Genetic factors predisposing to the development of papillary thyroid cancer

Monika Puzianowska-Kuźnicka[1,2], Maciej Pietrzak[1]

[1] *Department of Endocrinology, Medical Research Center, Warsaw;*
[2] *Department of Biochemistry, Medical Center for Postgraduate Education, Warsaw*

Abstract

According to classic theory of neogenesis, cancer arises from well-differentiated cell that in response to variety of factors de-differentiates, becomes able to proliferate without control and/or loses its ability to undergo apoptosis. According to another theory, cancers (at least cancers of some organs) originate from stem cells, which „by definition" are poorly differentiated and able to proliferate indefinitely. Therefore a lower number of abnormal events is necessary for these cells to escape proliferation-controlling mechanisms. With regard to papillary thyroid cancers it is still thought that it arises from well-differentiated thyreocyte.

One of the characteristic features of cancer cell is chromosomal instability. Lowest number of such abnormalities is observed in well-differentiated thyroid cancers (including papillary cancer), intermediate – in poorly-differentiated cancers, while highest – in anaplastic cancers. Microarray analysis shows that despite of clinical heterogeneity, gene expression profiles of papillary cancers are very similar. Genetic anomalies predisposing to the development of papillary cancer most commonly regard proteins that possess kinase activity. Kinases phosphorylate other proteins, and play an extremely important role in signal transduction from outside the cell as well as inside the cell. Constitutive activation of some kinases may lead to the excessive and/or permanent activation of some transduction pathways specific for mitogens or growth factors. This results in excessive proliferation. The best known protein of such type which function is altered in papillary thyroid cancers is RET – a membrane-located growth factor-receptor with kinase activity. *RET* gene undergoes different rearrangements in this type of cancer. There are approximately 10 *RET* rearrangements known, with RET/PTC3 and RET/PTC1 being most common. In this anomaly kinase domain-encoding 3′ end of *RET* gene is aberrantly bound to 5′ end of another gene. Fusion protein synthesized on such hybrid template is not present in the cell membrane but in the cytoplasm, where it permanently activates transduction pathway specific for RET. *NTRK1* gene encoding a member of family of neuronal growth factor receptors containing thyrosine kinase domain is also rearranged in papillary cancers. However, genes fused to its kinase domain-encoding sequence are different from the ones fused to *RET*. *MET*, a gene encoding another membrane protein with thyrosine kinase activity, which acts as a growth factor-receptor, is overexpressed in 70%-90% of papillary thyroid cancers.

BRAF gene encoding another yet kinase transducing signals from RAS and RAF to the cell is mutated at position 1796 (T/A, amino acid substitution V599E) in 38-69% of papillary cancers. The presence of this activatory mutation is associated with higher degree of clinical advancement of the disease. In addition, in majority of papillary cancers tested, mutations of the genes encoding nuclear triiodothyronine receptors were found. Transgenic mice with both *TRB* allele replaced with dominant-negative *TRB* mutants develop aggressive thyroid cancers.

Progression from papillary to anaplastic cancer is most possibly caused by the occurrence of additional anomalies within *P53*, *RAS*, *NM23*,b-catenin gene and other genes.

Keywords: *papillary thyroid cancer, chromosomal instability, genetic profile, protein kinases, signal transduction, rearrangement, mutation, RET, NTRK1, MET, BRAF, TR*

Czynniki genetyczne usposabiające do powstawania raka brodawkowatego tarczycy

Monika Puzianowska-Kuźnicka[1,2], Maciej Pietrzak[1]

[1] *Zakład Endokrynologii IMDiK PAN, Warszawa;*
[2] *Zakład Biochemii CMKP, Warszawa*

Streszczenie

Według klasycznej teorii nowotworzenia punktem wyjścia nowotworu jest komórka wysoko zróżnicowana, która wskutek zadziałania różnych czynników odróżnicowuje się, nabiera zdolności do niekontrolowanej proliferacji lub/i traci zdolność do ulegania apoptozie. Z kolei inna teoria dowodzi, że nowotwory (przynajmniej niektórych narządów) wywodzą się z komórek pnia, które „z definicji" są nisko zróżnicowane i posiadają zdolność do ciągłej proliferacji. W takiej sytuacji mniejsza liczba anomalii genetycznych jest konieczna, by przestały działać mechanizmy kontrolujące szybkość podziałów komórkowych. W przypadku raka brodawkowatego tarczycy nadal uważa się, że jego punktem wyjścia jest wysoko zróżnicowany tyreocyt.

