



BRAF initiating mutations in the papillary thyroid carcinoma

Dagmara Rusinek, Elżbieta Gubała

Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology MSC Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch

Abstract

Among genetic alterations most important for the initiation of papillary thyroid carcinoma (PTC) is mutation T1799A in the *BRAF* gene which is the most frequent event (54.5%) in this type of thyroid cancer. It is seen in all stages, from microcarcinoma through clinically overt disease to anaplastic cancer. It has been shown that *BRAF* mutation is correlated with PTC histotype. It is identified most frequently in classical PTC and in tall cell variant. Moreover, *BRAF* mutation is described more often in older patients, whereas in young patients *RET/PTC* rearrangements dominate. In PTC cases with *BRAF* mutation V600E the prognosis is poorer, with more cancer invasiveness, metastasis and recurrence. The presence of *BRAF* mutation is related to the specific gene expression signature, different than in cancer cases showing *RET/PTC* rearrangement or no known initiating mutation.

(*Pol J Endocrinol* 2006; 4 (57): 438–444)

Key words: papillary thyroid carcinoma, BRAF, initiating mutation

□ Dagmara Rusinek, MSc
Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology
MSC Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch
Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice
phone: 032 278 93 03, fax: 032 278 93 25
e-mail: drusinek@io.gliwice.pl



Inicjujące mutacje genu *BRAF* w raku brodawkowatym tarczycy

Dagmara Rusinek, Elżbieta Gubała

Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej
Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Streszczenie

Spośród 3 zmian genetycznych, najważniejszych dla rozwoju raka brodawkowatego tarczycy (PTC, *papillary thyroid carcinoma*), mutacja T1799A genu *BRAF* jest zdarzeniem najczęściej opisywanym (54,5%). Mutacja ta ma charakter inicjujący i spotyka się ją we wszystkich stadiach raka, począwszy od mikroraka, przez jawną postać kliniczną, kończąc na odróżnicowanym raku anaplastycznym. Wykazano, że wspomniana substytucja nukleotydowa jest skorelowana z typem histopatologicznym PTC i jest najczęściej identyfikowana w postaci klasycznej raka oraz w wariantcie wysokokomórkowym PTC. Mutację *BRAF* znacznie częściej opisuje się u starszych chorych z PTC, natomiast u dzieci dominują rearanżacje *RET/PTC*. Przypadki raka brodawkowatego tarczycy z mutacją V600E genu *BRAF* wiążą się ze znacznie gorszym rokowaniem, większą inwazyjnością raka, wystąpieniem przerzutów oraz nawrotami choroby, co czyni z genu *BRAF* jeden z czynników prognostycznych dla PTC. Poszczególne mutacje inicjujące, w tym mutacja

genu *BRAF*, warunkują odmienne profile ekspresji genów w obrębie raków brodawkowatych tarczycy, co może mieć znaczenie diagnostyczne oraz może się stać istotnym czynnikiem w podejmowaniu decyzji dotyczącej terapii i postępowania wobec chorego.

(*Endokrymol Pol* 2006; 4 (57): 438–444)

Słowa kluczowe: rak brodawkowaty tarczycy, *BRAF*, mutacja inicjująca

mgr Dagmara Rusinek
Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej
Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie,
Oddział w Gliwicach
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44–101 Gliwice
tel.: 032 278 93 03, faks: 032 278 93 25
e-mail: drusinek@io.gliwice.pl

Wstęp

Rak tarczycy jest najczęstszym nowotworem złośliwym gruczołów wydzielania dokrewnego. W 2000 roku, według Krajowego Rejestru Nowotworów, w Polsce zdiagnozowano 1338 nowych przypadków raka tarczycy, w tym 251 u mężczyzn i 1087 u kobiet [1]. Guzki tarczycy stwierdza się u 5–20% populacji, a odsetek ten jest znacznie większy, jeśli zastosuje się badanie ultrasonograficzne [2], jednak tylko niewielka część z nich wiąże się z ryzykiem rozwoju raka tarczycy.

Raki tarczycy wywodzące się z komórek pęcherzykowych stanowią szerokie spektrum guzów o różnych właściwościach fenotypowych, biologicznych oraz klinicznych. Są wśród nich dobrze zróżnicowane raki brodawkowe (PTC, *papillary thyroid carcinoma*) i pęcherzykowe (FTC, *follicular thyroid carcinoma*) oraz agresywne raki anaplastyczne (ATC, *anaplastic thyroid carcinoma*). Rak brodawkowaty jest najczęstszym złośliwym guzem tarczycy i stanowi prawie 80% wszystkich raków tarczycy. W populacji amerykańskiej jego częstość szacuje się na 16 000 przypadków na rok [3]. Biologiczne zachowanie PTC jest bardzo zróżnicowane, od wolno

rosnących mikroraków po inwazyjne raki, mogące prowadzić do śmierci. Etiologia raków brodawkowatych tarczycy nie jest jeszcze w pełni zrozumiała. Wykazano silne powiązanie rozwoju PTC z ekspozycją na promieniowanie jonizujące [4]. Większość przypadków PTC to raki sporadyczne, ale około 6% chorych wykazuje dodatni wywiad rodzinny.

