των δειγμάτων δεν επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης RT-PCR. Το εμπόδιο αυτό μπορεί να ξεπεραστεί είτε με την χρήση ενζύμων που πέπτουν το DNA (DNase) είτε με τον κατάλληλο σχεδιασμό των εκκινήτων.



Στην παρούσα μελέτη τα ζεύγη των εκκινήτων για τα γονίδια της προθυμοσίνης α και του p53 σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να μην ενισχύουν γονιδιωματικό DNA (ΠΙΝΑΚΕΣ 11 και 12). Η αλληλουχία κάθε εκκινήτη (sense και antisense) είναι συμπληρωματική σε περιοχή του cDNA που αντιστοιχεί σε δύο διαδοχικά εξόνια με αποτέλεσμα να μην ενισχύεται το μεταξύ τους ιντρόνιο και κατά συνέπεια να μην ενισχύεται γενωμικό DNA που πιθανότατα να έχει επιμολύνει τα δείγματα RNA (ΣΧΗΜΑ 7). Αντίθετα οι θέσεις των εξονίων και των ιντρονίων του γονιδίου της παραθυμοσίνης δεν έχουν καθοριστεί στο ανθρώπινο γονιδίωμα με αποτέλεσμα οι αντιστοιχοι εκκινήτες να μην ενισχύουν αποκλειστικά εκμαγείο RNA (ΠΙΝΑΚΑΣ 13). Στην περίπτωση αυτή τα δείγματα RNA επωάστηκαν με DNase I (Promega) πριν την αντίδραση RT-PCR.



ΣΧΗΜΑ 7. Η αλληλουχία κάθε εκκινήτη (sense και antisense) για τα γονίδια της προθυμοσίνης α και του p53 σχεδιάστηκε ώστε να είναι συμπληρωματική σε περιοχή του cDNA (RNA) που αντιστοιχεί σε δύο διαδοχικά εξόνια, με αποτέλεσμα να μην ενισχύεται το μεταξύ τους ιντρόνιο και κατά συνέπεια να μην ενισχύεται γονιδιωματικό DNA.

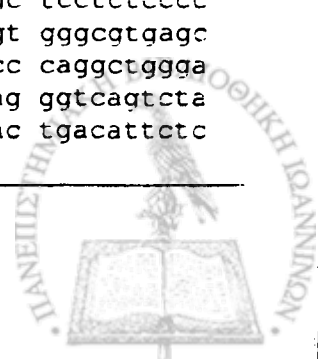


ΠΙΝΑΚΑΣ 11. Τμήμα της αλληλουχίας του cDNA της προθυμοσίνης α ανθρώπου (Manrow et al., 1992). Οι υπογραμμισμένες περιοχές αντιστοιχούν στις θέσεις των εκκινητών και με έντονα γράμματα παρατίθενται η αλληλουχία του προϊόντος της αντίδρασης RT-PCR (255 bp). Η αλληλουχία του κωδικεύοντος (sense) εκκινητή (θέσεις 193-212) υπερπηδά το ιντρόνιο 1 και η αλληλουχία του αντικωδικεύοντος (antisense) εκκινητή (θέσεις 429-448) υπερπηδά το ιντρόνιο 4.

1	ctttgcattg	ttcctcates	gcctcettgc	tcgcegcage	cgctcgcgc	gcgcgcctcc
61	tccgcccgcg	eggactccgg	cagctttatc	gccagagtc	ctgaactctc	gctttctttt
121	taatccccctt	catcggatca	ccggcgtgcc	ccaccatgtc	agacgcagcc	gtagacacca
181	gctccgaaat	<u>caccaccaag</u>	<u>gacttaaagg</u>	<u>agaagaagga</u>	<u>agttgtggaa</u>	<u>gaggcagaaa</u>
241	<u>atggaagaga</u>	cgccccctgct	aacgggaatg	ctaatgagga	aaatggggag	caggaggctg
301	<u>acaatgaggt</u>	agacgaagaa	gaggaagaag	gtggggagga	agaggaggag	gaagaagaag
361	<u>gtgatggtga</u>	ggaagaggat	ggagatgaag	atgaggaagc	tgagtcagct	acgggcaagc
421	<u>gggcagctga</u>	<u>agatgatgag</u>	<u>gatgacgatg</u>	tcgataccaa	gaagcagaag	accgacgagg
481	atgactagac	agcaaaaaag	gaaaagttaa	actaaaaaaa	aaaaggccgc	cgtgacctat
541	tcaccctcca	cttcccgtct	cagaatctaa	acgttggtca	ccttcgagta	gagaggcccg

ΠΙΝΑΚΑΣ 12. Τμήμα της αλληλουχίας του cDNA του γονιδίου p53 ανθρώπου (GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank). Οι υπογραμμισμένες περιοχές αντιστοιχούν στις θέσεις των εκκινητών και με έντονα γράμματα παρατίθενται η αλληλουχία του προϊόντος της αντίδρασης RT-PCR (565 bp). Η αλληλουχία του κωδικεύοντος (sense) εκκινητή (θέσεις 613-631) υπερπηδά το ιντρόνιο 4 και η αλληλουχία του αντικωδικεύοντος (antisense) εκκινητή (θέσεις 1158-1176) υπερπηδά το ιντρόνιο 8.

421	accaggtcc	agatgaagct	cccagaatgc	cagaggctgc	tccccgcgtg	gcccctgcac
481	cagcagctcc	tacaccggcg	gcccctgcac	cagccccctc	ctggcccctg	tcattctctg
541	tcccttccca	gaaaacctac	cagggcagct	acggtttccg	tctgggcttc	ttgcattctg
601	ggacagccaa	<u>gtctgtgact</u>	<u>tgcaactact</u>	<u>ccccctgcct</u>	<u>caacaagatg</u>	<u>ttttgccaac</u>
661	<u>tgcccaagac</u>	ctgccctgtg	cagctgtggg	ttgattccac	acccccgccc	ggcaccocgcg
721	tccgcgccat	ggccatctac	aagcagtcac	agcacatgac	ggaggttgtg	aggcgcctgcc
781	cccaccatga	gcgctgctca	gatagcgatg	gtctggcccc	tcctcagcat	cttatccogag
841	<u>tggaaggaaa</u>	tttgcgtgtg	gagtatgttg	atgacagaaa	cacttttoga	catagtgtgg
901	tggtgcccta	tgagccgcct	gaggttggtc	ctgactgtac	caccatccac	tacaactaca
961	tgtgtaacag	ttcctgcatg	ggcggcatga	accggaggcc	catcctcacc	atcatcacac
1021	tggaagactc	cagtggtaat	ctactgggac	ggaacagctt	tgagggtgct	gtttgtgcct
1081	gtcctgggag	agaccggcgc	acagaggaag	agaatctccg	caagaaaggg	gagcctcacc
1141	<u>acgagctgcc</u>	<u>cccagggagc</u>	<u>actaagcgag</u>	<u>cactgc</u>	cccaa	caacaccagc
1201	agccaaagaa	gaaaccactg	gatggagaat	atttcaccct	tcagatccgt	gggcgtgagc
1261	gcttcgagat	gttccgagag	ctgaatgagg	ccttggaact	caaggatgcc	caggctggga
1321	aggagccagg	ggggagcagg	gctcaactca	gccacctgaa	gtccaaaaag	ggtcagctca
1381	cctcccgcga	taaaaaactc	atgttcaaga	cagaagggcc	tgactcagac	tgacattctc



ΠΙΝΑΚΑΣ 13. Αλληλουχία του cDNA της παραθυμοσίνης ανθρώπου (Clinton et al., 1989). Οι υπογραμμισμένες περιοχές αντιστοιχούν στις θέσεις των εκκινήτων και με έντονα γράμματα παρατίθενται η αλληλουχία του προϊόντος της αντίδρασης RT-PCR (310 bp). Η αλληλουχία του κωδικεύοντος (sense) εκκινήτη αντιστοιχεί στις θέσεις 301-317 και η αλληλουχία του αντκωδικεύοντος (antisense) εκκινήτη στις θέσεις 592-610. Οι θέσεις των εξονίων και των ιντρονίων του γονιδίου της παραθυμοσίνης δεν έχουν καθοριστεί στον άνθρωπο.

1	ggcggcgacg	gatcgagetc	accgcgcccga	gcgcgcgggc	accgcctgca	cgcccttcc
61	gcccgcctc	cggacggccg	cagcctgcgg	tctccgtcca	gaccacccc	cgccccacc
121	cgcgcgctc	tgccgcctet	tccagagacc	cagcttgccg	agcggccgcc	gctgccgtg
181	cgccgcgcc	gcccaccg	cgccaggtc	cgccgcggc	caccctccgc	cgtccagggc
241	ctctccgtct	cggccccggg	accccgcctc	cccgccagcc	ccggccccgg	ccccgacc
301	<u>atgtcggaga</u>	<u>aaagcgtcga</u>	<u>ggcagcggcc</u>	<u>gagttgagcg</u>	<u>ccaaggacct</u>	<u>gaaggagaag</u>
361	<u>aaaggagaag</u>	<u>tggaggagaa</u>	<u>ggcaagccgg</u>	<u>aaagagcgaa</u>	<u>agaagaagt</u>	<u>ggtggaggag</u>
421	<u>gaggagaacg</u>	<u>ggcctgagga</u>	<u>ggaagaagaa</u>	<u>gaaactgccc</u>	<u>aggaaggaga</u>	<u>ggagggaagt</u>
481	<u>gaagggaag</u>	<u>aagaagatga</u>	<u>ggaagaagaa</u>	<u>gaagaggatg</u>	<u>atgaagggcc</u>	<u>cgcgctgaag</u>
541	<u>agagctgccc</u>	<u>aagaggagga</u>	<u>tgaagcggat</u>	<u>cccaaacggc</u>	<u>agaagacaga</u>	<u>aaatggggca</u>
601	<u>tggcgtgac</u>	<u>gcctgccaac</u>	<u>agcctgggtt</u>	<u>gggaggcctc</u>	<u>tctgggctgg</u>	<u>aggtgggggt</u>
661	gggggcagcc	aagtcagcc	actctacc	tgctccctg	ctctggccc	tgaccgaga
721	gctgccacc	tctctctct	ccccagcct	ctcatttccg	cctctccaga	cactgcgcc
781	tccaccctca	ctctgccatt	gtccaccctc	ctgacctget	ccatctgagc	tctccagctg
841	gcccccaatt	gctctctct	ctctttgctc	tctttctccc	tcccctacca	gcctcattct
901	tctccggtag	cctctcccac	ctaacctctg	catccccag	cgtcatgtcc	tgccccatcc
961	ctactctgcc	tgatccctgg	atctccctca	gatccctct	tctcagacag	cgccagggcg
1021	gggtggggcc	ggggttggcg	agccccacag	ctgccccct	cccctccctt	tttgtataat
1081	ttaataaaga	aatggctcgcg	ctctgttt			

Οι αλληλουχίες των εκκινήτων για την ενίσχυση των γονιδίων της προθυμοσίνης α, της παραθυμοσίνης, του p53 και της β-ακτίνης καθώς και οι αντίστοιχες θερμοκρασίες αποελικώσης και το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος παρατίθενται στον ΠΙΝΑΚΑ 14.

Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της RT-PCR προϋποθέτει τον τερματισμό της αντίδρασης κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης ενίσχυσης (exponential phase) του προϊόντος, ώστε να επιτυγχάνεται γραμμική αντιστοιχία της τελικής ποσότητας του προϊόντος με την αρχική ποσότητα του mRNA. Η παραπάνω συνθήκη αποτελεί την βασική αρχή λειτουργίας της real-time PCR (Higuchi et al., 1993). Στην παρούσα μελέτη η διατήρηση της αντίδρασης RT-PCR στην εκθετική φάση ενίσχυσης του προϊόντος επιτεύχθη μετά από επαναλαμβανόμενες αντιδράσεις με αυξανόμενους θερμοκούς κύκλους (22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36). Ως εκμαγείο στις αντιδράσεις αυτές χρησιμοποιήθηκε ολικό RNA σε συγκέντρωση 2 pg/μl. Με βάση την μελέτη της

ΠΙΝΑΚΑΣ 14. Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του cDNA των γονιδίων της προθρομβίνης α, της παραθρομβίνης του p53 και της β-ακτινής. Παράτιθενται επίσης η θερμοκρασία υβριδισμού (annealing) και το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος.

	Αλληλουχία των εκκινητών	Θερμοκρασία υβριδισμού (annealing)	Μέγεθος προϊόντος
Προθρομβίνη α (BioSpring)	sense: 5'-CCA CCA AGG ACT TAA GGA G-3' antisense: 5'-TCG TCA TCC TCA TCA TCT TC-3'	55°C	255 bp
Παραθρομβίνη (BioSpring)	sense: 5'-CCG GAA TTC ATG TCG GAG AAA AGC GTC-3' antisense: 5'-TCC GC TCG AGT CAC GCC GAT GCC CCA TT-3'	50°C	310 bp
p53 (BioSpring)	sense: 5'-CTG TGA CTT GCA CGT ACT C-3' antisense: 5'-GCA GTG CTC GCT TAG TGC T-3'	50°C	565 bp
β-ακτινή (Roche)	sense: 5'-CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA-3' antisense: 5'-AGG GTA CAT GGT GGT GCC GCC AGA C-3'	66°C	575 bp

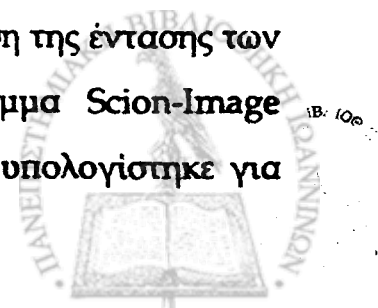
κινητικής της ενίσχυσης κάθε γονιδίου προσδιορίστηκε το αντίστοιχο θερμικό προφίλ, σύμφωνα με το οποίο η εκτέλεση της αντίδρασης σε 30 θερμικούς κύκλους δίνει την δυνατότητα ποσοτικοποίησης του mRNA των γονιδίων της προθυμοσίνης α, της παραθυμοσίνης και της β-ακτίνης (ΠΙΝΑΚΑΣ 15). Λόγω των πολύ χαμηλών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου p53 δεν έγινε τιλοποίηση των θερμικών κύκλων. Οι αντιδράσεις RT-PCR πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer).

ΠΙΝΑΚΑΣ 15. Συνθήκες της ημιοσοτικής αντίδρασης RT-PCR για την ενίσχυση των γονιδίων της προθυμοσίνης α, της παραθυμοσίνης του p53 και της β-ακτίνης.

Κύκλοι	Θερμοκρασία και χρόνος
1 x	Αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription): 60°C για 30 min
1 x	Αποδιάταξη (preliminary denaturation): 94°C για 2 min
10 x	Αποδιάταξη (denaturation): 94°C για 30 sec Υβριδισμός (annealing): 50-66°C για 30 sec Επιμήκυνση (extension): 68°C για 45 sec
20 x	Αποδιάταξη: 94°C για 30 sec Υβριδισμός: 50-66°C για 30 sec Επιμήκυνση: 68°C για 45 sec + 5 sec ανά κύκλο
1 x	Τελική επιμήκυνση (final extension): 68°C για 3 min

Οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων και η σειρά με την οποία τοποθετούνται στον μικροφυγοκεντρικό σωλήνα 0.2 ml (Perkin Elmer) παρατίθενται στον ΠΙΝΑΚΑ 16. Πρέπει να τονιστεί ότι η πειραματική διαδικασία της RT-PCR εκτελείται σε καθαρούς χώρους με αποστειρωμένα υλικά για να αποφευχθεί επιμόλυνση των δειγμάτων.

Τα προϊόντα (10 μl) της RT-PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1.4%, οπτικοποιήθηκαν με βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογραφήθηκαν (KODAC digital science 120) σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας. Η ανάλυση και η σύγκριση της έντασης των ηλεκτροφορηθέντων προϊόντων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα Scion-Image (www.scioncorp.com). Η ένταση του σήματος (οπτική πυκνότητα) υπολογίστηκε για



όλα τα γονίδια σε όλα τα δείγματα. Τα επίπεδα έκφρασης της προθυμοσίνης α και της παραθυμοσίνης ομαλοποιήθηκαν με βάση τα επίπεδα της β-ακτίνης. Ο λόγος της έκφρασης της προθυμοσίνης α και της παραθυμοσίνης προς την β-ακτίνη υπολογίστηκε για όλα τα δείγματα της μελέτης. Με αυτόν τον τρόπο, οι υπάρχουσες διαφορές της αρχικής ποσότητας του εκμαγείου RNA ελαχιστοποιούνται και τα προϊόντα της RT-PCR καθίστανται συγκρίσιμα.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα SPSS (Version 10.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, USA). Τα επίπεδα έκφρασης κάθε πρωτεΐνης σε σχέση με τον ιστολογικό τύπο εκτιμήθηκαν με την μέθοδο ANOVA. Οι συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών και της ηλικίας ή του φύλου των ασθενών καθορίστηκαν με την μέθοδο Spearman. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά όταν η τιμή του P ήταν μικρότερη από 0.05.

ΠΙΝΑΚΑΣ 16. Συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της RT-PCR.		
Διάλυμα 1		
Αντιδραστήριο	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο νερό	έως 25 μl	
dNTPs mix	4 μl	0.2 mM (each)
DTT	2.5 μl	5 mM
Αναστολέας RNAσών	1 μl	5 U
Μίγμα εκκινήτων (10 μM each)	2 μl	0.4 μM (each)
Εκμαγείο RNA (template)	x μl	1 pg- 1 μg
Σύνολο	25 μl	-
Διάλυμα 2		
Αντιδραστήριο	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο νερό	14 μl	-
5x RT-PCR buffer	10 μl	1 x
Μίγμα ενζύμων (AMV and Expand)	1 μl	-
Σύνολο	25 μl	
Διάλυμα 1 + Διάλυμα 2 = 50 μl		



2.9. Πολυμορφισμοί διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP).

Η ανάλυση της διαμόρφωσης της μονόκλωνης δομής του DNA (SSCP) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων και πολυμορφισμών ενός γονιδίου. Σε μη-αποδιατακτικές συνθήκες η μονόκλωνη αλυσίδα του DNA λαμβάνει μια συγκεκριμένη δευτεροταγή δομή, η οποία καθορίζεται από ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις και κατ' επέκταση από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι μονόκλινα μόρια DNA που διαφέρουν κατά ένα νουκλεοτίδιο (βάση), μετακινούνται με διαφορετική ταχύτητα σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου λόγω αλλαγής της δευτεροταγούς δομής τους (Orita et al., 1989).

Η μέθοδος είναι ιδιαίτερα απλή και γρήγορη και περιλαμβάνει αρχικά την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), ακολουθεί αποδιάταξη του προϊόντος και στην συνέχεια ηλεκτροφόρηση σε πήγμα ακρυλαμιδίου. Η πήκτη βάφεται με χρώση νιτρικού αργύρου και εμφανίζονται οι ζώνες που αντιστοιχούν στα μονόκλινα μόρια DNA (ΣΧΗΜΑ 8).

Θεωρητικά όταν το τμήμα του DNA δεν φέρει μετάλλαξη εμφανίζονται δύο ζώνες που αντιστοιχούν στις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες ενώ στην περίπτωση σημειακής μετάλλαξης εμφανίζονται τέσσερις ζώνες που αντιστοιχούν δύο στη μεταλλαγμένη και δύο στην φυσιολογική αλληλουχία του DNA. Στις περισσότερες περιπτώσεις εμφανίζονται περισσότερες ζώνες από τις αναμενόμενες λόγω των διαφορετικών διαμορφώσεων που λαμβάνει το μονόκλινο DNA.

Η θερμοκρασία και η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου στην πήκτη με ή χωρίς γλυκερόλη, αποτελούν τις πιο κρίσιμες παραμέτρους της μεθόδου. Ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών της ηλεκτροφόρησης, μεταβάλλοντας τις παραπάνω παραμέτρους, αυξάνει την πιθανότητα ανίχνευσης μιας μετάλλαξης.

Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η ανίχνευση ψευδών μεταλλάξεων που οφείλονται στην εισαγωγή εσφαλμένης βάσης από την DNA πολυμεράση κατά την αντιγραφή και ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου με την PCR. Η επιλογή ενζύμου με



υψηλή επιδιορθωτική ενεργότητα (proofreading) μειώνει την πιθανότητα αυτή και αυξάνει την αξιοπιστία της αντιγραφής.

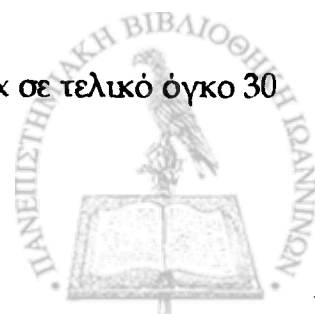
Στην παρούσα μελέτη με εκμαγείο ολικό RNA από θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς (FNA) παρασκευάστηκε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση και ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) για την ενίσχυση τμήματος του cDNA της προθυμοσίνης α μεγέθους 255 bp. Οι συνθήκες της αντίδρασης δίνονται στην παράγραφο 2. 8. 3. Η χρησιμοποίηση mRNA ως αρχικού υλικού προτιμάται γιατί επιτρέπει την ανίχνευση μεταλλάξεων σε μεγαλύτερα τμήματα της κωδικεύουσας περιοχής (exons) μιας πρωτεΐνης (Sarkar et al., 1992).

Το πρωτόκολλο της μεθόδου περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

α. Προετοιμασία της πηκτής (Glavac and Dean, 1993). Παρασκευάστηκε πηκτή ακρυλαμιδίου διαστάσεων 200 x 180 x 1 mm με τελικές συγκεντρώσεις: 7.5% ακρυλαμίδη (30% w/v, ακρυλαμίδη: δις-ακρυλαμίδη = 37.5:1, 2.6% C, Proto Gel, National Diagnostics), 5% γλυκερόλη (50%) (Merck), 0.5x TBE (10x) (TBE 5x/l: 54 gr Tris, 27.5 gr Boric acid, 20 ml EDTA 0.5 M, pH: 8), 6 μl/ml υπερθεϊκού αμμωνίου 10% (ammonium persulfate, APS, Sigma) και 0.7 μl/ml TEMED (Sigma). Στις παρενθέσεις αναφέρονται οι αρχικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων, τα οποία παρασκευάζονται κάθε εβδομάδα και διατηρούνται στους 4°C. Μετά τον πολυμερισμό, η πηκτή τοποθετείται τουλάχιστον μια ώρα πριν στον χώρο που θα γίνει η ηλεκτροφόρηση (θερμοκρασία δωματίου ή 4°C) ώστε να εξασφαλιστεί ομοιόμορφη θερμοκρασία σε όλη την επιφάνεια.

Η πηκτή ακρυλαμιδίου είναι πολύ ευαίσθητη στους χειρισμούς με τα χέρια και καταστρέφεται εύκολα. Αυτό μπορεί να αποθευχθεί με την παρασκευή συνθετικής πηκτής ακρυλαμιδίου-αγαρόζης σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Peng et al. (1995), το οποίο περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

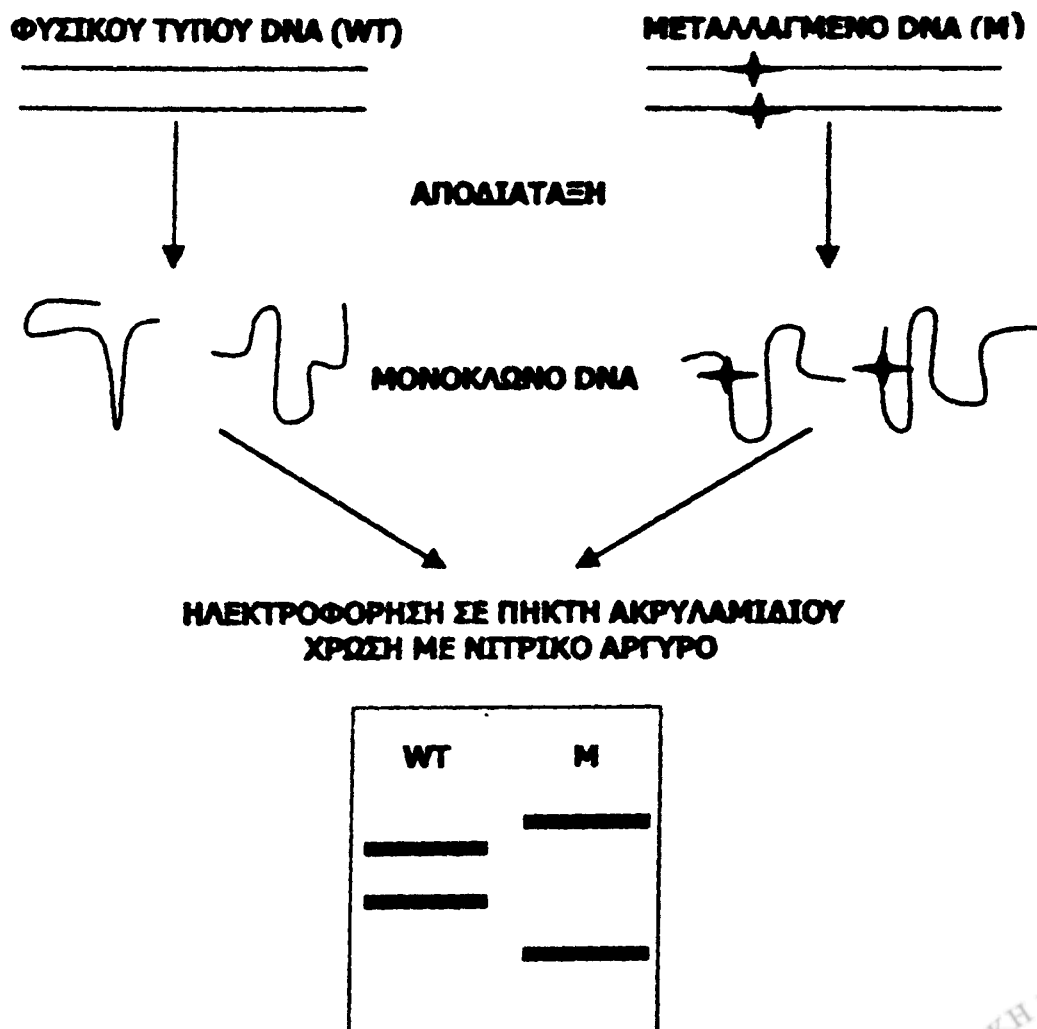
- Παρασκευάζεται διάλυμα A που περιέχει 14% ακρυλαμιδίου (30% w/v, ακρυλαμίδη: δις-ακρυλαμίδη = 37.5:1, 2.6% C) και 5% γλυκερόλη (50%) σε τελικό όγκο 30 ml. Το διάλυμα επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 30°C για 5 min.
- Παρασκευάζεται διάλυμα B που περιέχει 0.5% αγαρόζη σε TBE 2x σε τελικό όγκο 30 ml. Το διάλυμα επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 30°C για 5 min.



• Τα διαλύματα Α και Β αναμιγνύονται και προστίθενται 200 μl APS 10% και 20 μl TEMED. Το μίγμα τοποθετείται άμεσα σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να πήξει τουλάχιστον για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4°C.

β. Προετοιμασία των δειγμάτων. Το προϊόν της αντίδρασης RT-PCR (3μl, 10-20 ng/μl) αναμιγνύεται με διάλυμα φόρτωσης (95% φορμαμίδιο, 5 mM NaOH, 0.1% κυανό της ξυλόλης, 0.1% μπλε της βρωμοφαινόλης) σε αναλογία 1:2. Τα δείγματα επωάζονται στους 99°C (αποδιάταξη) για 5 min, ψύχονται σε πάγο για άλλα 5 min και στην συνέχεια τοποθετούνται στην πηκτή.

γ. Συνθήκες ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση διεξάγεται σε σταθερή τάση 130 Volt (5-10 V/cm) για 12 ώρες στους 4°C min ή σε θερμοκρασία δωματίου σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1x.



ΣΧΗΜΑ 8. Σχηματική ανάλυση της μεθόδου SSCP.



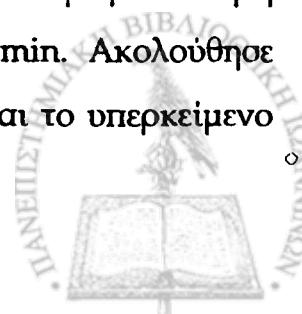
δ. Η χρώση με νιτρικό άργυρο (AgNO_3) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Peng et al. (1995) και περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- Η μονιμοποίηση των δειγμάτων της πηκτής επιτυγχάνεται με διάλυμα που περιέχει 12% οξικό οξύ, 50% μεθανόλη και 0.02% φορμαλδεΐδη, υπό ήπια ανάδευση για 2-12 h.
- Η πηκτή ξεπλένεται δύο φορές με διάλυμα 50% αιθανόλης για 20 min κάθε φορά.
- Ακολουθεί ανάδευση της πηκτής σε διάλυμα 0.02% sodium thiosulfate για 1 min και ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό για 3 φορές.
- Στην συνέχεια προστίθενται το διάλυμα της χρωστικής που περιέχει 0.2% AgNO_3 (Riedel-deHaen) και 0.03% φορμαλδεΐδη. Ακολουθεί ανάδευση για 30 min και στην συνέχεια ξεπλένεται δύο φορές με απεσταγμένο νερό. Τα υγρά απομακρύνονται με αντλία κενού γιατί η επαφή με τα χέρια έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία artefacts.
- Προστίθενται το διάλυμα εμφάνισης (developing solution) που περιέχει 6% Na_2CO_3 , 0.02% φορμαλδεΐδη και 0.0005% sodium thiosulfate. Οι επιθυμητές ζώνες εμφανίζονται σε 10-15 min ενώ η πηκτή λαμβάνει ένα σκούρο καφέ χρώμα.
- Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος 50% μεθανόλης και 16% οξικού οξέος και ακολουθεί η παρατήρηση και η φωτογράφιση της πηκτής.

2.10. Συναγωνιστική ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοροφητική μέτρηση (Competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA).

Η μέτρηση της προθυμοσίνης α στον ορό και σε κυτταρικά εκχυλίσματα θυρεοειδικού ιστού πραγματοποιήθηκε με συναγωνιστική ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοροφητική μέθοδο με την χρήση αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της προθυμοσίνης α ανθρώπου (87-109 αμινοξέα). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών υπό την επίβλεψη του Επικ. Καθηγητή Α. Αλετρά.

Ο θυρεοειδικός ιστός εκχυλίστηκε με διάλυμα PBS pH: 7.4 που περιέχει 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ απροτινίνης (αναστολέας πρωτεασών) και ομογενοποιήθηκε σε ομογενοποιητή Polytron (Kinematika, Switzerland) στις μέγιστες στροφές για 3 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του ομογενοποιημένου στις 15000 rpm για 15 min και το υπερκείμενο



φυγοκεντρήθηκε εκ νέου στις ίδιες συνθήκες. Το τελικό υπερκείμενο αποθηκεύτηκε στους -20°C (Costopoulou et al., 1998).

Ο ορός (1 ml) συλλέχθηκε από φρέσκο περιφερικό αίμα, το οποίο προηγουμένως φυγοκεντρήθηκε στις 3000 rpm για 10 min σε ειδικούς σωλήνες (serum separator tubes).

Το πρωτόκολλο της μεθόδου περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

α. Προετοιμασία των δειγμάτων του ορού και του ομογενοποιημένου ιστού.

- Προστίθενται 150 μl διαλύματος 10% τριφθοροξικού οξέως (TFA, CF_3COOH) σε 1 ml ορού. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται εξισορρόπηση του pH του δείγματος (οξίνιση) στο 2.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση (μέγιστες στροφές) για 10 sec και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα.

β. Προετοιμασία της στήλης εμπλουτισμού (Sep-Pak Vac 1 cc, C-18 Cartridges, Waters).

- Έκλουση της στήλης με 2 ml διαλύματος ακετονιτριλίου (CH_3CN).
- Εξισορρόπηση της στήλης με 2 ml διαλύματος 0.02% TFA.
- Έκλουση 1 ml δείγματος με χαμηλή ροή.
- Έκπλυση της στήλης με 6 ml διαλύματος 0.02% TFA.
- Έκλουση της στήλης με 2 ml διαλύματος που περιέχει 0.02% TFA και 80% ακετονιτρίλιο. Το διάλυμα συλλέγεται σε καθαρό σωλήνα και λυοφιλοποιείται σε συσκευή speed-vac.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται με 1 ml απεσταγμένο νερό και λυοφιλοποιείται άλλες δύο φορές για να απομακρυνθεί πλήρως το TFA.

γ. Συναγωνιστική ELISA (ΣΧΗΜΑ 9).

- Επίστρωση (Coating) με 50 μl ανά υποδοχή της πλάκας πολυστυρονίου (PS microplate 96 well, Microton, Greiner) διαλύματος που περιέχει: 2.5 ng προθυμοσίνης α (καρβοξυτελικό πεπτίδιο, 87-109), 10 ng Poly-L-Lys και απεσταγμένο H_2O . Η αυτόνομη δέσμευση της αρνητικά φορτισμένης πρωτεΐνης στην υποδοχή είναι δυνατή μόνο με την προσθήκη της θετικά φορτισμένης Poly-L-Lys. Το πινάκιο ξηραίνεται στους 60°C για 4 h.
- Προσθήκη 100 μl ανά υποδοχή διαλύματος γλουταραλδεύδης 0.5% v/v σε διάλυμα 0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH: 8.5. Η γλουταραλδεύδη επιτρέπει την ομοιοπολική σύνδεση



μεταξύ της προθυμοσίνης α και της Poly-L-Lys και την ακινητοποίηση τους στο πολυστυρόλιο. Μετά από 30 min σε θερμοκρασία δωματίου το διάλυμα απομακρύνεται.

- Προστίθενται 100 μl αιθανολαμίνης 1 M (pH: 8) ανά υποδοχή για την κάλυψη των ελεύθερων αλδεϋδομάδων. Μετά από 30 min σε θερμοκρασία δωματίου το διάλυμα απομακρύνεται.

- Δέσμευση (blocking) των ελεύθερων θέσεων της υποδοχής με επώαση για 1 h στους 37°C με 200 μl διαλύματος 4% BSA και NaH₂PO₄·2H₂O 0.1 M. Ακολουθεί έκπλυση με 200 μl ανά υποδοχή διαλύματος PBS-Tween 20 (2 φορές).

- Προσθήκη 100 μl ανά υποδοχή διαλύματος που περιέχει το 1^ο αντίσωμα (rabbit IgG, anti-καρβόξυ-τελικό πεπτιδίο) σε συγκέντρωση 0.2 μg/ml αραιωμένο σε διάλυμα PBS (NaCl)⁺-Tween 20 και το δείγμα. Ακολουθεί επώαση στους 4°C για 16 h και στην συνέχεια έκπλυση με 200 μl ανά υποδοχή διαλύματος PBS-Tween 20 (4 φορές).

- Επιστροφή με το 2^ο αντίσωμα το οποίο είναι συνδεδεμένο με υπεροξειδάση (goat anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase conjugated, Chemicon). Τοποθετούνται 100 μl αντισώματος διαλυμένο σε PBS-Tween 20 (1:5000) ανά υποδοχή. Ακολουθεί επώαση για 2 h στους 37°C και στην συνέχεια έκπλυση με 200 μl ανά υποδοχή διαλύματος PBS-Tween 20 (4 φορές).

- Προσθήκη 100 μl διαλύματος ανά υποδοχή που περιέχει 2 mg/ml χρωστικής o-phenylenediamine (OPD, PIERCE) σε διάλυμα κιτρικών 0.1 M pH: 5 και 1 μl/ml υποστρώματος υπεροξειδάσης (H₂O₂). Η αντίδραση εκτελείται σε σκοτεινό χώρο για 30 min.

- Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 100 μl ανά υποδοχή διαλύματος H₂SO₄.