Cechą charakterystyczną komórki nowotworowej jest niestabilność chromosomalna. Najmniejszą liczbę nieprawidłowości tego typu obserwuje się w wysoko zróżnicowanych rakach tarczycy, zwłaszcza w raku brodawkowatym, pośrednią – w rakach nisko zróżnicowanych i największą – w rakach anaplastycznych. Badania metodą mikromacierzy wykazują, że mimo znacznej klinicznej heterogenności raków brodawkowatych, profil ekspresji genów jest w nich bardzo podobny. Anomalie genetyczne, które usposabiają do powstawania raków brodawkowatych tarczycy, najczęściej dotyczą genów kodujących białka o aktywności kinazy. Kinazy fosforylujące inne białka odgrywają bardzo ważną rolę w procesie przekazywania sygnałów z zewnątrz komórki oraz w jej wnętrzu (transdukcja sygnału). Konstytutywna aktywacja niektórych kinaz prowadzić może do nadmiernego, ciągłego pobudzenia niektórych szlaków specyficznych dla mitogenów lub czynników wzrostowych. Skutkiem takiego działania jest nadmierna proliferacja. Najlepiej poznanym w rakach brodawkowatych tarczycy białkiem tego typu, którego funkcja jest zaburzona, jest RET – białko błonowe o aktywności kinazy tyrozynowej, będące receptorem czynników wzrostowych. W rakach brodawkowatych występują rearanżacje genu *RET*. Znanych jest około 10 różnych rearanżacji tego genu, najczęściej spotyka się RET/PTC3 i RET/PTC1. Polegają one na fuzji kodującego domenę o aktywności kinazy końca 3' genu *RET* z końcem 5' innego genu. Białko fuzyjne powstające na matrycy takiej hybrydy zlokalizowane jest nie w błonie komórkowej, ale w cytoplazmie i w sposób ciągły aktywuje szlak typowy dla RET. Podobnie rearanżacji ulega gen *NTRK1* kodujący białko z rodziny receptorów neuronalnych czynników wzrostowych, również zawierające domenę o aktywności kinazy tyrozynowej. Jednakże geny, które ulegają fuzji z *NTRK1* są inne niż te, które łączą się z *RET*. Z kolei *MET*, gen kodujący jeszcze inne białko błonowe o aktywności kinazy tyrozynowej, będące receptorem czynników wzrostowych, ulega nadekspresji w 70%-90% raków brodawkowatych tarczycy.
Gen *BRAF* kodujący kinazę przekazującą sygnał of RAS i RAF do wnętrza komórki jest zmutowany w pozycji 1796 (T/A, aminokwas V599E) w 38-69% raków brodawkowatych. Jest to mutacja aktywująca, a jej obecność kojarzy się z wyższym stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu. Ponadto, w większości badanych raków brodawkowatych tarczycy znaleziono mutacje genów kodujących jądrowe receptory trijodotyroniny. U myszy transgenicznych z dominującymi-negatywnymi mutacjami obydwu alleli *TRB* rozwijają się raki tarczycy o złośliwym przebiegu.
Progresja raka brodawkowatego do raka anaplastycznego najprawdopodobniej spowodowana jest wystąpieniem dodatkowych anomalii genetycznych dotyczących *P53*, *RAS*, genu β-kateniny, *NM23* i innych genów.

Słowa kluczowe: *rak brodawkowaty tarczycy, niestabilność chromosomalna, profil genetyczny, kinazy białkowe, transdukcja, rearanżacja, mutacja, RET, NTRK1, MET, BRAF, TR*

Monika Puzianowska-Kuźnicka,
Zakład Endokrynologii IMDiK PAN, ul. Banacha 1a,
02-097 Warszawa;
e-mail: monika@amwaw.edu.pl

praca finansowana przez grant KBN 3 P04A 012 25

Wstęp - teorie nowotworzenia

Badania epidemiologiczne, doświadczenia na zwierzętach, badania transformacji nowotworowej *in vitro* oraz wyniki badań molekularnych wskazują, że neogeneza jest procesem wieloetapowym, wielogenowym i zależnym od wielu czynników endo- i egzogennych. Dla usystematyzowania tego procesu podzielono go na trzy etapy. W pierwszym, zwanym inicjacją, dochodzi do uszkodzenia komórki. W drugim, nazywanym promocją, pod wpływem sygnału mitogennego, na skutek kompensacyjnej hiperplazji lub zahamowania apoptozy, itp., dochodzi do klonalnej ekspansji nieprawidłowej komórki, w wyniku czego powstaje grupa dzielących się komórek o wciąż łagodnym genotypie. W trzecim etapie wskutek dodatkowych zmian genetycznych (np. mutacji protoonkogenów lub/i supresorów nowotworzenia, itd.) dochodzi do transformacji nowotworowej niektórych komórek klonu – onkogeneza wchodzi w etap progresji. Według klasycznej teorii nowotworzenia nowotwory wywodzą się z wysoko zróżnicowanych komórek, które pod wpływem różnych czynników odróżnicowują się, tracą zdolność do ulegania apoptozie, nabierają zdolności do niekontrolowanej proliferacji oraz do tworzenia przerzutów. Od kilku lat gromadzone są dowody na to, że nowotwory przynajmniej niektórych narządów/tkanek wywodzić się mogą z pluripotencjalnych komórek pnia. Podczas neogenezy komórki te nie muszą być unieśmiertelnione, gdyż ich fizjologiczną cechą jest zdolność do ciągłych podziałów. W takim przypadku wystarczy, by podziały te przestały być prawidłowo kontrolowane lub/i, by dominować zaczął podział symetryczny, w którym obydwie komórki potomne zachowują zdolność podziałową, a żadna z nich nie różnicuje w kierunku dojrzałej komórki danego narządu (która przestaje się dzielić lub dzieli się bardzo powoli i ograniczoną liczbę razy). Co więcej, w komórkach wciąż się dzielących łatwiej może dojść do akumulacji onkogennych mutacji [1, 2, 3]. Jednakże do tej pory nie ma przekonujących dowodów, że raki tarczycy wywodzą się z komórek pnia. Uważa się nadal, że rak brodawkowaty i pęcherzykowy tego narządu wywodzą się z wysoko zróżnicowanej komórki pęcherzykowej.