Wiele badań wskazuje na różnice molekularne w poszczególnych histotypach raka tarczycy [5]. Mutacje spotykane dość często w raku gruczołu tarczowego obejmują rearanżacje *RET/PTC* [6, 7], mutacje *BRAF*, mutacje *RAS* [8] oraz rearanżację prowadzącą do powstania fuzyjnego onkogenu *PAX8-PPAR γ* [9]. Aktywujące mutacje *RAS*, spotykane często w innych nowotworach, są głównie identyfikowane w FTC oraz pęcherzykowym wariantcie PTC [10]. Rearanżacja genu *PAX8*, której efektem jest fuzyjny onkogen *PAX8-PPAR γ* , pojawia się zarówno w FTC, jak i w łagodnych gruczolakach pęcherzykowych [11], najpewniej jako wczesne wydarzenie molekularne prowadzące do rozwoju raka pęcherzykowego. Ważny typ wydarzenia molekularnego związanego z rakiem tarczycy to rearanżacje *RET/PTC*. Przez połączenie domeny kinazy

tyrozynowej *RET* z końcem 5' innego genu dochodzi do powstania fuzyjnego onkogenu kodującego białko ulegające konstytutywnej aktywacji. Aktywacja ta inicjuje rozwój raka brodawkowatego tarczycy. Ponieważ fuzja dotyczy zawsze domeny kinazowej *RET*, ale drugi partner (tak zwany gen aktywujący) może być różny, poszczególne geny fuzyjne oznacza się kolejnymi liczbami. Do tej pory zidentyfikowano 11 różnych typów rearanżacji *RET/PTC*, z czego najczęstszymi są: *RET/PTC1*, *RET/PTC2* oraz *RET/PTC3*.

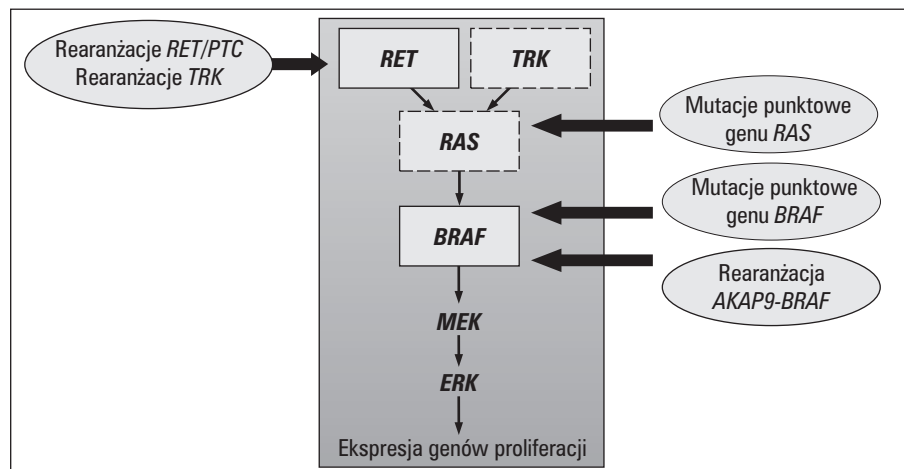
Niedawno odkryto, że również gen *BRAF* odgrywa istotną rolę w etiopatogenezie PTC. Co więcej, aktywujące mutacje tego genu okazały się najczęstszą zmianą genetyczną opisywaną w brodawkowatym raku tarczycy [12]. W tym aspekcie istotne jest, że w raku brodawkowatym tarczycy wszystkie poznane mutacje inicjujące dotyczą genów na szlaku kinaz MAP (kinazy aktywowane mitogenem)/kinaz ERK (kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym) (ryc. 1). Aktywacja tych szlaków oraz zmiany w obrębie poszczególnych tworzących je białek są niezwykle istotne w procesie transformacji nowotworowej poprzez wpływ na podział i proliferację komórek [13, 14]. Ścieżka ta ulega aktywacji w około 30% wszystkich raków [15], niemniej na ogół dotyczy ona późniejszych faz transformacji nowotworowej.