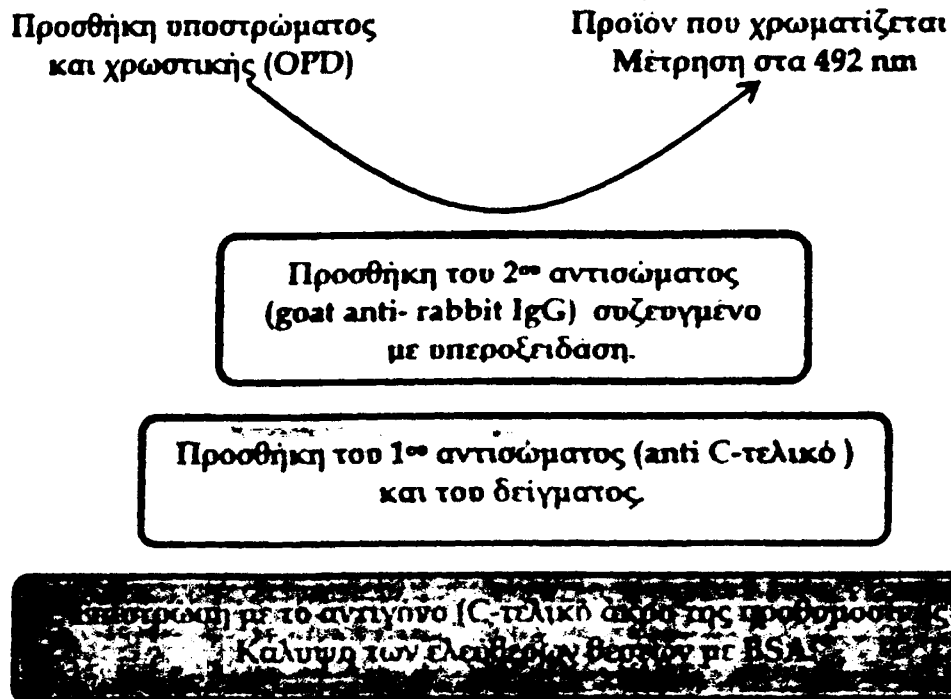
δ. Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 492 nm (φωτόμετρο DENLEY WELLSCAN).

Το επί % ποσοστό της αναστολής υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ Αναστολή (Inhibition)} = \left(1 - \frac{\text{O.D. δείγματος} - \text{O.D. τυφλού}}{\text{O.D. μάρτυρα} - \text{O.D. τυφλού}} \right) \times 100$$

όπου O.D.: οπτική πυκνότητα (optical density).





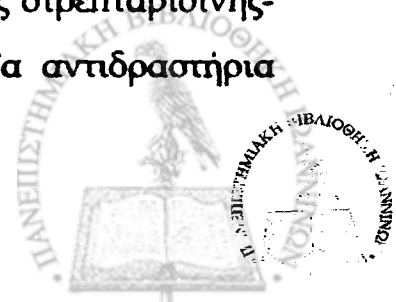
ΣΧΗΜΑ 9. Σχηματική ανάλυση της συναγωνιστικής ενζυμοσύνδετης ανοσοπροσοφητικής μέτρησης (Competitive Inhibition ELISA).

Η πρότυπη καμπύλη αναστολής καθορίστηκε με βάση γνωστές συγκεντρώσεις καθαρής προθυμοσίνης α που προστίθεντο στο 1^ο αντίσωμα (0.5, 1, 2, 4, 6, 10, 20, 40 και 80 pmol ανά υποδοχή). Προέκυψε μια σιγμοειδής καμπύλη από την οποία καθίστανται δυνατή η ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης σε συγκεντρώσεις από 10-100 pmol/ml.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα SPSS Version 10.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, USA).

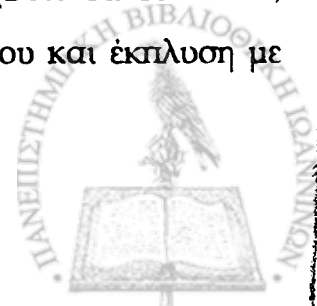
2.11. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης της προθυμοσίνης α, του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67, των μεταγραφικών παραγόντων E2F-1 και p53 και των αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bax σε ιστολογικές τομές παραφίνης.

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη έγινε σε ιστολογικές τομές 5 μm μονιμοποιημένες σε φορμόλη και εγκλεισμένες σε παραφίνη. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος στρεπταβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης (labeled streptavidin biotin peroxidase). Τα αντιδραστήρια



που χρησιμοποιήθηκαν είναι από το πακέτο υλικών Super Sensitive Immunodetection System της BioGenex. Το πρωτόκολο της μεθόδου περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- Προετοιμασία των πλακιδίων για αποπαραφινοποίηση των τομών με ολονύκτια επώαση στους 55°C.
- Αποπαραφινοποίηση των τομών με διαδοχικές εμβαπτίσεις των πλακιδίων σε ξυλόλη για 15 min (2 φορές), 100% αιθανόλη για 2 min (2 φορές), 96% αιθανόλη για 2 min (3 φορές) και ενυδάτωση σε απεσταγμένο νερό.
- Αποκατάσταση της αντιγονικότητας του ιστού (antigen retrieval pretreatment) με θέρμανση των πλακιδίων σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών 10 mM, pH: 6 σε φούρνο μικροκυμάτων (750 W) για 15 min (2 φορές). Ακολουθεί έκπλυση με διάλυμα PBS για 5 min.
- Αδρανοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης με επώαση των τομών με διάλυμα 3% H₂O₂ για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πλακίδια ξεπλένονται σε διάλυμα PBS για 5 min.
- Επιστροφή των πλακιδίων με διάλυμα καζεΐνης (Power Block Reagent) και επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η καζεΐνη συνδέεται με μη ειδικές πρωτεΐνες (protein block) και μειώνεται η πιθανότητα μη-ειδικής χρώσης της τομής. Έκπλυση με διάλυμα PBS για 5 min.
- Προσθήκη του 1^{ου} αντισώματος. Η αραίωση, η θερμοκρασία και ο χρόνος επώασης για κάθε αντίσωμα παρατίθενται στον ΠΙΝΑΚΑ 17. Μετά το πέρας της επώασης οι τομές ξεπλένονται με διάλυμα PBS για 5 min.
- Ακολουθεί η προσθήκη του 2^{ου} βιοτινυλιωμένου αντισώματος αραιωμένου σε PBS (Multilink, QD200-OX). Οι τομές επώάζονται για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια ξεπλένονται σε διάλυμα PBS για 5 min.
- Επώαση των τομών με διάλυμα στρεπταβιδίνης συνδεδεμένης με υπεροξειδάση σε PBS (horseradish peroxidase conjugated streptavidin, QD200-OX) για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί έκπλυση με διάλυμα PBS για 5 min.
- Προσθήκη του διαλύματος που περιέχει το υπόστρωμα (H₂O₂) και τη χρωμογόνο ουσία διαμινοβενζιδίνη (3,3'-diaminobenzidine chromogen, DAB) (DAB substrate kit, QD200-OX). Ακολουθεί επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και έκπλυση με



διάλυμα PBS για 5 min. Η DAB είναι εξαιρετικά καρκινογόνος χρωστική και η χρήση της απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή.

ΠΙΝΑΚΑΣ 17. Αραίωση, χρόνος και θερμοκρασία επώασης των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοϊστοχημική μελέτη. (RT: θερμοκρασία δωματίου).

Αντίσωμα	Αραίωση	Χρόνος επώασης	Θερμοκρασία επώασης	Προέλευση του αντιώματος
Προθυμοσίνη α	1:300	2 h	RT	Τμήμα Χημείας Παν. Πατρών
Ki-67	1:25	1 h	RT	Dako, Denmark
E2F-1	1:25	2 h	RT	Santa Cruz, USA
p53	1:25	1 h	RT	Dako, Denmark
Bcl-2	1:40	12 h	4°C	Dako, Denmark
Bax	1:40	2 h	RT	Dako, Denmark

- Τα κύτταρα χρωματίζονται με διάλυμα αιματοξυλίνης (Mayer's hematoxylin counter-stain) για 1.5 min και ακολουθεί αφυδάτωση των τομών με διαδοχικές εμβαπτίσεις σε διαλύματα αιθανόλης 70%, 96% και 100%.
- Τα πλακίδια επιστρώνονται με μονιμοποιητικό υλικό και καλύπτονται με καλυπτρίδες (microscopic glass cover slips, STEPS).

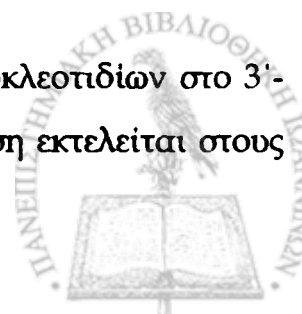
Η παρατήρηση των ιστολογικών τομών και η καταμέτρηση των κυττάρων έγινε σε οπτικό μικροσκόπιο (OLYMPUS) με αντικειμενικό φακό x 40 σε συνεργασία με την Καθηγήτρια κ. Β. Μαλάμου-Μήτση. Μελετήθηκαν 5 οπτικά πεδία ανά πλακίδιο και μετρήθηκαν τουλάχιστον 1000 κύτταρα σε κάθε περίπτωση. Για τις πρωτεΐνες προθυμοσίνη α, E2F-1, p53 και το πυρηνικό αντιγόνο Ki-67, θετικές χαρακτηρίστηκαν οι περιπτώσεις των κυττάρων με έντονη πυρηνική χρώση. Κύτταρα θετικά για τις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bax θεωρήθηκαν αυτά με έντονη κυτταροπλασματική χρώση. Η έκφραση κάθε πρωτεΐνης προσδιορίστηκε ως η μέση εκατοστιαία αναλογία των θετικών κυττάρων προς τον συνολικό αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν. Επιπλέον, για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, η έκφραση των πρωτεϊνών p53, Bcl-2 και Bax θεωρήθηκε θετική όταν το ποσοστό των ανοσοδραστικών κυττάρων ήταν μεγαλύτερο από 10%.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα SPSS (Version 10.0 for Windows, SPSS Inc.). Οι διαφορές της έκφρασης κάθε πρωτεΐνης ανάμεσα στους ιστολογικούς τύπους που μελετήθηκαν εκτιμήθηκαν με την μέθοδο Kruskal-Wallis. Οι συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών καθορίστηκαν με τις στατιστικές μεθόδους Pearson και Spearman. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά όταν η τιμή του P ήταν μικρότερη από 0.05.

2.12. In situ ανίχνευση της απόπτωσης.

Η in situ ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων στις ιστολογικές τομές παραφίνης έγινε με την μέθοδο TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated X-dUTP nick-end labeling) με το πακέτο υλικών ApoTag peroxidase kit (Oncor, Carbiochem). Κατά την ολοκλήρωση της αποπτωτικής διαδικασίας το γενωματικό DNA αποδομείται (fragmentation) σε μικρά κλάσματα τα οποία δίνουν την γνωστή εικόνα δίκην επιχρίσματος (smear) κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Kerr et al., 1972, 1995). Η μέθοδος TUNEL βασίζεται στην ενσωμάτωση σημασμένων με διγοξιγενίνη νουκλεοτιδίων (dUTP) στο 3'-OH άκρο των κλασμάτων του DNA παρουσία του ενζύμου TdT (Gold et al., 1993). Το πρωτόκολλο της μεθόδου περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

- Αποπαραφίνοποίηση των τομών με διαδοχικές εμβαπτίσεις των πλακιδίων σε ξυλόλη για 10 min (2 φορές), 100% αιθανόλη για 5 min (2 φορές), 96% αιθανόλη για 3 min (1 φορά), και 70% αιθανόλη για 3 min (1 φορά). Ακολουθεί έκπλυση των πλακιδίων με διάλυμα PBS για 5 min.
- Επώαση των τομών με διάλυμα πρωτεΐνάσης K (16 μg/ml) σε PBS για 25 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η μερική πέψη των πρωτεϊνών των ιστών έχει σαν αποτέλεσμα το DNA να γίνει προσιτό στο ένζυμο TdT.
- Αδρανοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης με επώαση των τομών με διάλυμα 3% H₂O₂ για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί έκπλυση σε διάλυμα PBS για 5 min (2 φορές).
- Ενσωμάτωση των σημασμένων με διγοξιγενίνη (Dig-dUTP) νουκλεοτιδίων στο 3'-OH άκρο τμημάτων DNA παρουσία του ενζύμου TdT. Η αντίδραση εκτελείται στους

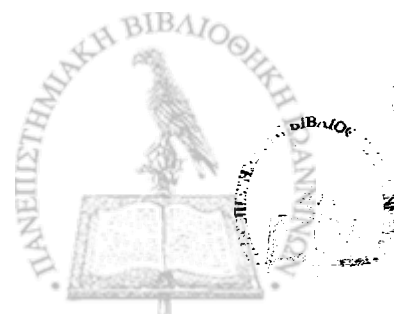


37°C για 1 h. Στην συνέχεια τα πλακίδια ξεπλένονται με διάλυμα PBS για 5 min (3 φορές).

- Προσθήκη του συμπλόκου αντισώματος αντι-διγοξιγενίνης-υπεροξειδάσης. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 30 min και στην συνέχεια έκπλυση με διάλυμα PBS για 5 min (4 φορές).
- Προσθήκη του διαλύματος που περιέχει το υπόστρωμα (H_2O_2) και τη χρωμογόνο ουσία διαμινοβενζιδίνη (3,3'-diaminobenzidine chromogen, DAB). Η αντίδραση εκτελείται σε θερμοκρασία δωματίου για 50 sec. Τα πλακίδια ξεπλένονται σε απεσταγμένο νερό για 1 min (3 φορές).
- Τα κύτταρα χρωματίζονται με διάλυμα αιματοξυλίνης (Mayer's hematoxylin counter-stain) για 2 min και ακολουθεί αφυδάτωση των τομών με διαδοχικές εμβαπτίσεις σε διαλύματα αιθανόλης 70%, 96% και 100%.
- Τα πλακίδια επιστρώνονται με μονιμοποιητικό υλικό και καλύπτονται με καλυπτρίδες (microscopic glass cover slips, STEPS).
- Ακολουθεί η παρατήρηση των πλακιδίων σε οπτικό μικροσκόπιο με αντικειμενικό φακό x 40 (OLYMPUS). Η καταμέτρηση των αποπτωτικών κυττάρων έγινε σε τουλάχιστον πέντε διαφορετικά πεδία ανά πλακίδιο (1000 κύτταρα). Ως αποπτωτικός δείκτης ορίστηκε η εκατοστιαία αναλογία των κυττάρων που αποπίπτουν προς τον συνολικό αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν. Αποπτωτικά κύτταρα θεωρήθηκαν:
α. τα TUNEL-θετικά κύτταρα (με ή χωρίς μορφολογικούς χαρακτήρες απόπτωσης) και
β. τα TUNEL-αρνητικά κύτταρα με μορφολογικούς χαρακτήρες απόπτωσης. Οι νεκρωτικές περιοχές αποκλείστηκαν από την καταμέτρηση.

Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές από λεμφαδενίτιδες με υπερπλαστικά δευτερογενή λεμφοζίδια που είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν θετική αντίδραση, ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές από το ίδιο υλικό στις οποίες παραλήφθηκε η εφαρμογή του ενζύμου TdT.

Ο αποπτωτικός δείκτης συμπεριλήφθηκε στην στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημείας που αναφέρεται στην παράγραφο 2.11.



3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

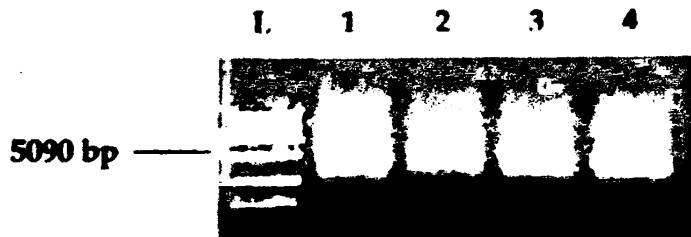
3.1.1. Ανίχνευση του λειτουργικού γονιδίου της προθυμοσίνης α από λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος και θυλακιώδη κύτταρα θυρεοειδούς αδένα (FNA).

Η προθυμοσίνη α κωδικοποιείται από μια οικογένεια έξι γονιδίων από τα οποία το ένα είναι λειτουργικό ενώ τα άλλα πέντε στερούνται ιντρονίων και χαρακτηρίζονται ως ψευδογονίδια (Manrow et al., 1992). Απομονώθηκε γονιδιωματικό DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος με την μέθοδο Miller et al. (1998) και από τα θυλακιώδη κύτταρα του αδένα (FNA) με το πακέτο υλικών της Hybaid. Η ειδική ενίσχυση (specific amplification) του λειτουργικού γονιδίου της προθυμοσίνης α πραγματοποιήθηκε με αντίδραση PCR με την επιλογή κατάλληλου ζεύγους εκκινητών (παράγραφος 2. 8. 2). Το 5'-άκρο του κωδικεύοντος (sense) εκκινητή περιλαμβάνει τμήμα του υποκινητή του λειτουργικού γονιδίου, του οποίου η αλληλουχία διαφέρει και στα πέντε ψευδογονίδια. Στις ΕΙΚΟΝΕΣ 6 και 7 απεικονίζεται μια ζώνη μεγέθους ~ 5 Kb που αντιστοιχεί στο λειτουργικό γονίδιο της προθυμοσίνης α όπως ανιχνεύθηκε σε δείγματα περιφερικού αίματος και σε θυλακιώδη κύτταρα από το υλικό της παρακέντησης (FNA) αντίστοιχα.

3.1.2. Μελέτη της έκφρασης της προθυμοσίνης α και της παραθυμοσίνης με ημι-ποσοτική RT-PCR σε δείγματα FNA με απλή οζώδη βρογχοκήλη και σε τομές παραφίνης με καλοήθεις και κακοήθεις παθήσεις του θυρεοειδούς.

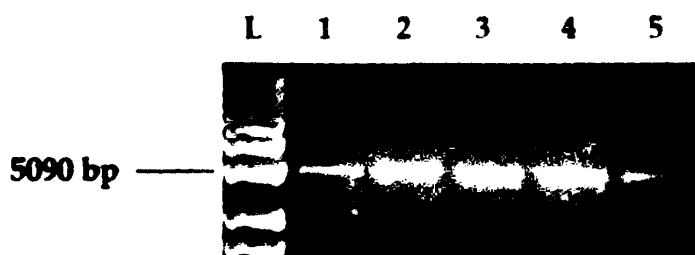
Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων της προθυμοσίνης α, της παραθυμοσίνης και του γονιδίου p53 πραγματοποιήθηκε με ημι-ποσοτική αντίδραση RT-PCR ενός βήματος σε δείγματα FNA ασθενών με απλή οζώδη βρογχοκήλη (n = 18). Χειρουργικά παρασκευάσματα (n = 4) φυσιολογικού θυρεοειδικού ιστού παρακεντήθηκαν και αποτέλεσαν τους μάρτυρες για την συγκεκριμένη μελέτη. Επιπλέον η έκφραση της προθυμοσίνης α μελετήθηκε σε ιστολογικές τομές παραφίνης με καλοήθη και κακοήθη νεοπλασμάτα του αδένα.





ΕΙΚΟΝΑ 6. Ειδική ενίσχυση του λειτουργικού γονιδίου της προθυμοσίνης α σε δείγματα περιφερικού αίματος. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πηκτή αгарόζης 1.4%. Στις διαδρομές 1-4 απεικονίζεται μια ζώνη μεγέθους ~ 5 Kb που αντιστοιχεί στο λειτουργικό γονίδιο της προθυμοσίνης α .

L: 1 Kb DNA ladder.



ΕΙΚΟΝΑ 7. Ειδική ενίσχυση του λειτουργικού γονιδίου της προθυμοσίνης α στον θυρεοειδή αδένα (FNA). Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πηκτή αгарόζης 1.4%. Στις διαδρομές 1-5 απεικονίζεται μια ζώνη μεγέθους ~ 5 Kb που αντιστοιχεί στο λειτουργικό γονίδιο της προθυμοσίνης α .

L: 1 Kb DNA ladder.

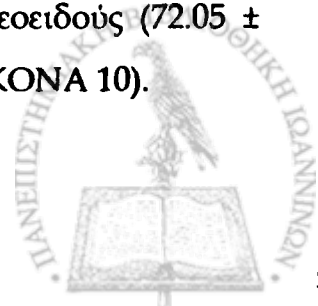
Ο τερματισμός της ημι-ποσοτικής αντίδρασης RT-PCR κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης ενίσχυσης του προϊόντος αποτέλεσε την σημαντικότερη προϋπόθεση για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Η κινητική της αντίδρασης RT-PCR για κάθε γονίδιο μελετήθηκε σε αυξανόμενους θερμικούς κύκλους και στην συνέχεια καθορίστηκε το αντίστοιχο θερμικό προφίλ (ΕΙΚΟΝΑ 8).

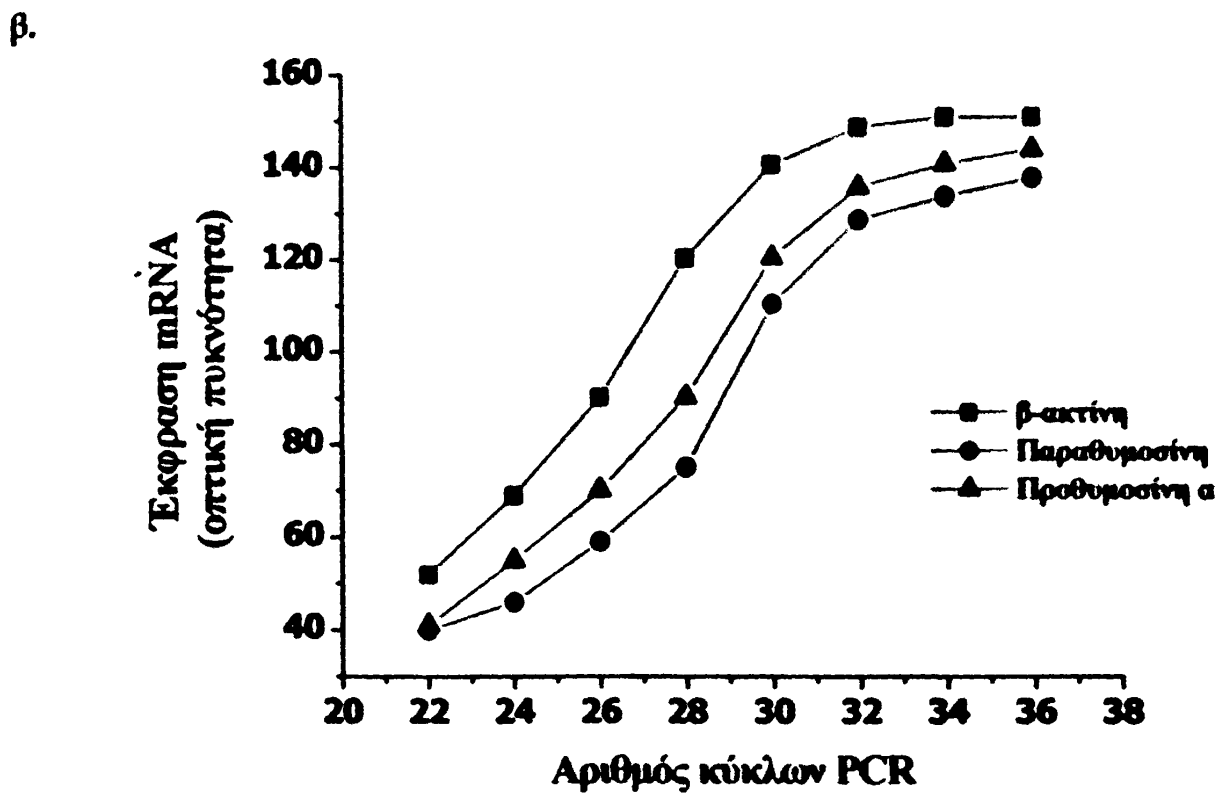
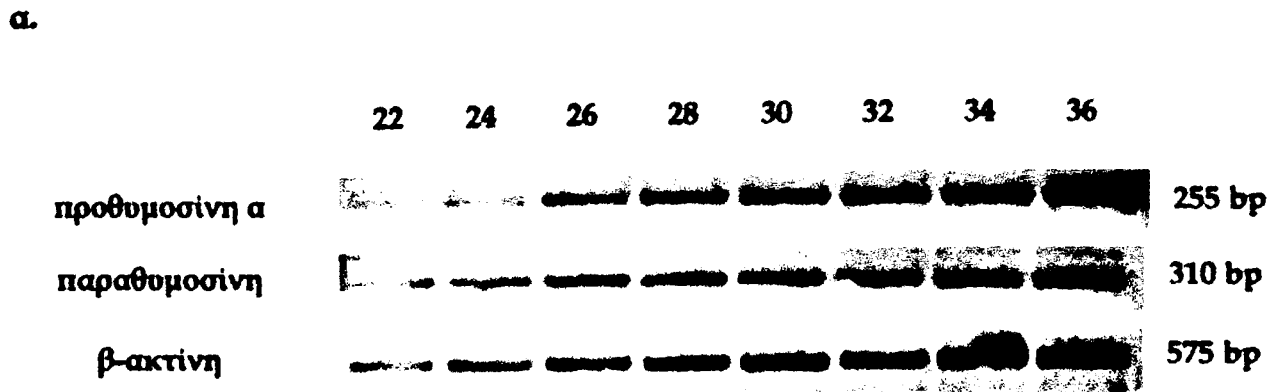
Η ένταση του σήματος (οπτική πυκνότητα) του προϊόντος της αντίδρασης υπολογίστηκε για όλα τα γονίδια σε όλα τα δείγματα (ΕΙΚΟΝΑ 9). Το γονίδιο p53 δεν εκφράζεται στον φυσιολογικό ιστό και στην απλή οζώδη βρογχοκήλη. Η θετική έκφραση του γονιδίου της β-ακτίνης (εσωτερικός μάρτυρας) σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν έδειξε ότι το υλικό της παρακέντησης που παρέμεινε στην βελόνη μετά την βιοψία ήταν αρκετό για την απομονώση ολικού RNA. Ωστόσο, για να ελαχιστοποιηθούν οι διαφορές στην αρχική ποσότητα του εκμαγείου RNA και τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους, τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών ομαλοποιήθηκαν ως προς αυτά της β-ακτίνης (ΣΧΗΜΑ 10).

Ο λόγος της έκφρασης προθυμοσίνη α/β-ακτίνη βρέθηκε σημαντικά υψηλότερος στην απλή οζώδη βρογχοκήλη (61.05 ± 12.42) σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό (47.50 ± 13.25) ($p = 0.03$). Ο αντίστοιχος λόγος για την παραθυμοσίνη βρέθηκε σημαντικά υψηλότερος στην απλή οζώδη βρογχοκήλη (77.61 ± 13.81) σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό (58.75 ± 13.25) ($p = 0.007$). Η παραθυμοσίνη διαπιστώθηκε ότι εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με την προθυμοσίνη α σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν (φυσιολογικό ιστό, απλή οζώδη βρογχοκήλη) ($p = 0.002$) (ΣΧΗΜΑ 11).

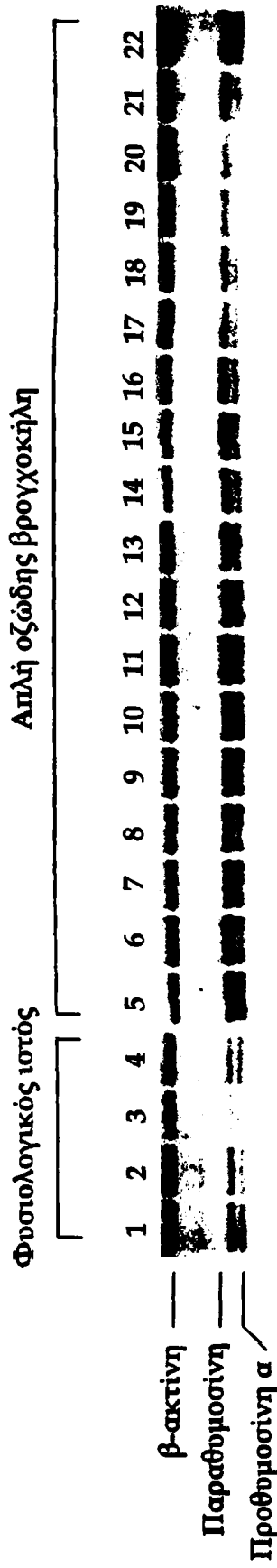
Τα επίπεδα της προθυμοσίνης α παραλληλίζονται με τα αντίστοιχα της παραθυμοσίνης σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν, γεγονός που πιθανότατα σχετίζεται κοινό μηχανισμό δράσης των δύο πρωτεϊνών (ΣΧΗΜΑ 10).

Η έκφραση της προθυμοσίνης α μελετήθηκε επίσης σε ιστολογικές τομές παραφίνης από κακοήθη νεοπλάσματα του θυρεοειδούς αδένα. Επιτυχής απομόνωση μη κατακερματισμένου RNA πραγματοποιήθηκε στις 5 από τις 11 περιπτώσεις καρκίνου του θυρεοειδούς (45%). Τα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης (λόγος προθυμοσίνη α/β-ακτίνη) μετρήθηκαν σημαντικά υψηλότερα στον καρκίνο του θυρεοειδούς (72.05 ± 11.72) σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό (53.50 ± 10.34) ($p = 0.007$) (ΕΙΚΟΝΑ 10).



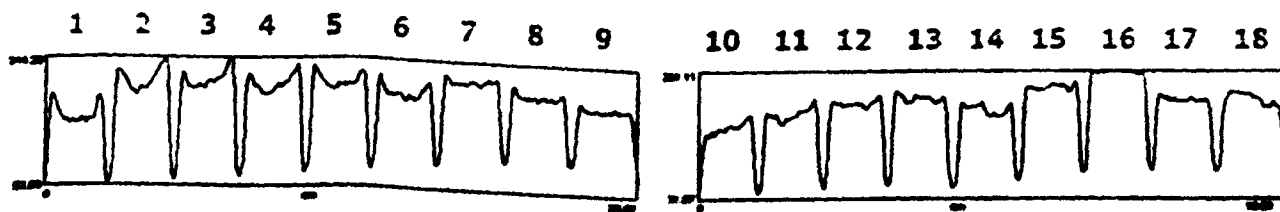


ΕΙΚΟΝΑ 8. Μελέτη της κινητικής της RT-PCR για τα γονίδια της προθυμοσίνης α, της παραθυμοσίνης και της β-ακτίνης. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της RT-PCR προϋποθέτει τον τερματισμό της αντίδρασης κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης ενίσχυσης (exponential phase) του προϊόντος. Μετά από επαναλαμβανόμενες αντιδράσεις με αυξανόμενους θερμικούς κύκλους (22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36) προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες θερμικές συνθήκες ενίσχυσης κάθε γονιδίου (30 κύκλοι). α. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης RT-PCR των γονιδίων της προθυμοσίνης α (255 bp), της παραθυμοσίνης (310bp) και της β-ακτίνης (575 bp) σε πηκτή αγαρόζης 1.4%. β. Γραφική παράσταση της κινητικής της αντίδρασης RT-PCR για τα γονίδια της προθυμοσίνης α, της παραθυμοσίνης και της β-ακτίνης.



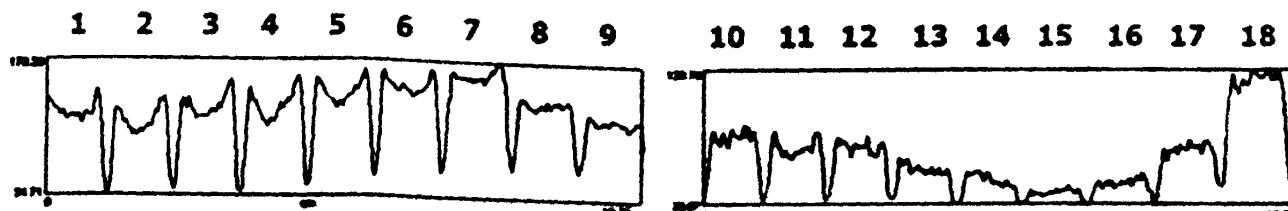
ΕΙΚΟΝΑ 9. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης RT-PCR των γονιδίων της β-ακτίνης (575 bp), της παραθυροσίνης (310 bp) και της προθυροσίνης α (255 bp). Θέσεις 1-4: δείγματα φυσιολογικού θυρεοειδικού ιστού, θέσεις 5-22: δείγματα παρακέντησης (FNA) από ασθενείς με απλή οζώδη βρογχοκλήλη. Τα προϊόντα (10 μl) της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1.4%, οπτικοποιήθηκαν με βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογραφήθηκαν σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας. Η ανάλυση και η σύγκριση της έντασης των ηλεκτροφορηθέντων προϊόντων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα Scion-Image και ο λόγος της έκφρασης της προθυροσίνης α και της παραθυροσίνης προς την β-ακτίνη υπολογίστηκε σε όλες τις περιπτώσεις.

α.



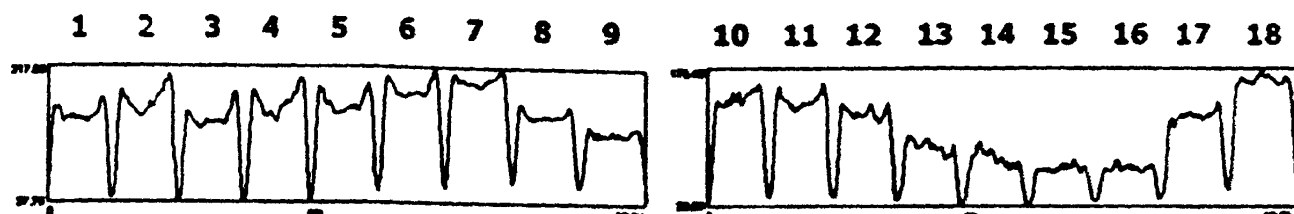
Επίπεδα mRNA β-ακτίνης

β.



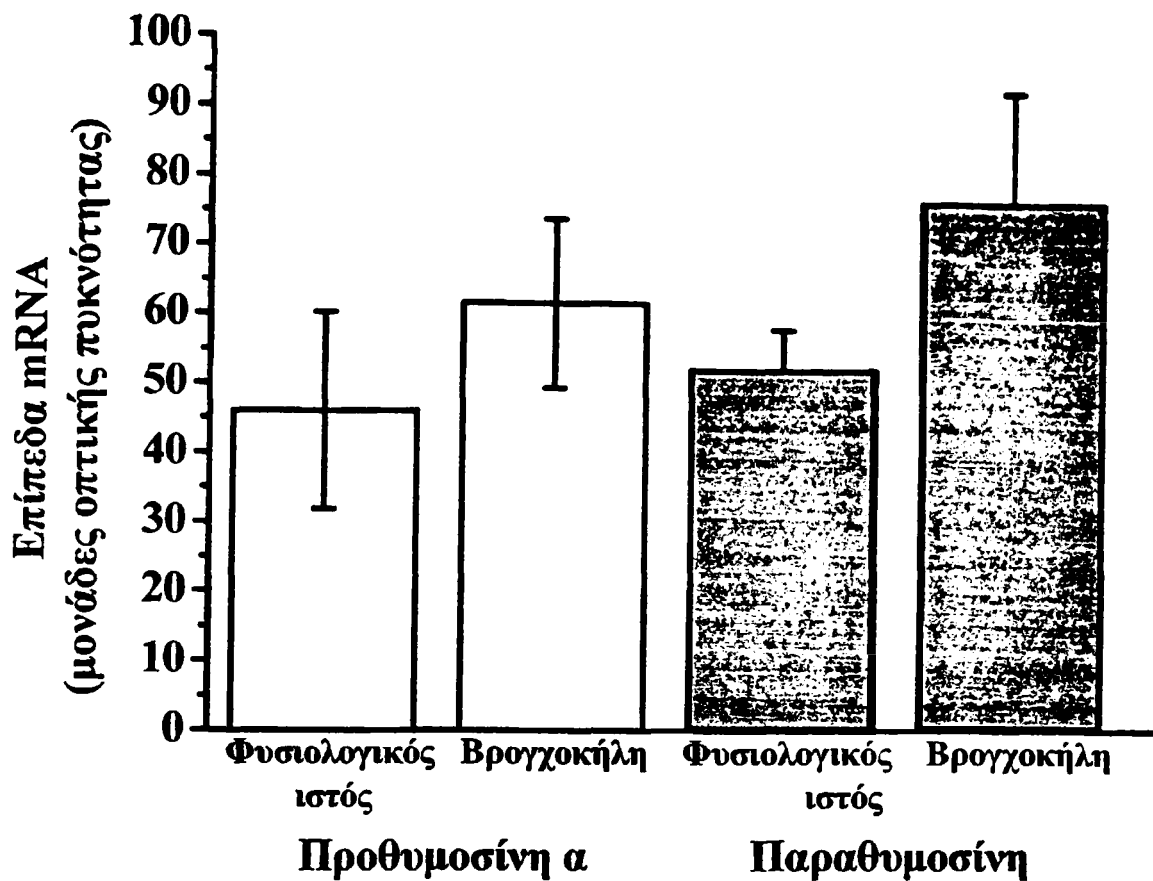
Επίπεδα mRNA προθυμοσίνης α

γ.



