

**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra antropologie a genetiky člověka**

Disertační práce

**Molekulárně-genetická analýza
karcinomů štítné žlázy**

Mgr. Vlasta Sýkorová

Školitel: RNDr. Běla Bendlová, CSc.

Disertační práce byla vypracována na Oddělení molekulární endokrinologie
Endokrinologického ústavu v Praze.
Byla podpořena grantovým projektem IGA MZ ČR NR/9165-3.

Praha 2010

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně. Veškerou literaturu a ostatní prameny, z nichž jsem při přípravě čerpala, řádně cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

Prohlašuji, že jsem disertační práci ani její podstatnou část nepředložila k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 25. března 2010

Mgr. Vlasta Sýkorová

OBSAH

Předmluva.....	5
1 ÚVOD.....	7
1.1 ANATOMIE ŠTÍTNÉ ŽLÁZY.....	7
1.2 NÁDORY ŠTÍTNÉ ŽLÁZY.....	8
1.3 PAPILÁRNÍ KARCINOM.....	10
1.3.1 Rizikové faktory.....	10
1.3.2 Diagnostika PTC.....	12
1.3.2.1 Histologické varianty PTC.....	15
1.3.2.1.1 Folikulární varianta.....	15
1.3.2.1.2 Papilární mikrokarcinom.....	16
1.3.2.1.3 Varianta z vysokých buněk.....	16
1.3.2.1.4 Další varianty PTC.....	16
1.3.3 Léčba PTC.....	17
1.3.4 Prognóza PTC.....	18
1.3.5 Genetika PTC.....	19
1.3.5.1 <i>RET/PTC</i> přeskupení.....	20
1.3.5.2 Mutace genu <i>BRAF</i>	24
1.3.5.3 Mutace genů <i>RAS</i>	26
1.3.5.4 Další geny účastnící se onkogeneze PTC.....	27
1.3.5.4.1 <i>NTRK1</i> přeskupení.....	27
1.3.5.4.2 <i>PAX8-PPARγ</i> přeskupení.....	27
2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	29
3 MATERIÁL A METODY.....	30
3.1 STUDOVANÉ SOUBORY.....	30
3.1.1 Soubor pacientů s nádory štítné žlázy.....	30
3.1.2 Kontrolní soubor.....	32
3.2 MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ ANALÝZA.....	32
3.2.1 Izolace nukleových kyselin.....	32
3.2.1.1 Izolace DNA z parafinových bločků.....	32
3.2.1.2 Izolace DNA a RNA z čerstvých tkání a biopsií.....	33
3.2.1.3 Izolace DNA z periferní krve.....	34
3.2.1.4 Měření koncentrace.....	34

3.2.2 Reverzní transkripce.....	35
3.2.3 Detekce bodových změn.....	35
3.2.3.1 High Resolution Melting (HRM) analýza	35
3.2.3.2 Sekvenace	36
3.2.3.3 Genotypizace polymorfismů.....	37
3.2.4 Detekce exprese genů.....	41
3.3 STATISTICKÁ ANALÝZA.....	42
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	45
4.1 ALTERACE GENU <i>RET</i>	45
4.1.1 Výsledky.....	45
4.1.2 Diskuze.....	51
4.1.3 Shrnutí.....	53
4.1.4 Prezentace výsledků.....	54
4.2 MUTACE GENU <i>BRAF</i>	55
4.2.1 Výsledky.....	55
4.2.2 Diskuze.....	61
4.2.3 Shrnutí.....	64
4.2.4 Prezentace výsledků.....	64
4.3 MUTACE GENŮ <i>RAS</i>	65
4.3.1 Výsledky.....	65
4.3.2 Diskuze.....	69
4.3.3 Shrnutí.....	70
5 ZÁVĚR.....	71
Literatura.....	74
Seznam použitých zkratk.....	88
Seznam obrázků.....	90
Seznam tabulek.....	92
Publikační a prezentační aktivita.....	93
Seznam příloh.....	97
Přílohy.....	100