B-Raf — kinaza serynowo-treoninowa

Początkowo gen Raf zidentyfikowano jako transformujący gen (v-Raf) mysiego wirusa mięsaka (MSV) 3611. Już wtedy opisano aktywność serynowo-treoninową jego produktu białkowego [16]. Geny pokrewne (v-Raf) zostały wkrótce opisane u człowieka. Tworzą rodzinę składającą się z 3 izoform: A-Raf, B-Raf oraz C-Raf, okre-

ślanej również nazwą Raf-1. Protoonkogennym homologiem v-Raf jest Raf-1. cDNA genu A-Raf zidentyfikowano, przeszukując bibliotekę cDNA mysiej śledziona [17]. Izoformę B-Raf opisano jako onkogen aktywujący w analizie linii komórkowej NIH3T3 transformowanej ludzkim DNA z mięsaka Ewinga [18]. Poszczególne izoformy różnią się pod względem funkcjonalnym, biochemicznym, swoistości komórkowej ekspresji oraz lokalizacji wewnątrzkomórkowej [19]. Spośród 3 znanych form kinazy Raf, B-Raf, kodowana przez gen zlokalizowany na chromosomie 7, jest najsilniejszym aktywatorem szlaku kinaz MAP. Ponadto B-Raf posiada wyższe powinowactwo do kinaz MEK1 i MEK2 oraz wykazuje większą efektywność w fosforylacji MEKs w porównaniu z pozostałymi izoformami Raf [20]. Wszystkie 3 formy kinazy Raf mają jednak wspólny plan budowy. Każda składa się z 3 regionów, CR1, CR2 oraz CR3. Początkowy proces aktywacji Raf obejmuje interakcję aktywnego GTP związanego z białkiem RAS z domeną wiązania RAS (RBD) oraz domeną bogatą w reszty cysteinowe (CRD) regionu CR1. Fosforylacja reszt CR2 jest odpowiedzialna za lokalizację oraz aktywację białka Raf. Region CR3 natomiast pełni funkcję katalitycznej domeny kinazy. Poszczególne izoformy białka Raf różnią się między sobą miejscami fosforylacji zlokalizowanymi we wspomnianych 3 regionach [19].

Aktywujące mutacje punktowe genu *BRAF* zlokalizowano w eksonach 11 oraz 15, z czego transwersja tymidyny do adeniny T1799A stanowiła aż 80% wszystkich mutacji genu *BRAF* [21]. Początkowo mutację tę opisywano jako T1796A w oparciu o sekwencję nukleotydową NM 004333 NCBI GeneBank, w której brakuje kodonu w obrębie 1 eksonu genu *BRAF*. Obecnie funkcjonuje aktualna sekwencja NT 007914, według której



Rycina 1. Aktywacja szlaku MAPK w raku brodawkowatym tarczycy wskutek alternatywnych mutacji w genach kodujących kluczowe białka szlaku (na podstawie [35])

Figure 1. Activation of the MAPK pathway in papillary thyroid carcinoma as a result of alternative mutations in genes which code crucial proteins of the pathway (based on [35])

wspomnianą mutację wyznaczono jako T1799A [22]. Mutacja ta prowadzi do substytucji waliny do glutamianu w kodonie 600 (V600E), niegdyś oznaczanej jako V599E. Ustalenie krystalicznej struktury dzikiej formy kinazy B-Raf oraz kinazy z mutacją V600E umożliwiło zrozumienie mechanizmów aktywacji białka przez wspomnianą substytucję nukleotydową [23]. B-Raf wykazuje charakterystyczną dwuczłonową strukturę typową dla kinaz. W nieaktywnej konformacji białka reszty G596–V600 zlokalizowane w pętli aktywacyjnej tworzą hydrofobowe wiązania z resztami G464–V471 (miejsca wiązania ATP; pętla P), uniemożliwiając wiązanie substratu oraz cząsteczek ATP. Onkogenne mutacje zaburzają wspomniane interakcje w obrębie pętli aktywacyjnej oraz pętli P i prowadzą do destabilizacji nieaktywnej konformacji. Większość znanych onkogennych substytucji *BRAF* umożliwia tworzenie dodatkowych interakcji, które nadają kinazie strukturę katalitycznie kompetentną [24]. Paradoksalnie część mutacji genu *BRAF* prowadzi do zmniejszenia aktywności białka [23]. Jednak takie kinazy B-Raf o obniżonej aktywności są w stanie wywołać fosforylację ERK poprzez aktywację Raf1 [23].