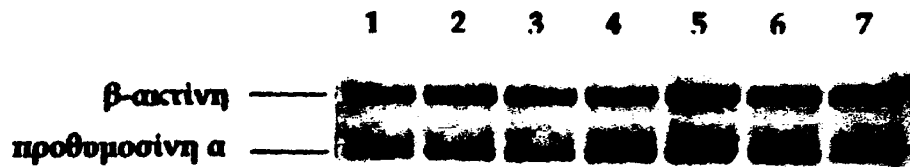
Επίπεδα mRNA παραθυμοσίνης

ΣΧΗΜΑ 10. Γραφική παράσταση των επιπέδων (α) της β-ακτίνης, (β) της προθυμοσίνης α και (γ) της παραθυμοσίνης σε δείγματα FNA ($n = 18$) ασθενών με απλή οξώδη βρογχοκήλη. Τα γραφήματα είναι αποτέλεσμα της ανάλυσης της έντασης των ηλεκτροφορηθέντων προϊόντων της αντίδρασης RT-PCR με το λογισμικό πρόγραμμα Scion-Image. Τα επίπεδα έκφρασης της β-ακτίνης κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα στα περισσότερα δείγματα FNAB που μελετήθηκαν και θεωρητικά αντιστοιχούν στην ίδια αρχική ποσότητα εκμαγείου RNA που χρησιμοποιήθηκε. Ωστόσο, για την ανάλυση και σύγκριση των αποτελεσμάτων, τα επίπεδα έκφρασης της προθυμοσίνης α και της παραθυμοσίνης ομαλοποιήθηκαν με βάση τα επίπεδα της β-ακτίνης για να ελαχιστοποιηθούν οι μικρές διαφορές της αρχικής ποσότητας του RNA. Τα επίπεδα της παραθυμοσίνης ακολουθούν τα επίπεδα της προθυμοσίνης α σε όλα τα δείγματα FNAB που μελετήθηκαν, γεγονός που πιθανότατα έχει σχέση με την συμμετοχή των δύο πρωτεϊνών σε κοινούς δρόμους του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.



ΣΧΗΜΑ 11. Επίπεδα mRNA της προθυμοσίνης α και της παραθυμοσίνης στον φυσιολογικό ιστό (n = 4) και στην απλή οζώδη βρογχοκήλη (n = 18). Η προθυμοσίνη α και η παραθυμοσίνη υπερεκφράζονται στην απλή οζώδη βρογχοκήλη σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό (P = 0.03, P = 0.007). Επιπλέον τα επίπεδα της παραθυμοσίνης βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα από τα αντίστοιχα της προθυμοσίνης α σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν (P = 0.002).





ΕΙΚΟΝΑ 10. Μελέτη της έκφρασης της προθυμοσίνης α στον καρκίνο του θυρεοειδούς αδένος σε δείγματα από ιστολογικές τομές παραφίνης, στις οποίες έγινε απομόνωση ολικού RNA. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης RT-PCR (10 μl) σε ιηκτική αγαρόζης 1.4%. Διαδρομές 1-2 : δείγματα φυσιολογικού ιστού. Διαδρομές 3-7: δείγματα από καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα του αδένος (θηλώδη, θαλακτώδη). Τα επίπεδα mRNA της προθυμοσίνης α προσδιορίστηκαν σημαντικά υψηλότερα στον καρκίνο του θυρεοειδούς σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό ($P = 0.007$)



3.2. Μέτρηση των επιπέδων της προθυμοσίνης α στον ορό και σε ιστικά εκχυλίσματα θυρεοειδικού ιστού με συναγωνιστική ανοσοπροσοροφητική μέθοδο (ELISA).

Η συγκέντρωση της προθυμοσίνης α στον ορό και σε κυτταρικά εκχυλίσματα θυρεοειδικού ιστού μετρήθηκε με συναγωνιστική ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοροφητική μέθοδο με την χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της προθυμοσίνης α ανθρώπου (αλληλουχία αμινοξέων 87-109). Δείγματα ορού ελήφθησαν από υγιή άτομα ($n = 20$) και ασθενείς με απλή οξώδη βρογχοκήλη ($n = 20$). Ιστικά παρασκευάσματα ελήφθησαν από ασθενείς ($n = 20$) με καλοήθεις και κακοήθεις παθήσεις του θυρεοειδούς, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε μερική ή ολική θυρεοειδεκτομή. Σύμφωνα με την ιστοπαθολογική έκθεση οι ασθενείς διαχωρίστηκαν σε αυτούς με απλή οξώδη βρογχοκήλη ($n = 9$), θυλακιώδες αδένωμα ($n = 6$), θηλώδες καρκίνωμα ($n = 3$) και θυλακιώδες καρκίνωμα ($n = 2$).

Ο ορός συλλέχθηκε από περιφερικό αίμα, το οποίο προηγουμένως φυγοκεντρήθηκε σε ειδικούς σωλήνες. Ο θυρεοειδικός ιστός εκχυλίστηκε σε διάλυμα PBS παρουσία αναστολέα πρωτεασών και ομογενοποιήθηκε σε ομογενοποιητή. Μετά την προετοιμασία των δειγμάτων (οξίνιση και καθαρισμό σε ειδικές στήλες) ακολούθησε η ανοσοπροσοροφητική μέτρηση των επιπέδων της προθυμοσίνης α σε ειδικές πλάκες πολυστυρολίου.

Οι τελικές συγκεντρώσεις αντιγόνου και 1^{ου} αντισώματος που χρησιμοποιήθηκαν στην ELISA καθορίστηκαν μετά από επαναλαμβανόμενα πειράματα στα οποία μελετήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του καρβοξυτελικού πεπτιδίου (1, 2, 3, 4, 5 ng/φρεάτιο) και του αντίστοιχου αντισώματος (0.1, 0.2, 0.4 μg/φρεάτιο). Τα καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν με συγκέντρωση αντιγόνου 2 και 3 ng/φρεάτιο και συγκέντρωση αντισώματος 0.2 μg/φρεάτιο. Επομένως, καταλήξαμε σε συγκέντρωση αντιγόνου ίση με 2.5 ng/φρεάτιο.

Η πρότυπη καμπύλη αναστολής καθορίστηκε με βάση γνωστές συγκεντρώσεις καθαρής προθυμοσίνης α που προστίθεντο στο 1^ο αντίσωμα (0.5, 1, 2, 4, 6, 10, 20, 40 και 80 pmol ανά φρεάτιο). Προέκυψε μια σιγμοειδής καμπύλη, μέσω της οποίας



προσδιορίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης (τιμές από 10 μέχρι 100 pmol/ml) (ΣΧΗΜΑ 12).

Τα δείγματα φωτομετρήθηκαν σε μήκος κύματος 492 nm και το επί % ποσοστό της αναστολής υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

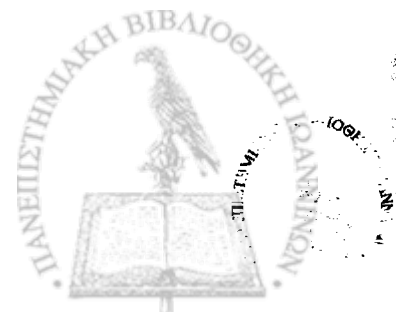
$$\% \text{ Αναστολή} = \left(1 - \frac{\text{O.D. δείγματος} - \text{O.D. τυφλού}}{\text{O.D. μάρτυρα} - \text{O.D. τυφλού}} \right) \times 100$$

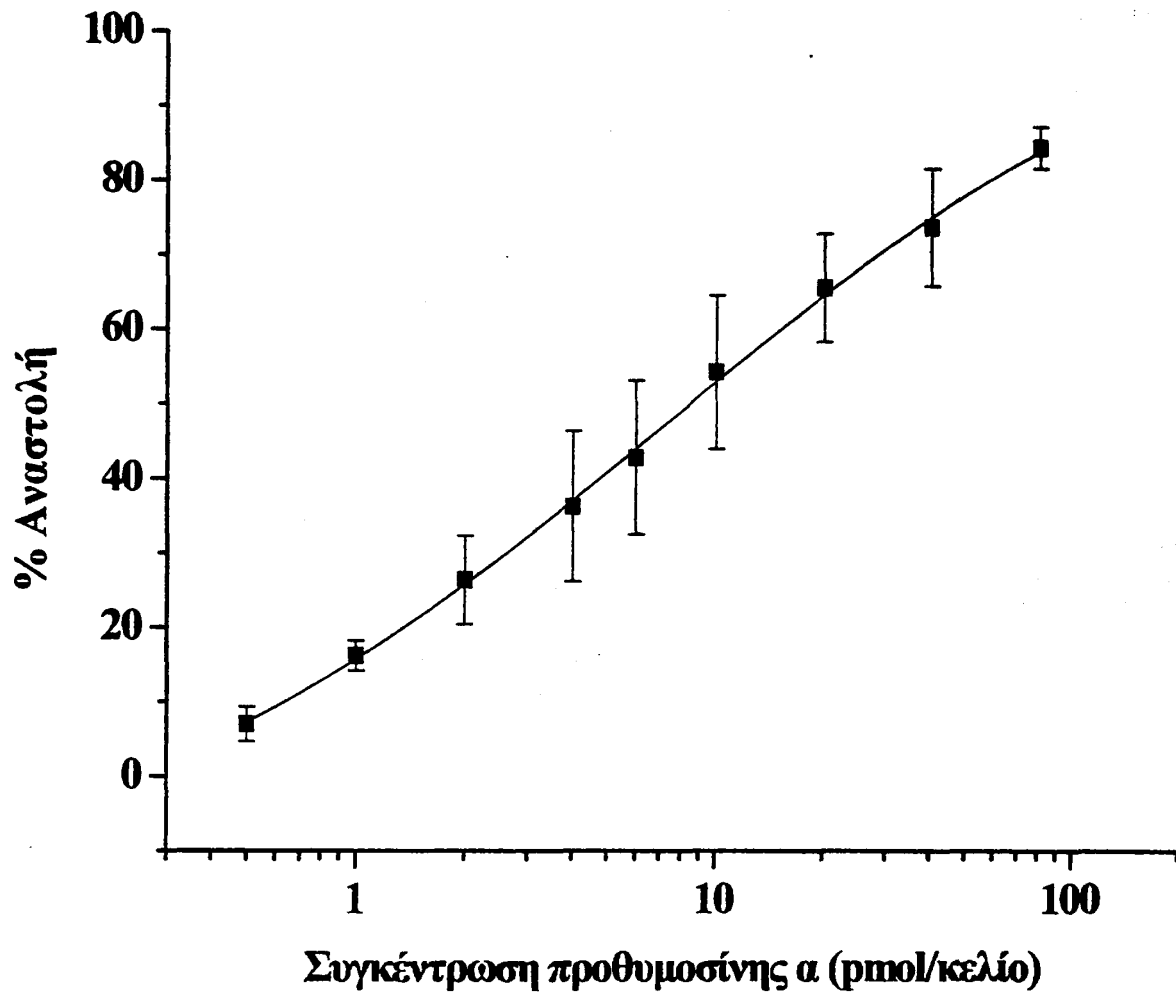
όπου O.D.: οπτική πυκνότητα (optical density).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα SPSS Version 10.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, USA).

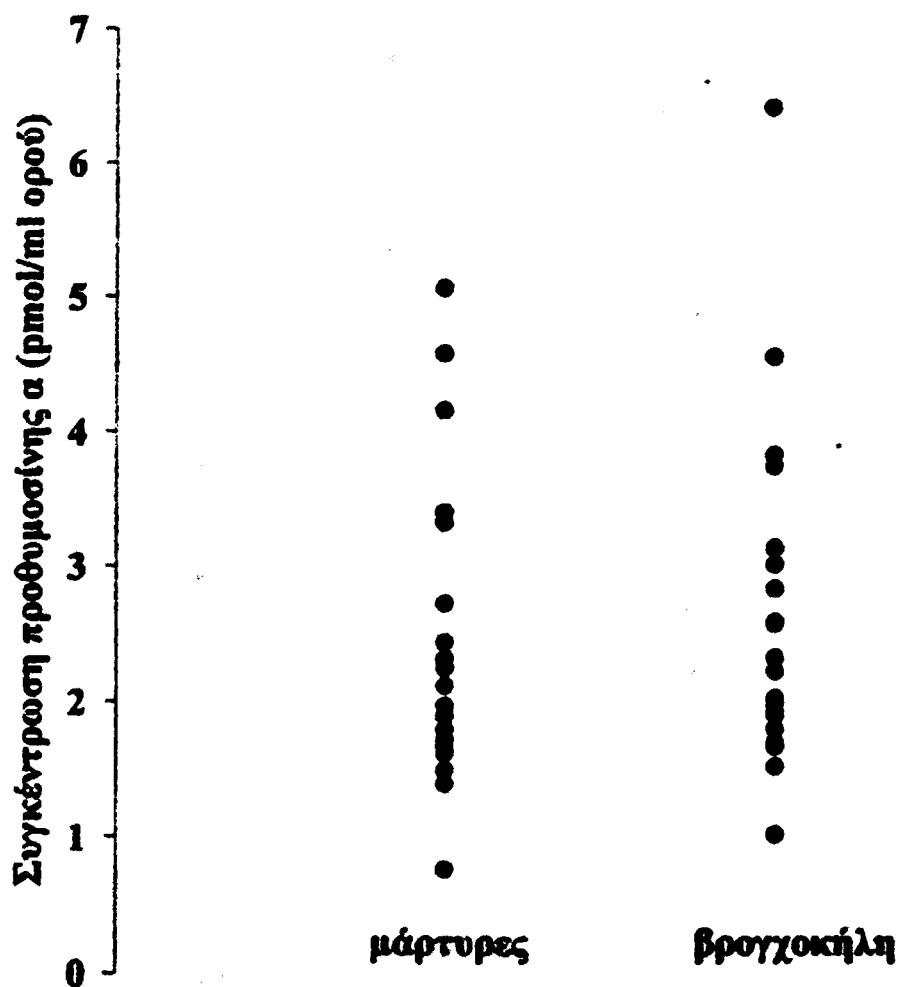
Η συγκέντρωση της προθυμοσίνης α στον ορό υγιών ατόμων και ασθενών με απλή οξώδη βρογχοκήλη βρέθηκε να κυμαίνεται από 1 έως 6.34 pmol/ml (2.6 ± 1.23 pmol/ml) και από 0.75 έως 5.03 pmol/ml (2.48 ± 1.13 pmol/ml) αντίστοιχα (ΣΧΗΜΑ 13). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της συγκέντρωσης σε σχέση με το φύλο ή την ηλικία των ασθενών.

Η συγκέντρωση της προθυμοσίνης στον θυρεοειδικό ιστό μετρήθηκε 231-570 pmol/g (359.44 ± 103.89 pmol/g) στην απλή οξώδη βρογχοκήλη, 231-458 pmol/g (322.50 ± 82.55 pmol/g) στο θυλακιώδες αδένωμα και 265-526 pmol/g (370.60 ± 106.71 pmol/g) στα καρκινώματα (ΣΧΗΜΑ 14). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης ανάμεσα στις ομάδες των ασθενών [(βρογχοκήλη vs. αδένωμα, $P = 0.63$), (βρογχοκήλη vs. καρκίνο, $P = 0.85$), (αδένωμα vs. καρκίνο, $P = 0.5$)]. Ωστόσο, τα επίπεδα της πρωτεΐνης μετρήθηκαν ελαφρώς υψηλότερα στα καρκινώματα (370 ± 106 pmol/g) σε σχέση με τις καλοήθειες παθήσεις του αδένα (344 ± 103 pmol/g) (ΣΧΗΜΑ 15). Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες σε όλες τις ομάδες των ασθενών (ΣΧΗΜΑ 16).

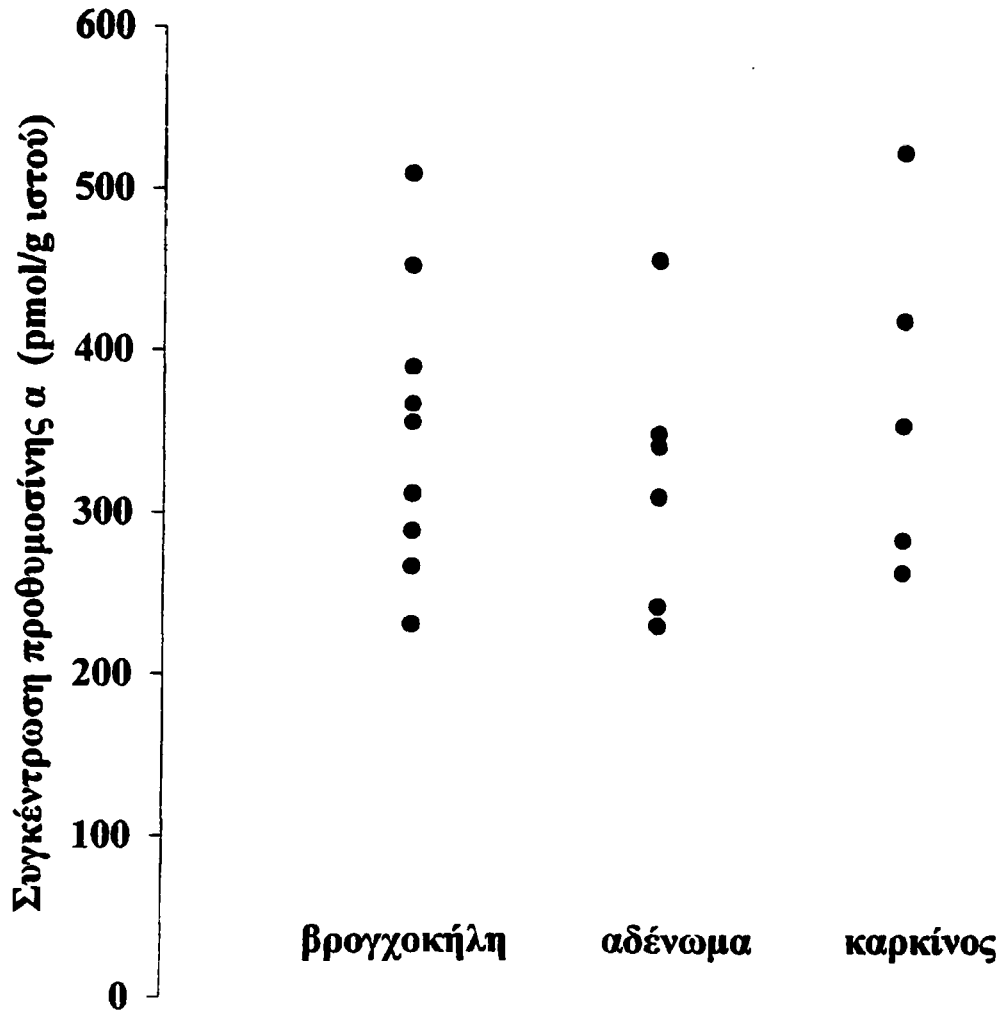




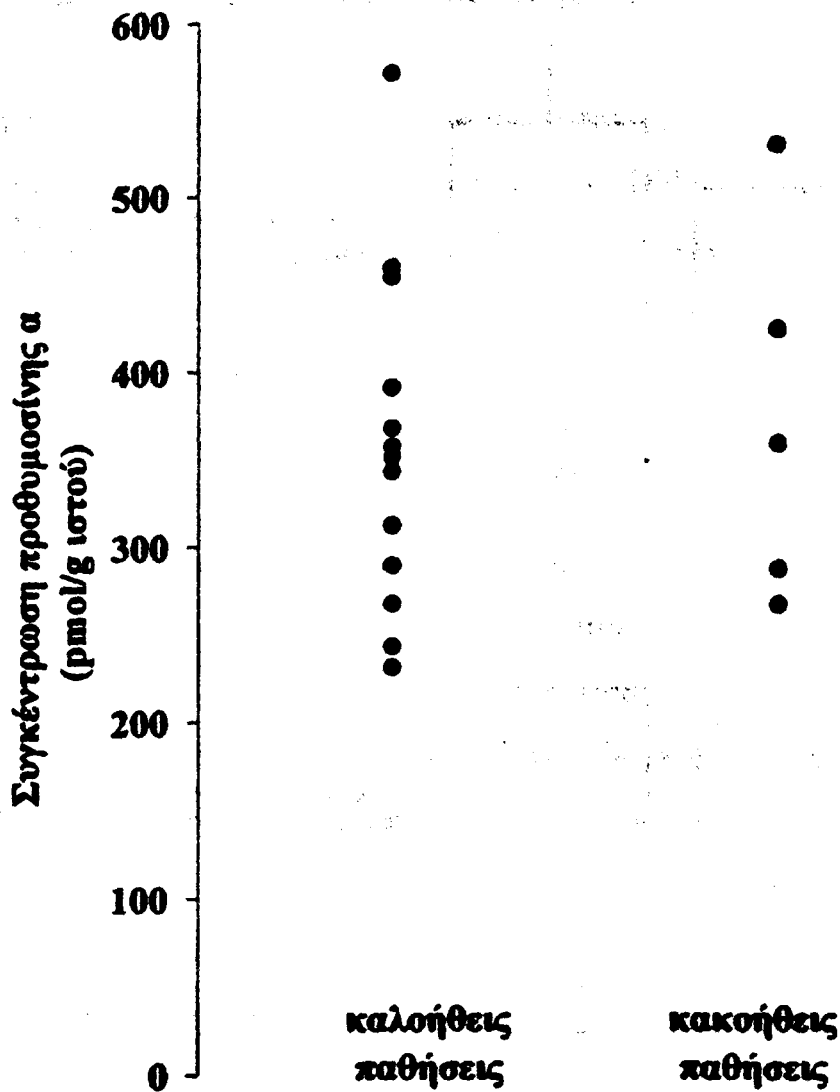
ΣΧΗΜΑ 12. Πρότυπη καμπύλη αναστολής της προθρομολίνης α.



ΣΧΗΜΑ 13. Επίπεδα της πρωθυμοσίνης α (pmol/ml) στον ορό υγιών ατόμων και ασθενών με απλή οζώδη βρογχοκήλη. Η μέση τιμή συγκέντρωσης της πρωτεΐνης βρέθηκε 2.6 ± 1.23 pmol/ml στα υγιή άτομα ($n = 20$) και 2.48 ± 1.13 pmol/ml στους ασθενείς ($n = 20$).

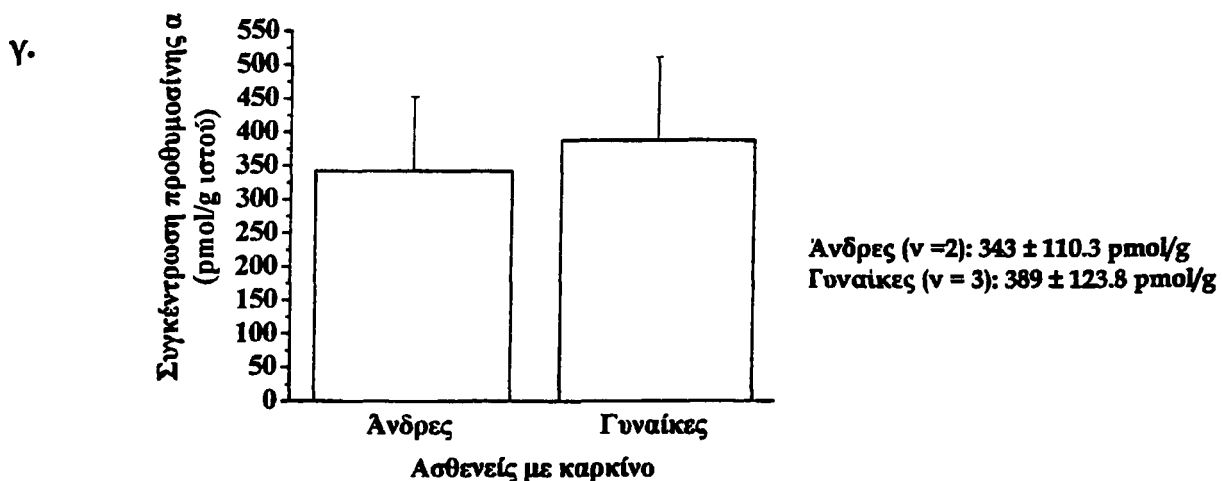
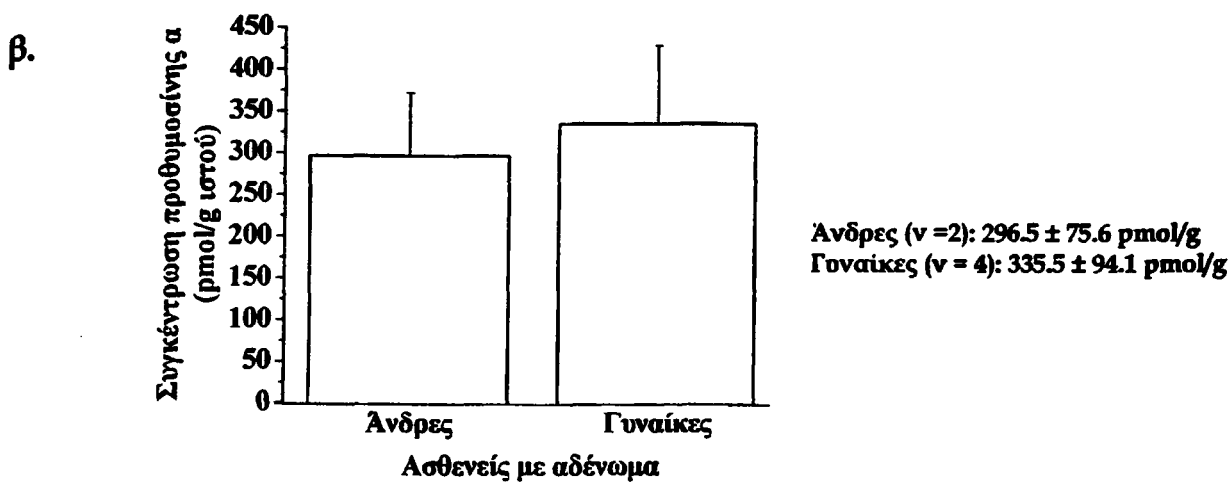
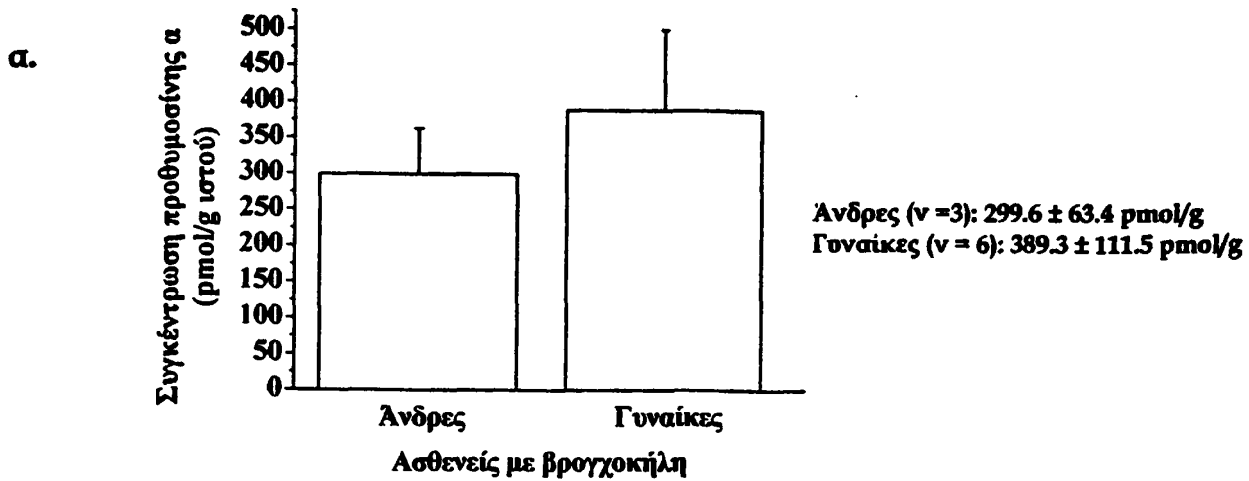


ΣΧΗΜΑ 14. Επίπεδα της προθυμοσίνης α (pmol/g) στον θυροξειδικό ιστό ασθενών με απλή οζώδη βρογχοκήλη, θυλακιώδες αδένωμα και καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα. Οι μέσες τιμές της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης βρέθηκαν 359.44 ± 103.89 pmol/g στην απλή οζώδη βρογχοκήλη ($n = 9$), 322.50 ± 82.55 pmol/g στο θυλακιώδες αδένωμα ($n = 6$) και 370.60 ± 106.71 pmol/g στα καρκινώματα ($n = 5$). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης ανάμεσα στις ομάδες των ασθενών (βρογχοκήλη vs. αδένωμα, $P = 0.63$), (βρογχοκήλη vs. καρκίνο, $P = 0.85$), (αδένωμα vs. καρκίνο, $P = 0.5$).

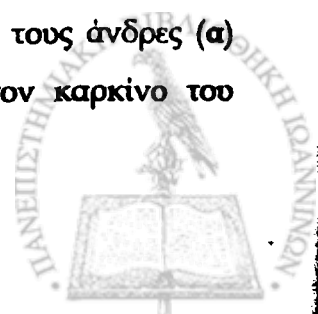


ΣΧΗΜΑ 15. Επίπεδα της προλακτίνης α (pmol/g) στον θοροειδικό ιστό ασθενών με καλοήθειες και κακοήθειες παθήσεις. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης μετρήθηκε 344 ± 103 pmol/g στην απλή οζώδη βροχγοκίλη και στα αδενώματα ($n = 15$) και 370 ± 106 pmol/g στα καρκινώματα του αδένου ($n = 5$).





ΣΧΗΜΑ 16. Επίπεδα της προθυμοσίνης α στον θυρεοειδικό ιστό σε σχέση με το φύλο. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης βρέθηκε υψηλότερη στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες (α) στην απλή οξώδη βρογχοκίλη, (β) στο θυλακιώδες αδένωμα και (γ) στον καρκίνο του θυρεοειδούς.



3.3. Μελέτη των πολυμορφισμών του γονιδίου της προθυμοσίνης α

Η ύπαρξη πολυμορφισμών του γονιδίου της προθυμοσίνης α μελετήθηκε με την μέθοδο της διαμόρφωσης μονής αλυσού του DNA (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP). Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι μονόκλινα μόρια DNA που διαφέρουν κατά ένα νουκλεοτίδιο (βάση), μετακινούνται με διαφορετική ταχύτητα κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου λόγω αλλαγής της δευτεροταγούς δομής τους. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου της προθυμοσίνης α αναζητήθηκαν σε δείγματα FNA ασθενών με απλή οξώδη βρογχοκίλη.

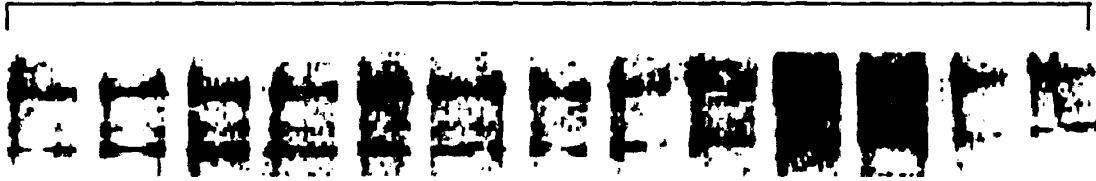
Με εκμαγείο ολικό RNA παρασκευάστηκε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase) και ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) για την ενίσχυση (amplification) τμήματος του cDNA της προθυμοσίνης α μεγέθους 255 bp. Οι συνθήκες της αντίδρασης δίνονται στην παράγραφο 2.8.3. Η πιθανότητα εισαγωγής εσφαλμένης βάσης από την DNA πολυμεράση κατά την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου με την PCR και κατά συνέπεια η ανίχνευση ψευδών μεταλλάξεων ήταν πολύ μικρή λόγω της υψηλής επιδιορθωτικής ενεργότητας του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε (Expand High Fidelity PCR System, Roche).

Μελετήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα παρασκευής της πηκτής πολυακρυλαμιδίου με ή χωρίς την προσθήκη αγαρόζης. Διαπιστώθηκε ότι η παρουσία μικρής ποσότητας αγαρόζης (0.25%) σταθεροποιεί την πηκτή, η οποία γίνεται περισσότερο ανθεκτική στους χειρισμούς χωρίς να επηρεάζει το αποτέλεσμα της χρώσης με τον AgNO₃. Η πηκτή ηλεκτροφορήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και στους 4°C. Η θερμοκρασία και η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου στην πηκτή με ή χωρίς γλυκερόλη, αποτελούν τις πιο κρίσιμες παραμέτρους της μεθόδου. Ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών της ηλεκτροφόρησης, μεταβάλλοντας τις παραπάνω παραμέτρους, αυξάνει την πιθανότητα ανίχνευσης μιας μετάλλαξης. Διαπιστώθηκε ότι η παραμονή της πηκτής για μεγάλο χρονικό διάστημα στο διάλυμα μονιμοποίησης (>12 h) μειώνει την μη ειδική χρώση του αργύρου (artefacts) και βελτιώνει το τελικό αποτέλεσμα.



Στην παρούσα μελέτη δεν ανιχνεύθηκαν πολυμορφισμοί του γονιδίου της προθυμοσίνης α (ΕΙΚΟΝΑ 11).

Δείγματα FNA



ΕΙΚΟΝΑ 11. Μελέτη της κινητικότητας των αποδιαταγμένων μονόκλωνων αλύσων του cDNA για την ανίχνευση πολυμορφισμών του γονιδίου της προθυμοσίνης α. Τα προϊόντα της αντίδρασης RT-PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική ακρυλαμιδίου 7% με προσθήκη 0.25% αγαρόζης σε θερμοκρασία δωματίου. Υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες δεν παρατηρήθηκαν πολυμορφισμοί του γονιδίου της προθυμοσίνης α στην απλή οζώδη βρογχοκλήλη.

3. 4. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης πρωτεϊνών προθυμοσίνη α, E2F-1, p53, Bcl-2, Bax και του πυρηνικού αντιγόνου Ki-67 σε ιστολογικές τομές παραφίνης.

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών προθυμοσίνη α, E2F-1, p53, Bcl-2, Bax και του πυρηνικού αντιγόνου Ki-67 πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της στρεπταβιδίνης-βιοτινής-υπεροξειδάσης (labeled streptavidin-biotin-peroxidase method) σε μια σειρά από ιστολογικές τομές θυρεοειδούς αδένα, που περιελάμβανε περιπτώσεις απλής οζώδους βρογχοκλήλης (n = 10), θυλακιώδους αδενώματος (n = 10) και καλά διαφοροποιημένου καρκινώματος του θυρεοειδούς (θηλώδες, θυλακιώδες) (n = 11). Ο πέριξ φυσιολογικός ιστός σε πέντε (n = 5) περιπτώσεις απλής οζώδους βρογχοκλήλης χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για την σύγκριση των αποτελεσμάτων.