Předmluva

Nádory štítné žlázy jsou nejčastější endokrinní malignitou a jejich incidence v posledních desetiletích stále stoupá. Představují vážný zdravotní a socio-ekonomický problém, proto se úsilí vědeckých týmů upírá k objasnění jejich patogenetických příčin. V současné době je známo několik hlavních genetických změn, ovšem jejich vliv na fenotyp onemocnění je stále kontroverzní. Spekuluje se také o vlivu polymorfních variant některých genů jako genetických modifikátorů projevu tohoto onemocnění. Znalost molekulárně genetických změn a jejich vlivu na fenotyp onemocnění, které vedou ke vzniku a rozvoji karcinomů štítné žlázy, by mohla přispět k lepší diagnostice, upřesnění prognózy onemocnění, predikci a případně i k prevenci onemocnění.

Disertační práce navazuje na mou diplomovou práci obhájenou v roce 2007, ve které byla zavedena molekulárně genetická analýza nejčastějších genových alterací spojených s papilárním karcinomem štítné žlázy v české populaci. V rámci disertační práce jsem pokračovala v započatém výzkumu a zaměřila se vedle hlavních genetických změn i na studium dalších mutací a modifikujících faktorů, zejména polymorfismů *RET* proto-onkogenu, které mohou ovlivňovat riziko vzniku karcinomů štítné žlázy.

Tuto práci jsem vypracovala v Endokrinologickém ústavu na Oddělení molekulární endokrinologie, které má již dlouholetou tradici výzkumu genetiky nádorů štítné žlázy a je jediným pracovištěm v ČR zabývající se touto problematikou. Na tomto místě bych chtěla poděkovat především své školitelce RNDr. Běle Bendlové, CSc. za vstřícný přístup, předané cenné rady a pečlivé a trpělivé vedení. Dále bych chtěla poděkovat kolegyním Mgr. Elišce Václavíkové a RNDr. Šárce Dvořákové, Ph.D., které se věnují podobné problematice. Za pomoc se statistickým vyhodnocením děkuji Mgr. Josefu Včelákovi a Ing. Martinu Hillovi, DrSc. Můj dík patří celému kolektivu Oddělení molekulární endokrinologie za vytvoření příjemného prostředí pro realizaci této práce, laskavou pomoc a podporu při práci.

Tato práce by nevznikla bez úzké spolupráce s kliniky, chirurgy a pathology z pražských i mimopražských pracovišť. Můj dík patří Doc. MUDr. Petru Vlčkovi, CSc. z Kliniky nukleární medicíny a endokrinologie 2. LF UK a FNM, který zajišťoval klinickou stránku výzkumu. Za vstřícnost a pomoc při odběru tkání děkuji Doc. MUDr. J. Astlovi, CSc., MUDr. D. Veselému, Ph.D., a Prof. MUDr. J. Betkovi, Dr.Sc. z Kliniky ORL a chirurgie hlavy a krku 1.LF UK a FNM,

as. MUDr. S. Smutnému a Prof. MUDr. J. Hochovi z Chirurgické kliniky 2.LF UK a FNM a MUDr. J. Lukášovi, CSc. z Oddělení ORL Nemocnice na Homolce. Za vyhledávání parafinových bločků, jejich popis a cenné rady v oblasti patologie štítné žlázy děkuji Prof. MUDr. A. Ryškovi, Ph.D. z Fingerlandova ústavu patologie FN v Hradci Králové. Za pečlivý sběr a patologické vyhodnocování vzorků děkuji prim. MUDr. D. Kodetové, Mgr. A. Cibulovi a Prof. MUDr. R. Kodetovi, CSc. z Ústavu patologie a molekulární medicíny 2.LF UK a FNM. Za vyhledání a vyhodnocení parafinových bločků děkuji Doc. MUDr. J. Duškové, CSc. z Ústavu patologie 1. LF UK a VFN, MUDr. J. Lacovi, Ph.D. z Fingerlandova ústavu patologie FN v Hradci Králové a MUDr. A. Hlobilkové, Ph.D. z Laboratoře molekulární patologie LF UP v Olomouci. Dále děkuji MUDr. Z. Novákovi, CSc. a s MUDr. J. Vrbíkové, CSc. z Endokrinologického ústavu za odběr bioptických vzorků štítné žlázy. Děkuji také všem pacientům, kteří se zúčastnili této studie.