Mutacje genu *BRAF* opisano w inwazyjnym raku jajnika (MPSCs, *micropapillary serous ovarian carcinoma*; niskozróżnicowany mikrobroadawkowy rak surowicy) oraz w zmianach chorobowych będących prekursorami dla MPSCs [25, 26], w raku jelita grubego [27], czerniaku [28], jak również w nielicznych przypadkach innych nowotworów układu wydzielania wewnętrznego i gruczołoraków [29]. Spośród wymienionych zmian nowotworowych czerniaki zajmują pierwsze miejsce pod względem częstości mutacji genu *BRAF*, którą szacuje się na 27–70% [30]. W badaniach nad mutacjami *BRAF* w raku tarczycy, prowadzonych przez ostatnie lata, wykazano, że rak gruczołu tarczowego jest drugi pod względem liczby przypadków ze zidentyfikowanymi mutacjami.

W obrębie 24 badanych kodonów genu *BRAF* opisano ponad 40 różnych mutacji zmiany sensu. Większość z tych mutacji jest bardzo rzadka, a ich częstość nie przekracza 2% [30]. Najczęstszą substytucją nukleotydową wspomnianą już wcześniej jest zmiana T1799A.

Mutacje genu *BRAF* w raku brodawkowym tarczycy

W raku tarczycy najczęstszą mutacją jest substytucja T1799A (V600E) genu *BRAF* [12]. Inną mutacją *BRAF* w raku gruczołu tarczowego jest zmiana A1801G (K601E), którą opisano w 2 łagodnych gruczolakach [31] oraz w 3 przypadkach pęcherzykowego wariantu PTC [32]. Obie substytucje nukleotydowe są zlokalizowane w eksonie 15 genu *BRAF*. W eksonie 11 tego genu,

w którym opisano wiele mutacji w innych ludzkich rakach, nie zidentyfikowano żadnych zmian dla badanych przypadków raka tarczycy [33, 34]. Poza somatycznymi mutacjami punktowymi opisano rearanżację genu *BRAF*, która poprzez paracentryczną inwersję prowadzi do powstania fuzyjnego genu *AKAP9-BRAF*. Zmianę tą zaobserwowano u chorych narażonych wcześniej na ekspozycję na promieniowanie radiacyjne [35].

Częstość mutacji *BRAF* w raku brodawkowym tarczycy polegającej na transwersji tyminy do adeniny T1799A szacuje się na 39–69% przypadków PTC [34, 36, Rusinek D i wsp., dane niepublikowane]. Wiele badań dowodzi, że mutacja ta występuje wyłącznie w PTC oraz w nielicznych przypadkach ATC. Nie zaobserwowano jej natomiast w pęcherzykowym oraz rdzeniastym raku tarczycy [36, 37]. Obecność mutacji T1799A w raku anaplastycznym tarczycy wiąże się z dalszym odróżnicowaniem raka brodawkowego. Uważa się, że ATC wywodzące się z pierwotnie występującego PTC mogą być właśnie związane z występowaniem mutacji V600E [38, 39]. Tak duża częstość substytucji nukleotydowej T1799A genu *BRAF* w PTC, niezależnie od szerokości geograficznej, populacji oraz specyficzności nowotworowa jej występowania świadczy o unikalnym znaczeniu tej mutacji w procesie transformacji nowotworowej.

Mutację V600E uznaje się za mutację inicjującą raka brodawkowego tarczycy. Świadczy o tym wiele badań, w których opisano tę zmianę w mikrorakach [38, 40]. Jednocześnie doniesienia te wskazują, że obecność mutacji T1799A zarówno w jawnym PTC, jak i w mikrorakach brodawkowych, może sugerować, że sama mutacja jest wczesnym wydarzeniem, najprawdopodobniej niewystarczającym do rozwinięcia fenotypu w pełni agresywnego. Mutacja ta może natomiast predysponować komórki rakowe do nabywania dodatkowych zmian genetycznych, które w konsekwencji aktywują bardziej agresywne szlaki i prowadzą do odróżnicowania [38]. Inicjujący charakter mutacji T1799A potwierdzono na drodze doświadczenia, w którym u myszy z ekspresją transformowanego *BRAFV600E* rozwinął się rak brodawkowy tarczycy. Raki te charakteryzowały się dużą penetracją w początkowym stadium życia myszy, progresją w kierunku odróżnicowywania się, otorebkowania oraz inwazji do naczyń mikrowaskularnych [41]. Także u ludzi obserwowano znacznie gorsze rokowanie w przypadku obecności mutacji T1799A [42].