Η καταμέτρηση των θετικών κυττάρων (ανοσοδραστικών) για κάθε πρωτεΐνη έγινε με αντικειμενικό φακό x 40. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως η μέση εκατοστιαία τιμή των ανοσοδραστικών κυττάρων προς τον συνολικό αριθμό των κυττάρων που

μετρήθηκαν. Επιπλέον, η έκφραση των πρωτεϊνών p53, Bcl-2 και Bax θεωρήθηκε θετική όταν το ποσοστό των ανοσοδραστικών κυττάρων ήταν μεγαλύτερο από 10%.

Οι διαφορές της έκφρασης κάθε πρωτεΐνης ανάμεσα στους ιστολογικούς τύπους που μελετήθηκαν εκτιμήθηκαν με την μέθοδο Kruskal-Wallis. Οι συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών καθορίστηκαν με την δοκιμασία Spearman. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά όταν η τιμή του P ήταν μικρότερη από 0.05.

3. 4. 1. Μελέτη της ανοσοδραστικότητας-έκφρασης της προθυμοσίνης α.

Θετική ανοσοαντίδραση για την προθυμοσίνη α (έντονη πυρηνική και ελαφρά κυτταροπλασματική χρώση) διαπιστώθηκε σε όλους τους ιστολογικούς τύπους που μελετήθηκαν (ΕΙΚΟΝΕΣ 12 και 13). Η έκφραση της πρωτεΐνης βρέθηκε αυξημένη στην απλή οξώδη βρογχοκίλη (P = 0.08), στα θυλακιώδη αδενώματα (P = 0.06) και στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα του αδένου (P = 0.02) σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές της έκφρασης της προθυμοσίνης α ανάμεσα στις υπερπλαστικές και νεοπλασματικές βλάβες του αδένου. Ωστόσο, τα επίπεδα της πρωτεΐνης ήταν σαφώς υψηλότερα στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα σε σχέση με τους άλλους ιστολογικούς τύπους (ΠΙΝΑΚΑΣ 18).

ΠΙΝΑΚΑΣ 18. Ανοσοδραστικότητα-έκφραση της προθυμοσίνης α με βάση τον ιστολογικό τύπο. Όπου NT: φυσιολογικός ιστός, NG: οξώδης βρογχοκίλη, FA: θυλακιώδες αδένωμα και WDC: καλά διαφοροποιημένο καρκίνωμα (θηλώδες θυλακιώδες).

Ιστολογικός τύπος	Ποσοστό ανοσοδραστικών κυττάρων για την προθυμοσίνης α (%)	
	Εύρος τιμών	Μέση τιμή
NT (n = 5)	20-40	27.00 ± 8.36
NG (n = 10)	25-90	62.00 ± 22.75
FA (n = 10)	20-95	63.50 ± 26.25
WDC (n = 11)	40-90	75.90 ± 18.14

3.4.2. Μελέτη της ανοσοδραστικότητας-έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα E2F-1.

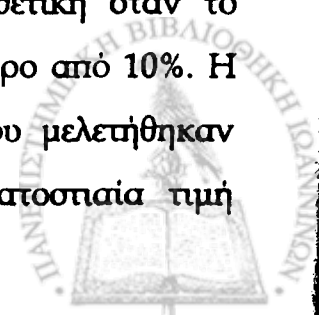
Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα E2F-1 θεωρήθηκε θετική στις περιπτώσεις με πυρηνική χρώση. Η μέση εκατοστιαία τιμή έκφρασης υπολογίστηκε 0.82 ± 0.24 στον φυσιολογικό ιστό, 1.10 ± 0.31 στην απλή οζώδη βρογχοκήλη, 2.90 ± 3.41 στο θυλακιώδη αδενώματα και 5.81 ± 6.16 στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα του αδένου. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα στα καρκινώματα (ΕΙΚΟΝΑ 14) σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό ($P = 0.005$) και την απλή οζώδη βρογχοκήλη ($P = 0.002$).

3.4.3. Μελέτη της ανοσοδραστικότητας-έκφρασης της ογκο-κατασταλτικής πρωτεΐνης p53.

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης p53 θεωρήθηκε θετική όταν το ποσοστό των κυττάρων με πυρηνική χρώση ήταν μεγαλύτερο από 10%. Τα θυλακιώδη κύτταρα στον φυσιολογικό ιστό και στην απλή οζώδη βρογχοκήλη βρέθηκε ότι δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη p53. Θετικές χαρακτηρίστηκαν οι περιπτώσεις ενός θυλακιώδους αδενώματος (1/10, 10%) και ενός καλά διαφοροποιημένου καρκινώματος (1/11, 9.09%) (ΕΙΚΟΝΑ 15). Η μέση εκατοστιαία τιμή έκφρασης βρέθηκε 0.12 ± 0.12 στον φυσιολογικό ιστό, 0.37 ± 0.58 στην απλή οζώδη βρογχοκήλη, 2.10 ± 4.30 στα θυλακιώδη αδενώματα και 3.72 ± 7.34 στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα του αδένου.

3.4.4. Μελέτη της ανοσοδραστικότητας-έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2.

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 θεωρήθηκε θετική όταν το ποσοστό των κυττάρων με κυτταροπλασματική χρώση ήταν μεγαλύτερο από 10%. Η πρωτεΐνη Bcl-2 βρέθηκε να εκφράζεται σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν ανεξάρτητα από τον ιστολογικό τύπο (ΕΙΚΟΝΑ 16). Η μέση εκατοστιαία τιμή



έκφρασης ήταν 75.00 ± 7.90 στον φυσιολογικό ιστό, 75.50 ± 13.63 στην απλή οζώδη βρογχοκήλη, 75.50 ± 10.91 στο θυλακιώδες αδένωμα και 78.63 ± 7.44 στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα (ΠΙΝΑΚΑΣ 19).

3. 4. 5. Μελέτη της ανοσοδραστικότητας-έκφρασης της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax.

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης Bax ήταν επιτυχής σε όλες τις ιστολογικές τομές και θεωρήθηκε θετική όταν το ποσοστό των κυττάρων με έντονη κυτταροπλασματική χρώση ήταν μεγαλύτερο από 10%. Η πρωτεΐνη δεν εκφράζεται στον φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό (0/5, 0%), ενώ αντίθετα θετική ανοσοαντίδραση παρατηρήθηκε σε 3 από τις 10 βρογχοκήλες (30%), σε 7 από τα 10 αδενώματα (70%) και σε 8 από τα 11 καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα (72.72%) (ΕΙΚΟΝΑ 17). Αναλυτικότερα, η μέση εκατοστιαία τιμή έκφρασης υπολογίστηκε 2.20 ± 1.30 στον φυσιολογικό ιστό, 12.33 ± 22.17 στην απλή οζώδη βρογχοκήλη, 42.60 ± 29.20 στο θυλακιώδες αδένωμα και 51.09 ± 37.30 στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα του αδένου (πίνακας 19). Στατιστικά υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης παρατηρήθηκε στα αδενώματα και στα καρκινώματα του αδένου ($P < 0.05$). Ο λόγος των αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2/Bax προσδιορίστηκε σε όλους τους ιστολογικούς τύπους και βρέθηκε υψηλός στον φυσιολογικό αδένου και χαμηλός στα καρκινώματα (ΠΙΝΑΚΑΣ 19).

ΠΙΝΑΚΑΣ 19. Ανοδραστικότητα-έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bax (%) και προσδιορισμός του λόγου Bcl-2/Bax με βάση τον ιστολογικό τύπο. Όπου NT: φυσιολογικός ιστός, NG: οζώδης βρογχοκήλη, FA: θυλακιώδες αδένωμα και WDC: καλά διαφοροποιημένο καρκίνωμα (θηλώδες, θυλακιώδες).

Ιστολογικός τύπος	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax ratio
NT (n = 5)	75.00 ± 7.90	2.20 ± 1.30	34.00
NG (n = 10)	75.50 ± 13.63	12.33 ± 22.17	6.12
FA (n = 10)	75.50 ± 10.91	42.60 ± 29.20	1.77
WDC (n = 11)	78.63 ± 7.44	51.09 ± 37.30	1.53

3. 4. 6. Μελέτη της ανοσοδραστικότητας-έκφρασης του αντιγόνου Ki-67. Προσδιορισμός του δείκτη πολλαπλασιασμού των θυλακιωδών κυττάρων.

Ο δείκτης πολλαπλασιασμού (proliferation index, PI) των θυλακιωδών κυττάρων εκτιμήθηκε σε όλους τους ιστολογικούς τύπους και υπολογίστηκε ως η επί τοις εκατό αναλογία των κυττάρων που εκφράζουν το πυρηνικό αντιγόνο Ki-67 προς τον συνολικό αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν. Η μέση εκατοστιαία τιμή έκφρασης βρέθηκε 0.24 ± 0.11 στον φυσιολογικό ιστό, 0.74 ± 1.19 στην απλή οζώδη βρογχοκήλη, 0.96 ± 0.59 στα θυλακιώδη αδενώματα και 3.33 ± 2.70 στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα του αδένου (ΠΙΝΑΚΑΣ 20). Στατιστικά σημαντική υψηλή έκφραση του Ki-67 παρατηρήθηκε στα καρκινώματα (ΕΙΚΟΝΑ 18) σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό ($P = 0.002$), την βρογχοκήλη ($P = 0.005$) και τα αδενώματα ($P = 0.045$).

3. 4. 7. In situ ανίχνευση της απόπτωσης σε καλοήθειες και κακοήθειες παθήσεις του θυρεοειδούς. Προσδιορισμός του αποπτωτικού δείκτη των θυλακιωδών κυττάρων.

Η ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων στις ιστολογικές τομές του θυρεοειδούς πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated X-dUTP nick-end labeling). Η καταμέτρηση των αποπτωτικών κυττάρων έγινε με αντικειμενικό φακό $\times 40$ και σε κάθε περίπτωση μελετήθηκαν τουλάχιστον 5 τυχαία οπτικά πεδία (1000 κύτταρα). Ο αποπτωτικός δείκτης (apoptotic index, AI) ορίστηκε ως η εκατοστιαία αναλογία των TUNEL-θετικών κυττάρων προς τον συνολικό αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν.

Ο αποπτωτικός δείκτης ήταν πολύ χαμηλός σε όλους τους ιστολογικούς τύπους που μελετήθηκαν. Η μέση τιμή βρέθηκε 0.13 ± 0.10 στον φυσιολογικό ιστό, 0.17 ± 0.10 στην απλή οζώδη βρογχοκήλη, 0.31 ± 0.30 στα θυλακιώδη αδενώματα και 0.34 ± 0.14 στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα του αδένου (ΠΙΝΑΚΑΣ 20). Ωστόσο, ο δείκτης ήταν στατιστικά υψηλός στα καρκινώματα (ΕΙΚΟΝΑ 19) σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό ($P = 0.003$) και την απλή οζώδη βρογχοκήλη ($P = 0.032$).



Ο λόγος των δεικτών πολλαπλασιασμού και απόπτωσης (PI/AI) προσδιορίστηκε σε όλους τους ιστολογικούς τύπους και βρέθηκε πολύ χαμηλός στον φυσιολογικό ιστό, στην απλή οξώδη βρογχοκήλη και στα θυλακιώδη αδενώματα και υψηλότερος στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα του αδένου (ΠΙΝΑΚΑΣ 20). Στατιστικά σημαντική διαφορά στην τιμή του λόγου PI/AI παρατηρήθηκε ανάμεσα στα καρκινώματα και στον φυσιολογικό ιστό ($P = 0.002$).

ΠΙΝΑΚΑΣ 20. Δείκτες απόπτωσης (TUNEL) και πολλαπλασιασμού (Ki-67) ανά ιστολογικό τύπο. Όπου NT: φυσιολογικός ιστός, NG: οξώδης βρογχοκήλη, FA: θυλακιώδες αδένωμα και WDC: καλά διαφοροποιημένο καρκίνωμα (θηλώδες, θυλακιώδες).

Ιστολογικός τύπος	Αποπτωτικός δείκτης (AI)		Δείκτης πολλαπλασιασμού (PI)		Λόγος PI/AI
	Μέση τιμή	Εύρος	Μέση τιμή	Εύρος	
NT (n = 5)	0.13 ± 0.10	0.1-0.2	0.24 ± 0.11	0.1-0.2	1.8
NG (n = 10)	0.17 ± 0.10	0.1-0.2	0.74 ± 1.19	0.1-4.0	4.3
FA (n = 10)	0.31 ± 0.30	0.1-1.0	0.96 ± 0.59	0.2-1.5	3.1
WDC (n = 11)	0.34 ± 0.14	0.2-0.6	3.33 ± 2.70	1.0-8.0	9.8

3.4.8. Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών προθυμοσίνη α, E2F-1, p53, Bcl-2, Bax και των δεικτών πολλαπλασιασμού και απόπτωσης.

Στον ΠΙΝΑΚΑ 21 παρατίθενται οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στους δείκτες πολλαπλασιασμού και απόπτωσης και στις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν (Spearman test). Αναλύοντας όλους τους ιστολογικούς τύπους, η προθυμοσίνη α συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 ($P = 0.015$). Σημαντικές συσχετίσεις διαπιστώθηκαν μεταξύ του δείκτη πολλαπλασιασμού και της έκφρασης των πρωτεϊνών E2F-1 ($P = 0.014$) και Bax ($P = 0.035$). Ο μεταγραφικός παράγοντας E2F-1 συνδέθηκε θετικά με την έκφραση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax ($P = 0.002$) και με τον αποπτωτικό δείκτη ($P = 0.001$). Η ογκο-κατασταλτική

πρωτεΐνη p53 συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση της πρωτεΐνης Bax ($P = 0.008$). Στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα του αδένου, θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε ανάμεσα στην έκφραση της προθυμοσίνης α και της πρωτεΐνης Bcl-2 ($P = 0.007$). Στον ίδιο ιστολογικό τύπο θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε επίσης ανάμεσα στις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bax ($P = 0.009$). Στα θυλακιώδη αδενώματα θετικές συσχετίσεις διαπιστώθηκαν ανάμεσα στον δείκτη πολλαπλασιασμού και στην πρωτεΐνη bcl-2 ($P = 0.003$) και ανάμεσα στον E2F-1 και στον αποπτωτικό δείκτη ($P = 0.045$). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στην έκφραση των πρωτεϊνών και των δεικτών πολλαπλασιασμού και απόπτωσης σε σχέση με την ηλικία ή το φύλο των ασθενών.

ΠΙΝΑΚΑΣ 21. Συσχετίσεις ανάμεσα στην έκφραση των πρωτεϊνών προθυμοσίνη α (ProT α), E2F-1, p53, Bcl-2, Bax και των δεικτών πολλαπλασιασμού (PI) και απόπτωσης (AI). Όπου NT: φυσιολογικός ιστός, NG: οζώδης βρογχοκήλη, FA: θυλακιώδες αδένωμα, WDC: καλά διαφοροποιημένο καρκίνωμα και NS: στατιστικά μη σημαντική συσχέτιση ($P > 0.05$).

Παράμετροι	Όλες οι περιπτώσεις	NT	NG	FA	WDC
	P value	P value	P value	P value	P value
ProT α /Bcl-2	0.015	NS	NS	NS	0.007
Ki-67/E2F-1	0.014	NS	NS	NS	NS
Ki-67/Bcl-2	NS	NS	NS	0.003	NS
Ki-67/Bax	0.035	NS	NS	NS	NS
E2F-1/Bax	0.002	NS	NS	NS	NS
E2F-1/AI	0.001	NS	NS	0.045	NS
p53/Bax	0.008	NS	NS	NS	NS
Bax/Bcl-2	NS	NS	NS	NS	0.009



α.



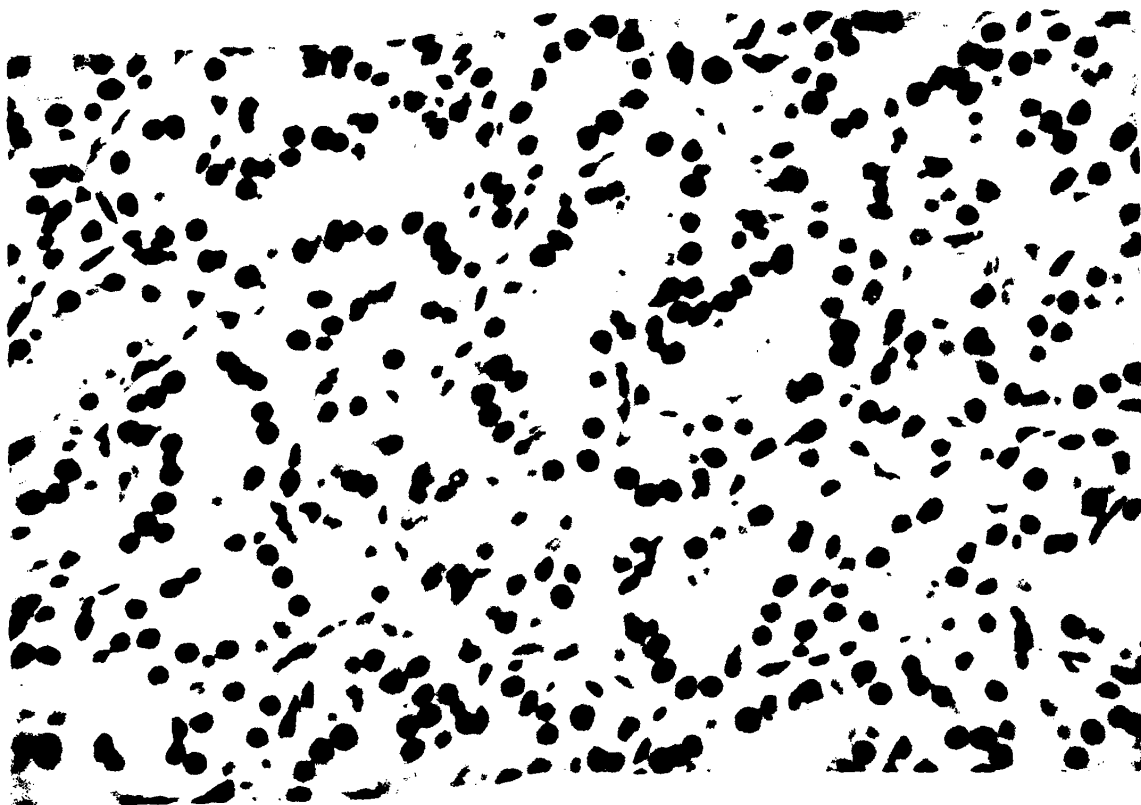
β.



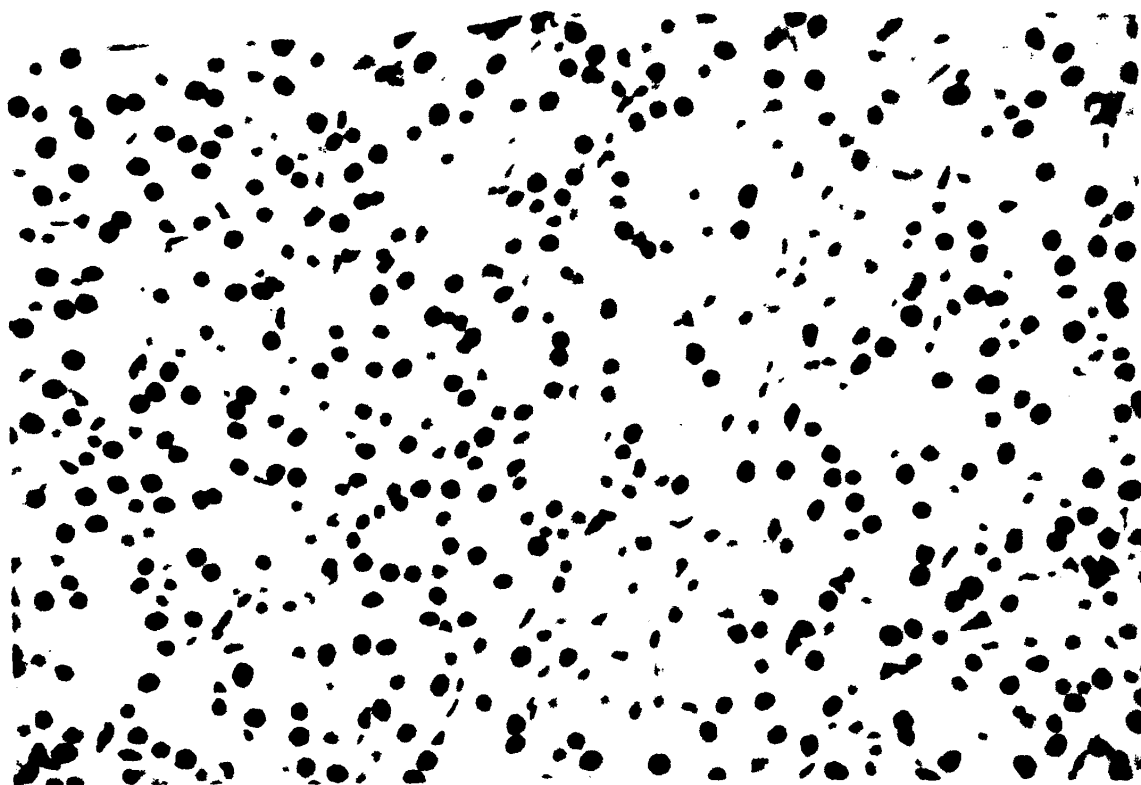
ΕΙΚΟΝΑ 12. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης της προθυμοσίνης α (α) σε φυσιολογικό θυροειδή αδένα και (β) σε απλή οξώδη βρογχοκλήλη. Στην απλή οξώδη βρογχοκλήλη διακρίνεται η υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης σε ενεργοποιημένα θυλάκια, που φέρουν κολλοειδή ουσία (θυροσφαιρίνη) (μεγέθυνση x 400).



α.



β.

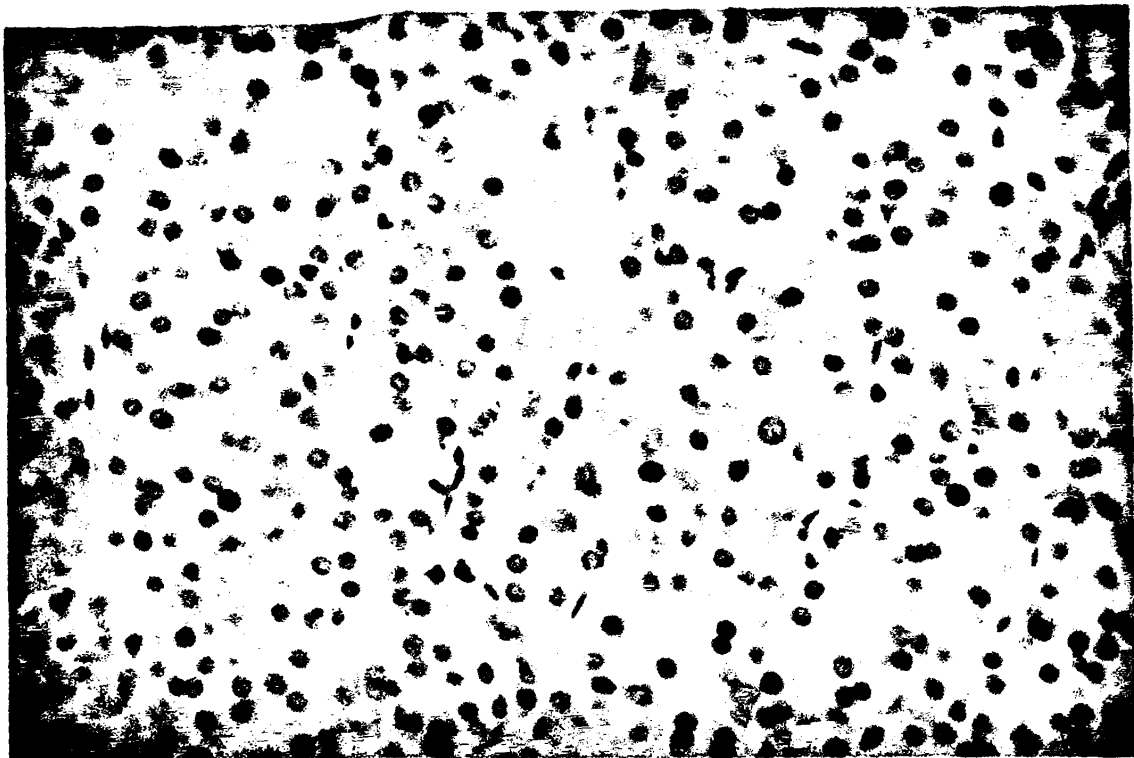


ΕΙΚΟΝΑ 13. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης της προθυμοσίνης α (α) σε θυλακιώδες αδένωμα και (β) σε καλά διαφοροποιημένο θυλακιώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς (μεγέθυνση x 400).

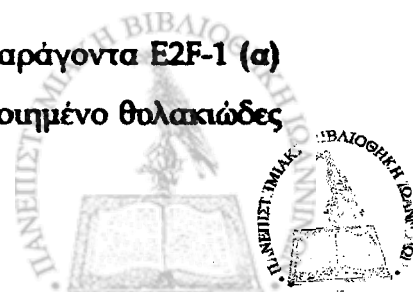
α.



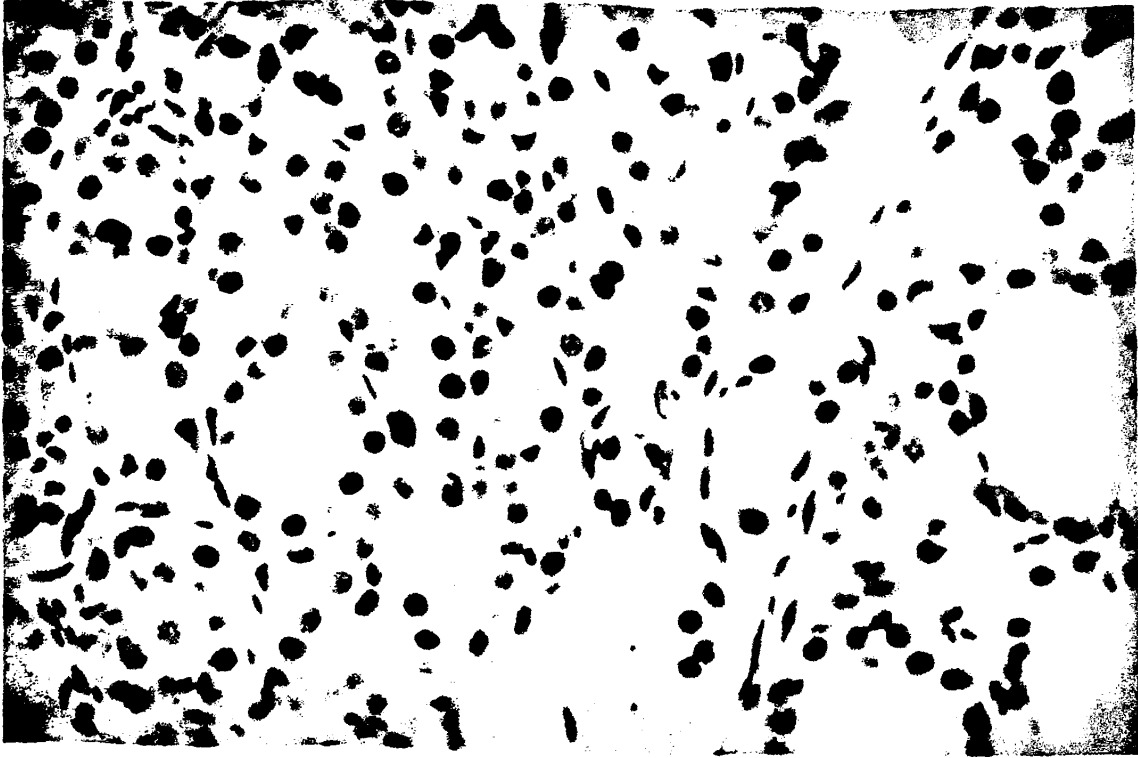
β.



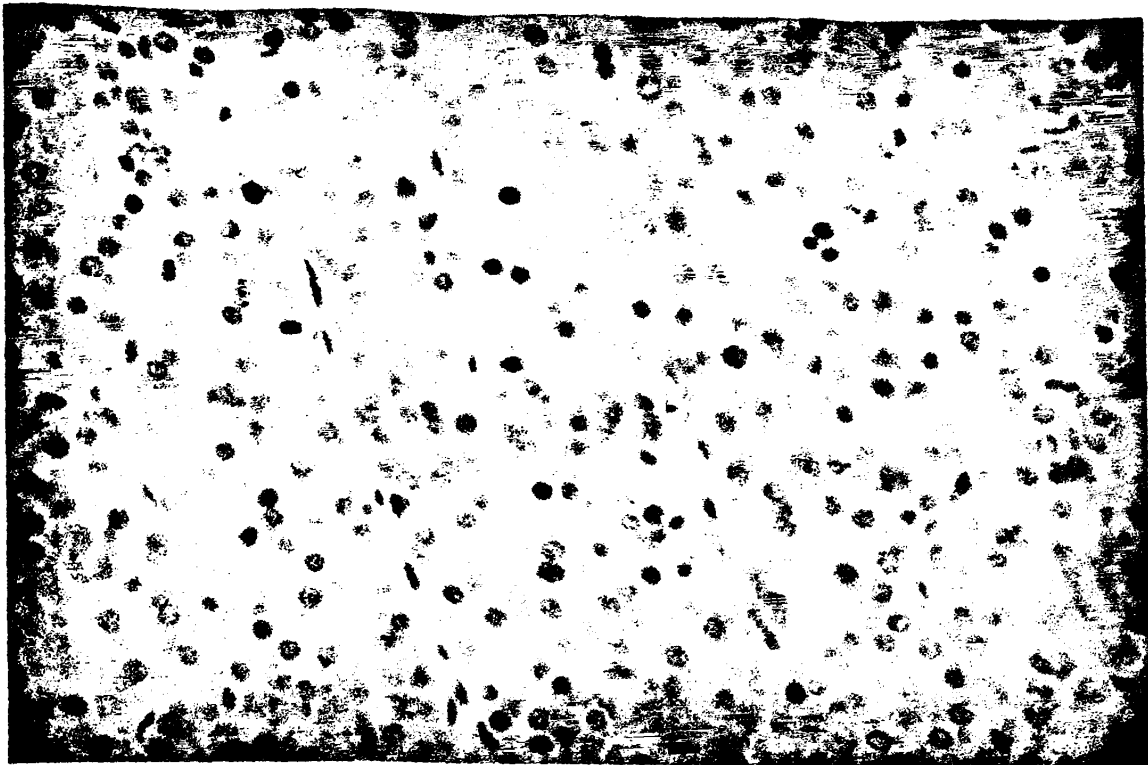
ΕΙΚΟΝΑ 14. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα E2F-1 (α) σε καλά διαφοροποιημένο θηλώδες καρκίνωμα και (β) σε καλά διαφοροποιημένο θολακιάδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς (μεγέθυνση x 400).



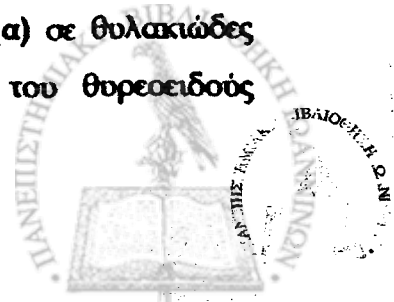
α.



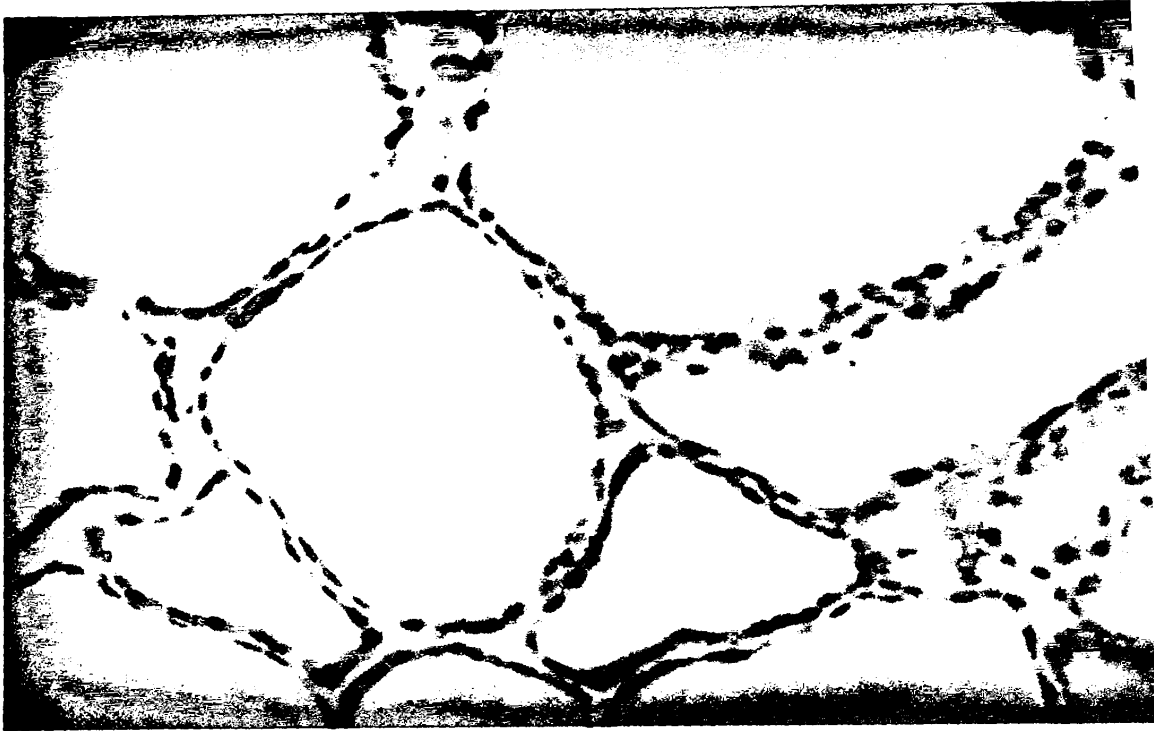
β.



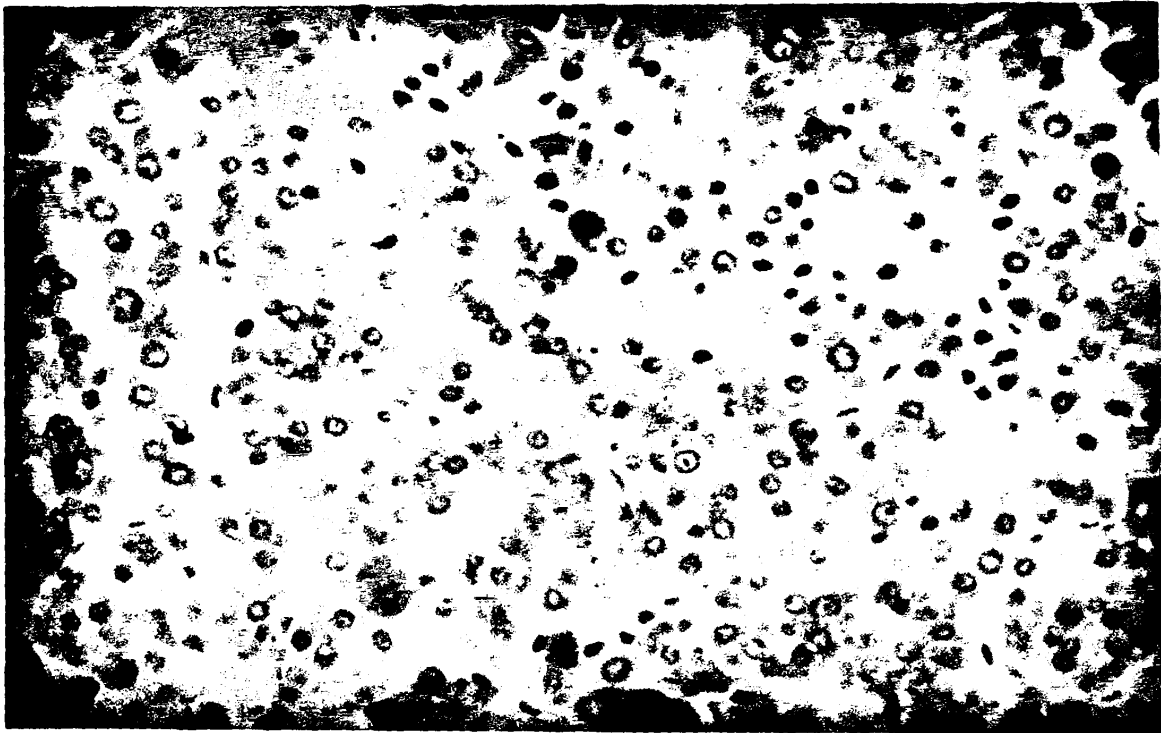
ΕΙΚΟΝΑ 15. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 (α) σε θυλακίωδες αδένωμα και (β) σε καλά διαφοροποιημένο θυλακίωδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς (μεγέθυνση x 400).