Tato práce vznikla díky finanční podpoře grantového projektu IGA MZ ČR NR/9165-3.

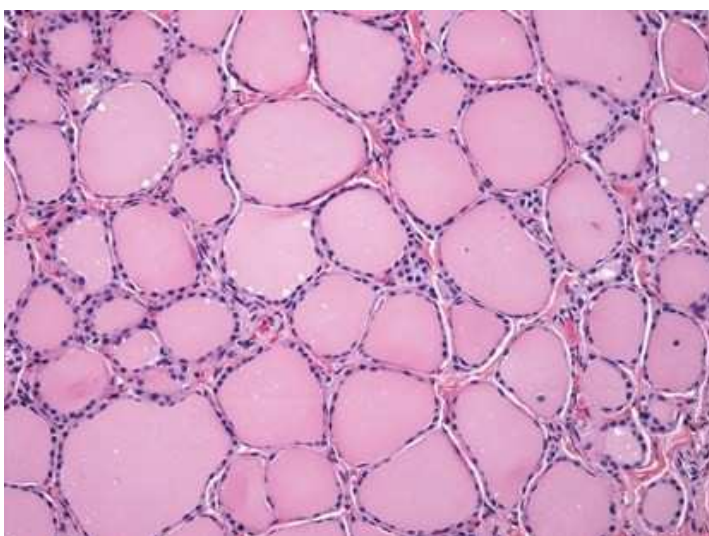
1 ÚVOD

1.1 ANATOMIE ŠTÍTNÉ ŽLÁZY

Štítná žláza je uložena v přední části krku na úrovni 5.–7. obratle v oblasti štítné chrupavky, před a po stranách průdušnice. Skládá se ze dvou laloků spojených isthmem. Jako variace se objevuje pyramidální lalok.

Štítná žláza vzniká spojením dvou vývojově odlišných struktur. **Folikulární buňky** vznikají z výchlípků embryonálního faryngu u kořene jazyka a sestupují jako ductus thyreoglossus, který později zaniká, nebo se částečně zachovává ve formě pyramidálního laloku. **Parafolikulární buňky** (C-buňky) pocházejí z neurální lišty, ze které vycestují do 4. žaberní výchlípků a odtud k základu štítné žlázy, se kterým se spojují.

Štítná žláza je uložena v tenkém vazivovém pouzdru složeném ze dvou listů, z nichž vnitřní list vysílá do tkáně septa a tím ji dělí na lalůčky (lobuli). Lobuli se skládají z folikulů, kulovitých útvarů, ohraničených jednou vrstvou folikulárních buněk (obr. 1). Uvnitř folikulu se nachází viskózní tekutina koloid, secernovaná folikulárními buňkami a obsahující tyreoglobulin, který je prekurzorem hormonů trijodothyroninu (T_3) a tyroxinu (T_4). Mezi folikulárními buňkami jsou roztroušeny shluky 3–5 parafolikulárních buněk produkujících kalcitonin.



Obr. 1 Histologie normálních folikulů štítné žlázy (Nikiforov et al. 2009)

1.2 NÁDORY ŠTÍTNÉ ŽLÁZY

Nádory štítné žlázy představují více než 90 % endokrinních tumorů. Jejich výskyt je 3–5krát častější u žen než u mužů (www.svod.cz). Incidence nádorů štítné žlázy v posledních desetiletích stále vzrůstá (obr. 2). U lidí ve věku 15–45 let patří mezi pět nejčastějších karcinomů (Límanová 2006).