Liczne doniesienia wskazują na określony wzór występowania substytucji nukleotydowej T1799A w zależności od wariantu PTC, co potwierdza korelację genotyp/fenotyp [38, 43–45]. Największą częstość mutacji V600E opisano w wariantcie wysokokomórkowym PTC (77%) oraz w klasycznym PTC (60%), a naj-

niższą — w wariantcie pęcherzykowym [46]. Warianty PTC z wyższą częstością mutacji *BRAF* — wariant klasyczny, a szczególnie wariant wysokokomórkowy — odznaczają się dużo większą agresywnością od postaci pęcherzykowej PTC, między innymi częściej wiążą się z przerzutami do węzłów chłonnych [47].

Mutacja V600E wykazuje także korelację z wiekiem chorego. Podczas gdy rearanżacje *RET/PTC* występują przede wszystkim u chorych poniżej 21. roku życia [48], a u osób starszych są opisywane w 3–35% przypadków PTC [49], mutacje *BRAF* są znajdowane przede wszystkim u chorych starszych [30, 38]. Także w naszym doświadczeniu mutacja T1799A genu *BRAF* występuje z niewielką częstością u osób poniżej 21. roku życia, a znacznie większą u pacjentów powyżej 41. roku życia (79% przypadków > 41 lat [Rusinek D i wsp., dane niepublikowane]). Odrębną sprawą jest związek *BRAF* z promieniowaniem jonizującym, dużo słabszy niż analogiczny związek mutacji *RET/PTC*. W wyniku skażenia radioaktywnego, będącego następstwem awarii w Czarnobylu, 98% nowotworów tarczycy rozwinęło się u dzieci, których wiek w 1986 roku nie przekraczał 10 lat, a 80% z nich miało wówczas mniej niż 5 lat. W grupie raków brodawkowatych tarczycy powstałych w związku z katastrofą w Czarnobylu rearanżacje *RET/PTC* zidentyfikowano u 60% chorych [50]. Rearanżacje genu *RET* występują nie tylko w PTC powstałych na skutek ekspozycji na działanie jodu promieniotwórczego u dzieci, ale również w wyniku ekspozycji zewnętrznej na promieniowanie [51]. W popromiennych PTC opisano również rearanżację *AKAP9-BRAF* [35]. Jednak badania te opierały się na niewielkiej liczbie przypadków. Sporną kwestią pozostaje również, czy PTC z mutacją inicjującą T1799A genu *BRAF* rozwijają się wolniej niż PTC z rearanżacją *RET/PTC*, co wiązałoby się z późniejszym klinicznym ujawnieniem raka. Jeśli hipoteza ta zostałaby udowodniona, pozwoliłoby to na przynajmniej częściowe wytłumaczenie zależnego od wieku rozkładu rearanżacji *RET/PTC* oraz mutacji *BRAF* [46].

Czy mutacja *BRAF* może współistnieć z rearanżacjami *RET/PTC*?

Wspomniane mutacje inicjujące raka brodawkowatego tarczycy, rearanżacje *RET/PTC*, mutacje *BRAF* oraz mutacje *RAS* w większości doniesień opisuje się jako wydarzenia alternatywne, niewspółwystępujące w tych samych przypadkach PTC [31, 44, 52]. Zjawisko to reprezentuje unikalny paradygmat procesu nowotworzenia poprzez mutacje 3 sygnałnych efektorów położonych kaskadowo [53]. Jednak pojawiają się prace, które podważają to ogólnie panujące przekonanie. Xu i wsp. [12] wykazali obecność rearanżacji *RET/PTC*

w 8 na 21 przypadków PTC z mutacją T1799A genu *BRAF*. Wyniki te wzbudziły duże wątpliwości przez wzgląd na metodę, jaką wykorzystano do analizy rearanżacji genu *RET*. W badaniu tym zastosowano metodę barwienia immunohistochemicznego do wykazania obecności rearanżacji *RET/PTC*, w której przeciwciała skierowano przeciwko C-końcowej części produktu genu *RET*. Rezultat takiego oznaczenia może nie być wiarygodny, gdyż przeciwciała może również reagować z produktem dzięki formie genu *RET* [46]. Nasza grupa badawcza wykazała, że rearanżacje *RET/PTC* i mutacja genu *BRAF* nie są tak rozłączne, jak wcześniej zakładano. Obserwowaliśmy współwystępowanie tych dwóch zmian genetycznych w 2 na 45 przypadków PTC [Rusinek D i wsp., dane niepublikowane] z wykorzystaniem metody RT-PCR opracowanej przez Klugbauer i wsp. Ponadto, opisano inne przypadki współwystępowania mutacji genu *RAS* z rearanżacjami *RET/PTC* [54, 55]. Wyniki przytoczonych doniesień mogą świadczyć o współdziałaniu poszczególnych mutacji inicjujących w procesie transformacji nowotworowej w kierunku klinicznie jawnej postaci PTC. Nie wykluczone również, że współwystępowanie tych zmian genetycznych w pojedynczych przypadkach raka brodawkowatego tarczycy może wynikać z poliklonalnego charakteru PTC.