α.



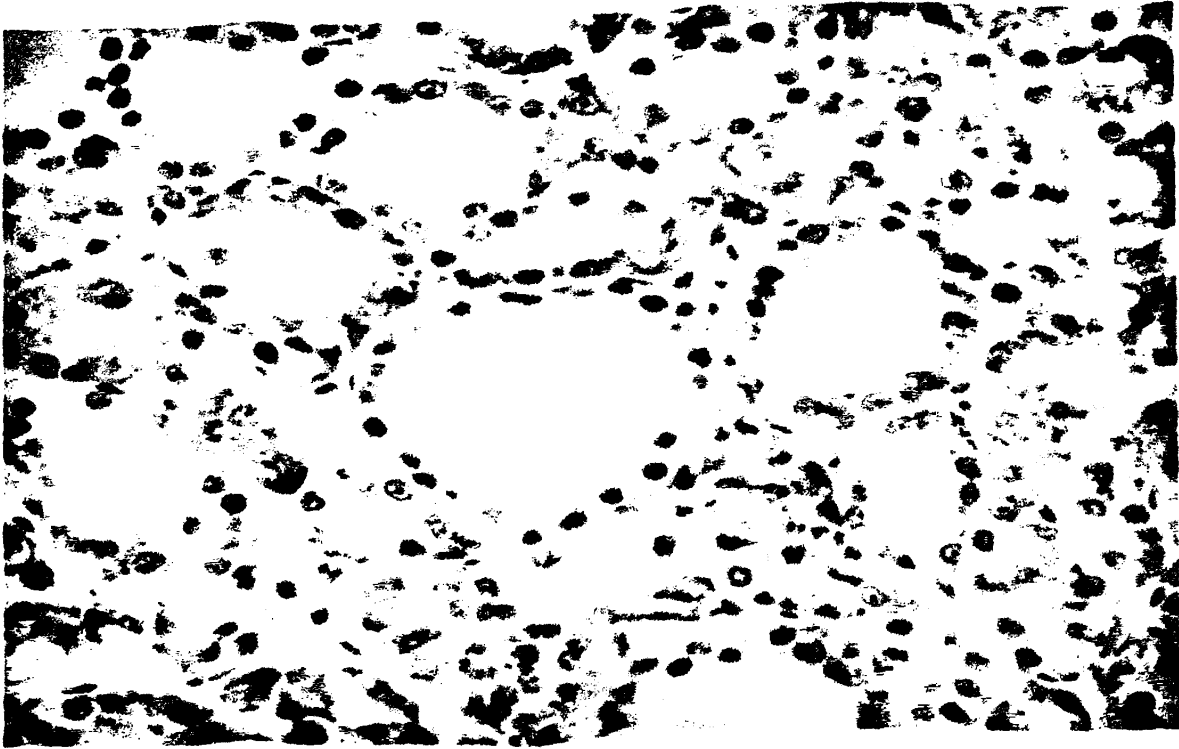
β.



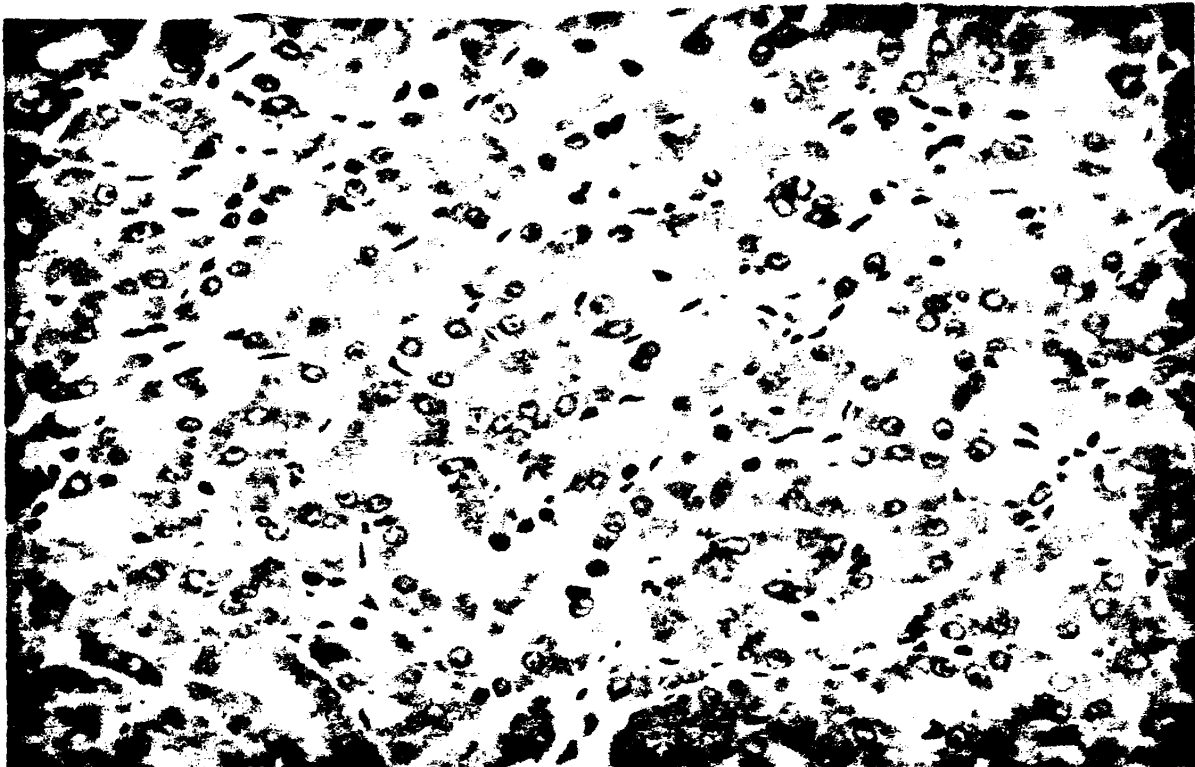
ΕΙΚΟΝΑ 16. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 (σε απλή οξώδη βρογχοκήλη και (β) σε καλά διαφοροποιημένο θυλακιώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς (μεγέθυνση x 400).



α.

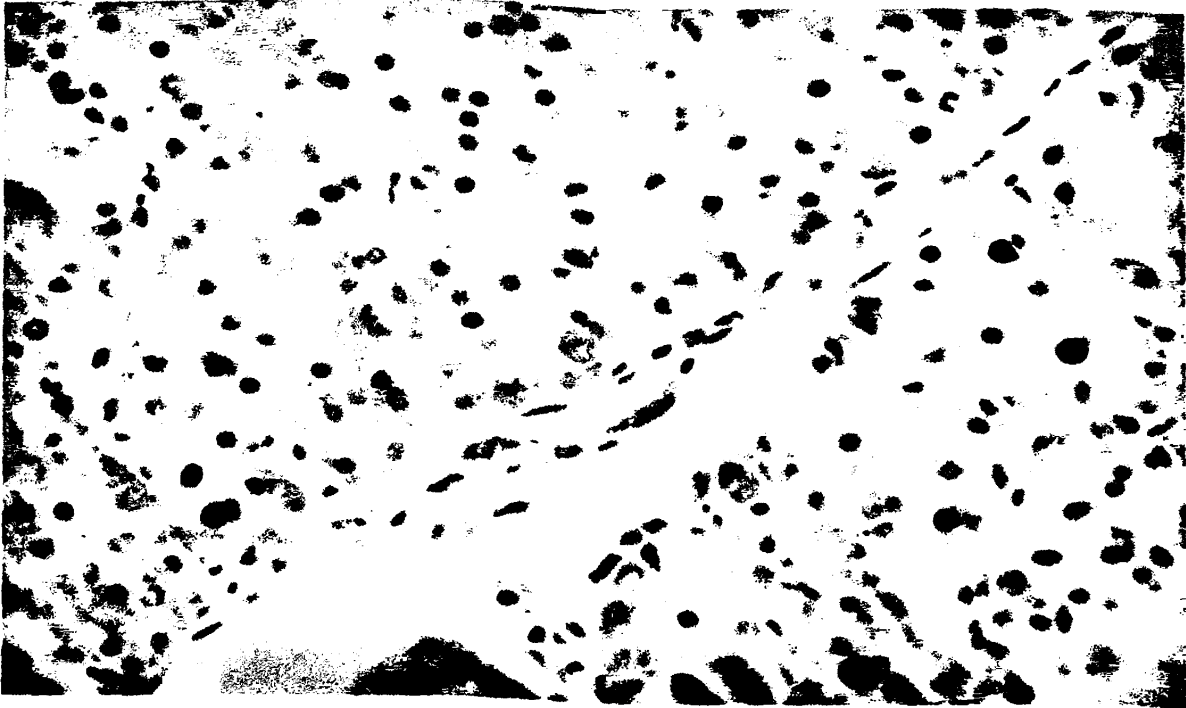


β.

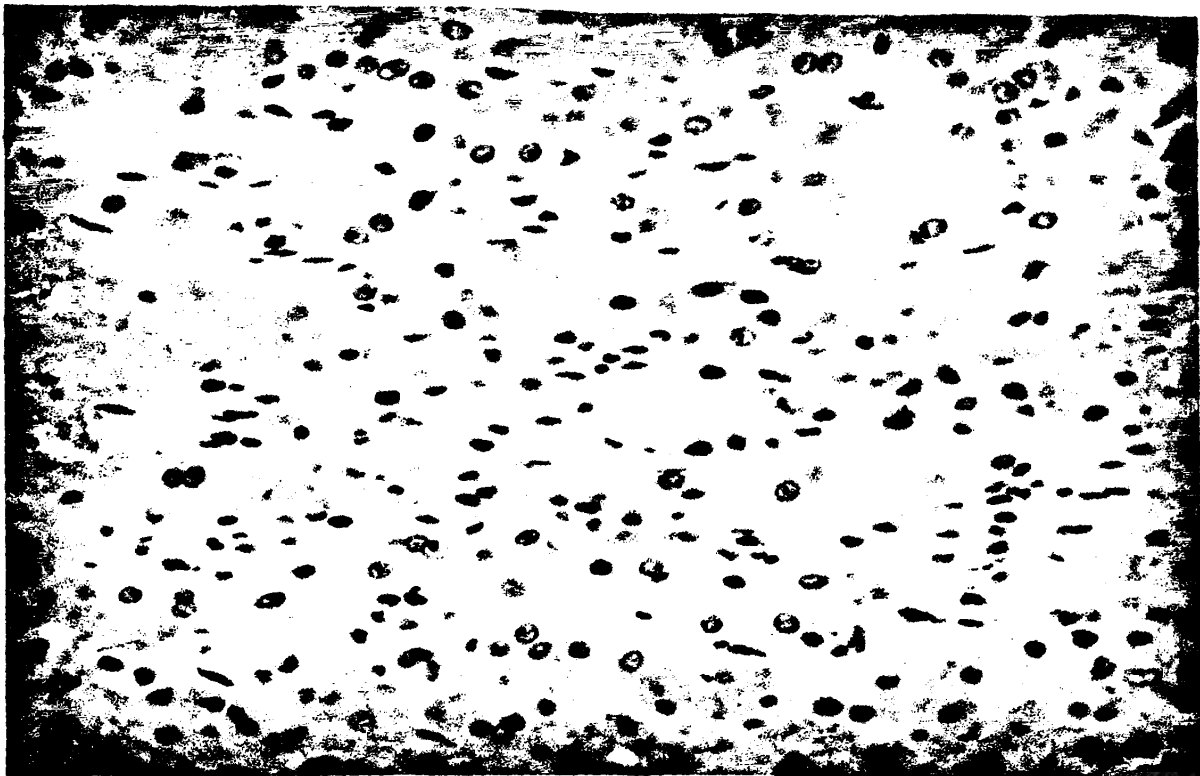


ΕΙΚΟΝΑ 17. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax (α) σε θυλακιώδες αδένωμα και (β) σε καλά διαφοροποιημένο θυλακιώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς (μεγέθυνση x 400).

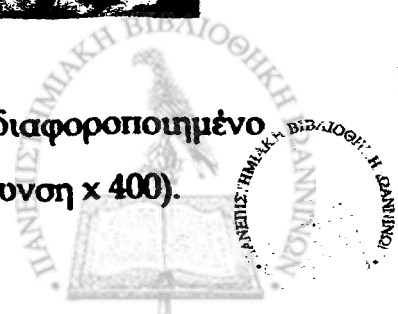




ΕΙΚΟΝΑ 18. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης του πυρηνικού αντιγόνου Ki-67 σε καλά διαφοροποιημένο θυλακιδώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς (μεγέθυνση x 400).



ΕΙΚΟΝΑ 19. In situ ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων σε καλά διαφοροποιημένο θυλακιδώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς με την μέθοδο TUNEL (μεγέθυνση x 400).



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Γενικά

Η προθυμοσίνη α και η παραθυμοσίνη είναι δύο μικρές (12.5 και 11.5 kDa), όξινες (pI: 3.55 και 4.55) πυρηνικές πρωτεΐνες με κοινά χαρακτηριστικά και σημαντική ομολογία στην πρωτοταγή τους δομή (40%) (Haritos et al., 1984, 1985). Κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η παρουσία πολλών όξινων αμινοξέων (Asp, Glu) τα οποία είναι τοποθετημένα στην κεντρική περιοχή των μορίων και προσδίδουν τον εξαιρετικά όξινο χαρακτήρα ο οποίος συναντάται κυρίως σε πυρηνικές πρωτεΐνες (νουκλεοπλασμίνη, HMG πρωτεΐνες). Αντίθετα στερούνται αρωματικών και θειούχων αμινοξέων καθώς και ισχυρά υδρόφοβων αλληλουχιών. Κάθε πρωτεΐνη φέρει στο καρβοξυτελικό της άκρο δύο σήματα πυρηνικής εντόπισης (Rubtsov et al., 1996, Trompeter et al., 1996). Ομοιότητα παρατηρείται και στην δομή των γονιδίων των δύο πρωτεϊνών. Το γονίδιο της προθυμοσίνης α αποτελείται από πέντε εξόνια που διακόπτονται από τέσσερα ιντρόνια, φέρει ρυθμιστικές αλληλουχίες μεταγραφής TATA και CAAT στην περιοχή του υποκινητή και εδράζεται στο χρωμόσωμα 2 του ανθρώπινου γονιδιώματος (Szabo et al., 1993). Το γονίδιο της παραθυμοσίνης παρουσιάζει την ίδια δομή ιντρονίων-εξονίων και εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 του ανθρώπινου γονιδιώματος (Szabo et al., 1989). Οι δύο πρωτεΐνες εμφανίζουν αντίστροφη ιστική κατανομή. Η προθυμοσίνη α ανιχνεύεται σε υψηλά επίπεδα σε λεμφικούς ιστούς (θύμος, σπλήνας) και η παραθυμοσίνη σε μη λεμφικούς ιστούς (ήπαρ, εγκέφαλο, νεφρούς και πνεύμονες) (Tsitsiloni et al., 1988, Economou et al., 1988, Clinton et al., 1989, Frillingos et al., 1991).

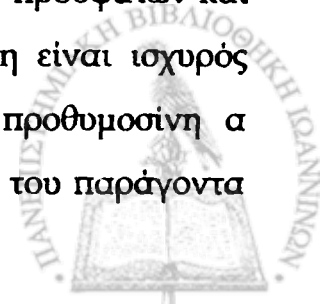
Η προθυμοσίνη α και η παραθυμοσίνη παρουσιάζουν ευρεία ιστική και φυλογενετική κατανομή καθώς και συντηρημένη πρωτοταγή δομή (90%) ανάμεσα στα είδη που έχουν μελετηθεί, γεγονός που καταδεικνύει τον σημαντικό βιολογικό ρόλο που διαδραματίζουν στο κύτταρο και ο οποίος σχετίζεται άμεσα με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Οι δύο πρωτεΐνες συνδέονται με την ιστόνη H1 του νουκλεοσώματος μέσω της κεντρικής όξινης περιοχής και πιθανότατα μεταβάλλουν την στοιχειομετρία του δεσμού της τελευταίας με την χρωματίνη ώστε να είναι δυνατή η αντιγραφή και η

μεταγραφή του DNA (Paramarcaki and Tsolas, 1994, Karetsoy et al., 1998, Kondili et al., 1996). Η προθυμοσίνη α εντοπίζεται σε πυρηνικές θέσεις που σχετίζονται με την μεταγραφή του DNA και η παραθυμοσίνη σε θέσεις αντιγραφής της χρωματίνης, κατά την έναρξη της S φάσης της μίτωσης (Vareli et al., 2000).

Η συμμετοχή της προθυμοσίνης α στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό έχει μελετηθεί εκτενώς στην διεθνή βιβλιογραφία. Η έκφραση της πρωτεΐνης επάγεται σε συνθήκες κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε καλλιέργειες NIH3T3 ινοβλαστών (Eschenfeldt et al., 1986), T-λεμφοκυττάρων και ηπατοκυττάρων (Bustelo et al., 1991). Η πρωτεΐνη επάγει τον πολλαπλασιασμό HL-60 κυττάρων (Rodriguez et al., 1998). Η μιτωτική διαδικασία αναστέλλεται στην κυτταρική σειρά ανθρώπινου μυελώματος RPMI 8226 όταν προστεθεί στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας μίγμα από τέσσερα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (antisense) συμπληρωματικά σε περιοχές του mRNA της προθυμοσίνης α (Sbularti et al., 1993). Αυξημένα επίπεδα mRNA της προθυμοσίνης α ανιχνεύονται στο τέλος της S φάσης στις κυτταρικές σειρές CV1, NIH3T3 και U937 και παραλληλίζονται με τα επίπεδα της κυκλίνης B (Vareli et al., 1996). Τα επίπεδα της προθυμοσίνης α έχουν βρεθεί αυξημένα σε ταχέως αναπτυσσόμενους φυσιολογικούς ιστούς (Clinton et al., 1989, Dosil et al., 1990, Frillingos and Tsolas, 1992) καθώς και σε καρκινικούς ιστούς του μαστού, του εντέρου, του ήπατος και του πνεύμονα (Tsitsiloni et al., 1993, Mori et al., 1993, Wu CG et al., 1997α, 1997β, Sasaki et al., 1997, 2001). Η προθυμοσίνη α έχει θεωρηθεί ως ογκο-πρωτεΐνη που επάγει την κακοήγη εξαλλαγή ινοβλαστικών κυττάρων (Orre et al., 2001).

Τα στοιχεία για την συμμετοχή της παραθυμοσίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είναι περιορισμένα. Αυξημένα επίπεδα της παραθυμοσίνης έχουν ανιχνευθεί σε καρκινικούς ιστούς εντέρου και μαστού (Tsitsiloni et al., 1993, 1994, 1998). Η πρωτεΐνη θεωρήθηκε ότι επιταχύνει τις διαδικασίες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω αναστολής του συμπλέγματος του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε ηπατοκύτταρα επίμυος (Okamoto et al., 2000).

Ο ρόλος της προθυμοσίνης α στην απόπτωση αποτελεί αντικείμενο πρόσφατων και σημαντικών μελετών. Οι Jiang et al. (2003) έδειξαν ότι η πρωτεΐνη είναι ισχυρός αναστολέας της αποπτωτικής διαδικασίας. Πιο συγκεκριμένα, η προθυμοσίνη α αναστέλλει τον σχηματισμό του συμπλόκου (αποπτωσωμάτιο) μεταξύ του παράγοντα



Araf-1 (apoptotic protease activator factor-1) και του κυτοχρώματος c, το οποίο είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση της πρωτεάσης-caspase 9. Η αύξηση των επιπέδων της προθυμοσίνης α σε αποπτωτικά κύτταρα (Furuya et al., 1993, Wang et al., 2000) πιθανότατα έχει σχέση με τον παραπάνω μηχανισμό επιβίωσης των κυττάρων. Η αναστολή της σύνθεσης της προθυμοσίνης α οδήγησε τις κυτταρικές σειρές HeLa και HL-60 σε απόπτωση, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι πρόκειται για αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη (Rodriguez et al., 1999, Jiang et al., 2003).

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα γίνεται φανερό ότι η προθυμοσίνη α συμμετέχει τόσο στην ρύθμιση κυτταρικού πολλαπλασιασμού όσο και της αποπτωτικής διαδικασίας, γεγονός που χαρακτηρίζει τους κλασσικούς μεταγραφικούς παράγοντες c-myc, E2F-1 και p53.

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε για πρώτη φορά η έκφραση της προθυμοσίνης α και της παραθυμοσίνης στον θυρεοειδή αδένα του ανθρώπου σε περιπτώσεις φυσιολογικού ιστού και απλής οζώδους βρογχοκήλης. Η έκφραση της προθυμοσίνης α μελετήθηκε επιπλέον σε καλοήγη και κακοήγη νεοπλασμάτα του αδένα. Επιπρόσθετα διερευνήθηκε ο ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων προθυμοσίνη α, E2F-1 και p53 και των αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bax στην ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης των θυλακιωδών κυττάρων του θυρεοειδούς.

Επίπεδα mRNA της προθυμοσίνης α και της παραθυμοσίνης στην απλή οζώδη βρογχοκήλη.

Η παρακέντηση του θυρεοειδούς αδένα με λεπτή βελόνη σε συνδυασμό με την κυτταρολογική εξέταση του δείγματος (Fine-needle aspiration biopsy, FNAB) αποτελεί μια αξιόπιστη προεγχειρητική μέθοδο αξιολόγησης των θυρεοειδικών όζων. Η μέθοδος είναι υψηλής διαγνωστικής ακριβείας, χαμηλού κόστους, καλά ανεκτή από τον ασθενή και το σημαντικότερο μπορεί να επαναληφθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα επιτρέποντας την συνεχή παρακολούθηση της εξέλιξης ενός όζου (Gharib et al., 1994). Σε ένα μεγάλο ποσοστό (10-25%) η κυτταρολογική εξέταση είναι μη-διαγνωστική, είτε λόγω ανεπαρκούς ποσότητας δείγματος είτε λόγω αδιευκρίνιστου ιστολογικού τύπου, συνήθως όταν πρόκειται για θυλακιώδες νεόπλασμα (αδένωμα, καρκίνωμα) (Baloch et

al., 1998, Bakhos et al., 2000, Chow et al., 2001). Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει τον σημαντικό ρόλο της μοριακής ανάλυσης του υλικού της παρακέντησης στην διάγνωση των θυρεοειδικών όζων. Το υλικό της παρακέντησης που παραμένει μέσα στην σύριγγα έχει αποδειχτεί ότι είναι αρκετό για την απομόνωση γονιδιωματικού DNA και RNA. Το γενετικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση (PCR) και την μελέτη της έκφρασης (RT-PCR) γονιδίων που σχετίζονται με νοσήματα του θυρεοειδούς καθώς και για τον έλεγχο μεταλλάξεων είτε άμεσα με αλληλούχηση του προϊόντος (sequencing) είτε έμμεσα με τεχνικές όπως η SSCP που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη (Russo et al., 1999). Οι Winzer et al. (1998) με τεχνική FNAB-RT-PCR ανίχνευσαν από ελάχιστο αριθμό θυλακιωδών κυττάρων (10-1000) ένα πλήθος γονιδίων που σχετίζονται με τον θυρεοειδή αδένα (Tg, TSHr, NIS, DI, DII). Η ανίχνευση του mRNA της ιωδονεκτίνης (onfFN) και των γονιδίων MAGE 1 και GAGE 1/2 έχει συνδεθεί με την διάγνωση του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς (Ruschenburg et al., 1999, Takano et al., 2000). Η ταυτόχρονη ανίχνευση των γονιδίων RET, καλοτονίνης και καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA) σε δείγματα FNAB είναι ενδεικτική μυελοειδούς καρκίνου του θυρεοειδούς (Takano et al., 2000). Οι Chiappetta et al. (2000) χρησιμοποιώντας την τεχνική FNAB-RT-PCR έδειξαν ότι το γονίδιο fra-1 εκφράζεται μόνο σε νεοπλασματικές βλάβες του αδένα.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε για πρώτη φορά η έκφραση των γονιδίων της προθυμοσίνης α, της παραθυμοσίνης και της πρωτεΐνης p53 σε υλικό παρακέντησης από ασθενείς με απλή οζώδη βρογχοκήλη, η οποία χαρακτηρίζεται από καλοήγη υπερπλασία των θυλακιωδών κυττάρων και είναι αποτέλεσμα του χρόνιου ερεθισμού του αδένα από την θυρεοειδοτρόπο ορμόνη (TSH), ανεξάρτητα από την αρχική αιτία (ιωδοπενία, δυσορμονογένεση). Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου στην περιοχή της Ηπείρου είναι πολύ υψηλή (21%) σε αντίθεση με τον γενικό πληθυσμό (4-5%) (Tsatsoulis et al., 1996). Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών προσδιορίστηκαν με ημι-ποσοστική RT-PCR ενός βήματος κατά την εκθετική φάση ενίσχυσης του προϊόντος.

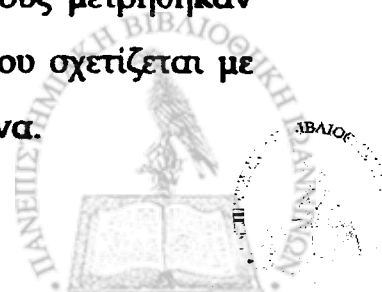
Η θετική έκφραση του γονιδίου της β-ακτίνης (εσωτερικός μάρτυρας) σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν έδειξε ότι το υλικό της παρακέντησης που παρέμεινε στην βελόνη μετά την βιοψία ήταν αρκετό για την απομονώση ολικού RNA. Ωστόσο η συγκέντρωση του εξαγόμενου RNA ήταν πολύ χαμηλή και δύσκολο να προσδιοριστεί

φωτομετρικά. Για τον λόγο αυτό τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν ομαλοποιήθηκαν με την χρήση ειδικού λογισμικού προγράμματος με βάση αυτά της β-ακτίνης ώστε να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα επίπεδα mRNA της προθυμοσίνης α και της παραθυμοσίνης είναι αυξημένα στην απλή οξώδη βρογχοκήλη σε σχέση με τον φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό, γεγονός που συνδέεται άμεσα με την ικανότητα πολλαπλασιασμού των θυλακιωδών κυττάρων. Τα επίπεδα της προθυμοσίνης α παραλληλίζονται με τα αυτά της παραθυμοσίνης σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν, γεγονός που πιθανότατα σχετίζεται με κοινό μηχανισμό δράσης των δύο πρωτεϊνών. Δείξαμε επίσης ότι η παραθυμοσίνη εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με την προθυμοσίνη α στον θυρεοειδή αδένα. Αυτό επιβεβαιώνει την αντίστροφη ιστική κατανομή που παρουσιάζουν οι δύο πρωτεΐνες με υπεροχή της παραθυμοσίνης σε μη-λεμφικούς ιστούς και της προθυμοσίνης α σε λεμφικούς ιστούς.

Έχει δειχθεί ότι η έκφραση του mRNA της προθυμοσίνης α επάγεται από την θυρεοειδοτρόπο ορμόνη (TSH) σε πολλαπλασιαζόμενα θυρεοειδικά κύτταρα ποντικού (FRTL-5) (Alvarez et al., 1993). Η TSH επάγει ένα πλήθος γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των θυλακιωδών κυττάρων και την βιοσύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών. Τα αυξημένα επίπεδα της προθυμοσίνης α στην απλή οξώδη βρογχοκήλη σε συνδυασμό με την παρατήρηση (ανοσοϊστοχημική μελέτη) ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται ως επί το πλείστον σε ενεργοποιημένα κενοτοπιώδη θυλάκια, μπορεί να είναι αποτέλεσμα θετικής μεταγραφικής ρύθμισης από την TSH.

Η έκφραση της προθυμοσίνης α μελετήθηκε επίσης σε ιστολογικές τομές παραφίνης από κακοήγη νεοπλασμάτα του θυρεοειδούς αδένα. Η απομόνωση ολικού RNA από τομές παραφίνης είναι ιδιαίτερα δύσκολη διαδικασία λόγω της αποδόμησης που υφίστανται το RNA από τα υλικά μονιμοποίησης και διατήρησης του ιστού. Το ποσοστό επιτυχούς απομόνωσης RNA στην παρούσα μελέτη ήταν σχετικά υψηλό (45.45%) συγκρινόμενο με δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας (Coombs et al., 1999). Τα επίπεδα mRNA της προθυμοσίνης α στον καρκίνο του θυρεοειδούς μετρήθηκαν σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό, γεγονός που σχετίζεται με την αύξηση του πολλαπλασιασμού των θυλακιωδών κυττάρων του αδένα.



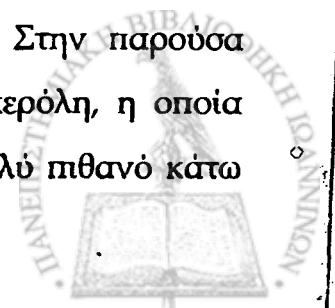
Δείξαμε ότι η πρωτεΐνη p53 δεν εκφράζεται σε επίπεδο mRNA στην απλή οζώδη βρογχοκήλη, γεγονός που ενισχύει τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής μελέτης και πιθανότατα σχετίζεται με την χαμηλή αποπτωτική δραστηριότητα που παρατηρείται στην συγκεκριμένη νόσο.

Μελέτη πολυμορφισμών του γονιδίου της προθυμοσίνης α στην απλή οζώδη βρογχοκήλη.

Η ανάλυση της διαμόρφωσης της μονόκλωνης δομής του DNA (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP) αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών ενός γονιδίου. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι μονόκλινα μόρια DNA που διαφέρουν κατά ένα νουκλεοτίδιο, μετακινούνται με διαφορετική ταχύτητα σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου λόγω αλλαγής της δευτεροταγούς δομής τους (Orita et al., 1989).

Στην παρούσα μελέτη τα δείγματα FNA των ασθενών με απλή οζώδη βρογχοκήλη διερευνήθηκαν με RT-PCR-SSCP για την ύπαρξη πολυμορφισμών του γονιδίου της προθυμοσίνης α. Όπως αναφέρθηκε, η προθυμοσίνη α κωδικοποιείται από μια οικογένεια έξι γονιδίων από τα οποία το ένα είναι λειτουργικό ενώ τα άλλα πέντε στερούνται ιντρονίων και χαρακτηρίζονται ως ψευδογονίδια (Eschenfeldt et al., 1989, Manrow et al., 1992). Επιπλέον, λόγω εναλλακτικού ματίσματος (alternative splicing) προκύπτουν δύο διαφορετικά mRNA της προθυμοσίνης α σε αναλογία 9:1 (Manrow and Berger, 1993).

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, θεωρήθηκε πολύ πιθανή η ανίχνευση πολυμορφισμών του γονιδίου της προθυμοσίνης α με την συγκεκριμένη τεχνική. Ωστόσο, υπό τις συνθήκες που διεξήχθη η πειραματική διαδικασία της SSCP δεν παρατηρήθηκαν πολυμορφισμοί του γονιδίου της προθυμοσίνης α στην απλή οζώδη βρογχοκήλη. Η SSCP επιτρέπει την ανίχνευση πολυμορφισμών ενός γονιδίου υπό συγκεκριμένες συνθήκες που καθορίζονται κυρίως από την συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου και την θερμοκρασία ηλεκτροφόρησης της πηκτής. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε πήγμα ακρυλαμιδίου 7% με ή χωρίς γλυκερόλη, η οποία ηλεκτροφορήθηκε στους 4°C και σε θερμοκρασία δωματίου. Είναι πολύ πιθανό κάτω



από αυτές τις συνθήκες να μην είναι δυνατή η ανίχνευση πολυμορφισμών του γονιδίου της προθυμοσίνης α. Επιπλέον, η ευαισθησία της μεθόδου εξαρτάται άμεσα από το μέγεθος (bp) του υπό μελέτη τμήματος. Στην δική μας περίπτωση το μέγεθος του cDNA της προθυμοσίνης α που μελετήθηκε ήταν 255 bp. Η SSCP ανιχνεύει το 70-95% των μεταλλάξεων σε προϊόντα PCR με μέγεθος μικρότερο από 200 bp και η ευαισθησία ελαττώνεται στο 50% για μεγέθη μεγαλύτερα από 400 bp (Michaud et al., 1992). Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι ο μικρός αριθμός των δειγμάτων που μελετήθηκαν δεν μπορεί να οδηγήσει σε ασφαλή συμπεράσματα για την ύπαρξη ή όχι πολυμορφισμών του γονιδίου της προθυμοσίνης α στην απλή οξώδη βρογχοκίλη.

Μελέτη της έκφρασης της προθυμοσίνης α σε επίπεδο πρωτεΐνης στον ορό και σε ιστικά εκχυλίσματα ασθενών με καλοήγη και κακοήγη νοσήματα του θυρεοειδούς αδένα.

Η μελέτη της έκφρασης της προθυμοσίνης α σε πρωτεϊνικό επίπεδο πραγματοποιήθηκε με συναγωνιστική ανοσοπροσοροφητική μέθοδο (competitive inhibition ELISA). Οι μέχρι πρόσφατα ανοσοπροσοροφητικές μέθοδοι (Elisa, RIA) που είχαν αναπτυχθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό της προθυμοσίνης α στον ορό και σε κυτταρικά εκχυλίσματα ιστών χρησιμοποιούσαν αντίσωμα έναντι της θυμοσίνης α1, του πεπτιδίου που αντιστοιχεί στο αμινοτελικό άκρο της προθυμοσίνης α (1-28 αμινοξέα) και πιθανότατα προέρχεται από πρωτεολυτική διάσπαση της τελευταίας (Haritos et al., 1984). Στις συγκεκριμένες μελέτες ο έμμεσος προσδιορισμός των επιπέδων της προθυμοσίνης α μέσω των επιπέδων της θυμοσίνης α1 (αναλογία 1:1) οδήγησε σε αντιφατικά αποτελέσματα (ΠΙΝΑΚΑΣ 22). Οι Tsitsiloni et al. (1998) προσδιόρισαν τα επίπεδα της προθυμοσίνης α σε κυτταρικά εκχυλίσματα μαστικού αδένα με ραδιοανοσολογική μέθοδο χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι του αμινοτελικού άκρου (θυμοσίνη α1) και έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της προθυμοσίνης α. Οι μέσες τιμές συγκέντρωσης της πρωτεΐνης διέφεραν σημαντικά, γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει αναλογία 1:1 μεταξύ της θυμοσίνης α1 και της προθυμοσίνης α. Στην παρούσα μελέτη η ανοσοπροσοροφητική μέθοδος που αναπτύχθηκε χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Τα επίπεδα της

ΠΑΝΑΚΑΣ 22. Συγκριτική μελέτη των συγκεντρώσεων της προθυμοσίνης α και της θυροσίνης α1 στον ορό και σε ιστικά παρασκευάσματα, όπως προσδιορίστηκαν με ανοσοπροσροφητικές μεθόδους (ELISA, RIA). Η αμινοξική αλληλουχία της θυροσίνης α1 είναι ταυτόσημη με το αμινοτελικό άκρο της προθυμοσίνης α (αμινοξέα 1-28) (Haritos et al., 1984).