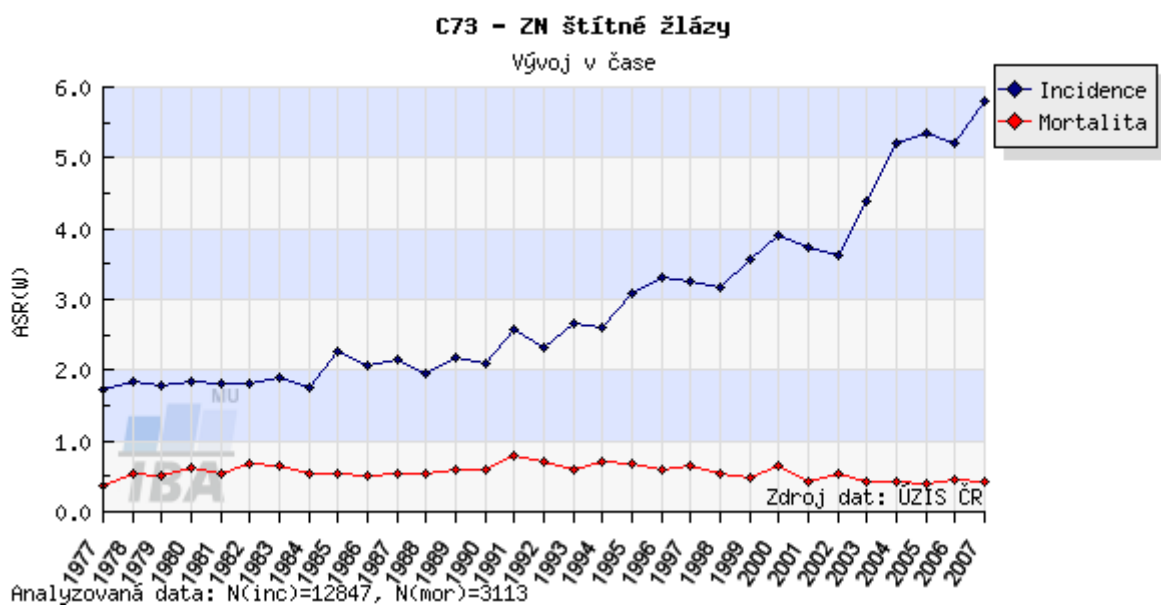
Nádory štítné žlázy zahrnují primární a sekundární nádory. Primární nádory se rozlišují podle svého buněčného původu. Z folikulárních buněk vznikají benigní a maligní nádory. Benigním nádorem je folikulární adenom. Mezi maligní folikulární nádory patří diferencované karcinomy (DTC – papilární a folikulární karcinom) a nediferencovaný anaplastický karcinom. Z parafolikulárních (C-buněk) vzniká medulární karcinom.

- **Folikulární adenom (FTA)** je benigním nádorem, vzácně může docházet k malignímu zvratu. Zvláštní jednotkou je onkocytární adenom.
- **Papilární karcinom (PTC)** je nejčastějším karcinomem štítné žlázy a jeho incidence stále stoupá.
- **Folikulární karcinom (FTC)** je druhým nejčastějším karcinomem štítné žlázy. Může vzniknout maligním zvratem folikulárního adenomu, od kterého se může lišit pouze přítomností invaze do cév nebo okolních tkání. Pomocí biopsie tenkou jehlou (FNAB) je od FTA nerozlišitelný, proto musí být potvrzen histologicky. Šíří se převážně hematogenní cestou a zakládá vzdálené metastázy v kostech, plicích a mozku. Mezi FTC se řadí i stále kontroverzní onkocytární (Hürthleho) karcinom z oxyfilních, neboli jasných buněk. Jedná se o agresivnější variantu FTC dříve považovanou za samostatný typ (Nikiforov et al. 2009).
- Jakýmsi přechodným typem mezi diferencovanými a nediferencovanými karcinomy je **špatně diferencovaný karcinom (PDC)**, který může vzniknout z DTC.
- **Anaplastický karcinom (ATC)** je nejagresivnějším typem nádoru štítné žlázy. Jedná se o vzácný rychle rostoucí nádor se vzdálenými metastázami, často již inoperativní s úmrtím do několika měsíců. Vyskytuje se ve vyšším věku (7.–8. dekáda). Předpokládá se, že může vzniknout dediferenciací z diferencovaných karcinomů (Venkatesh et al. 1990).