Profil ekspresji genów raków brodawkowatych tarczycy a typ mutacji inicjującej

W analizie porównawczej ekspresji genów w PTC i tkance zdrowej w przypadkach raka brodawkowatego tarczycy wykazano znaczące zmiany w profilu molekularnym [56]. W badaniu wykonanym w ośrodku autorów potwierdzono, że sygnał ekspresji PTC jest bardzo silny i łatwo wykrywalny, nawet jeśli liczba komórek raka nie przeważa nad pościeliskiem guza [57]. Praca ta miała na celu znalezienie klasyfikatora wielogenowego, który umożliwiłby odróżnienie raka brodawkowatego tarczycy od tkanki zdrowej i wspomagał diagnostykę różnicową trudnych przypadków. Jednocześnie, poznanie różnic w ekspresji genów między tkanką zdrową a rakiem tarczycy to kolejny krok ku lepszemu zrozumieniu mechanizmów transformacji nowotworowej w tym gruczole. Warto dodać, że rak brodawkowaty tarczycy stał się rakiem modelowym w analizach mikromacierzowych ze względu na bardzo silne różnice w profilu ekspresji genów i jego stabilność. Ostatnie doniesienia i doświadczenia własne wskazują na różnorodność profilu ekspresji genów w obrębie samego PTC, jeśli zostanie wzięty pod uwagę rodzaj mutacji inicjującej [52; Rusinek D i wsp., dane niepublikowane]. Ścisła zależność między profilem

ekspresji genów i genotypem wskazuje, że mutacje *BRAF*, *RAS* oraz rearanżacje *RET/PTC* są istotnym źródłem zmienności w ekspresji genów, a jednocześnie sugeruje, że te genetyczne zmiany są najwcześniejszym wydarzeniem mutacyjnym w PTC. Ponadto, analiza mikromacierzowa dostarczyła dowodów na wykorzystywanie przez wspomniane mutacje inicjujące szlaków alternatywnych do MAPK, w tym PI3K [52].

Stwierdzono, że ekspresja *TPO* jest najsilniej obniżona w PTC z mutacją T1799A genu *BRAF*, co może sugerować, że te raki wykazywałyby mniejszą wrażliwość na terapię jodem promieniotwórczym. W tym kontekście należałoby nawiązać do gorszego rokowania w rakach brodawkowatych tarczycy z mutacją *BRAF*.

Mutacja genu *BRAF* a rokowanie i leczenie

Mutacja T1799A genu *BRAF* niewątpliwie odgrywa znaczącą rolę w transformacji nowotworowej w kierunku PTC oraz determinuje właściwości kliniczne i patologiczne raka. W serii badań wykazano w obrębie raków brodawkowatych tarczycy powiązanie mutacji *BRAF* z występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych [30, 38, 47], natomiast żadne z przeprowadzonych analiz nie ukazały związku mutacji *BRAF* z wielkością guza, sugerując, że ten rodzaj mutacji inicjującej zwiększa agresywność PTC przez pobudzanie inwazyjności, przerzutów oraz nawrotów choroby [46]. Znaczenie mutacji *BRAF* jako czynnika prognostycznego wiążącego się z gorszym rokowaniem chorego z PTC wspierają doniesienia na temat rozwoju PTC u myszy i jego odróżnicowywaniu się do raka anaplastycznego [41]. W związku z możliwością analizy mutacji genu *BRAF* z materiału otrzymanego drogą cienkoigłowej biopsji aspiracyjnej (FNAB, *fine needle aspiration biopsy*) [45], rozważa się stosowanie tego badania jeszcze przed zabiegiem operacyjnym w celu wyboru optymalnego postępowania klinicznego wobec konkretnego chorego. Innym aspektem odkrycia mutacji *BRAF* T1799A w rakach brodawkowatych tarczycy jest pytanie, na ile kinaza B-Raf stanie się ważnym celem terapii antynowotworowej w tym typie raka. Większość innych antagonistów kinaz jest skierowanych przeciw miejscu wiązania ATP, ale ostatnie badania skupiają się na inhibitorach, które zaburzałyby ekspresję specyficzną kinazy lub jej interakcje z substratami [58]. Spośród inhibitorów B-Raf obiecujące wyniki uzyskano dla BAY43-9006, ze względu na dużą efektywność oraz bezpieczeństwo [59]. Prowadzi się również badania nad mniejszymi molekułami hamującymi kinazy Raf oraz oligonukleotydami antysensownymi [60]. W niedalekiej przyszłości można się również spodziewać prób terapeutycznego zastosowania interferencji RNA w stosunku do tego genu.