Τεχνική	Αντίσωμα	Συγκέντρωση	Βιβλιογραφία
RIA (αίμα)	προθυμοσίνη α (αμινοτελικό άκρο, Τα1)	0.69-0.88 µg/ml σε υγιή άτομα	Panneerselvam et al., 1987
RIA (ιστός)	προθυμοσίνη α (αμινοτελικό άκρο, Τα1)	2.98 µg/g σε υγιή άτομα 4.64 µg/g στον καρκίνο του μαστού	Tsitsilonis et al., 1998
RIA (ιστός)	προθυμοσίνη α (καρβοξυτελικό άκρο)	5.45 µg/g σε υγιή άτομα 12.73 µg/g στον καρκίνο του μαστού	Tsitsilonis et al., 1998
ELISA (ορός)	προθυμοσίνη α (καρβοξυτελικό άκρο)	0.67-2.34 µg/ml σε υγιή άτομα	Costopoulou et al., 1998
ELISA (ορός)	προθυμοσίνη α (καρβοξυτελικό άκρο)	0.03 ± 0.016 µg/ml σε υγιή άτομα	Παρούσα μελέτη, 2003
ELISA (ιστός)	προθυμοσίνη α (καρβοξυτελικό άκρο)	4.5 ± 1.25 µg/g στην οξώδη βρογχοκήλη 4.06 ± 1.04 µg/g στο θυλακιώδες αδένωμα 4.63 ± 1.34 µg/g στον καρκίνο του θυρεοειδούς	Παρούσα μελέτη, 2003
ELISA (ορός)	Τα1	0.252-1.158 µg/ml σε υγιή άτομα	Weller et al., 1992
ELISA (ορός)	Τα1	1.043 ± 0.576 µg/ml σε υγιή άτομα	Welch et al., 1987
RIA (ορός)	Τα1	0.0026 ± 0.0011 µg/ml σε υγιή άτομα 0.0055 ± 0.0067 µg/ml στον καρκίνο του στομάχου	Mitani et al., 2000
RIA (ορός)	Τα1	0.00273 ± 0.00108 µg/ml σε υγιή άτομα 0.00572 ± 0.00429 µg/ml στον καρκίνο του πνεύμονα	Sasaki et al., 1997

Προθυμοσίνη α

Θυροσίνη α1 (Τα1)

προθυμοσίνης α μετρήθηκαν άμεσα με την χρήση αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης (87-109 αμινοξέα).

Όπως αναφέρθηκε, η προθυμοσίνη α και η θυμοσίνη α1 είναι ανοσοενεργά πεπτίδια με πιθανή συμμετοχή στην παθογένεια αυτοάνοσων νοσημάτων (ανασκόπηση των Pineiro et al., 2000). Η οξώδης υπερπλαστική θυρεοειδική νόσος είναι συνήθως αποτέλεσμα αυτοανοσίας (νόσος του Graves, θυρεοειδίτιδα Hashimoto). Επιπλέον, τα επίπεδα της θυμοσίνης α1 έχουν βρεθεί αυξημένα στον ορό ασθενών με κακοήθη νεοπλασμάτα του στομάχου και του πνεύμονα (Sasaki et al., 1997, Mitani et al., 2000), γεγονός που πιθανότατα ισχύει και για την προθυμοσίνη α. Για τους λόγους που αναφέρθηκαν, τα επίπεδα της προθυμοσίνης α προσδιορίστηκαν αρχικά στον ορό υγιών ατόμων και ασθενών με απλή οξώδη βρογχοκίλη. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης βρέθηκε να κυμαίνεται στα ίδια χαμηλά επίπεδα στους μάρτυρες και στους ασθενείς (ΠΙΝΑΚΑΣ 22). Πρέπει να αναφερθεί ότι όλοι οι ασθενείς ήταν αρνητικοί για αντιθυρεοειδικά αντισώματα (anti-TSH, anti-TPO), οπότε ένας πιθανός εξωκυττάριος ανοσορρυθμιστικός ρόλος της προθυμοσίνης α δεν μπορεί να αποκλειστεί για την συγκεκριμένη νόσο. Στην διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει μόνο μια μελέτη στην οποία τα επίπεδα της προθυμοσίνης α μετρήθηκαν στον ορό υγιών ατόμων με αντίσωμα έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της προθυμοσίνης α (101-109 αμινοξέα) (Costoroulou et al., 1998). Στην συγκεκριμένη μελέτη η συγκέντρωση της πρωτεΐνης βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με την αντίστοιχη της παρούσας εργασίας. Η διαφορά αυτή θα μπορούσε να ερμηνευθεί από την σχετική ειδικότητα και ευαισθησία των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και την πιθανότητα να συνδέονται και με άλλες όξινες πρωτεΐνες. Στην παρούσα μελέτη το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε αντιστοιχεί σε μεγαλύτερη περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου της προθυμοσίνης α (87-109 αμινοξέα) και θεωρητικά είναι περισσότερο ειδικό.

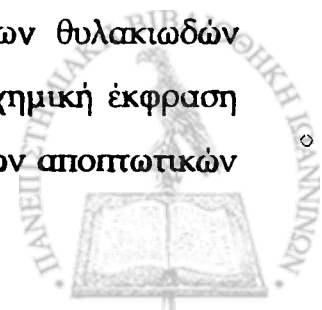
Στην συνέχεια η συγκέντρωση της προθυμοσίνης α μετρήθηκε σε εκχυλίσματα θυρεοειδικού ιστού από ασθενείς με απλή οξώδη βρογχοκίλη, θυλακιώδες αδένωμα και καλά διαφοροποιημένο καρκίνωμα. Με έκκληξη διαπιστώσαμε ότι τα επίπεδα της προθυμοσίνης α δεν διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στις καλοήθεις και κακοήθεις βλάβες του αδένου (ΠΙΝΑΚΑΣ 22). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε πλήρη συμφωνία με τα αντίστοιχα της ανοσοϊστοχημικής μελέτης και μπορεί να

δικαιολογηθούν από τον πολύ χαμηλό δείκτη πολλαπλασιασμού των θυλακιωδών κυττάρων στις συγκεκριμένες νόσους (βλέπε αποτελέσματα ανοσοϊστοχημείας, Katoh et al., 1995, Yoshida et al., 1999). Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα επίπεδα της προθυμοσίνης α δεν αποτελούν διαφοροδιαγνωστικό δείκτη ανάμεσα στις καλοήθειες και κακοήθειες νόσους του θυρεοειδούς. Αξιίζει να αναφερθεί ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης μετρήθηκαν σημαντικά υψηλότερα στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες, ιδιαίτερα σε ηλικίες άνω των 50 ετών.

Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και απόπτωση στον θυρεοειδή αδένα. Ο ρόλος της προθυμοσίνης α και του μεταγραφικού παράγοντα E2F-1 στην ρύθμιση της έκφρασης των αποπτωτικών γονιδίων bcl-2 και bax.

Η φυσιολογική ανάπτυξη και διατήρηση της ομοιόστασης ενός ιστού διασφαλίζεται από την δυναμική ισορροπία ανάμεσα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) (Meier et al., 2000). Οι σημαντικότεροι μεταγραφικοί παράγοντες (p53, E2F-1, c-myc) εμπλέκονται στην ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν τόσο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όσο και στην απόπτωση (Vogelstein et al., 2000, Sears and Nevins, 2002). Η προθυμοσίνη α είναι μια ογκο-πρωτεΐνη (Orre et al., 2001) με χαρακτηριστές μεταγραφικού παράγοντα (Subramanian et al., 2002) με αδιαμφισβήτητο ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση. Η έκφραση της πρωτεΐνης επάγεται από τον παράγοντα E2F-1 (Vareli et al., 1996) και τα ογκο-γονίδια c-myc (Eilers et al., 1991) και E6 (papilloma virus type 16) (Kinoshita et al., 1997), ενώ καταστέλλεται από το γονίδιο p53 (Zhao et al., 2000). Η προθυμοσίνη α και οι μεταγραφικοί παράγοντες NFκB (Bui et al., 2001), STAT-3 (Stephanou et al., 2000) και STAT-5 (Socolovsky et al., 2001) αναστέλλουν την αποπτωτική διαδικασία, ενώ οι μεταγραφικοί παράγοντες p53 (Vogelstein et al., 2000), E2F-1 (Qin et al., 1994), c-myc (Zindy et al., 1998), c-Jun (Crocker et al., 2001) και AFX (Tang et al., 2002) επάγουν την απόπτωση.

Στην παρούσα μελέτη ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση των θυλακιωδών κυττάρων του θυρεοειδούς διερευνήθηκε σε σχέση με την ανοσοϊστοχημική έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων προθυμοσίνη α, E2F-1 και p53 και των αποπτωτικών



πρωτεϊνών Bcl-2 και Bax, σε μια σειρά από ιστολογικές τομές παραφίνης, που περιελάμβανε περιπτώσεις φυσιολογικού ιστού, απλής οζώδους βρογχοκήλης, θυλακιώδους αδενώματος και καλά διαφοροποιημένου καρκίνωματος. Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων εκτιμήθηκε σε σχέση με την έκφραση του αντιγόνου Ki-67. Το πυρηνικό αντιγόνο Ki-67 είναι μια μη ιστονική πρωτεΐνη με άγνωστη λειτουργία, η οποία εκφράζεται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου εκτός από την φάση G0 (Gerdes et al., 1984). Η έκφραση του Ki-67 αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη πολλαπλασιασμού των κυττάρων καθώς έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται στους περισσότερους καρκινικούς ιστούς που έχει μελετηθεί (Quinn et al., 1990, Scott et al., 1991). Η *in situ* ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο TUNEL.

Ο δείκτης πολλαπλασιασμού των θυλακιωδών κυττάρων βρέθηκε πολύ χαμηλός σε όλους τους ιστολογικούς τύπους. Στατιστικά σημαντική αύξηση του δείκτη παρατηρήθηκε στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα του αδένου σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό, την απλή οζώδη βρογχοκήλη και τα θυλακιώδη αδενώματα, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Katoh et al., 1995, Yoshida et al., 1999). Αξίζει να αναφερθεί ότι τα θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς πολλαπλασιάζονται μόνο 5 φορές στην ενήλικη ζωή (Coclet et al., 1989).

Ο αποπτωτικός δείκτης βρέθηκε χαμηλός σε όλους τους ιστολογικούς τύπους που μελετήθηκαν. Μείτρια αύξηση του αποπτωτικού δείκτη παρατηρήθηκε στα θυλακιώδη αδενώματα και στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες, στις οποίες ο αποπτωτικός δείκτης, με εξαίρεση τα αδιαφοροποίητα καρκινώματα, είναι χαμηλός στις καλοήθεις και καλά διαφοροποιημένες νεοπλασίες του αδένου (Yoshida et al., 1999, Sreelenkha et al., 2000).

Ο λόγος των δεικτών πολλαπλασιασμού και απόπτωσης βρέθηκε πολύ χαμηλός στον φυσιολογικό ιστό, χαμηλός στην απλή οζώδη βρογχοκήλη και στα θυλακιώδη αδενώματα και υψηλότερος στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα του αδένου. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ώστε να αποτελέσει κριτήριο διαφοροδιάγνωσης μεταξύ των παραπάνω ιστολογικών τύπων. Υψηλός λόγος των δεικτών πολλαπλασιασμού και απόπτωσης παρατηρείται κυρίως στα αδιαφοροποίητα

καρκινώματα του θυρεοειδούς για τα οποία θεωρείται διαγνωστικό κριτήριο (Basholo et al., 1997, Yoshida et al., 1999).

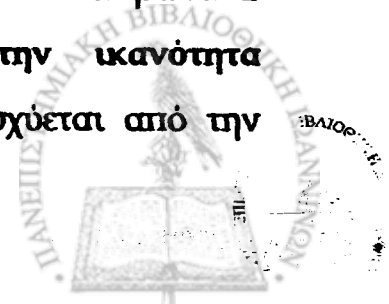
Η έκφραση της προθυμοσίνης *a* βρέθηκε σημαντικά αυξημένη στην απλή οζώδη βρογχοκήλη, στα θυλακιώδη αδενώματα και στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα του αδένου σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό. Η αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης στην απλή οζώδη βρογχοκήλη επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της μελέτης της ημι-ποσοτικής RT-PCR. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές της έκφρασης της προθυμοσίνης *a* ανάμεσα στις υπερπλαστικές και νεοπλασματικές βλάβες του αδένου, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της ανοσοπροσοφθητικής μέτρησης και μπορεί να εξηγηθεί με βάση τον χαμηλό δείκτη πολλαπλασιασμού των κυττάρων στις περιπτώσεις αυτές. Ωστόσο, τα επίπεδα της πρωτεΐνης ήταν σαφώς υψηλότερα στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα του αδένου σε σχέση με τους άλλους ιστολογικούς τύπους. Η προθυμοσίνη *a* βρέθηκε να υπερεκφράζεται σε ενεργοποιημένα θυλάκια στην απλή οζώδη βρογχοκήλη, γεγονός που πιθανότατα συνδέεται με θετική ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την βιοσύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών.

Η προθυμοσίνη *a* είναι είναι ισχυρός αναστολέας της αποπτωτικής διαδικασίας. Σύμφωνα με την καλά τεκμηριωμένη μελέτη των Jiang et al. (2003), η πρωτεΐνη αναστέλλει τον σχηματισμό του συμπλόκου (αποπτωσωμάτιο) μεταξύ του παράγοντα Araf-1 (apoptotic protease activator factor-1) και του κυτοχρώματος *c*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση της πρωτεάσης-caspase 9. Στην συγκεκριμένη μελέτη ωστόσο, δεν αποσαφηνίστηκε ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται η αναστολή του σχηματισμού του αποπτωσωματίου. Θεωρητικά, η αντι-αποπτωτική δράση της προθυμοσίνης *a* δύναται να σχετίζεται είτε με αρνητική ρύθμιση της έκφρασης του αποπτωτικού παράγοντα Araf-1 είτε με αναστολή της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος *c* από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα. Στην τελευταία περίπτωση η προθυμοσίνη *a* μπορεί να ρυθμίζει την διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης για το κυτόχρωμα *c* είτε άμεσα, είτε έμμεσα μέσω επαγωγής της έκφρασης γονιδίων της οικογένειας *bcl-2*, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB, ο οποίος επάγει θετικά την έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-x (Bui et al., 2001). Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε για πρώτη φορά η έκφραση της

προθυμοσίνης α σε σχέση με την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax και την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2. Σε όλους τους ιστολογικούς τύπους και ειδικότερα στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα του θυρεοειδούς παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των πρωτεϊνών προθυμοσίνη α και Bcl-2. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η προθυμοσίνη α αναστέλλει έμμεσα τον σχηματισμό του αποπτωσωματίου πιθανότατα μέσω επαγωγής της έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, η οποία παρεμποδίζει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα σταθεροποιώντας τους πόρους της μιτοχονδριακής μεμβράνης (ΣΧΗΜΑ 17).

Ο μεταγραφικός παράγοντας E2F-1 εμπλέκεται στον παθολογικό δρόμο cyclin/Cdk/Rb (Sears and Nevins, 2002). Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb) από τις κυκλίνες D και E μέσω των αντίστοιχων κινασών οδηγεί σε ενεργοποίηση του E2F-1 με άμεσο αποτέλεσμα την είσοδο των κυττάρων στην S φάση του κύκλου (Johnson et al., 1994, Degregori et al., 1995). Η έκφραση του παράγοντα E2F-1 επάγει την κακοήγη εξαλλαγή ινοβλαστικών κυττάρων (Johnson et al., 1993), ενώ αυξημένα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης παρατηρούνται σε καρκινικούς ιστούς του στομάχου, του παχέως εντέρου (Suzuki et al., 1999) και του μαστού (Zhang et al., 2000) καθώς και σε μη-Hodgkin λεμφώματα (Lai et al., 1998). Πρόσφατες ανοσοϊστοχημικές μελέτες έδειξαν ότι ο E2F-1 υπερκφράζεται σε καλοήθεις και κακοήθεις υπερπλασίες του θυρεοειδούς αδένα σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό (Saiz et al., 2002, Volante et al., 2002).

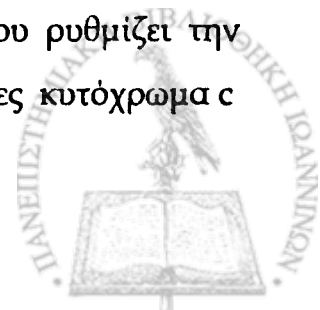
Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του E2F-1 στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα και στα θυλακιώδη αδενώματα του θυρεοειδούς σε σχέση με την απλή οζώδη βρογχοκήλη και τον φυσιολογικό ιστό. Σημαντική διαφορά στην έκφραση βρέθηκε επιπλέον στα νεοπλάσματα του αδένα (καρκινώματα και αδενώματα). Το γεγονός αυτό αποκτά κλινική σημασία στην διαφοροδιάγνωση των νεοπλασιών του αδένα και ιδιαίτερα ανάμεσα στο θυλακιώδες αδένωμα από το αντίστοιχο καρκίνωμα. Τα παραπάνω δείχνουν ότι τα επίπεδα του E2F-1 αντικατοπτρίζουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού των θυλακιωδών κυττάρων, γεγονός που ενισχύεται από την

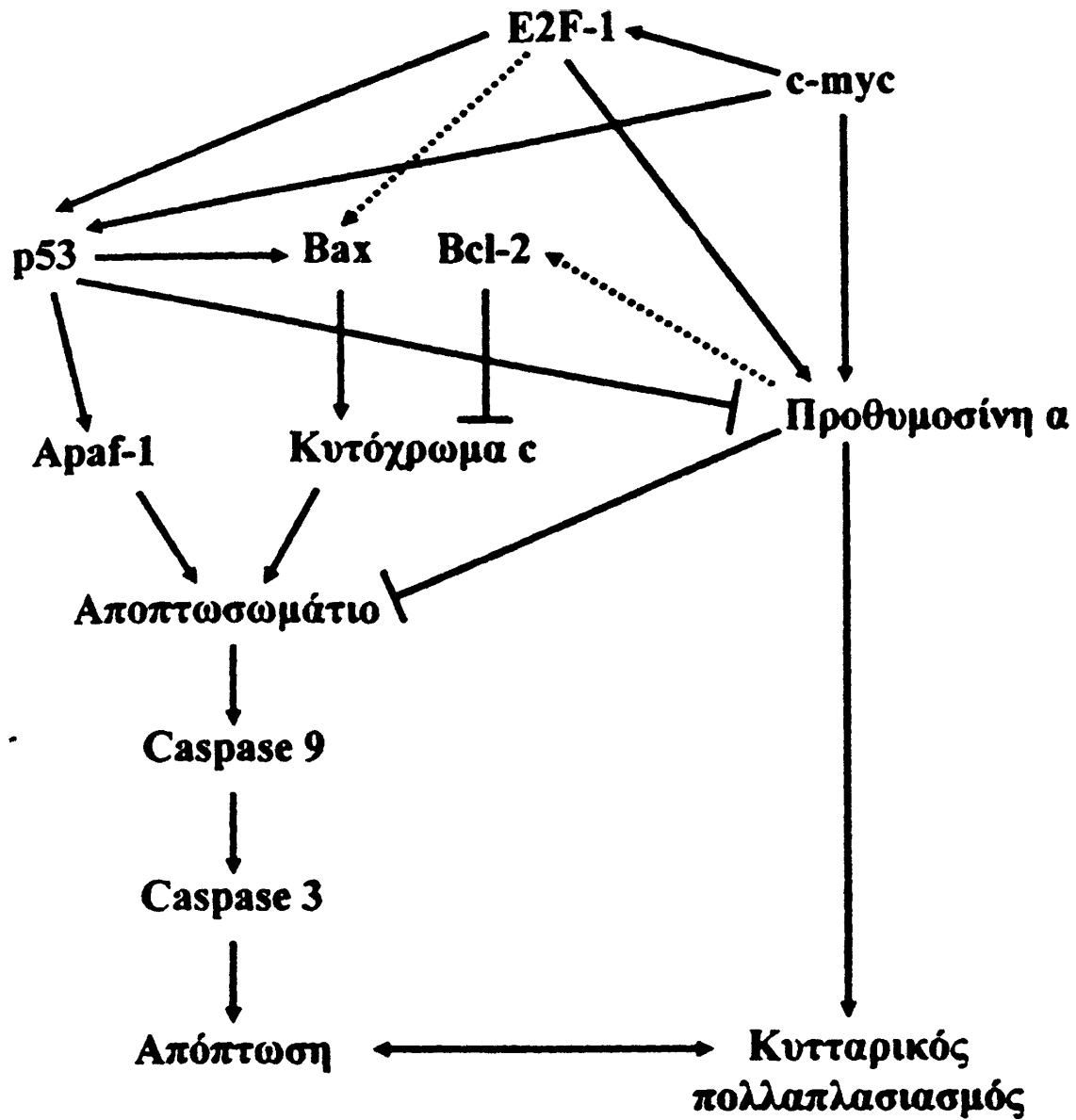


θετική συσχέτιση που παρατηρήθηκε ανάμεσα στη έκφραση του E2F-1 και στον δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67.

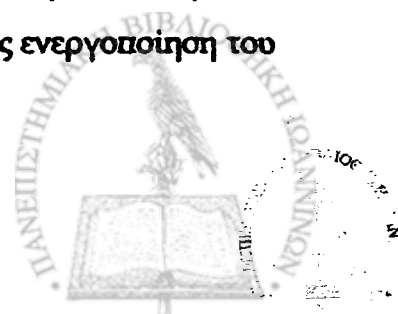
Αποτελέσματα σημαντικών μελετών έδειξαν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας E2F-1 επάγει την απόπτωση είτε απευθείας μέσω ενεργοποίησης του γονιδίου p53 (Wu and Levine, 1994, Kowalik et al., 1995) είτε ανεξάρτητα από τον παθογενετικό δρόμο του p53 (Holmberg et al., 1998, Flores et al., 2002, Tanaka et al., 2002). Δείξαμε ότι η έκφραση του E2F-1 συσχετίζεται με τον βαθμό απόπτωσης των θυλακιωδών κυττάρων. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax με την έκφραση των πρωτεϊνών E2F-1 και p53. Ο αποπτωτικός δρόμος E2F-1/p53 περιλαμβάνει αρχικά την ενεργοποίηση του γονιδίου p53 από τον E2F-1 (Kowalik et al., 1995) και στην συνέχεια την επαγωγή της έκφρασης της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax από το γονίδιο p53 (Selvankumaran et al., 1994). Στην συγκεκριμένη μελέτη, οι πρωτεΐνες E2F-1 και p53 δεν συσχετίστηκαν μεταξύ τους, ενώ όπως ήταν αναμενόμενο (Moore et al., 1998, Puglisi et al., 2000) η πλειονότητα των περιπτώσεων που μελετήθηκαν (καλοήθεις και κακοήθεις) βρέθηκε αρνητική για έκφραση της πρωτεΐνης p53. Ανοσοϊστοχημικά το γονίδιο p53 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα κυρίως στα αδιαφοροποίητα καρκινώματα (Pollina et al., 1996, Puglisi et al., 2000) και συνήθως ανιχνεύεται η ανενεργός μεταλλαγμένη πρωτεΐνη η οποία εμφανίζει μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής σε σχέση με την φυσιολογική (Levine et al., 1991, Battifora et al., 1994). Τα παραπάνω ευρήματα μας οδηγούν στην υπόθεση ότι η επαγόμενη από τον E2F-1 απόπτωση, ανεξάρτητα από τον παθογενετικό δρόμο του p53, πιθανότατα σχετίζεται με άμεση ενεργοποίηση του προ-αποπτωτικού γονιδίου bax (ΣΧΗΜΑ 17). Πρόσφατες μελέτες με DNA μικροσυστοιχίες (microarrays) έδειξαν ότι ο E2F-1 επάγει την έκφραση των προ-αποπτωτικών γονιδίων Bok, Bad, Bak και Bid1 της οικογένειας Bcl-2 (Ma et al., 2002, Polager et al., 2002, Stanelle et al., 2002) και ενισχύουν την υπόθεση της παρούσας μελέτης.

Οι πρωτεΐνες Bcl-2 και Bax σχηματίζουν ομοδιμερή και ετεροδιμερή στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και η σχετική αναλογία (Bcl-2/Bax, Bcl-2/Bcl-2 και Bax/Bax) λειτουργεί σαν ένα είδος ενδοκυττάρου ρεοστάτη που ρυθμίζει την διαπερατότητα της μεμβράνης για τους προ-αποπτωτικούς παράγοντες κυτόχρωμα c





ΣΧΗΜΑ 17. Μηχανισμοί ρύθμισης της απόπτωσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τους μεταγραφικούς παράγοντες προθυμοσίνη α, p53, E2F-1 και c-myc. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης απεικονίζονται με τα διακοπόμενα βέλη. Η προθυμοσίνη α αναστέλλει τον σχηματισμό του αποπτωσωματίου (Jiang et al., 2003) πιθανότατα μέσω επαγωγής της έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, η οποία αναστέλλει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια. Η επαγόμενη από τον E2F-1 απόπτωση σε κύτταρα τα οποία δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη p53 πιθανότατα σχετίζεται με απευθείας ενεργοποίηση του γονιδίου bax.



και Smac/DIABLO (Oltvai et al., 1993, Kluck et al., 1997, Gross et al., 1999, Sun et al., 2002). Η αντι-αποπτωτική δράση της πρωτεΐνης Bcl-2 οφείλεται στο γεγονός ότι σταθεροποιεί την μιτοχονδριακή μεμβράνη και δεν επιτρέπει την έξοδο των ανωτέρω παραγόντων στο κυτταρόπλασμα, σε αντίθεση με την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax (Tao et al., 1998, Goldstein et al., 2000, Antonsson et al., 2001, Degenhardt et al., 2002).

Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι η πρωτεΐνη Bcl-2 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον φυσιολογικό ιστό, στην απλή οζώδη βρογχοκήλη, στα θυλακιώδη αδενώματα και στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα του αδένου, γεγονός που εξηγεί τον πολύ χαμηλό αποπτωτικό δείκτη που προσδιορίστηκε στους συγκεκριμένους ιστολογικούς τύπους και καταδικνεί την ισχυρή αντι-αποπτωτική δράση της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν προηγούμενες μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας (Pollina et al., 1996, Sreelenkha et al., 2000).

Η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax βρέθηκε ότι δεν εκφράζεται στον φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό, ενώ θετική ανοσοαντίδραση παρατηρήθηκε στο 30% των περιπτώσεων της απλής οζώδους βρογχοκήλης, στο 70% των αδενωμάτων και στο 72.72% των καρκινωμάτων. Η στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του Bax στα νεοπλάσματα του αδένου μπορεί να δικαιολογήσει την ήπια αύξηση του αποπτωτικού δείκτη που παρατηρήθηκε στις περιπτώσεις αυτές. Η αύξηση του ποσοστού έκφρασης του Bax στις παραπάνω περιπτώσεις πιθανότατα σχετίζεται με τον βαθμό διαφοροποίησης των θυλακιωδών κυττάρων. Προηγούμενες μελέτες σχετικά με την έκφραση του Bax οδήγησαν σε αντιφατικά συμπεράσματα. Οι Farid et al. (2001) έδειξαν ότι η πρωτεΐνη δεν εκφράζεται στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τις μελέτες των Branet et al. (1996) και Hermann et al. (2001) των οποίων τα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά της παρούσας εργασίας.

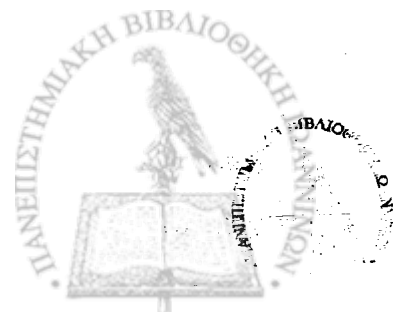
Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι σε όλους τους παθολογικούς τύπους που μελετήθηκαν η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 υπερείχε της αντίστοιχης του Bax και ο λόγος Bcl-2/Bax βρέθηκε υψηλός στον φυσιολογικό αδένου, χαμηλός στην απλή οζώδη βρογχοκήλη και χαμηλότερος στα αδενώματα και καρκινώματα. Ωστόσο η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική ώστε να αποτελέσει κριτήριο διαφοροδιάγνωσης μεταξύ των παραπάνω ιστολογικών τύπων.



Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε μια θετική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bax στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα. Ο μηχανισμός με τον οποίο οι δύο πρωτεΐνες ανταγωνίζονται μεταξύ τους και σχηματίζουν ομοδιμερή και ετεροδιμερή στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων δεν είναι γνωστός. Πιθανότατα αυτό καθορίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες που επάγουν ή αναστέλλουν την έκφραση των δύο πρωτεϊνών, όπως συμβαίνει με το γονίδιο p53 (Selvankumaran et al., 1994).

Συμπερασματικά θα μπορούσε να λεχθεί:

1. Η προθυμοσίνη α και η παραθυμοσίνη υπερεκφράζονται στην απλή οξώδη βρογχοκήλη σε σχέση με τον φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό, γεγονός που συνδέεται άμεσα με την ικανότητα πολλαπλασιασμού των θυλακιωδών κυττάρων.
2. Η προθυμοσίνη α υπερεκφράζεται στις καλοήθεις και κακοήθεις βλάβες του αδένου σε σχέση με τον φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό. Ωστόσο, τα επίπεδα της πρωτεΐνης δεν αποτελούν διαφοροδιαγνωστικό δείκτη ανάμεσα στις παθήσεις αυτές.
3. Η προθυμοσίνη α υπερεκφράζεται σε ενεργοποιημένα κενστοπώδη θυλάκια στην απλή οξώδη βρογχοκήλη, γεγονός που πιθανότατα συνδέεται με θετική ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την βιοσύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών.
4. Η προθυμοσίνη α αναστέλλει έμμεσα τον σχηματισμό του αποπτωσωματίου, πιθανότατα μέσω επαγωγής της έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2.
5. Η προθυμοσίνη α επάγει τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την απόπτωση των θυλακιωδών κυττάρων, προάγωντας την συνεχή ανάπτυξη των θυρεοειδικών όζων.



5. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

5.1. Περίληψη στα Ελληνικά.

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗΣ α ΣΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Π. ΛΕΤΣΑΣ, ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Η προθυμοσίνη α είναι μια μικρή, όξινη, πυρηνική ογκο-πρωτεΐνη με χαρακτηρισές μεταγραφικού παράγοντα που εμπλέκεται τόσο στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού όσο και της αποπτωτικής διαδικασίας. Η έκφραση του γονιδίου της προθυμοσίνης α επάγεται από τους παράγοντες c-myc και E2F-1 και καταστέλλεται από την πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη p53. Ο ενδοκυττάριος ρόλος της πρωτεΐνης είναι στενά συνδεδεμένος με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η έκφραση της πρωτεΐνης επάγεται σε συνθήκες κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε καλλιέργειες NIH3T3 ινοβλαστών, T-λεμφοκυττάρων και ηπατοκυττάρων. Η μιτωτική διαδικασία αναστέλλεται στην κυτταρική σειρά ανθρώπινου μυελώματος RPMI 8226 όταν προστεθεί στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας μίγμα από τέσσερα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (antisense) συμπληρωματικά σε περιοχές του mRNA της προθυμοσίνης α . Τα επίπεδα της προθυμοσίνης α έχουν βρεθεί αυξημένα σε ταχέως αναπτυσσόμενους φυσιολογικούς ιστούς καθώς και σε καρκινικούς ιστούς του μαστού, του εντέρου, του ήπατος και του πνεύμονα.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η προθυμοσίνη α είναι ισχυρός αναστολέας της αποπτωτικής διαδικασίας. Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη αναστέλλει τον σχηματισμό του συμπλόκου (αποπτωσωμάτιο) μεταξύ του παράγοντα Apaf-1 (apoptotic protease activator factor-1) και του κυτοχρώματος c, το οποίο είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση της πρωτεάσης-caspase 9.

Η παραθυμοσίνη είναι μια μικρή, όξινη πρωτεΐνη που παρουσιάζει σημαντική ομολογία και κοινά χαρακτηριστικά με την προθυμοσίνη α . Τα δεδομένα για την

συμμετοχή της παραθυμοσίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είναι περιορισμένα. Αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης έχουν ανιχνευθεί σε καρκινικούς ιστούς εντέρου και μαστού. Η παραθυμοσίνη θεωρήθηκε ότι επιταχύνει τις διαδικασίες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω αναστολής του συμπλέγματος του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε ηπατοκύτταρα επίμυος.

Η απλή οζώδης βρογχοκήλη χαρακτηρίζεται από καλοήγη υπερπλασία των θυλακιωδών κυττάρων, ως αποτέλεσμα του χρόνιου ερεθισμού του αδένου από την θυρεοειδοτρόπο ορμόνη (TSH), ανεξάρτητα από την αρχική αιτία (ιωδοπενία, δυσορμονογένεση). Η συχνότητα εμφάνισης της οζώδους βρογχοκήλης στην περιοχή της Ηπείρου είναι πολύ υψηλή (21%) σε αντίθεση με τον γενικό πληθυσμό (4-5%). Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αδένου αποτελεί την συχνότερη ενδοκρινική νεοπλασία. Η συχνότητά του ανέρχεται στο 0.6% και 1.6% του συνόλου των νεοπλασμάτων στους άνδρες και στις γυναίκες αντίστοιχα. Η αιτιολογία του καρκίνου του θυρεοειδούς αδένου παραμένει κατά το πλείστον αδιευκρίνιστη. Σήμερα πιστεύεται ότι περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες δρουν συνεργικά για την κακοήγη εξαλλαγή των θυλακιωδών κυττάρων του αδένου.

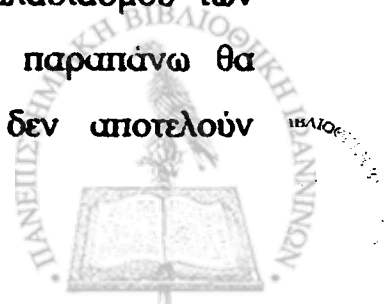
Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε για πρώτη φορά η έκφραση των γονιδίων της προθυμοσίνης α και της παραθυμοσίνης σε θυλακιώδη κύτταρα θυρεοειδούς αδένου που ελήφθησαν με παρακέντηση με λεπτή βελόνη (fine-needle aspiration, FNA) από ασθενείς με απλή οζώδη βρογχοκήλη. Τα επίπεδα mRNA των δύο πρωτεϊνών προσδιορίστηκαν με ημι-ποσοστική αντίδραση RT-PCR ενός βήματος κατά την εκθετική φάση ενίσχυσης του προϊόντος.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα επίπεδα mRNA της προθυμοσίνης α και της παραθυμοσίνης είναι αυξημένα στην απλή οζώδη βρογχοκήλη σε σχέση με τον φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό, γεγονός που συνδέεται άμεσα με την ικανότητα πολλαπλασιασμού των θυλακιωδών κυττάρων. Τα επίπεδα της προθυμοσίνης α ακολουθούν τα αντίστοιχα της παραθυμοσίνης σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν, γεγονός που πιθανότατα σχετίζεται κοινό μηχανισμό δράσης των δύο πρωτεϊνών. Η έκφραση της προθυμοσίνης α μελετήθηκε επιπλέον σε ιστολογικές τομές παραφίνης από κακοήγη νεοπλάσματα του θυρεοειδούς αδένου, από τις οποίες απομονώθηκε επιτυχώς ολικό RNA. Τα επίπεδα mRNA της προθυμοσίνης α στον

καρκίνο του θυρεοειδούς μετρήθηκαν σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό, γεγονός που σχετίζεται με την αύξηση του πολλαπλασιασμού των θυλακιωδών κυττάρων του αδένου.