- **Medulární karcinom (MTC)** vzniká z parafolikulárních buněk (C-buněk). Vyskytuje se ve sporadické (75–80 %) nebo familiární formě (20–25 %). Familiárně se objevuje jako samostatný familiární MTC (FMTC), nebo jako součást mnohočetné endokrinní neoplázie typu 2A (MEN2A – MTC, feochromocytom, hyperparathyreóza) nebo 2B (MEN2B – MTC, neurofibromy, ganglioneuromatóza a marfanoidní habitus). Metastazuje do lymfatických uzlin, do jater a kostí. Prognóza sporadických forem je relativně příznivá, narozdíl od podstatně agresivnější familiární formy (Nikiforov et al. 2009).

Vzácnými typy nádorů jsou smíšené typy medulárního s folikulárním nebo papilárním karcinomem, které jsou v primárním tumoru i v metastázách imunopozitivní pro tyreoglobulin i kalcitonin.

Sekundární jsou nádory, které do štítné žlázy metastazují. Nejčastěji se jedná o karcinomy ledvin, plic, prsu a melanoblastom. Představují spíše diferenciální diagnostický problém, než primární poruchu funkce štítné žlázy.



Obr. 2 Vývoj incidence nádorů štítné žlázy (www.svod.cz). Graf zobrazuje časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100 000 osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100 000 osob) pro nádory štítné žlázy v celé populaci ČR

1.3 PAPILÁRNÍ KARCINOM

Papilární karcinom (PTC) je nejčastějším karcinomem štítné žlázy a jeho incidence stále vzrůstá. Příčiny tohoto trendu částečně vysvětluje přesnější diagnostika, která pomocí ultrasonografií asistované biopsie tenkou jehlou (FNAB) odhalí již nádory menší než 1 cm (Burgess and Tucker 2006). Další příčinou může být změna diagnostických kritérií, kdy mnoho nádorů dnes označovaných jako folikulární varianta PTC bylo dříve klasifikováno jako FTC a mnoho dnešních PTC bylo dříve klasifikováno jako benigní nádory (Suster 2006). Nicméně tyto faktory nemohou stát za veškerým nárůstem incidence těchto nádorů. Dalším zvažovaným faktorem může být vyšší příjem jodu v potravě (Williams et al. 1977; Franceschi et al. 1993). Dosud rozporuplnou otázkou zůstává vliv havárie černobylské jaderné elektrárny (26. duben 1986).

PTC je pomalu rostoucí nádor s poměrně dobrou prognózou. Časté jsou mikrometastázy v druhém laloku a metastázy v lymfatických uzlinách. U 20–25 % PTC se nádor šíří přímou invazí přes pouzdro (Carcangiu et al. 1985). Naopak vzdálené metastázy jsou vzácné. Nejčastěji se vyskytují v plicích (70 %), dále v kostech (20 %) a vzácněji např. v měkkých tkáních mediastena a mozku (Hoie et al. 1988; Dinneen et al. 1995).

Incidence PTC vykazuje značnou geografickou a etnickou variabilitu (Parkin et al. 2005). Je častější u žen, ovšem agresivita a mortalita jsou vyšší u mužů (Mazzaferri and Jhiang 1994; Parkin et al. 2005). V dětství je vzácný, ale během adolescence a časně dospělosti dochází k strmému nárůstu s nejvyšším výskytem v 5. dekádě u žen a 6.–7. dekádě u mužů (<http://seer.cancer.gov/data>).

1.3.1 Rizikové faktory

- **Ionizační záření.** Expozice ionizačnímu záření patří k hlavním rizikovým faktorům pro vznik PTC, obzvláště během dětství. Rozsáhlé používání zevní aktinoterapie krku při léčbě benigních onemocnění v USA a dalších zemích od 30.–50. let vedlo ke značnému vzestupu karcinomů štítné žlázy u osob ozářených během dětství (Ron et al. 1995). K velkému nárůstu PTC došlo také po výbuchu jaderné