Niestabilność chromosomalna

Cechą charakterystyczną komórki nowotworowej jest uszkodzenie jej materiału genetycznego. Uszkodzenia te dotyczą nie tylko poszczególnych genów, ale i dużych fragmentów chromo-

somów. Fragmenty te mogą ulec delecji, duplikacji lub multiplikacji, inwersji, translokacji, itd. Badanie komórek raka tarczycy metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej (*comparative genomic hybridization*, CGH) wykazuje, że najmniej cech niestabilności chromosomalnej (zarówno odsetka przypadków z niestabilnością jak i średniej liczby nieprawidłowości chromosomalnych) obserwuje się w wysoko zróżnicowanych rakach brodawkowatych, nieco więcej w rakach nisko zróżnicowanych, podczas gdy najwięcej – w rakach anaplastycznych. Wiele z tych nieprawidłowości, na przykład dodatkowe fragmenty 5p15, 5q11-13, 19p i 19q lub utrata 8p występuje w rakach tarczycy na różnym stopniu zróżnicowania, co sugeruje, że w ich neogenezie przynajmniej częściowo odgrywają rolę takie same czynniki genetyczne [4]. Z kolei badania wykonane metodą ISSR-PCR (*inter-simple sequence repeat polymerase chain reaction*) wykazują, że liczba uszkodzeń genomu w rakach brodawkowatych jest bardzo duża (statystycznie najwięcej stwierdza się ich u młodych pacjentów), jednakże stosunkowo łagodny przebieg kliniczny tego typu nowotworu wskazuje, że uszkodzenia te mogą nie być wystarczające dla progresji raka do postaci bardziej złośliwych [5]. Tak odmienne wyniki uzyskiwane przez różnych badaczy mogą odzwierciedlać odrębności genetyczne badanych populacji, ale mogą też być pochodną stosowania różnych metod badawczych. Na poziomie molekularnym raki tarczycy mogą być bardzo heterogenne, o czym świadczy obecność komórek z różnymi cechami niestabilności chromosomalnej w obrębie tego samego guza. Z drugiej strony wykazano, że mikroogniska raka brodawkowatego i raka anaplastycznego znalezione w tym samym guzie mogą zawierać te same uszkodzenia materiału genetycznego, co wspiera teorię ewolucji raka z postaci łagodniejszej do bardziej złośliwej [6].

Profil ekspresji genów

Dzięki dostępnej od kilku lat metodzie mikromacierzy możliwe jest jednoczesne badanie profilu ekspresji kilkuset – kilkunastu tysięcy genów. Porównanie poziomu ekspresji genów w rakach brodawkowatych tarczycy i w odpowiadających im zdrowych kontrolach wykazało, że mimo heterogenności klinicznej raki te charakteryzują się zbliżonym profilem genetycznym. Znaleziono bowiem 24 geny, których ekspresja była znacznie wyższa we wszystkich 8 badanych rakach niż w zdrowych kontrolach. Co więcej, znaleziono 22 dodatkowe geny, których ekspresja była wyższa w 7 na 8 przypadków raka. Wiele z tych genów kodowało białka adhezyjne oraz białka macierzy pozakomórkowej. Stwierdzono również, że w 7 na 8 przypadków 8 tych samych genów miało ekspresję niższą niż w odpowiadających im zdrowych kontrolach, a w 6 na 8 przypadków podobną sytuację obserwowano dla dodatkowych 19 genów. Geny o niskiej ekspresji kodowały supresory nowotworzenia, białka związane z fizjologiczną funkcją tarczycy i białka wiążące kwasy tłuszczowe [7]. Brak poważnych różnic w ogólnym poziomie ekspresji genów pomiędzy poszczególnymi przypadkami raka brodawkowatego obserwowali również inni autorzy [8]. Ponieważ przebieg kliniczny wariantów tego raka różni się od siebie, metodą mikromacierzy poszukiwano genów o odmiennym poziomie ekspresji w agresywnym wariancie wysokokomórkowym i w wariancie typowym. Zidentyfikowano 82 takie geny. Jednym z nich był ulegający nadekspresji w wariancie wysokokomórkowym gen *MUC1* (mucyny), kodujący glikozylowane białko błonowe, odgrywające rolę w progresji nowotworu i w tworzeniu przerzutów. Wykazano korelację pomiędzy poziomem ekspresji tego genu i przebiegiem klinicznym choroby oraz przeżywalnością pacjentów (jego nadekspresja zwiększała względne ryzyko zgonu 2.3 razy) [9].

Nieprawidłowości dotyczące poszczególnych genów

Fosforylacja jest najczęstszą modyfikacją potranslacyjną, warunkującą aktywność biologiczną białka. Kinazy (enzymy fosforylujące) stanowią niewielką frakcję białek komórkowych, ale ze względu na swą funkcję odpowiedzialne są za ponad 90% procesów wzajemnych regulacji i oddziaływań. Szczególną rolę odgrywają w procesach przekazywania sygnału z zewnątrz komórki oraz w jej wnętrzu (transdukcja). Większość cząsteczek sygnałowych niosących informację z zewnątrz nie może dostać się do wnętrza komórki, wiąże się natomiast ze specyficznymi dla nich białkami receptorowymi w błonie komórkowej. Receptor w postaci wolnej jest nieaktywny, ale po związaniu cząsteczki sygnałowej ulega czasowej aktywacji. Domeny wewnątrzkomórkowe receptorów mitogenów i czynników wzrostowych oraz niektórych hormonów (na przykład insuliny i hormonu wzrostu) posiadają aktywność kinazy i po związaniu cząsteczki sygnałowej mogą fosforylować same siebie, a następnie – inne białka, zapoczątkowując kaskadę sygnałową w komórce. Dlatego też uszkodzenie genu kodującego taki receptor prowadzące do nadmiernej produkcji białka receptorowego lub do produkcji białka aktywnego mimo braku czynnika stymulującego (tzw. aktywacja konstytutywna) może powodować nadmierną lub/i ciągłą stymulację proliferacji komórki. Co ciekawe, większość genów, których uszkodzenie wiąże się z patogenezą raka brodawkowatego tarczycy, dotyczy właśnie białek posiadających aktywność kinazy.