Podsumowanie

Odkrycie mutacji *BRAF* w raku brodawkowatym tarczycy stało się jednym z ważniejszych etapów na drodze do zrozumienia procesu transformacji nowotworowej w tym typie nowotworu. Znaczenie mutacji T1799A genu *BRAF* w inicjacji PTC wydaje się niewątpliwe. Coraz lepiej jest poznawany związek tej mutacji z molekularnymi i klinicznymi cechami choroby u poszczególnych chorych. Gen *BRAF* może stać się wskaźnikiem prognostycznym, który być może przyczyni się do zmiany konwencjonalnego szacowania ryzyka w raku tarczycy.

Piśmiennictwo

1. Diagnostyka i leczenie nowotworów złośliwych tarczycy. Rekomendacje Komitetu Naukowego II Konferencji Naukowej „Rak tarczycy Szczyrk 2000”. *Wiad Lek* 2001; 54 (supl. 1): 443–461.
2. Hegedus L. Thyroid ultrasonography as a screening tool for thyroid disease. *Thyroid* 2004; 14 (11): 879–880.
3. Sherman SI. Thyroid carcinoma. *Lancet* 2003; 361: 501–511.
4. Inskip PD. Thyroid cancer after radiotherapy for childhood cancer. *Med Ped Oncol* 2001; 36: 568–573.
5. Pierotti MA, Bongarzone I, Borrello MG i wsp. Cytogenetics and molecular genetics of carcinomas arising from thyroid epithelial follicular cells. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 16: 1–14.
6. Fusco A, Santoro M, Grieco M i wsp. RET/PTC activation in human thyroid carcinomas. *J Endocrinol Invest* 1995; 18 (2): 127–129.
7. Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F i wsp. Molecular mechanisms of RET activation in human cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 963: 116–121.
8. Fagin JA. Minireview: Branded from the start — distinct oncogenic initiating events may determine tumor fate in the thyroid. *Mol Endocrinol* 2002; 16 (5): 903–911.
9. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L i wsp. *PAX8-PPARγ1* Fusion oncogene in human thyroid carcinoma. *Science* 2002; 289: 1357–1360.
10. Vasko V, Ferrand M, Di Cristofaro J i wsp. Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2745–2752.
11. Sahin M, Allard BL, Yates M i wsp. PPARγ staining as a surrogate for *PAX8/PPARγ* fusion oncogene expression in follicular neoplasms: Clinicopathological correlation and histopathological diagnostic value. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 463–468.
12. Xu X, Quiros RM, Gattuso P i wsp. High prevalence of *BRAF* gene mutation in papillary thyroid carcinoma and thyroid tumor cell lines. *Cancer Res* 2003; 63: 4561–4567.
13. Melillo RM, Castellone MD, Guarino V i wsp. The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J Clin Invest* 2005; 115: 1068–1081.
14. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000; 351: 289–305.
15. Hoshino R, Chatani Y, Yamori T i wsp. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 1999; 18 (3): 813–822.
16. Rapp UR, Goldsborough MD, Mark GE i wsp. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci* 1983; 80: 4218–4222.
17. Huebner K, ar-Rushidi A, Griffin CA i wsp. Actively transcribed genes in the raf oncogene group, located on the X chromo-