elektrárny v Černobyli 26. dubna 1986, kdy se do atmosféry uvolnilo ohromné množství radioaktivních isotopů (radioaktivní jod a cesium). U dětí do 4 let vzrostl počet PTC na Ukrajině a v Bělorusku po roce 1986 více než 80krát (Smida et al. 1999; Thomas et al. 1999). Minimální latentní doba pro vznik nádoru jsou čtyři roky a zvýšené riziko může přetrvávat až 40 let po expozici (Schneider et al. 1993) (Nikiforov 2006). Další událostí byl pokusný výbuch vodíkové zbraně na Bikinách v Tichomoří, kdy kvůli náhlé změně počasí došlo k návratu radioaktivního mraku na Marshallské souostroví a následnému radioaktivnímu spadu na obydlenou oblast. Po 20 letech měly všechny exponované děti rakovinu štítné žlázy (Kreze et al. 2004).

- **Resekce benigní strumy.** Po resekci benigní strumy může docházet k recidivám, z nichž některé jsou maligní a velmi agresivní (Kreze et al. 2004).
- **Vysoký příjem jodu.** Vyšší incidence PTC je spojena s oblastmi s vysokým přísunem jodu, na rozdíl od FTC, který je častější v oblastech s jodovým deficitem (Belfiore et al. 1987). Zavedení suplementace jodu v oblastech s jodovou deficiencí vedlo k poklesu výskytu FTC a ATC a nárůstu PTC (Harach et al. 2002).
- **Benigní onemocnění v minulosti.** Přítomnost solitárních thyroideálních uzlů a adenomů zvyšují riziko PTC 27–29krát a multinodulární strumy 6–9krát (D'Avanzo et al. 1995). Příčinou mohou být mutace v RAS genech (Fagin 2002) nebo zvýšená proliferace buněk u adenomů a hyperplastických uzlů, která nahromaděním genetických změn v často se dělících buňkách může vést ke karcinogenezi (Williams 1995). Je možné, že za část tohoto nárůstu je zodpovědná lepší diagnostika a nalezení malých maligních tumorů u odoperovaných původně benigních nádorů. Některé studie uvádějí vyšší výskyt PTC u Gravesovy nemoci a chronické lymfocytární (Hashimotovy) tyreoiditidy (Walker and Paloyan 1990).
- **Hormonální a reprodukční faktory.** O hormonálních a reprodukčních faktorech se uvažuje kvůli vysoké incidenci PTC u žen v reprodukčním věku. Tato asociace ovšem zatím nebyla potvrzena. V některých studiích bylo mírně zvýšené riziko spojeno s užíváním estrogenových preparátů, včetně orální antikoncepce, potratem v prvním těhotenství, uměle vyvolanou menopauzou, počtem těhotenství a vyšším věkem matky při prvním porodu (Negri et al. 1999).

- **Dědičné faktory.** Riziko vzniku PTC je 3–6krát vyšší u příbuzných prvního stupně pacienta s karcinomem štítné žlázy než v běžné populaci (Hemminki et al. 2005). Přibližně 5 % PTC je familiárních, vyskytující se samostatně nebo jako součást dědičných nádorových syndromů. Jsou často multifokální (Uchino et al. 2002). Za familiární PTC se považuje onemocnění, které se objeví u tří a více příbuzných prvního stupně. Dědičnost je pravděpodobně autosomálně dominantní s neúplnou penetrancí (Malchoff and Malchoff 2006). Genetická příčina není zatím známa, třebaže bylo identifikováno několik lokusů asociovaných s náchylností k familiárnímu PTC (Canzian et al. 1998; Malchoff et al. 2000; McKay et al. 2001). Co se týče syndromů, PTC bývá nejčastěji spojen s familiární adenomatózní polypózou (FAP) – autosomálně dominantním onemocněním způsobeným zárodečnou mutací *APC* genu na pozici 5q21. FAP je charakterizovaná četnými adenomatózními polypy tlustého střeva, rakovinou tlustého střeva a dalšími tumory, hlavně PTC, který se u tohoto onemocnění manifestuje nejčastěji ve třetí dekádě života pacienta a postihuje především ženy (Plail et al. 1987). Pacientky s FAP mladší 35 let mají až 160krát vyšší riziko thyroidálních karcinomů než normální populace (Plail et al. 1987). PTC asociované s FAP jsou často multifokální s kribriformně-morulární variantou (Harach et al. 1994). Vyšší frekvence PTC byla nalezena také u pacientů s Carneyho komplexem (Boikos and Stratakis 2006) a Wernerovým syndromem (Ishikawa et al. 1999).