Rearanżacje genu *RET*

Najbardziej znaną anomalią genetyczną wiązaną z powstawaniem raka brodawkowatego tarczycy jest rearanżacja genu *RET*. *RET* koduje posiadający aktywność kinazy tyrozynowej błonowy

receptor czynników wzrostowych (takich jak FGF, EGF, VEGF, HGF, itd.). Wydaje się, że w prawidłowym tyreocycie *RET* nie jest aktywny. Rearanżacja tego genu polega na fuzji końca 3' genu *RET*, który koduje wewnątrzkomórkową domenę RET o aktywności kinazy, z końcem 5' innego genu. Wskutek takiego połączenia powstaje nieprawidłowy gen fuzyjny, w którym promotor regulujący poziom ekspresji nie pochodzi z genu *RET*. Dlatego też ekspresja genu fuzyjnego jest z reguły większa niż prawidłowego genu *RET* oraz jest kontrolowana inaczej niż ekspresja *RET*. Co więcej, kodowane przez gen fuzyjny białko nie posiada typowej dla prawidłowego RET domeny zewnątrzkomórkowej ani domeny przezbłonowej (które są zastąpione fragmentem innego białka), w związku z czym białko fuzyjne nie jest już umocowane w błonie komórkowej, ale znajduje się w cytoplazmie. Posiada ono jednak prawidłową domenę RET o aktywności kinazy. Tak więc białko fuzyjne ma niefizjologiczną lokalizację oraz jest konstytutywnie aktywne – w nieobecności czynników wzrostowych ciągle stymuluje szlak przekazywania sygnału zarezerwowany dla tych właśnie czynników. Znanych jest kilkanaście różnych rearanżacji *RET*. Najczęściej spotykane są rearanżacje RET/PTC1 (paracentryczna inwersja w obrębie chromosomu 10) i RET/PTC3 (również inwersja w obrębie chromosomu 10). Rearanżacje *RET* powstają też wskutek wymiany materiału genetycznego w obrębie różnych chromosomów, np. RET/PTC2, do której dochodzi wskutek translokacji pomiędzy chromosomami 10 i 17. Obserwuje się znaczące różnice w częstości występowania RET/PTC w rakach brodawkowatych w zależności od miejsca zamieszkania badanej populacji, wieku chorych i narażenia na promieniowanie jonizujące (młody wiek i promieniowanie zwiększają szansę na występowanie rearanżacji *RET*). W rakach brodawkowatych u osób narażonych w przeszłości na promieniowanie jonizujące najczęściej spotyka się rearanżację RET/PTC3 [10], podczas gdy w rakach sporadycznych – RET/PTC1. RET/PTC bardzo często występują w ogniskach mikroraka, co sugeruje, że mogą one odgrywać rolę na wczesnych etapach onkogenezy. Niezwykle ciekawym odkryciem było stwierdzenie, że w większości przypadków raka wieloogniskowego w różnych guzkach znajduje się różne typy rearanżacji *RET*. To z kolei sugeruje, że poszczególne ogniska raka pojawiały się niezależnie [11]. Około 80% wariantu litego raka brodawkowatego lub pęcherzykowego posiada RET/PTC3 w przeciwieństwie do wariantu typowego, gdzie rearanżacja ta występuje znacznie rzadziej [12, 13]. Doniesienia na temat korelacji obecności RET/PTC z przebiegiem klinicznym choroby są wyjątkowo niespójne. RET/PTC3 najczęściej wiąże się z szybkim postępem choroby i gorszym rokowaniem [10]. Obecność RET/PTC wydaje się być powiązana z wyższym stopniem miejscowego zaawansowania choroby [14]. Istnieją jednak doniesienia, według których nie ma korelacji pomiędzy rodzajem rearanżacji *RET* i typem histologicznym raka brodawkowatego, ani korelacji pomiędzy RET/PTC i rokowaniem [15]. Jeszcze inne doniesienia wskazują, że u osób z rearanżacją RET/PTC istnieje tendencja do niższej częstości nawrotów i lepszej przeżywalności mimo większej skłonności do tworzenia przerzutów w węzłach chłonnych [16]. Szczegóły dotyczące rearanżacji *RET* znaleźć można w artykułach przeglądowych [17, 18]. Interesujące jest, że w komórce, w której występuje rearanżacja RET, obserwuje się zmiany morfologiczne jądra komórkowego, które jest nieregularne i barwi się euchromatycznie zamiast tworzyć agregaty chromatyny [19].