Στην συνέχεια, τα δείγματα FNA των ασθενών με απλή οζώδη βρογχοκήλη διερευνήθηκαν με την τεχνική της ανάλυσης της διαμόρφωσης της μονόκλωνης δομής του DNA (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP) για την ύπαρξη πολυμορφισμών του γονιδίου της προθυμοσίνης α. Η προθυμοσίνη α κωδικοποιείται από μια οικογένεια έξι γονιδίων από τα οποία το ένα είναι λειτουργικό ενώ τα άλλα πέντε στερούνται ιντρονίων και χαρακτηρίζονται ως ψευδογονίδια. Επιπλέον, λόγω εναλλακτικού ματίσματος (alternative splicing) προκύπτουν δύο διαφορετικά mRNA της προθυμοσίνης α σε αναλογία 9:1. Υπό τις συνθήκες που διεξήχθη η πειραματική διαδικασία της SSCP δεν παρατηρήθηκαν πολυμορφισμοί του γονιδίου της προθυμοσίνης α στην απλή οζώδη βρογχοκήλη.

Ακολούθως, η μελέτη της έκφρασης της προθυμοσίνης α πραγματοποιήθηκε με συναγωνιστική ανοσοπροσοφητική μέθοδο (competitive inhibition ELISA) υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας με την χρήση αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης (87-109 αμινοξέα). Τα επίπεδα της προθυμοσίνης α προσδιορίστηκαν αρχικά στον ορό υγιών ατόμων και ασθενών με απλή οζώδη βρογχοκήλη και βρέθηκαν να κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα. Πρέπει να αναφερθεί ότι όλοι οι ασθενείς ήταν αρνητικοί για αντιθυρεοειδικά αντισώματα (anti-TSH, anti-TPO), οπότε ένας πιθανός εξωκυττάριος ανοσορρυθμιστικός ρόλος της προθυμοσίνης α δεν μπορεί να αποκλειστεί για την συγκεκριμένη νόσο. Στην συνέχεια η συγκέντρωση της προθυμοσίνης α προσδιορίστηκε σε εκχυλίσματα θυρεοειδικού ιστού από ασθενείς με απλή οζώδη βρογχοκήλη, θυλακιώδες αδένωμα και καλά διαφοροποιημένο καρκίνωμα. Διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα της προθυμοσίνης α δεν διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στις καλοήθειες και κακοήθειες βλάβες του αδένου. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε πλήρη συμφωνία με τα αντίστοιχα της ανοσοϊστοχημικής μελέτης και μπορεί να δικαιολογηθούν από τον πολύ χαμηλό δείκτη πολλαπλασιασμού των θυλακιωδών κυττάρων στις συγκεκριμένες νόσους. Με βάση τα παραπάνω θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα επίπεδα της προθυμοσίνης α δεν αποτελούν



διαφοροδιαγνωστικό δείκτη ανάμεσα στις καλοήθειες και κακοήθειες παθήσεις του θυρεοειδούς αδένα.

Ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση των θυλακιωδών κυττάρων του θυρεοειδούς διερευνήθηκαν σε σχέση με την ανοσοϊστοχημική έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων προθυμοσίνη α, E2F-1 και p53 και των αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bax, σε μια σειρά από ιστολογικές τομές παραφίνης, που περιελάμβανε περιπτώσεις φυσιολογικού ιστού, απλής οζώδους βρογχοκήλης, θυλακιώδους αδενώματος και καλά διαφοροποιημένου καρκινώματος. Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων εκτιμήθηκε σε σχέση με την έκφραση του αντιγόνου Ki-67. Η *in situ* ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο TUNEL.

Οι δείκτες πολλαπλασιασμού και απόπτωσης των θυλακιωδών κυττάρων βρέθηκαν πολύ χαμηλοί σε όλους τους ιστολογικούς τύπους μελετήθηκαν. Στατιστικά σημαντική αύξηση των δεικτών παρατηρήθηκε στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα του αδένα σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό, την απλή οζώδη βρογχοκήλη και τα θυλακιώδη αδενώματα, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες.

Η έκφραση της προθυμοσίνης α βρέθηκε σημαντικά αυξημένη στην απλή οζώδη βρογχοκήλη, στα θυλακιώδη αδενώματα και στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα του αδένα σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό. Η αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης στην απλή οζώδη βρογχοκήλη επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της μελέτης της ημι-ποσοτικής RT-PCR. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές της έκφρασης της προθυμοσίνης α ανάμεσα στις υπερπλαστικές και νεοπλασματικές βλάβες του αδένα, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της ανοσοπροσοφορικής μέτρησης και μπορεί να εξηγηθεί με βάση τον χαμηλό δείκτη πολλαπλασιασμού των κυττάρων στις περιπτώσεις αυτές. Η προθυμοσίνη α βρέθηκε να υπερεκφράζεται σε ενεργοποιημένα κενοτοπιώδη θυλάκια στην απλή οζώδη βρογχοκήλη, γεγονός που πιθανότατα συνδέεται με θετική ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την βιοσύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών.

Ακολούθως διερευνήθηκε για πρώτη φορά η έκφραση της προθυμοσίνης α σε σχέση με την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax και την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2. Σε όλους τους ιστολογικούς τύπους και ειδικότερα στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα του θυρεοειδούς παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των πρωτεϊνών

προθυμοσίνη α και Bcl-2. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η προθυμοσίνη α αναστέλλει έμμεσα τον σχηματισμό του αποπτωσωματίου πιθανότατα μέσω επαγωγής της έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, η οποία παρεμποδίζει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα σταθεροποιώντας τους πόρους της μιτοχονδριακής μεμβράνης.

Ο μεταγραφικός παράγοντας E2F-1 εμπλέκεται στην ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν τόσο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όσο και στην απόπτωση. Στην παρούσα ανοσοϊστοχημική μελέτη διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων του E2F-1 στον καρκίνο του θυρεοειδούς σε σχέση με το θυλακιώδες αδένωμα, την απλή οζώδη βρογχοκήλη και τον φυσιολογικό ιστό. Το γεγονός αυτό αποκτά κλινική σημασία στην διαφοροδιάγνωση των νεοπλασιών του αδένου και ιδιαίτερα ανάμεσα στο θυλακιώδες αδένωμα από το αντίστοιχο καρκίνωμα. Ο παράγοντας E2F-1 επάγει την διαδικασία της απόπτωσης είτε απευθείας μέσω ενεργοποίησης του γονιδίου p53 είτε ανεξάρτητα από τον παθογενετικό δρόμο του p53. Τα αποτελέσματα της εργασίας οδήγησαν στην υπόθεση ότι η επαγόμενη από τον E2F-1 απόπτωση, ανεξάρτητα από τον παθογενετικό δρόμο του p53, πιθανότατα σχετίζεται με άμεση ενεργοποίηση του προ-αποπτωτικού γονιδίου bax.

Συμπερασματικά, θα μπορούσε να λεχθεί ότι η προθυμοσίνη α επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την απόπτωση των θυλακιώδων κυττάρων, προάγοντας την συνεχή ανάπτυξη των νεοπλασιών του θυρεοειδούς αδένου. Η διερεύνηση του ενδοκυττάριου ρόλου της προθυμοσίνης α και ειδικότερα η συμμετοχή της στην ρύθμιση της αποπτωτικής διαδικασίας, αποτελεί ένα ελκυστικό πεδίο μελλοντικής έρευνας.



5. 2. Περίληψη στα Αγγλικά.

SUMMARY**THE ROLE OF PROTHYMOSIN α IN PROLIFERATION AND APOPTOSIS
OF HUMAN THYROID DISEASES****KONSTANTINOS P. LETSAS, MD****DOCTORATE THESIS**

Prothymosin α and parathymosin are two small acidic nuclear and highly homology proteins, initially isolated from rat thymus. Both polypeptides are evolutionary conserved and widely distributed within mammalian tissues, indicating an essential biological role. The distribution of ProT α and ParaT in the nucleus has been related to transcription and replication sites, respectively, while both proteins have been found to interact with histone H1, indicating a role in chromatin remodeling.

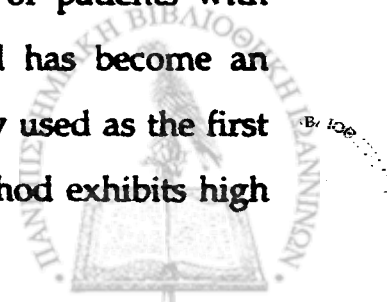
Accumulating data have demonstrated that prothymosin α and parathymosin are involved in cell cycle progression and proliferation. Prothymosin α gene expression is upregulated by c-myc and E2F-1 transcription factors as well as by human papilloma virus type 16 E6 oncogene, and downregulated by p53 tumor suppressor protein, suggesting a crucial involvement in cell proliferation machinery. Prothymosin α mRNA levels are increased during the G1-S transition of the cell cycle, while abrogation of prothymosin α synthesis by antisense oligonucleotides led to cell division arrest in myeloma cells. Prothymosin α transcripts are induced upon growth stimulation of resting lymphocytes, NIH3T3 fibroblasts, thymocytes and hepatocytes during liver regeneration. The protein has been reported as an oncoprotein inducing transformation in rodent fibroblasts. Similarly to other transcriptions factors, prothymosin α levels have been found elevated in several malignant tissues, including colon, hepatocellular, breast, and lung cancer, and therefore, a participation in carcinogenesis appears to be quite possible. Parathymosin levels as determined by

radioimmunoassays were found elevated in breast and colon cancer in relation to the neighbouring normal tissues. Moreover, parathyrosin has been suggested to accelerate the proliferation process by inhibiting glucocorticoid action.

Prothymosin α has been recently linked with programmed cell death. The protein has been suggested as an anti-apoptotic factor that negatively regulates caspase-9 activation by inhibition of apoptosome formation (Apaf-1/cytochrome c complex). Prothymosin α gene is upregulated in the early stages of retinoic acid-induced apoptosis in T-cell lymphoma cells, while inhibition of prothymosin α synthesis by antisense oligonucleotides induces apoptosis in HL-60 cells.

Human simple non-toxic nodular goiter is characterized by focal hyperplasia and hypertrophy of follicular thyroid cells. In northwestern Greece, the incidence of the disease is over 20%, mostly due to iodine deficiency. The development of simple nodular goiter, either endemic or sporadic, has been suggested to be the result of complex interactions between genetic, environmental and endogenous factors. In family studies, a variety of genes have been implicated in goitrogenesis, such as the thyroglobulin gene, the thyroid-stimulating hormone receptor gene, the Na⁺/I⁻ symporter gene, and the multinodular goiter marker-1 on chromosome 14. The importance of genetic factors is evident from the clustering of simple nodular goiter within families and from the higher concordance rate in monozygotic than in dizygotic twins. On molecular basis the aetiology of simple nodular goiter still remains obscure. Cancer is a complex, multistep process, which in the case of thyroid neoplasms is not yet completely understood. Several genes have been proposed to implicate in the pathogenesis of thyroid carcinomas.

Prothymosin α and parathyrosin expression patterns have never been studied in thyroid proliferations. In the present study, using a semi-quantitative RT-PCR assay, we investigated prothymosin α and parathyrosin mRNAs expression pattern in thyroid follicular cells obtained from the remaining material within the needle used for fine-needle aspiration biopsy (FNAB)-based cytology examination of patients with simple nodular goiter. FNAB-based cytology of the thyroid gland has become an established and accurate diagnostic preoperative test that is routinely used as the first step in the evaluation of nodular thyroid disease. Although the method exhibits high

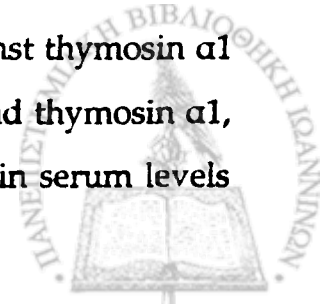


specificity and sensitivity, results might be non-diagnostic in a significant number of cases, usually because of specimen inadequacy. Previous studies have demonstrated that genetic analysis of FNABs by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) may contribute, in parallel to the cytology report, to a more precise diagnosis.

We found that after cytological preparation of aspirates, the remaining material within the needle was adequate for RNA isolation and RT-PCR amplification of prothymosin α and parathymosin cDNA. Prothymosin α and parathymosin levels were found elevated in simple nodular goiter in relation to normal thyroid tissue, and may provide an objective measure of thyroid follicular cells proliferation activity. Previous studies have been shown that the two polypeptides share a reciprocal tissue distribution; prothymosin α is predominantly expressed in lymphoid tissues such as spleen and thymus, while parathymosin is mainly expressed in non-lymphoid tissues such as liver and kidney. We showed that parathymosin is expressed in higher levels than prothymosin α in human thyroid tissue.

RT-PCR-SSCP genetic analysis of FNABs was subsequently performed to investigate for polymorphisms of prothymosin α gene. The protein is coded by a gene family of six members, one of which is functional giving rise to two mRNA transcripts by alternative splicing, while the other five are intronless and characterized as pseudogenes. Under the conditions that our method was carried out, no polymorphisms of prothymosin α cDNA fragments were detected in FNABs. Keeping in mind the small number of FNABs studied and the reduced sensitivity of the method for cDNA fragments over 200 bp, we evaluate our results as indicative of no polymorphisms of prothymosin α gene in thyroid tissue.

A highly specific competitive inhibition immunosorbent assay (ELISA) was then developed for quantitative determination of prothymosin α in serum samples and tissue extracts taken from patients with benign and malignant thyroid diseases. ELISA was carried out using an antibody against the C-terminal of prothymosin α (87-109 residues), which allowed us to discriminate ProT α from T α 1, the NH₂-terminal of prothymosin α (1-28 residues). Previous studies, using antibodies against thymosin α 1 and assuming a one to one correspondence between prothymosin α and thymosin α 1, have given conflicting data. No significant differences were observed in serum levels



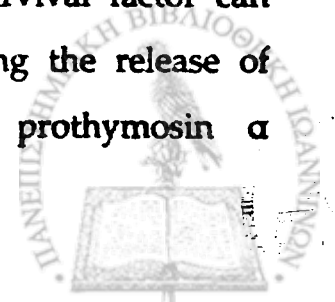
between simple nodular goiter patients and normal individuals. In tissue specimens, prothymosin α was found to share a parallel expression profile in benign and malignant lesions, and thus, could not be considered as a diagnostic marker for thyroid neoplasias.

Apoptosis and proliferation were subsequently investigated in benign and malignant thyroid tissue sections in relation to transcription factors (prothymosin α , E2F-1, p53)-mediated expression of the pro- and anti-apoptotic proteins (Bcl-2, Bax). Proliferation index was determined by Ki-67 immunoreactivity. In situ detection of apoptosis and determination of apoptotic index were carried out using the TUNEL method.

The proliferative activity of follicular cells in normal, hyperplastic and neoplastic thyroid histotypes was found very low. However, the growth activity was significantly higher in carcinomas compared to other histological types. The apoptotic index was also found very low in all histotypes studied, exhibiting a slightly higher extend in neoplastic lesions. The ratio between proliferation and apoptotic indices was ineffective in distinguishing between benign and well-differentiated malignant thyroid lesions.

Prothymosin α immunoexpression was found elevated in goiters, follicular adenomas and well-differentiated carcinomas in relation to normal tissues. However, no significant differences of prothymosin α immunoexpression were observed in benign and carcinomatous lesions. This fact could be explained by the low proliferative activity of follicular cells in all histotypes studied, as assessed by Ki-67 expression. We also found that prothymosin α is mainly expressed in activated vacuolated follicles in nodular goiter, and therefore may be implicated, as a transcription factor, in thyroid hormones synthesis. This hypothesis is strongly supported by the observation that prothymosin α mRNA is induced in proliferating rat thyroid cells, upon thyroid stimulating hormone (TSH) stimulation.

Our results showed a direct correlation between prothymosin α and the anti-apoptotic protein Bcl-2 in well-differentiated carcinomas. Bcl-2 survival factor can negatively modulate the formation of the apoptosome by blocking the release of cytochrome c from mitochondria. These data suggest that prothymosin α



overexpression may prevent apoptosis and promote the development and progression of thyroid tumors by inducing bcl-2 gene expression.

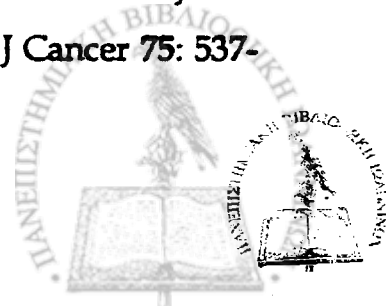
E2F-1 transcription factor couples cellular proliferation with the induction of apoptosis via p53-dependent and p53-independent pathways. Our findings showed that E2F-1 is overexpressed in well-differentiated carcinomas and follicular adenomas compared to goiters and normal tissues, an event possibly linked to thyroid tumor development. The direct correlation observed between proliferation index and E2F-1 accumulation supports the above hypothesis. Moreover, E2F-1 was directly correlated with apoptotic index and Bax immunoexpression. Considering that the majority of benign and malignant thyroid lesions were negative for p53 expression we suggest that E2F-1-induced apoptosis via p53-independent pathways may be associated to direct transcriptional activation of bax pro-apoptotic gene.

In conclusion, these data suggest that prothymosin α and parathymosin mRNA expression profile is associated with the proliferation activity of thyroid follicular cells. However, prothymosin α was found to share a similar expression profile in benign and malignant thyroid diseases, as assessed by ELISA and immunohistochemistry, an event possibly linked to the low proliferative activity of follicular cells. Furthermore, we showed that prothymosin α might promote cell survival, and therefore, the development of thyroid neoplasias through the Bcl-2 anti-apoptotic pathway, while E2F-1-induced apoptosis via p53-independent pathways may be associated to transcriptional activation of bax pro-apoptotic gene. Additional studies addressing the functional role of prothymosin α and parathymosin are needed to gain further insight into the regulation of proliferation and apoptosis of thyroid follicular cells.



6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

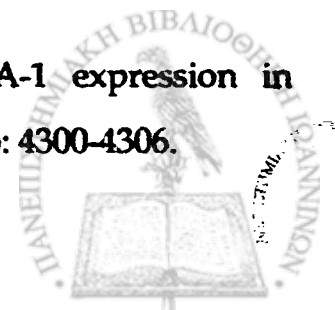
1. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci.* 2001 26: 61-66.
2. Alvarez CV, Zalvide JB, Cancio E, et al. 1993. Prothymosin alpha mRNA is expressed in competent and proliferating rat thyroid cells (FRTL-5) but is not sufficient to elicit cell progression through the cell cycle. *J Mol Endocrinol.* 11: 249-256.
3. Ameisen JC. 1996. The origin of programmed cell death. *Science.* 272: 1278-1289.
4. Ancell CD, Phipps J, Young L. 2001. Thymosin alpha-1. *Am J Health Syst Pharm.* 58: 879-885.
5. Aniello F, Branno M, De Rienzo G, et al. 2002. First evidence of prothymosin alpha in a non-mammalian vertebrate and its involvement in the spermatogenesis of the frog *Rana esculenta*. *Mech Dev.* 110: 213-217.
6. Antonsson B. 2001. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res.* 306: 347-361.
7. Bakhos R, Selvaggi SM, DeJong S, et al. 2000. Gordon DL, Pitale SU, Herrmann M, Wojcik EM. Fine-needle aspiration of the thyroid: rate and causes of cytohistopathologic discordance. *Diagn Cytopathol.* 23: 233-237.
8. Bakiri F, Djemli FK, Mokrane LA, et al. 1998. The relative roles of endemic goiter and socioeconomic development status in the prognosis of thyroid carcinoma. *Cancer.* 82: 1146-1153.
9. Baloch ZW, Sack MJ, Yu GH, et al. 1998. Fine-needle aspiration of thyroid: an institutional experience. *Thyroid.* 8: 565-569.
10. Barcia MG, Castro JM, Jullien CD, et al. 1993. Prothymosin alpha is phosphorylated in proliferating stimulated cells. *J Biol Chem.* 268: 4704-4708.
11. Basolo F, Pollina L, Fontanini G, et al. 1997. Apoptosis and proliferation in thyroid carcinoma: correlation with bcl-2 and p53 protein expression. *Br J Cancer* 75: 537-541.



12. Basu A, Haldar S. 1998. The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod.* 4: 1099-1109.
13. Battifora H. 1994. p53 immunohistochemistry: a word of caution. *Hum Pathol.* 25: 435-437.
14. Baxevanis CN, Frillingos S, Seferiadis K, et al. 1990. Enhancement of human T lymphocyte function by prothymosin alpha: increased production of interleukin-2 and expression of interleukin-2 receptors in normal human peripheral blood T lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 12: 595-617.
15. Baxevanis CN, Reclos GJ, Economou M, et al. 1988. Mechanism of action of prothymosin alpha in the human autologous mixed lymphocyte response. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 10: 443-461.
16. Baxevanis CN, Reclos GJ, Papamichail M, et al. 1987. Prothymosin alpha restores the depressed autologous and allogeneic mixed lymphocyte responses in patients with systemic lupus erythematosus. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 9: 429-440.
17. Baxevanis CN, Reclos GJ, Papamichail M. 1993. Prothymosin alpha restores depressed allogeneic cell-mediated lympholysis and natural-killer-cell activity in patients with cancer. *Int J Cancer.* 53: 264-268.
18. Baxevanis CN, Sfagos C, Anastasopoulos E, et al. 1990. Prothymosin-alpha enhances HLA-DR antigen expression on monocytes from patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 27: 141-147.
19. Baxevanis CN, Thanos D, Reclos GJ, et al. 1992. Prothymosin alpha enhances human and murine MHC class II surface antigen expression and messenger RNA accumulation. *J Immunol.* 148: 1979-1984.
20. Becker DV, Robbins J, Beebe GW, et al. 1996. Childhood thyroid cancer following the Chernobyl accident: a status report. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 25: 197-211.
21. Boan F, Vinas A, Buceta M, et al. 2001. Prothymosin alpha, a mammalian c-myc-regulated acidic nuclear protein, provokes the decondensation of human chromosomes in vitro. *Cytogenet Cell Genet.* 93: 171-174.



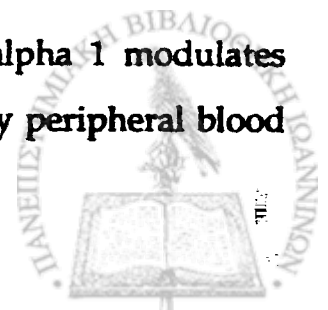
22. Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, et al. 2000. Review of thymic hormones in cancer diagnosis and treatment. *Int J Immunopharmacol.* 22: 261-273.
23. Brand IA, Heinickel A, Soling HD. 1991. Localization of a 11.5 kDa Zn (2+)-binding protein (parathymosin) in different rat tissues. Cell type-specific distribution between cytosolic and nuclear compartment. *Eur J Cell Biol.* 54: 157-165.
24. Brand IA, Heinickel A. 1991. Key enzymes of carbohydrate metabolism as targets of the 11.5-kDa Zn (2+)-binding protein (parathymosin). *J Biol Chem.* 266: 20984-20989.
25. Branet F, Brousset P, Krajewski S, et al. 1996. Expression of the cell death-inducing gene bax in carcinomas developed from the follicular cells of the thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab.* 81: 2726-2730.
26. Brix TH, Hegedus L. 2000. Genetic and environmental factors in the aetiology of simple goiter. *Ann Med.* 32: 153-156.
27. Brix TH, Kyvik KO, Hegedus L. 1999. Major role of genes in the etiology of simple goiter in females: a population-based twin study. *J Clin Endocr Metab.* 84: 3071-3075.
28. Bui NT, Livolsi A, Peyron JF, et al. 2001. Activation of nuclear factor kappaB and Bcl-x survival gene expression by nerve growth factor requires tyrosine phosphorylation of IkappaBalpha. *J Cell Biol.* 152: 753-764
29. Bustelo XR, Otero A, Gomez-Marquez J, et al. 1991. Expression of the rat prothymosin alpha gene during T-lymphocyte proliferation and liver regeneration. *J Biol Chem.* 266: 1443-1447.
30. Castro JM, Barcia MG. 1996. Localization of prothymosin alpha in the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun.* 224: 140-146.
31. Cheung NW, Lou JC, Boyages SC. 1996. GH does not increase thyroid size in the absence of thyrotropin: a study in adults with hypopituitarism. *J Crin Endocr Metab.* 81: 1179-1183.
32. Chiappetta G, Tallini G, De Biasio MC, et al. 2000. FRA-1 expression in hyperplastic and neoplastic thyroid diseases. *Clin Cancer Res.* 6: 4300-4306.



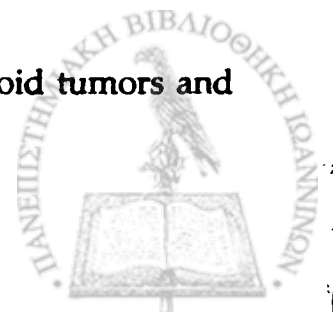
33. Chow LS, Gharib H, Goellner JR, et al. 2001. Nondiagnostic thyroid fine-needle aspiration cytology: management dilemmas. *Thyroid*. **11**: 1147-1151.
34. Clinton M, Frangou-Lazaridis M, Panneerselvam C, et al. 1989. Prothymosin alpha and parathymosin: mRNA and polypeptide levels in rodent tissues. *Arch Biochem Biophys*. **269**: 256-263.
35. Clinton M, Frangou-Lazaridis M, Panneerselvam C, et al. 1989. The sequence of human parathymosin deduced from a cloned human kidney cDNA. *Biochem Biophys Res Commun*. **158**: 855-862.
36. Clinton M, Graeve L, el-Dorry H, et al. 1991. Evidence for nuclear targeting of prothymosin and parathymosin synthesized in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**: 6608-6612.
37. Cocks HC, Ramsden JD, Watkinson JC, et al. 2000. Thyroid stimulating hormone increases angiogenic growth factor expression in rat thyrocytes. *Clin Otolaryngol*. **25**: 570-576.
38. Contreas CN, Mutchnick MG, Palmer KC, et al. 1990. Cellular levels of thymosin immunoreactive peptides are linked to proliferative events: evidence for a nuclear site of action. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**: 3269-3273.
39. Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. 1999. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res*. **27**: e12.
40. Cordero OJ, Sarandeses C, Lopez-Rodriguez JL, et al. 1995. The presence and cytotoxicity of CD16⁺ CD2⁻ subset from PBL and NK cells in long-term IL-2 cultures enhanced by Prothymosin-alpha. *Immunopharmacology*. **29**: 215-223.
41. Cordero OJ, Sarandeses C, Nogueira M. 1994. Prothymosin alpha receptors on peripheral blood mononuclear cells. *FEBS Lett*. **341**: 23-27.
42. Cordero OJ, Sarandeses C, Nogueira M. 1995. Prothymosin alpha receptors on lymphocytes. *J Interferon Cytokine Res*. **15**: 731-737.
43. Cordero OJ, Sarandeses CS, Lopez JL, et al. 1991. Prothymosin alpha enhances interleukin 2 receptor expression in normal human T-lymphocytes. *Int J Immunopharmacol*. **13**: 1059-1065.



44. Cordero OJ, Sarandeses CS, Lopez JL, et al. 1992. Prothymosin alpha enhances human natural killer cell cytotoxicity: role in mediating signals for NK activity. *Lymphokine Cytokine Res.* 11: 277-285.
45. Costopoulou D, Leondiadis L, Czarnecki J, et al. 1998. Direct ELISA method for the specific determination of prothymosin alpha in human specimens. *J Immunoassay.* 19: 295-316.
46. Crocker SJ, Lamba WR, Smith PD, et al. 2001. c-Jun mediates axotomy-induced dopamine neuron death in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13385-13390
47. De Rienzo G, Di Sena R, Ferrara D, et al. 2002. Temporal and spatial localization of prothymosin alpha transcript in the Harderian gland of the frog, *Rana esculenta*. *J Exp Zool.* 292: 633-639.
48. Degenhardt K, Perez D, White E. 2000. Pathways used by adenovirus E1B 19K to inhibit apoptosis. *Symp Soc Exp Biol.* 52: 241-251.
49. Degregori J, Leone G, Ohtani K, et al. 1995. E2F1 accumulation bypasses a G1 arrest resulting from the inhibition of G1 cyclin-dependent kinase activity. *Genes Dev.* 9: 2873-2887.
50. Diaz-Jullien C, Perez-Estevez A, Covelo G, et al. 1996. Prothymosin alpha binds histones in vitro and shows activity in nucleosome assembly assay. *Biochim Biophys Acta.* 1296: 219-227.
51. Dominguez F, Magdalena C, Cancio E, et al. 1993. Tissue concentrations of prothymosin alpha: a novel proliferation index of primary breast cancer. *Eur J Cancer.* 29: 893-897.
52. Dosil M, Freire M, Gomez-Marquez J. 1990. Tissue-specific and differential expression of prothymosin alpha gene during rat development. *FEBS Lett.* 269: 373-376.
53. Eccles N, Ivan M, Wynford Thomas D. 1996. Mitogenic stimulation of normal and oncogene transformed thyroid epithelial cells by hepatocyte growth factor. *Molec Cell. Endocr.* 117: 247-251.
54. Eckert K, Garbin F, Maurer HR, et al. 1995. Prothymosin alpha 1 modulates lymphokine-activated killer cell activity and IL-2 production by peripheral blood

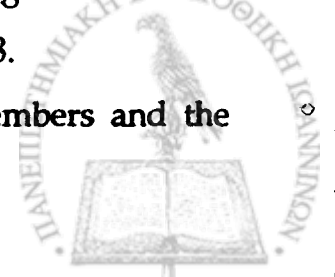


- lymphocytes from melanoma patients in vitro. *Int J Immunopharmacol.* 17: 555-561.
55. Eckert K, Grunberg E, Immenschuh P, et al. 1997. Interleukin-2-activated killer cell activity in colorectal tumor patients: evaluation of in vitro effects by prothymosin alpha1. *J Cancer Res Clin Oncol.* 123: 420-428.
56. Economou M, Seferiadis K, Frangou-Lazaridis M, et al. 1998. Isolation and partial characterization of prothymosin alpha from porcine tissues. *FEBS Lett.* 233: 342-346.
57. Eilers M, Schirm S, Bishop JM. 1991. The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *EMBO J.* 10: 133-141.
58. Enkemann SA, Pavur KS, Ryazanov AG, et al. 1999. Does prothymosin alpha affect the phosphorylation of elongation factor 2? *J Biol Chem.* 274: 18644-18650.
59. Enkemann SA, Wang RH, Trumbore MW, et al. 2000. Functional discontinuities in prothymosin alpha caused by caspase cleavage in apoptotic cells. *J Cell Physiol.* 182: 256-268.
60. Eschenfeldt WH, Berger SL. 1986. The human prothymosin alpha gene is polymorphic and induced upon growth stimulation: evidence using a cloned cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83: 9403-9407.
61. Eschenfeldt WH, Marrow RE, Krug MS, et al. 1989. Isolation and partial sequencing of the human prothymosin alpha gene family. Evidence against export of the gene products. *J Biol Chem.* 264: 7546-7555.
62. Evstafieva AG, Belov GA, Kalkum M, et al. 2000. Prothymosin alpha fragmentation in apoptosis. *FEBS Lett.* 467: 150-154.
63. Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, et al. 1993. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest.* 91: 179-184.
64. Farid NR, Zou M, Shi Y. 1995. Genetics of follicular thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 24: 865-883.
65. Farid P, Gomb SZ, Peter I, et al. 2001. bcl2, p53 and bax in thyroid tumors and their relation to apoptosis *Neoplasma.* 48: 299-301.

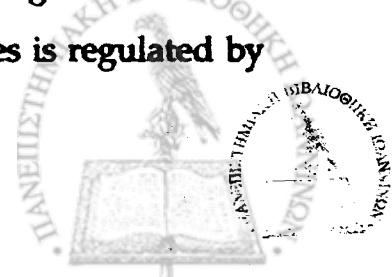


66. Flores ER, Tsai KY, Crowley D. 2002. p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature*. 416: 560-564.
67. Fraga M, Garcia-Caballero T, Dominguez F, et al. 1993. Immunohistochemical location of prothymosin alpha in regenerating human hepatocytes and hepatocellular carcinomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 423: 449-452.
68. Frangou-Lazaridis M, Clinton M, Goodall GJ, et al. 1988. Prothymosin alpha and parathymosin: amino acid sequences deduced from the cloned rat spleen cDNAs. *Arch Biochem Biophys*. 263: 305-310.
69. Freire J, Covelo G, Sarandeses C, et al. 2001. Identification of nuclear-import and cell-cycle regulatory proteins that bind to prothymosin alpha. *Biochem Cell Biol*. 79: 123-131.
70. Freire M, Hannappel E, Rey M, et al. 1981. Purification of thymus mRNA coding for a 16,000-dalton polypeptide containing the thymosin alpha 1 sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78: 192-195.
71. Freire M, Rey-Mendez M, Gomez-Marquez J, et al. 1985. Evidence for the synthesis of thymosin alpha 1 by calf thymocytes and the production of this peptide by natural processing. *Arch Biochem Biophys*. 239: 480-485.
72. Frillingos S, Frangou-Lazaridis M, Seferiadis K, et al. 1991. Isolation and partial sequence of goat spleen prothymosin alpha. *Mol Cell Biochem*. 108: 85-94.
73. Frillingos S, Tsolas O. 1992. Age- and sex-related differences in the content of prothymosin alpha in rat tissues. *Experientia*. 48: 236-239.
74. Gaitan E, Nelson NC, Poole GV. 1991. Endemic goiter and endemic thyroid disorders. *World J Surg*. 15: 205-215.
75. Gast K, Damaschun H, Eckert K, et al. 1995. Prothymosin alpha: a biologically active protein with random coil conformation. *Biochemistry*. 34: 13211-13218.
76. Gaubatz S, Imhof A, Dosch R, et al. 1995. Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2. *EMBO J*. 14: 1508-1519.
77. Gaubatz S, Meichle A, Eilers M. 1994. An E-box element localized in the first intron mediates regulation of the prothymosin alpha gene by c-myc. *Mol Cell Biol*. 14: 3853-3862.

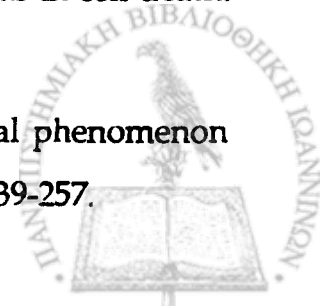
78. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, et al. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki67. *J Immunol.* **133**: 1710-1715.
79. Gharib H. 1994. Fine needle aspiration biopsy of the thyroid nodules: advantages, limitations, and effect. *Mayo Clin Proc.* **69**: 44-49.
80. Glavac D, Dean M. 1993. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mutat.* **2**: 404-414.
81. Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. 1985. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* **130**: 118-126.
82. Gold R, Schmied M, Rothe G, et al. 1993. Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of in situ nick translation to cell culture systems and tissue sections. *J Histochem Cytochem.* **41**: 1023.
83. Goldstein AL, Low TL, McAdoo M, et al. 1977. Thymosin alpha1: isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**: 725-729.
84. Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, et al. 2000. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol.* **2**: 156-162.
85. Gomez-Marquez J, Rodriguez P. 1998. Prothymosin alpha is a chromatin-remodelling protein in mammalian cells. *Biochem J.* **333**: 1-3.
86. Gomez-Marquez J, Segade F, Dosil M, et al. 1989. The expression of prothymosin alpha gene in T lymphocytes and leukemic lymphoid cells is tied to lymphocyte proliferation. *J Biol Chem.* **264**: 8451-8454.
87. Gomez-Marquez J, Segade F. 1988. Prothymosin alpha is a nuclear protein. *FEBS Lett.* **226**: 217-219.
88. Goodall GJ, Dominguez F, Horecker BL. 1986. Molecular cloning of cDNA for human prothymosin alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **83**: 8926-8928.
89. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **13**: 1899-1911.