- some in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 3934–3938.
18. Ikawa S, Fukui M, Ueyama Y i wsp. B-raf, a new member of the raf family, is activated by DNA rearrangements. *Mol Cell Biol* 1988; (8) 6: 2651–2654.
 19. Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* 2003; 15: 463–469.
 20. Peyssonnaud C, Eychene A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell* 2001; 93: 53–62.
 21. Davies H, Bignell GR, Cox C i wsp. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949–954.
 22. Kumar R, Angelini S, Czene K i wsp. BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3362–3368.
 23. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM i wsp. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004; 116: 855–867.
 24. Dhillon AS, Kolch W. Oncogenic B-Raf mutations: crystal clear at last. *Cancer Cell* 2004; 5: 303–330.
 25. Singer G, Oldt III R, Cohen Y i wsp. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95 (6): 484–486.
 26. Ho CL, Kurman RJ, Dehari R i wsp. Mutations of BRAF and KRAS precede the development of ovarian serous borderline tumors. *Cancer Res* 2004; 64: 6915–6918.
 27. Fransén K, Klintonäs M, Östertröm A i wsp. Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 2004; 25: 4527–4533.
 28. Meyer P, Sergi C, Garbe C. Polymorphisms of the BRAF gene predispose males to malignant melanoma. *J Carcinog* 2003; 2 (1): 7.
 29. Perren A, Schmid S, Locher T i wsp. BRAF and endocrine tumors: mutations are frequent in papillary thyroid carcinomas, rare in endocrine tumors of the gastrointestinal tract and not detected in other endocrine tumors. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11: 855–860.
 30. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004; 6 (4): 313–319.
 31. Lima J, Trovisco V, Soares P i wsp. BRAF mutations are not a major event in post-Chernobyl childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 4267–4271.
 32. Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P i wsp. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *J Pathol* 2004; 202: 247–251.
 33. Puxeddu E, Moretti S, Rossella E i wsp. BRAF^{V599E} mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89 (5): 2414–2420.
 34. Namba H, Nakashima M, Hayashi T i wsp. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4393–4397.
 35. Ciampi R, Knauf JA, Kerler R i wsp. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest* 2005; 115: 94–101.
 36. Cohen Y, Xing M, Mambo E i wsp. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 625–627.
 37. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z i wsp. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 1454–1457.
 38. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M i wsp. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary thyroid carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88 (11): 5399–5404.
 39. Quiros RM, Ding HG, Gattuso P i wsp. Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations. *Cancer* 2005; 103 (11): 2261–2268.
 40. Sedliarou I, Saenko V, Lantsov D i wsp. The BRAF^{T1796A} transversion is a prevalent mutational event in human thyroid microcarcinoma. *Int J Oncol* 2004; 25: 1729–1735.
 41. Knauf JA, Ma X, Smith EP i wsp. Targeted expression of BRAF^{V600E} in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res* 2005; 65: 4238–4245.
 42. Xing M, Westra WH, Tufano RP. BRAF Mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6373–6379.
 43. Chan JK. Papillary carcinoma of thyroid: classical and variants. *Histol Histopathol* 1990; 5: 241–257.
 44. Frattini M, Ferrario C, Bressan P i wsp. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene* 2004; 23: 7436–7740.
 45. Salvatore G, Giannini R, Faviana P i wsp. Analysis of BRAF point mutation and RET/PTC rearrangement refines the fine-needle aspiration diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89 (10): 5175–5180.
 46. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: 245–262.
 47. Kim KH, Kang DW, Kim SH i wsp. Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei Med J* 2004; 45: 5818–5821.
 48. Jarzab B, Wloch J, Wiench M. Molecular changes in thyroid neoplasia. *Folia Histochem Cytobiol* 2001; 39 (supl. 2): 26–27.
 49. Klugbauer S, Lengfelder E, Demidchik EP i wsp. High prevalence of RET rearrangements in thyroid tumors of children from Belarus after Chernobyl reactor accident. *Oncogene* 1995; 11: 2459–2467.
 50. Klugbauer S, Demidchik EP, Lengfelder E i wsp. Detection of a novel type of RET rearrangement (PTC5) in thyroid carcinomas after Chernobyl and analysis of the involved RET-fused gene RFG5. *Cancer Res* 1998; 58: 198–203.
 51. Ron E, Lubin JH, Shore RE i wsp. Thyroid cancer after exposure to external radiation: A pooled analysis of seven studies. *Radiat Res* 1995; 141: 259–277.
 52. Giordano TJ, Kuick R, Thomas DG i wsp. Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. *Oncogene* 2005; 24 (44): 6646–6656.
 53. Fagin JA. Editorial: Challenging dogma in thyroid cancer molecular genetics—role of RET/PTC and BRAF in tumor initiation. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89 (9): 4264–4266.
 54. Bounacer A, Wicker R, Caillou B i wsp. High prevalence of activating RET proto-oncogene rearrangements in thyroid tumors from patients who had received external radiation. *Oncogene* 1997; 15: 1263–1273.
 55. Sugg SL, Ezzat S, Zheng L i wsp. Oncogene profile of papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 1999; 125: 46–52.
 56. Huang Y, Prasad M, Lemon WJ i wsp. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 15044–15049.
 57. Jarzab B, Wiench M, Fajarewicz K i wsp. Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications. *Cancer Res* 2005; 65 (4): 1587–1597.
 58. Fagin JA. How thyroid tumors start and why it matters: kinase mutants as targets for solid cancer pharmacotherapy. *J Endocrinol* 2004; 183: 249–256.
 59. Bollag G, Freeman S, Lyons JF i wsp. Raf pathway inhibitors in oncology. *Curr Opin Investig Drugs* 2003; 4: 1436–1441.
 60. Dancey J, Sausville EA. Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2 (4): 296–313.