Rearanżacje genu *NTRK1*

Podobnie jak w przypadku *RET*, *NTRK1* koduje receptor błonowy o aktywności kinazy tyrozynowej, odgrywający niezwykle ważną rolę w ośrodkowym układzie nerwowym. Jest to bowiem receptor neuronalnego czynnika wzrostu (NGF) i czynników pokrewnych. Jego rearanżacje również polegają na fuzji końca 3' *NTRK1*, który koduje domenę o aktywności kinazy, z częścią 5' innego genu. Tak więc funkcję regulatorową sprawuje promotor genu innego niż *NTRK1*, a koniec aminowy białka fuzyjnego nie pochodzi z Ntrk1. Stała aktywacja domeny kinazy tyrozynowej Ntrk1 (koniec karboksylowy białka fuzyjnego) prowadzi do nadmiernej stymulacji szlaku zarezerwowanego dla czynnika wzrostowego i w efekcie – do zaburzeń proliferacji. W literaturze opisano 4 główne rearanżacje tego genu (istnieją też doniesienia o pojedynczych przypadkach innych rearanżacji, np. wskutek translokacji pomiędzy chromosomami 1 i 17). Trk, Trk-T1 i Trk-T2 powstają wskutek wewnątrzchromosomalnej inwersji w obrębie chromosomu 1, podczas gdy Trk-T3 jest skutkiem translokacji pomiędzy chromosomami 1 i 3. U wszystkich myszy transgenicznych z rearanżacją Trk-T1 w tyreocytach wystąpiły zmiany hiperplastyczne i/lub nowotworowe tarczycy (zjawiska tego nie obserwowano u rodzeństwa bez rearanżacji), co stanowi dowód *in vivo* na onkogenne działanie takiej anomalii genetycznej [20]. Częstość występowania rearanżacji Ntrk1 w rakach brodawkowatych tarczycy u ludzi jest niewielka: wynosi 2-25% (najczęściej opisywane są wartości kilku-kilkunastoprocentowe [10, 16]) i jest podobna w rakach po napromienieniu i w rakach „sporadycznych" [21]. W rakach nie indukowanych przez promieniowanie jej obecność wydaje się współistnieć z wyższym stopniem miejscowego zaawansowania nowotworu i mieć niekorzystne znaczenie rokownicze [14]. W porównaniu z rearanżacjami RET/PTC, anomalie dotyczące genu *NTRK1* kojarzą się z gorszym rokowaniem [16].

Nadekspresja genu *MET*

Protoonkogen *MET* koduje jeszcze inny receptor błonowy o aktywności kinazy tyrozynowej, będący receptorem czynnika wzrostu hepatocytów (HGF), którego znaczenie w patologii tarczycy jest coraz bardziej doceniane. Nadekspresję białka Met obserwuje się w 70-95% przypadków raka brodawkowatego tarczycy. Zaobserwowano, że zjawisku temu towarzyszy prawie 10-krotny wzrost specyficznego mRNA (w porównaniu ze zdrową tarczycą), co wskazuje, że nadmiar białka Met jest najprawdopodobniej skutkiem zwiększonej transkrypcji jego genu. Hipotezę tę wspiera fakt, że w badanych rakach stwierdza się 4.5-krotny wzrost ilości mRNA HIF-1 (*hypoxia inducible factor 1*, czynnik indukowany przez niedotlenienie-1), bardzo silnego aktywatora genu *MET* [22]. Akumulację mRNA *MET* powoduje równie aktywacja *RET* i *RAS*. Receptor Met i jego ligand HGF zwiększają ruchliwość i inwazyjność komórek nowotworowych pochodzenia nabłonkowego. Tak więc nadekspresja Met w rakach papilarnych tłumaczyć może dużą skłonność tego typu nowotworu (a zwłaszcza niektórych jego wariantów) do tworzenia przerzutów oraz fakt, że rak ten często jest wieloogniskowy. Wyższy niż w innych wariantach oraz niż w zdrowej tarczycy poziom ekspresji Met obserwuje się w wysokokomórkowym wariancie raka brodawkowatego oraz w rakach z naciekaniem otoczki i mięśni szkieletowych [23, 24, 25]. Intensywne barwienie immunohistochemiczne tkanek raka na obecność Met koreluje z krótszym czasem przeżycia bez nawrotu choroby oraz z młodszym wiekiem chorego [26]. Interesujące jest, że ostatnio pojawiło się doniesienie, iż raki z wyższym poziomem Met wykazują zmniejszoną migrację, podczas gdy zmniejszenie jego ilości wskutek działania siRNA skutkowało wzrostem migracji [27].