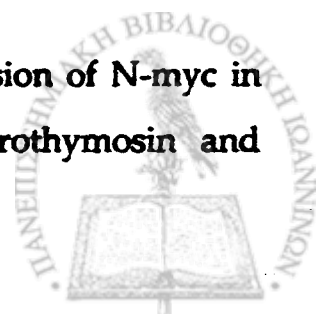
90. Halachmi N, Halachmi S, Evron E, et al. 1998. Somatic mutations of the PTEN tumor suppressor gene in sporadic follicular thyroid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 23: 239-243.
91. Hanahan D, Meselson M. 1983. Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol*. 100: 333-342.
92. Haritos AA, Tsolas O, Horecker BL. 1984. Distribution of prothymosin alpha in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81: 1391-1393.
93. Haritos AA, Goodall GJ, Horecker BL. 1984. Prothymosin alpha: isolation and properties of the major immunoreactive form of thymosin alpha 1 in rat thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81: 1008-1011.
94. Haritos AA, Goodall GJ, Horecker BL. 1985. Prothymosin alpha and alpha 1-like peptides. *Methods Enzymol*. 116: 255-65.
95. Haritos AA, Horecker BL. 1985. A radioimmunoassay for thymosin alpha 1 that detects the native polypeptide, prothymosin alpha. *J Immunol Methods*. 81: 199-205.
96. Haritos AA, Salvin SB, Blacher R, et al. 1985. Parathymosin alpha: a peptide from rat tissues with structural homology to prothymosin alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82: 1050-1053.
97. Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407: 770-776.
98. Hermann S, Sturm I, Mrozek A, et al. 2001. Bax expression in benign and malignant thyroid tumours: dysregulation of wild-type P53 is associated with a high Bax and P21 expression in thyroid carcinoma. *Int J Cancer*. 92: 805-811.
99. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, et al. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*. 11: 1026-1030.
100. Hill DJ, Phillips ID, Wang JF, et al. 1994. Basic FGF in isolated ovine thyroid follicles: TSH stimulation and effects of bFGF on DNA synthesis, and the release of IGFs and IGFbps. *Thyroid*. 4: 77-85.
101. Hofbauer LC, Rafferzeder M, Janssen EE, et al. 1995. Insulin like growth factor I messenger ribonucleic acid expression in porcine thyroid follicles is regulated by thyrotropin and iodine. *Eur J Endoc*. 132: 605-610.



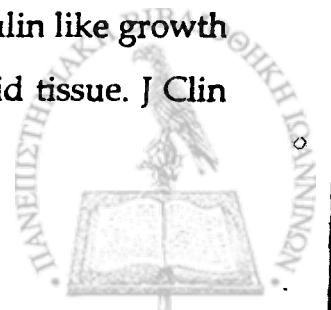
102. Holmberg C, Helin K, Sehested M, et al. 1998. E2F-1-induced p53-independent apoptosis in transgenic mice. *Oncogene*. 17: 143-155.
103. Hooper JA, McDaniel MC, Thurman GB, et al. 1975. Purification and properties of bovine thymosin. *Ann N Y Acad Sci*. 249: 125-144.
104. Huang DC, Strasser A. 2000. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*. 103: 839-842.
105. Innis M, White T, Sninsky J, et al. 1990. PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, CA.
106. Israels LG, Israels ED. 1999. Apoptosis. *Stem Cells*. 17: 306-313.
107. Jiang X, Kim HE, Shu H, et al. 2003. Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway. *Science*. 299: 223-226.
108. Johnson DG, Cress WD, Jkoi L, et al. 1994. Oncogenic capacity of the E2F1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91: 12823-12827.
109. Johnson DG, Schwarz JK, Cress WD, et al. 1993. Expression of transcription factor E2F-1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature (Lond.)*. 365: 349-352.
110. Karetsoy Z, Sandaltzopoulos R, Frangou-Lazaridis M, et al. 1998. Prothymosin alpha modulates the interaction of histone H1 with chromatin. *Nucleic Acids Res*. 26: 3111-3118.
111. Karga H, Lee JK, Vickery AL Jr, et al. 1991. Ras oncogene mutations in benign and malignant thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab*. 73: 832-836.
112. Katoh R, Bray CE, Suzuki K, Komiyama A, et al. 1995. Growth activity in hyperplastic and neoplastic human thyroid determined by an immunohistochemical staining procedure using monoclonal antibody MIB-1. *Hum Pathol*. 26: 139-146.
113. Kazakov VS, Demidchik EP, Astakhova LN. 1992. Thyroid cancer after Chernobyl. *Nature*. 359: 21.
114. Kerr JF, Gobe GC, Winterford CM, et al. 1995. Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol*. 46: 1-27.
115. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26: 239-257.



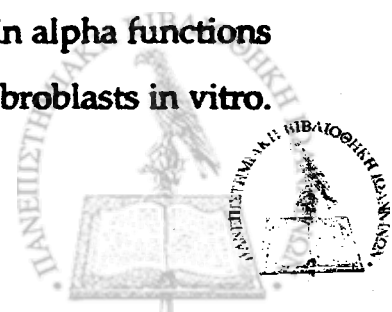
116. Kinoshita T, Shirasawa H, Shino Y, et al. 1977. Transactivation of prothymosin alpha and c-myc promoters by human papillomavirus type 16 E6 protein. *Virology*. 232: 53-61.
117. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, et al. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 275: 1132-1136.
118. Komiyama T, Pan LX, Haritos AA, et al. 1986. The primary structure of rat parathymosin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83: 1242-1245.
119. Kondili K, Tsolas O, Papamarcaki T. 1996. Selective interaction between parathymosin and histone H1. *Eur J Biochem*. 242: 67-74.
120. Koutrafouris V, Leondiadis L, Avgoustakis K, et al. 2001. Effect of thymosin peptides on the chick chorioallantoic membrane angiogenesis model. *Biochim Biophys Acta*. 1568: 60-66.
121. Kowalik TF, DeGregori J, Leone G, et al. 1998. E2F1-specific induction of apoptosis and p53 accumulation, which is blocked by Mdm2. *Cell Growth Differ*. 9: 113-118.
122. Lai R, Medeiros LJ, Coupland R, et al. 1998. Immunohistochemical detection of E2F-1 in non-Hodgkin's lymphomas: a survey of 124 cases. *Mod. Pathol*. 11: 457-463.
123. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. 1991. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*. 351: 453-456.
124. Loidi L, Vidal A, Zalvide JB, et al. 1997. Development of ELISA to estimate thymosin alpha1, the N terminus of prothymosin alpha, in human tumors. *Clin Chem*. 43: 59-63.
125. Low TL, Goldstein AL. 1979. The chemistry and biology of thymosin. II. Amino acid sequence analysis of thymosin alpha1 and polypeptide beta1. *J Biol Chem*. 254: 987-995.
126. Lukashev DE, Chichkova NV, Vartapetian AB. 1999. Multiple tRNA attachment sites in prothymosin alpha. *FEBS Lett*. 451: 118-124.
127. Lutz W, Stohr M, Schurmann J, et al. 1996. Conditional expression of N-myc in human neuroblastoma cells increases expression of alpha-prothymosin and



- ornithine decarboxylase and accelerates progression into S-phase early after mitogenic stimulation of quiescent cells. *Oncogene*. **13**: 803-812.
128. Ma Y, Croxton R, Moorer RL Jr, et al. 2002. Identification of novel E2F1-regulated genes by microarray. *Arch Biochem Biophys*. **399**: 212-224.
129. Magdalena C, Dominguez F, Loidi L, et al. 2000. Tumour prothymosin alpha content, a potential prognostic marker for primary breast cancer. *Br J Cancer*. **82**: 584-590.
130. Makarova T, Grebenshikov N, Egorov C, et al. 1989. Prothymosin alpha is an evolutionary conserved protein covalently linked to a small RNA. *FEBS Lett*. **257**: 247-250.
131. Manrow RE, Berger SL. 1993. GAG triplets as splice acceptors of last resort. An unusual form of alternative splicing in prothymosin alpha pre-mRNA. *J Mol Biol*. **234**: 281-288.
132. Manrow RE, Leone A, Krug MS, et al. 1992. The human prothymosin alpha gene family contains several processed pseudogenes lacking deleterious lesions. *Genomics*. **13**: 319-331.
133. Manrow RE, Sburlati AR, Hanover JA, et al. 1991. Nuclear targeting of prothymosin alpha. *J Biol Chem*. **266**: 3916-3924.
134. Maric D, Veljic J, Ranin J, et al. 1991. In vivo effect of prothymosin-alpha 1 on humoral and cell-mediated immune responses in the young rat. *Int J Neurosci*. **59**: 135-142.
135. Meier P, Finch A, Evan G. 2000. Apoptosis in development. *Nature*. **407**: 796-801.
136. Michaud J, Brody LC, Steel G, et al. 1992. Strand-separating conformational polymorphism analysis: efficacy of detection of point mutations in the human ornithine delta-aminotransferase gene. *Genomics*. **13**: 389-394.
137. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1998. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res*. **16**: 1215.
138. Minuto F, Barreca A, Del Monte P, et al. 1989. Immunoreactive insulin like growth factor I (IGF I) and IGF I binding protein content in human thyroid tissue. *J Clin Endoc Metab*. **68**: 621-627.



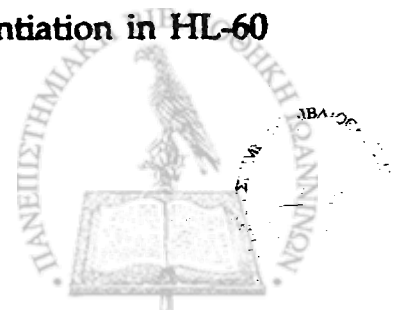
139. Mitani M, Kuwabara Y, Kawamura H, et al. 2000. Significance of plasma thymosin alpha1 measurements in gastric cancer patients. *World J Surg.* 24: 455-458.
140. Mol PC, Wang RH, Batey DW, et al. 1995. Do products of the myc proto-oncogene play a role in transcriptional regulation of the prothymosin alpha gene? *Mol Cell Biol.* 15: 6999-7009.
141. Moll J, Schmid P, Sansig G, et al. 1996. The pattern of prothymosin alpha gene expression coincides with that of myc proto-oncogenes during mouse embryogenesis. *Histochem J.* 28: 45-52.
142. Moore D, Ohene-Fianko D, Garcia B, et al. 1998. Apoptosis in thyroid neoplasms: relationship with p53 and bcl-2 expression. *Histopathology.* 32: 35-42.
143. Mori M, Barnard GF, Staniunas RJ, et al. 1993. Prothymosin-alpha mRNA expression correlates with that of c-myc in human colon cancer. *Oncogene.* 8: 2821-2826.
144. Nagata S. 1999. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet.* 33: 29-55.
145. Nikiforov Y, Gnepp DR. 1994. Pediatric thyroid cancer after the Chernobyl disaster. Pathomorphologic study of 84 cases (1991-1992) from the Republic of Belarus. *Cancer* 74: 748-766.
146. Okamoto K, Isohashi F. 2000. Purification and primary structure of a macromolecular-translocation inhibitor II of glucocorticoid-receptor binding to nuclei from rat liver. Inhibitor II is the 11.5-kDa Zn²⁺-binding protein (parathymosin). *Eur J Biochem* 267:155-62.
147. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 74: 609-619.
148. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics.* 5: 874-879.
149. Orre RS, Cotter MA 2nd, Subramanian C, et al. 2001. Prothymosin alpha functions as a cellular oncoprotein by inducing transformation of rodent fibroblasts in vitro. *J Biol Chem.* 276: 1794-1799.



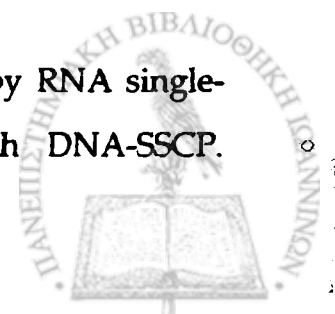
150. Pan LX, Haritos AA, Wideman J, et al. 1986. Human prothymosin alpha: amino acid sequence and immunologic properties. *Arch Biochem Biophys.* **250**: 197-201.
151. Panneerselvam C, Caldarella J, Horecker BL. 1987. A radioimmunoassay for parathymosin. *J Immunol Methods.* **104**: 131-136.
152. Panneerselvam C, Clinton M, Wellner D, et al. 1988. Bovine parathymosin: amino acid sequence and comparison with rat parathymosin. *Biochem Biophys Res Commun.* **155**: 539-545.
153. Panneerselvam C, Haritos AA, Caldarella J, et al. 1987. Prothymosin alpha in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**: 4465-4459.
154. Papamarcaki T, Tsolas O. 1994. Prothymosin alpha binds to histone H1 in vitro. *FEBS Lett.* **345**: 71-75.
155. Papanastasiou M, Baxevanis CN, Papanichail M. 1992. Promotion of murine antitumor activity by prothymosin alpha treatment: I. Induction of tumoricidal peritoneal cells producing high levels of tumour necrosis factor alpha. *Cancer Immunol Immunother.* **35**: 145-150.
156. Patel VA, Hill DJ, Sheppard MC, et al. 2000. Apoptosis during goitre involution - the role of Bcl-2. *J Endocr.* **164**: 323-330.
157. Perez-Centeno C, Gonzales-Sarmiento R, Mories MT, et al. 1996. Thyroglobulin exon 10 gene point mutation in a patient with endemic goiter. *Thyroid.* **6**: 423-427.
158. Perez-Estevez A, Freire J, Sarandeses C, et al. 2000. Properties of the protein kinase that phosphorylates prothymosin alpha. *Mol Cell Biochem.* **208**: 111-118.
159. Pineiro A, Begona Bugia M, Pilar Arias M, et al. 2001. Identification of receptors for prothymosin alpha on human lymphocytes. *Biol Chem.* **382**: 1473-1482.
160. Pinkoski MJ, Green DR. 1999. Fas ligand, death gene, *Cell Death Diff.* **6**: 1174-1181.
161. Polager S, Kalma Y, Berkovich E, et al. 2002. E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene.* **21**: 437-446.
162. Pollina L, Pacini F, Fontanini G, et al. 1996. bcl-2, p53 and proliferating cell nuclear antigen expression is related to the degree of differentiation in thyroid carcinomas. *Br J Cancer.* **73**: 139-143.



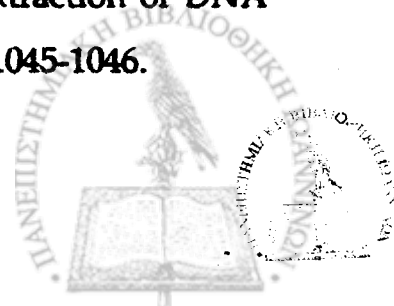
163. Pombo C, Suarez MJ, Nogueira M, et al. 2001. Secondary structure of prothymosin alpha evidenced for conformational transitions induced by changes in temperature and concentration of n-dodecyltrimethylammonium bromide. *Eur Biophys J.* 30: 242-249.
164. Puglisi F, Cesselli D, Damante G, et al. 2000. Expression of Pax-8, p53 and bcl-2 in human benign and malignant thyroid diseases. *Anticancer Res.* 20: 311-316.
165. Qin XQ, Livingston DM, Kaelin Jr WG, et al. 1994. Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 10918-10922.
166. Quinn CM, Wright NA. 1990. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol.* 160: 93-102.
167. Reclos GJ, Baxevanis CN, Sfagos C, et al. 1987. Multiple sclerosis: II. Effects of prothymosin alpha on the autologous and allogeneic MLR in patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 70: 336-344.
168. Reed JC. 1997. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol.* 34: 9-19.
169. Reed JC. 1998. bcl-2 family proteins. *Oncogene.* 17: 3225-3236.
170. Reed JC. 2000. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol.* 157: 1415-1430.
171. Ridgway EC. 1996. Modern concepts of primary thyroid gland failure. *Clin Chem.* 42: 179-182.
172. Riesco JM, Juanes JA, Carretero J, et al. 1998. Cell proliferation and apoptosis of thyroid follicular cells are involved in the involution of experimental non-tumoral hyperplastic goiter. *Anat Embryol.* 198: 439-450.
173. Robbins J, Merino MJ, Boice JD Jr, et al. 1991. Thyroid cancer: a lethal endocrine neoplasm. *Ann Intern Med.* 115: 133-147.
174. Rodriguez P, Vinuela JE, Alvarez-Fernandez L, et al. 1998. Overexpression of prothymosin alpha accelerates proliferation and retards differentiation in HL-60 cells. *Biochem J.* 331: 753-761.



175. Rodriguez P, Vinuela JE, Alvarez-Fernandez L, et al. 1999. Prothymosin alpha antisense oligonucleotides induce apoptosis in HL-60 cells. *Cell Death Differ.* 6: 3-5.
176. Rosen IB, Korman M, Walfish PG. 1997. Thyroid nodular disease in pregnancy: current diagnosis and management. *Clin Obstet Gynecol.* 40: 81-89.
177. Roson E, Gallego R, Garcia-Caballero T, et al. 1990. Prothymosin alpha expression is associated to cell division in rat testis. *Histochemistry.* 94: 597-599.
178. Roson E, Garcia-Caballero G, Heimer EP, et al. 1990. Cellular distribution of prothymosin alpha and parathymosin in rat thymus and spleen. *J Histochem Cytochem.* 38: 1889-1894.
179. Rubtsov YP, Zolotukhin AS, Vorobjev IA, et al. 1997. Mutational analysis of human prothymosin alpha reveals a bipartite nuclear localization signal. *FEBS Lett.* 413: 135-141.
180. Ruschenburg I, Kubitz A, Schlott T, et al. 1999. MAGE-1, GAGE-1/-2 gene expression in FNAB of classic variant of papillary thyroid carcinoma and papillary hyperplasia in nodular goiter. *Int J Mol Med.* 4: 445-448
181. Ryo A, Suzuki Y, Arai M, et al. 2000. Identification and characterization of differentially expressed mRNAs in HIV type 1-infected human T cells. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 16: 995-1005.
182. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. 1992. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology.* 24: 476-480.
183. Saiz AD, Olvera M, Rezk S, et al. 2002. Immunohistochemical expression of cyclin D1, E2F-1, and Ki-67 in benign and malignant thyroid lesions. *J Pathol.* 198: 157-162.
184. Santoro M, Thomas GA, Vecchio G, et al. 2000. Gene rearrangement and Chernobyl related thyroid cancers. *Br J Cancer.* 82: 315-322.
185. Sarkar G, Yoon HS, Sommer SS. 1992. Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP. *Nucleic Acids Res.* 20: 871-878.



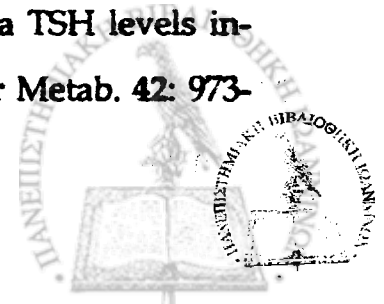
186. Sasaki H, Fujii Y, Masaoka A, et al. 1997. Elevated plasma thymosin-alpha1 levels in lung cancer patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 12: 885-891.
187. Sasaki H, Nonaka M, Fujii Y, et al. 2001. Expression of the prothymosin-a gene as a prognostic factor in lung cancer. *Surg Today.* 31: 936-938.
188. Sasaki H, Sato Y, Kondo S, et al. 2001. Expression of the prothymosin alpha mRNA correlated with that of N-myc in neuroblastoma. *Cancer Lett.* 168: 191-195.
189. Sburlati AR, Marrow RE, Berger SL. 1991. Prothymosin alpha antisense oligomers inhibit myeloma cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 253-257.
190. Schendel SL, Montal M, Reed JC. 1998. bcl-2 family proteins as ion-channels, *Cell Death Diff.* 5: 372-380.
191. Schmidt G, Werner D. 1991. Nucleotide sequence of the murine prothymosin alpha cDNA and its deduced primary and secondary protein structure. *Biochim Biophys Acta.* 1088: 442-444.
192. Schulte KM, Jonas C, Krebs R, et al. 2000. Activin A and activin receptors in the human thyroid: a link to the female predominance of goiter. *Horm Metab Res.* 32: 390-400.
193. Scott RJ, Hall PA, Haldane JS, et al. 1991. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Pathol.* 165: 173-178.
194. Sears R, Nevins JR. 2002. Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *J Biol Chem.* 277: 11617-11620.
195. Selvankumaran M, Lin HK, Miyashita T, et al. 1994. Immediate early upregulation of bax expression by p53 but not TGFb1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene.* 9: 1791-1798.
196. Shiau AL, Lin PR, Chang MY, et al. 2001. Retrovirus-mediated transfer of prothymosin gene inhibits tumor growth and prolongs survival in murine bladder cancer. *Gene Ther.* 8: 1609-1617.
197. Siafacas N, Burnett L, Bennetts B, et al. 1995. Nonenzymatic extraction of DNA from blood collected into serum separator tubes. *Clin Chem.* 41: 1045-1046.



198. Simon D, Goretzki PE, Gorelev V, Ebling B, Reishaus E, Lyons J, Haubruck H, Roher HD. Significance of P53 in human thyroid tumors. *World J Surg.* 1994 18: 535-540.
199. Socolovsky M, Nam H, Fleming MD, et al. 2001. Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood.* 98: 3261-3273.
200. Sreelekha TT, Pradeep VM, Vijayalakshmi K, et al. 2000. In situ apoptosis in the thyroid. *Thyroid.* 10: 117-122.
201. Stanelle J, Stiewe T, Theseling CC, et al. 2002. Gene expression changes in response to E2F1 activation. *Nucleic Acids Res.* 30: 1859-1867.
202. Stephanou A, Brar BK, Scarabelli TM, et al. 2000. Ischemia-induced STAT-1 expression and activation play a critical role in cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem.* 275: 10002-10008.
203. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. 2000. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem.* 69: 217-245.
204. Studer H, Derwahl M. 1995. Mechanisms of non-neoplastic endocrine hyperplasia-a changing concept: a review focused on the thyroid gland. *Endocr Rev.* 16: 411-426.
205. Subramanian C, Hasan S, Rowe M, et al. 2002. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and prothymosin alpha interact with the p300 transcriptional coactivator at the CH1 and CH3/HAT domains and cooperate in regulation of transcription and histone acetylation. *J Virol.* 76: 4699-4708.
206. Suzuki T, Yasui W, Yokozaki H, et al. 1999. Expression of the E2F family in human gastrointestinal carcinomas. *Int J Cancer.* 81: 535-538.
207. Szabo P, Clinton M, Macera M, et al. 1989. Localization of the gene coding for parathymosin to chromosome 17 in humans. *Cytogenet Cell Genet.* 50: 91-92.
208. Szabo P, Ehleiter D, Whittington E, et al. 1992. Prothymosin alpha expression occurs during G1 in proliferating B or T lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 185: 953-959.



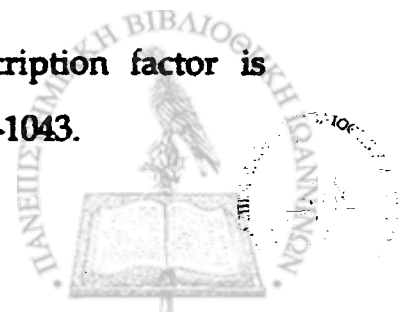
209. Szabo P, Parneerselvam C, Clinton M, et al. 1993. Prothymosin alpha gene in humans: organization of its promoter region and localization to chromosome 2. *Hum Genet.* 90: 629-634.
210. Takano T, Miyauchi A, Matsuzuka F, et al. 1999. Preoperative diagnosis of medullary thyroid carcinoma by RT-PCR using RNA extracted from leftover cells within a needle used for fine needle aspiration biopsy. *J Clin Endocrinol Metab.* 84: 951-955.
211. Takano T, Shiba E, Tada H, et al. 2000. Preoperative diagnosis of thyroid carcinomas by aspiration biopsy-reverse transcription-polymerase chain reaction (ABRP): a report of two cases. *Endocr J.* 47: 271-275.
212. Tamura M, Kimura H, Koji T, et al. 1998. Role of apoptosis of thyrocytes in a rat model of goiter. A possible involvement of Fas system. *Endocrinology.* 138: 3646-3653.
213. Tanaka H, Matsumura I, Ezoe S, et al. 2002. E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination. *Mol Cell.* 9: 1017-1029.
214. Tang TT, Dowbenko D, Jackson A, et al. 2002. The forkhead transcription factor AFX activates apoptosis by induction of the BCL-6 transcriptional repressor. *J Biol Chem.* 277: 14255-14265.
215. Thompson CB. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 267: 1456-1462.
216. Thomson SD, Franklyn JA, Watkinson JC, et al. 1998. Fibroblast receptors 1 and 2 and FGF receptor 1 are elevated in thyroid hyperplasia. *J Clin Endocr Metab.* 83: 1336-1341.
217. Tode B, Serio M, Rotella Cm, et al. 1989. Insulin like growth factor I: autocrine secretion by human thyroid follicular cells in primary culture. *J Clin Endocr Metab.* 69: 639-647.
218. Toft AD, Irvine WJ, Human WM. 1976. A comparison of plasma TSH levels in patients with diffuse and nodular non-toxic goiter. *J Clin Endocr Metab.* 42: 973-976.



219. Trompeter HI, Blankenburg G, Brugger B, et al. 1996. Variable nuclear cytoplasmic distribution of the 11.5-kDa zinc-binding protein (parathymosin-alpha) and identification of a bipartite nuclear localization signal. *J Biol Chem.* **271**: 1187-1193
220. Trompeter HI, Brand IA, Soling HD. 1989. The primary sequence of the PFK-1 inactivating zinc-binding protein as deduced from cDNA sequencing. Identity of the zinc-binding protein with rat parathymosin. *FEBS Lett.* **253**: 63-66
221. Trompeter HI, Soling HD. 1992. Cloning and characterisation of a gene encoding the 11.5 kDa zinc-binding protein (parathymosin-alpha). *FEBS Lett.* **298**: 245-248
222. Trovato M, Villari D, Bartolone L, et al. 1998. Expression of the hepatocyte growth factor and c-met in normal thyroid, non-neoplastic and neoplastic nodules. *Thyroid.* **8**: 125-131.
223. Trumbore MW, Manrow RE, Berger SL. 1998. Prothymosin alpha is not found in yeast. *Protein Expr Purif.* **13**: 383-388.
224. Trumbore MW, Wang RH, Enkemann SA, et al. 1997. Prothymosin alpha in vivo contains phosphorylated glutamic acid residues. *J Biol Chem.* **272**: 26394-26404.
225. Tsatsoulis A, Johnson EO, Andricula M, et al. 1999. Thyroid autoimmunity is associated with higher urinary iodine concentrations in an iodine-deficient area of Northwestern Greece. *Thyroid.* **9**: 279-283.
226. Tsitsiloni OE, Heimer E, Felix A, et al. 1994. Radioimmunoassays for the C-terminus of prothymosin alpha and the N-terminus of parathymosin alpha for the measurement of the levels of alpha-thymosins in human cancer. *J Immunol Methods.* **169**: 163-171.
227. Tsitsiloni OE, Stiakakis J, Koutselinis A, et al. 1993. Expression of alpha-thymosins in human tissues in normal and abnormal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**: 9504-9507.
228. Tsitsiloni OE, Yialouris PP, Heimer EP, et al. 1988. A radioimmunoassay for parathymosin alpha using antibodies to synthetic N-terminal peptide 1-30. *J Immunol Methods.* **113**: 175-184.
229. Tsitsiloni OE, Yialouris PP, Sekeri-Pataryas K, et al. 1989. Prothymosin alpha is not a nuclear polypeptide. *Experientia.* **45**: 332-334.



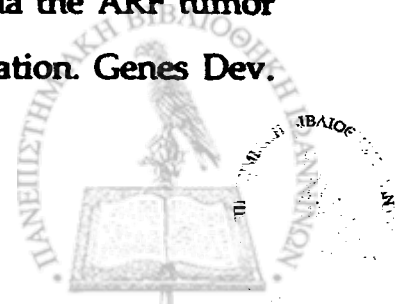
230. Tsitsilonis OE, Bekris E, Voutsas IF, et al. 1998. The prognostic value of alpha-thymosins in breast cancer. *Anticancer Res.* 18: 1501-1508.
231. Uversky VN, Gillespie JR, Millett IS, et al. 2000. Zn⁽²⁺⁾-mediated structure formation and compaction of the "natively unfolded" human prothymosin alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 267: 663-668.
232. Vareli K, Frangou-Lazaridis M, Tsolas O. 1995. Prothymosin alpha mRNA levels vary with c-myc expression during tissue proliferation, viral infection and heat shock. *FEBS Lett.* 371: 337-340.
233. Vareli K, Frangou-Lazaridis M, van der Kraan I, et al. 2000. Nuclear distribution of prothymosin alpha and parathymosin: evidence that prothymosin alpha is associated with RNA synthesis processing and parathymosin with early DNA replication. *Exp Cell Res.* 257: 152-161.
234. Vareli K, Tsolas O, Frangou-Lazaridis M. 1996. Regulation of prothymosin alpha during the cell cycle. *Eur J Biochem.* 238: 799-806.
235. Vartapetian A, Lukashev D, Lyakhov I, et al. 1997. Mammalian prothymosin alpha links to tRNA in *Escherichia coli* cells. *RNA.* 3: 1173-1181.
236. Vega FV, Vidal A, Hellman U, et al. 1998. Prothymosin alpha stimulates Ca²⁺-dependent phosphorylation of elongation factor 2 in cellular extracts. *J Biol Chem.* 273: 10147-10152.
237. Viglieto G, Romano A, Manzo G, et al. 1997. Upregulation of the angiogenic factors PIGF, VEGF and their receptors (Flt-1, Flk-1/KDR) by TSH in cultured thyrocytes and in the thyroid gland of thiouracil-fed rats suggest a TSH-dependend paracrine mechanism for goiter hypervascularization. *Oncogene.* 27: 2687-2698.
238. Vlachoyiannopoulos PG, Frilingos S, Tzioufas AG, et al. 1989. Circulating antibodies to prothymosin alpha in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol.* 53: 151-160.
239. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. 2000. Surfing the p53 network. *Nature.* 408: 307-310.
240. Volante M, Croce S, Pecchioni C, et al. 2002. E2F-1 transcription factor is overexpressed in oxyphilic thyroid tumors. *Mod Pathol.* 15: 1038-1043.



241. Voutsas IF, Baxevanis CN, Gritzapis AD, et al. 2000. Synergy between interleukin-2 and prothymosin alpha for the increased generation of cytotoxic T lymphocytes against autologous human carcinomas. *Cancer Immunol Immunother.* 49: 449-458.
242. Wada S, Naylor PH, Naylor CW, et al. 1988-89. Micro ELISA for measurement of parathymosin alpha utilizing a monoclonal antibody. *Thymus.* 12: 215-224.
243. Wang KC, Cheng AL, Chuang SE, et al. 2000. Retinoic acid-induced apoptotic pathway in T-cell lymphoma: Identification of four groups of genes with differential biological functions. *Exp Hematol.* 28: 1441-1450.
244. Wang RH, Tao L, Trumbore MW, et al. 1997. Turnover of the acyl phosphates of human and murine prothymosin alpha in vivo. *J Biol Chem.* Oct 17;272(42):26405-12.
245. Watts JD, Cary PD, Crane-Robinson C. 1989. Prothymosin alpha is a nuclear protein. *FEBS Lett.* 245: 17-20.
246. Watts JD, Cary PD, Sautiere P, et al. 1990. Thymosins: both nuclear and cytoplasmic proteins. *Eur J Biochem.* 192: 643-651.
247. Welch RA, Mutchnick MG, Weller FE, et al. 1987. Maternal and fetal circulating levels of thymosin alpha 1 during parturition. *Am J Reprod Immunol Microbiol.* 13: 125-127.
248. Weller FE, Shah U, Cummings GD, et al. 1992. Serum levels of immunoreactive thymosin alpha 1 and thymosin beta 4 in large cohorts of healthy adults. *Thymus.* 19: 45-52.
249. Werga P, Wallin G, Skoog L, et al. 2000. Expanding role of fine-needle aspiration cytology in thyroid diagnosis and management. *World J Surg.* 24: 907-912.
250. Winzer R, Schmutzler C, Jakobs TC, et al. 1998. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of thyrocyte-relevant genes in fine-needle aspiration biopsies of the human thyroid. *Thyroid.* 8: 981-987.
251. Wu CG, Boers W, Reitsma PR, et al. 1997. Overexpression of prothymosin alpha, concomitant with c-myc, during rat hepatic carcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 232: 817-821.



252. Wu CG, Habib NA, Mitry RR, et al. 1997. Overexpression of hepatic prothymosin alpha, a novel marker for human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. 76:1199-1204.
253. Wu CL, Shiau AL, Lin CS. 1997. Prothymosin alpha promotes cell proliferation in NIH3T3 cells. *Life Sci*. 61: 2091-2101.
254. Wu X, Levine AJ. 1994. p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91: 3602-3606.
255. Wuster C, Steger G, Schmelzle A, et al. 1991. Increased incidence of euthyroid and hyperthyroid goiter independent of thyrotropin in patients with acromegaly. *Horm Metab Res*. 23: 13101-13134.
256. Yialouris PP, Evangelatos GP, Soteriadis-Vlahos C, et al. 1988. The identification of prothymosin alpha-like material in vertebrate lymphoid organs by a radioimmunoassay for the N-terminal decapeptide. *J Immunol Methods*. 106: 267-275.
257. Yoshida A, Nakamura Y, Imada T, et al. 1999. Apoptosis and proliferative activity in thyroid tumors. *Surg Today*. 29: 204-208.
258. Zalvide JB, Cancio E, Alvarez CV, et al. 1992. Prothymosin alpha mRNA levels are invariant throughout the cell cycle. *J Biol Chem*. 267: 8692-8695.
259. Zatz MM, Goldstein AL. 1985. Mechanism of action of thymosin I. Thymosin fraction 5 increases lymphokine production by mature murine T cells responding in a mixed lymphocyte reaction. *J Immunol*. 134: 1032-1038.
260. Zav'yalov VP, Denesyuk AI, Zav'yalova GA. 1989. Theoretical analysis of conformation and active sites of interferons. *Immunol Lett*. 22: 173-181.
261. Zhang SY, Liu SC, Al-Saleem LF, et al. 2000. E2F-1: a proliferative marker of breast neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 9: 395-401.
262. Zhao R, Gish K, Murphy M, et al. 2000. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev*. 14: 981-993.
263. Zindy F, Eischen CM, Randle DH, et al. 1998. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev*. 12: 2424-2433.



264. Zoller B, Svensson P, Dahlback B. 1994. Identification of the same factor V gene mutation in 47 out 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein C. *J Clin Invest.* 94: 2521-2524.
265. Αποστολάκης Μ. 1986. Στοιχεία φυσιολογίας του ανθρώπου. Τόμος Γ. Εκδόσεις Κυριακίδη.
266. Μπατρινός Μ. 1999. Σύγχρονη ενδοκρινολογία. Θυρεοειδής. Εκδόσεις Πασχαλίδη.
267. Παπαδημητρίου Κ. 1990. Ειδική παθολογική ανατομική (Συστηματική Παθολογία). Εκδόσεις Λίτσας.
268. Σάββας Α. 1989. Επίτομη ανατομική του ανθρώπου και άτλας. Τόμος Β. Εκδόσεις Κυριακίδη.
269. Σμπαρούνης ΝΧ. 1989. Γενική χειρουργική. Τόμος Β. Εκδόσεις University Studio Press.
270. Χαρσούλης Φ. 1998. Κλινική ενδοκρινολογία. Παθήσεις θυρεοειδούς. Εκδόσεις University Studio Press.