Mutacja aktywująca genu *BRAF*

Najnowszym odkryciem dotyczącym patogenezy raka brodawkowatego tarczycy jest odkrycie mutacji aktywującej w genie *BRAF* (kinazy Raf typu B). BRAF jest kinazą serynowo-treoninową, która przekazuje sygnał mitogenny od RAS i RET do szlaku kinaz MAP. W eksonie 15 genu *BRAF*, w pozycji 1796, występuje zamiana tymidyny na adeninę, co skutkuje zmianą aminokwasu w pozycji 599 (V599E). Początkowo mutację tę stwierdzono w czerniaku złośliwym, a następnie w raku brodawkowatym tarczycy, gdzie znajduje się ją w 38-69% przypadków. Mutacja ta występuje równie często w różnych populacjach: w populacji północnoamerykańskiej i ukraińskiej wynosi około 45% [28]. Co więcej, wydaje się, że w rakach popromiennych częstość występowania tej mutacji jest znacznie niższa, niż w rakach „sporadycznych", podczas gdy w przypadku rearanżacji RET/PTC jest odwrotnie [29]. Niespójne są dane dotyczące współwystępowania mutacji *BRAF* i rearanżacji *RET*. Większość autorów twierdzi, że te anomalie występują całkowicie rozłącznie [8, 30], podczas gdy inni znajdują je występujące jednocześnie [31]. Mutacja *BRAF* częściej występuje w klasycznym oraz wysokokomórkowym wariancie raka brodawkowatego [32, 33]. Występuje ona również w raku nisko zróżnicowanym i anaplastycznym wywodzącym się z raka brodawkowatego, ale nie ma jej w raku pęcherzykowym, z komórek Hurthla, w raku rdzeniastym, w gruczolakach lub łagodnych zmianach hiperplastycznych [29, 32]. Interesujące, że mutacja ta najprawdopodobniej nie występuje w wariancie pęcherzykowym raka brodawkowatego [34]. Ze względu na wysoką specyficzność jej występowania może być ona ważnym elementem diagnostycznym przy ocenie wyników biopsji cienkoigłowej guza [35]. Mutacja *BRAF* w statystycznie istotny sposób koreluje z występowaniem przerzutów odległych [36], częściej znajduje się ją w rakach na III i IV etapie zaawansowania klinicznego [32]. Istnieją też doniesienia, których autorzy nie znajdują korelacji pomiędzy mutacją *BRAF* a wiekiem w chwili diagnozy, płcią, wielkością guza pierwotnego, miejscową inwazyjnością, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych, etapem zaawansowania klinicznego i chorobą wieloogniskową [33].

Dominujące-negatywne mutacje genów *TR*

W nowotworach dość często opisuje się nieprawidłowości dotyczące receptorów hormonów drobnocząsteczkowych, które między innymi biorą udział w regulacji proliferacji, dojrzewania i apoptozy. Analiza raków brodawkowatych tarczycy wykazała, że w każdym badanym przypadku zmutowany był co najmniej jeden gen kodujący receptory jądrowe trijodotyroniny. Mutacje genu *TRB* wykryto w 93.75% przypadków, podczas gdy mutacje genu *TRA* – w 62.5% przypadków. Zmutowane białka receptorowe nieprawidłowo regulowały transkrypcję genów docelowych i funkcjonowały jak mutanty dominujące-negatywne [37]. W przeciwieństwie do mutacji *BRAF* oraz mutacji *TRB* znajdowanych w zespole oporności na T3, gdzie mutacje są pojedyncze i występują w konkretnych pozycjach, mutacje genów *TR* w rakach brodawkowatych zlokalizowane były na całej długości regionu kodującego białko receptorowe i znajdowano od 1 do 6 mutacji w jednym allele. Jedynie niektóre z tych mutacji występowały w więcej niż jednym przypadku raka (potencjalne „nowotworowe *hot spots*"?). U 91% starych myszy transgenicznych z obydwoma allele genu *TRB* podstawionymi przez geny kodujące dominujące-negatywne mutanty *TRB*, rozwijały się raki tarczycy o dużym stopniu inwazyjności: u 74% raki te naciekały otoczkę, w 34% przypadków dawały przerzuty odległe, u 1/3 myszy były to raki anaplastyczne. Raki tarczycy rozwijały się też u myszy z jednym

zmutowanym i całkowitym brakiem drugiego allele tego genu [38, 39, 40, 41], co wspiera hipotezę o roli zmutowanych receptorów T3 w patogenezie raka tarczycy.

Progresja do raka anaplastycznego

Obecnie uważa się, że raki anaplastyczne tarczycy ewoluują stopniowo z raków wysoko zróżnicowanych, najprawdopodobniej w odpowiedzi na pojawienie się dodatkowych anomalii genetycznych i wskutek nasilenia niestabilności chromosomalnej. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa białko p53 biorące udział w regulacji proliferacji, naprawy DNA i apoptozy. U myszy transgenicznych z rearanżacją RET/PTC1 rozwijają się raki brodawkowate tarczycy, a u myszy z tą rearanżacją i dodatkowo – całkowitym brakiem genów *P53*, oprócz nowotworów innych narządów, stwierdza się obecność dużych, inwazyjnych raków anaplastycznych tarczycy [42]. Obecność zmutowanego p53 stwierdza się w 85% raków anaplastycznych, a jego akumulację – w większości tych raków. Akumulację p53 stwierdza się częściej w rakach o agresywnym przebiegu, można ją obserwować już w przypadkach, które nie przeszły do fazy anaplastycznej. Mutacje *P53* spotyka się przede wszystkim w rakach anaplastycznych. Są to głównie mutacje spontaniczne, ale istnieją dane wskazujące, że mutacje *P53* mogą pojawić się wskutek napromieniowania lub terapii ^{131}I [43]. Co więcej, wydaje się, że nie tylko mutacja, ale i naturalnie występujący polimorfizm w kodonie 72 genu *P53* (CGC – arginina lub CCC – prolina) może mieć związek ze skłonnością do tworzenia raków anaplastycznych. Żadna z osób z gruczolakiem lub zróżnicowanym rakiem tarczycy nie była homozygotą pod względem proliny, podczas gdy wszystkie badane przypadki raka anaplastycznego miały właśnie taki polimorfizm [44]. Innymi czynnikami genetycznymi, mogącymi brać udział w progresji raka brodawkowatego do anaplastycznego, są mutacje genów *RAS*, mutacje genu b-kateniny oraz poziom ekspresji białka nm23. Mutacje protoonkogenów *RAS* (*K-RAS*, *H*-RAS, *N-RAS*) prowadzą do konstytutywnej aktywacji szlaków oddziaływań, w które włączone są białkowe produkty tych genów, wskutek czego dochodzi do nadmiernej proliferacji i odróżnicowania komórek. Mutacje *RAS* rzadko występują w raku brodawkowatym, najczęściej – w jego wariancie pęcherzykowym. Spotyka się je również w rakach folikularnych. Ocenia się, że w rakach zróżnicowanych mutacje *RAS* występują w co dziesiątym przypadku, natomiast w rakach anaplastycznych mutacje tego genu stwierdza się w 50% przypadków. Istnieje korelacja pomiędzy występowaniem mutacji *RAS* i agresywnym przebiegiem choroby oraz wyższym ryzykiem zgonu, niezależnie od etapu zaawansowania choroby i stopnia zróżnicowania guza [45]. b-katenina jest białkiem o wielu funkcjach. Bierze udział w przyleganiu komórek, jest też ważnym składnikiem szlaków przekazywania sygnałów. Może być również zlokalizowana w jądrze komórkowym, gdzie bierze udział w regulacji transkrypcji, między innymi genu kodującego cyklinę D1 i genu kodyjącego białko c-myc. Mutacje b-kateniny prowadzić mogą do stabilizacji tego białka oraz do jego nadmiernej translokacji do jądra komórkowego. Obniżoną ekspresję błonową β-kateniny obserwowano we wszystkich badanych rakach tarczycy. Zaobserwowano korelację pomiędzy coraz słabszym barwieniem błony na obecność tego białka i progresywną utratą zróżnicowania oraz agresywnym przebiegiem choroby. Mutacje oraz jądrową lokalizację β-kateniny znajdowano jedynie w nisko zróżnicowanych i niezróżnicowanych rakach tarczycy [46] oraz w rakach anaplastycznych [47]. Obecność białek antymetastatycznych nm23-H1 i nm23-H2 wydaje się zmniejszać aktywność metastatyczną komórki nowotworowej. Wysoką ekspresję nm23-H1 stwierdza się w zróżnicowanych rakach tarczycy natomiast niską lub jej całkowity brak w rakach anaplastycznych oraz w przerzutach do węzłów chłonnych [48].

Piśmiennictwo

1. Pathak S Organ- and tissue-specific stem cells and carcinogenesis. Anticancer Res 2002; 22: 1353-1356.
2. Trosko JE The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. J Biochem Mol Biol 2003; 36: 43-48.
3. Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, et al. Stem cells in normal breast development and breast cancer. Cell Prolif 2003; 36 Suppl 1: 59-72.
4. Wreesmann VB, Ghossein RA, Patel SG, et al. Genome-wide appraisal of thyroid cancer progression. Am J Pathol 2002; 161: 1549-1556.
5. Wiseman SM, Loree TR, Rigual NR, et al. Papillary thyroid cancer: high inter-(simple sequence repeat) genomic instability in a typically indolent cancer. Head Neck 2003; 25: 825-832.
6. Wiseman SM, Loree TR, Hicks WL Jr, et al. Anaplastic thyroid cancer evolved from papillary carcinoma: demonstration of anaplastic transformation by means of the inter-simple sequence repeat polymerase chain reaction. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2003; 129: 96-100.
7. Huang Y, Prasad M, Lemon WJ, et al. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 15044-15049.
8. Frattini M, Ferrario C, Bressan P, et al. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. Oncogene. 2004; [Epub ahead of print]
9. Wreesmann VB, Sieczka EM, Socci ND, et al. Genome-wide profiling of papillary thyroid cancer identifies MUC1 as an independent prognostic marker. Cancer Res 2004; 64: 3780-3789.
10. Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, et al. Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. Clin Cancer Res 2000; 6: 1093-1103.
11. Sugg SL, Ezzat S, Rosen IB, et al. Distinct multiple RET/PTC gene rearrangements in multifocal papillary thyroid neoplasia. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83: 4116-4122.

12. Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, et al. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. Cancer Res 1997; 57: 1690-1694.
13. Thomas GA, Bunnell H, Cook HA, et al. High prevalence of RET/PTC rearrangements in Ukrainian and Belarussian post-Chernobyl thyroid papillary carcinomas: a strong correlation between RET/PTC3 and the solid-follicular variant. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84: 4232-4238.
14. Bongarzone I, Vigneri P, Mariani L, et al. RET/NTRK1 rearrangements in thyroid gland tumors of the papillary carcinoma family: correlation with clinicopathological features. Clin Cancer Res 1998; 4: 223-228.
15. Basolo F, Molinaro E, Agate L, et al. RET protein expression has no prognostic impact on the long-term outcome of papillary thyroid carcinoma. Eur J Endocrinol 2001; 145: 599-604.
16. Musholt TJ, Musholt PB, Khaladj N, et al. Prognostic significance of RET and NTRK1 rearrangements in sporadic papillary thyroid carcinoma. Surgery 2000; 128: 984-993.
17. Wiench M, Wloch J, Oczko M, et al. Rearrangement of the RET gene in papillary thyroid carcinoma. Wiad Lek 2001; 54 Suppl 1: 64-71.
18. Nikiforov YE. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. Endocr Pathol 2002; 13: 3-16.
19. Fischer AH, Bond JA, Taysavang P, et al. Papillary thyroid carcinoma oncogene (RET/PTC) alters the nuclear envelope and chromatin structure. Am J Pathol 1998; 153: 1443-1450.
20. Russell JP, Powell DJ, Cunnane M, et al. The TRK-T1 fusion protein induces neoplastic transformation of thyroid epithelium. Oncogene 2000; 19: 5729-5735.
21. Bounacer A, Schlumberger M, Wicker R, et al. Search for NTRK1 proto-oncogene rearrangements in human thyroid tumours originated after therapeutic radiation. Br J Cancer 2000; 82: 308-314.
22. Scarpino S, Cancellario d'Alena F, Di Napoli A, et al.. Increased expression of Met protein is associated with up-regulation of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) in tumour cells in papillary carcinoma of the thyroid. J Pathol 2004; 202: 352-358.
23. Ruco LP, Stoppacciaro A, Ballarini F, et al. Met protein and hepatocyte growth factor (HGF) in papillary carcinoma of the thyroid: evidence for a pathogenetic role in tumourigenesis. J Pathol 200; 194: 4-8.
24. Chen BK, Ohtsuki Y, Furihata M, et al. Overexpression of c-Met protein in human thyroid tumors correlated with lymph node metastasis and clinicopathologic stage. Pathol Res Pract 1999; 195: 427-433.
25. Nardone HC, Ziober AF, LiVolsi VA, et al. c-Met expression in tall cell variant papillary carcinoma of the thyroid. Cancer 2003; 98: 1386-1393.
26. Mineo R, Costantino A, Frasca F, et al. Activation of the HGF/MET system in papillary thyroid cancer: biological effects of HGF in thyroid cancer cells depend on Met expression levels. Endocrinology 2004; 145: 4355-4365
27. Ramirez R, Hsu D, Patel A, et al. Over-expression of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) and the HGF/SF receptor (cMET) are associated with a high risk of metastasis and recurrence for children and young adults with papillary thyroid carcinoma. Clin Endocrinol 2000; 53: 635-644.
28. Xing M, Vasko V, Tallini G, et al. BRAF T1796A transversion mutation in various thyroid neoplasms. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 1365-1368.
29. Nikiforova MN, Ciampi R, Salvatore G, et al. Low prevalence of BRAF mutations in radiation-induced thyroid tumors in contrast to sporadic papillary carcinomas. Cancer Lett 2004; 209: 1-6.
30. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, et al. 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.
31. Xu X, Quiros RM, Gattuso P, et al. High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. Cancer Res 2003; 63: 4561-4567.
32. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88: 5399-5404.
33. Puxeddu E, Moretti S, Elisei R, et al. BRAF(V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 2414-2420.
34. Trovisco V, Vieira de Castro I, et al. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. J Pathol 2004; 202: 247-251.
35. Xing M, Tufano RP, Tufaro AP, et al. Detection of BRAF mutation on fine needle aspiration biopsy specimens: a new diagnostic tool for papillary thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 2867-2872.
36. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88:4393-4397.
37. Puzianowska-Kuznicka M, Krystyniak A, Madej A, et al. Functionally impaired TR mutants are present in thyroid papillary cancer. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 1120-1128.
38. Suzuki H, Willingham MC, Cheng SY. Mice with a mutation in the thyroid hormone receptor beta gene spontaneously develop thyroid carcinoma: a mouse model of thyroid carcinogenesis. Thyroid 2002; 12: 963-969.
39. Yen PM, Cheng SY. Germline and somatic thyroid hormone receptor mutations in man. J Endocrinol Invest 2003; 26: 780-787.
40. Cheng SY. Thyroid hormone receptor mutations in cancer. Mol Cell Endocrinol 2003; 213: 23-30.
41. Kato Y, Ying H, Willingham MC, et al. A tumor suppressor role for thyroid hormone b receptor in a mouse model of thyroid carcinogenesis. Endocrinology 2004 [Epub ahead of print]
42. La Perle KM, Jhiang SM, Capen CC. Loss of p53 promotes anaplasia and local invasion in ret/PTC1-induced thyroid carcinomas. Am J Pathol 2000; 157: 671-677.
43. Sera N, Ashizawa K, Ando T, et al. Anaplastic changes associated with p53 gene mutation in differentiated thyroid carcinoma after insufficient radioactive iodine (131I) therapy. Thyroid 2000; 10: 975-979.
44. Boltze C, Roessner A, Landt O, et al. Homozygous proline at codon 72 of p53 as a potential risk factor favoring the development of undifferentiated thyroid carcinoma. Int J Oncol 2002; 21: 1151-1154.
45. Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, et al. Ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. J Clin Oncol 2003; 21: 3226-3235.
46. Garcia-Rostan G, Camp RL, Herrero A, et al. Beta-catenin dysregulation in thyroid neoplasms: down-regulation, aberrant nuclear expression, and CTNNB1 exon 3 mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and poor prognosis. Am J Pathol 2001; 158: 987-996.
47. Garcia-Rostan G, Tallini G, Herrero A, et al. Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma. Cancer Res 1999; 59: 1811-1815.
48. Arai T, Yamashita T, Urano T, et al. Preferential reduction of nm23-H1 gene product in metastatic tissues from papillary and follicular carcinomas of the thyroid. Mod Pathol 1995; 8: 252-256.