1.3.2 Diagnostika PTC

PTC se nejčastěji manifestuje bulkou na krku, objevenou náhodně pacientem nebo lékařem. V 17 % se projevuje chrapotem nebo dysfágií (Hundahl et al. 2000). Zvětšené uzliny na krku se objevují ve 27 % (Hundahl et al. 2000). Vzácně se manifestuje metastázami v plicích nebo patologickými frakturami kostí (0,2 %) (Hundahl et al. 2000). V některých případech je onemocnění asymptomatické a tumor je identifikován náhodně při vyšetření z jiných důvodů.

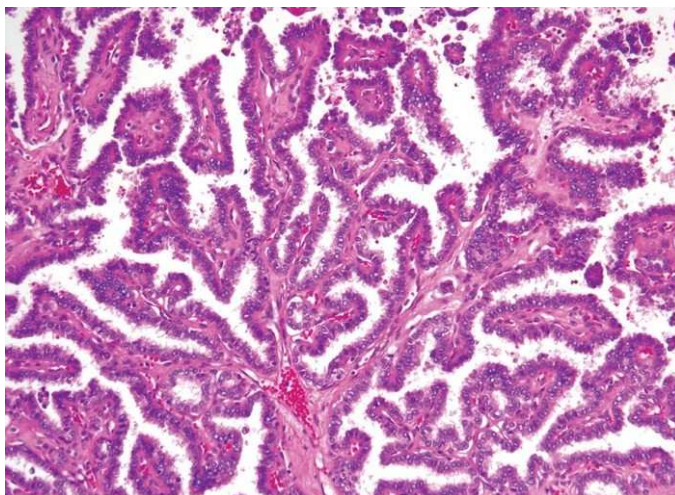
Základním vyšetřením je ultrasonografie (USG), která je neinvazivní a levnou metodou, nezatěžující pacienta. PTC se projevuje jako solidní, hypoechogenní útvar se špatně definovanými okraji. Mohou být přítomny cystické změny, běžné jsou mikrokalcifikace. Žádné charakteristiky nalezené ultrasonografií však nevedou ke konečné diagnóze malignity. Diagnózu je třeba potvrdit cytologicky z materiálu

odebraného ultrasonograficky řízenou biopsií tenkou jehlou (FNAB). Suspektní nález nebo diagnostikovaný PTC je indikován k operaci.

Další diagnostické postupy jako je počítačová tomografie (CT) nebo magnetická rezonance se mohou použít k vyhodnocení extrathyroidálního rozšíření a krční lymfadenopatie.

Definitivní diagnóza je určena na základě histologického vyšetření odebrané tkáně. PTC se často vyznačuje infiltrativním růstem s nepravidelnými hranicemi. V některých případech se mohou objevovat stlačené hranice, ale pravé opouzdření je vzácné kromě folikulární varianty PTC. Charakteristické mikroskopické znaky zahrnují papilární růst, jaderné znaky, psamomatózní tělíska a nádorovou fibrózu, ale pouze jaderné znaky jsou nezbytné pro diagnózu PTC (Nikiforov et al. 2009).

Pro PTC je charakteristický papilární růst (obr. 3), od kterého je odvozen jeho název. Papily jsou tvořené stopkou fibrovaskulárního stromatu obklopenou jednou vrstvou zvětšených folikulárních buněk s nahodile uspořádanými jádry. Přestože je papilární růst důležitým diagnostickým znakem, není pro diagnózu klíčový, neboť ne všechny PTC mají papilární růst (např. folikulární varianta PTC) a ne všechna thyroideální onemocnění s papilárním růstem jsou PTC (např. papilární hyperplasie ve strumě či folikulárním adenomu) (Nikiforov et al. 2009).

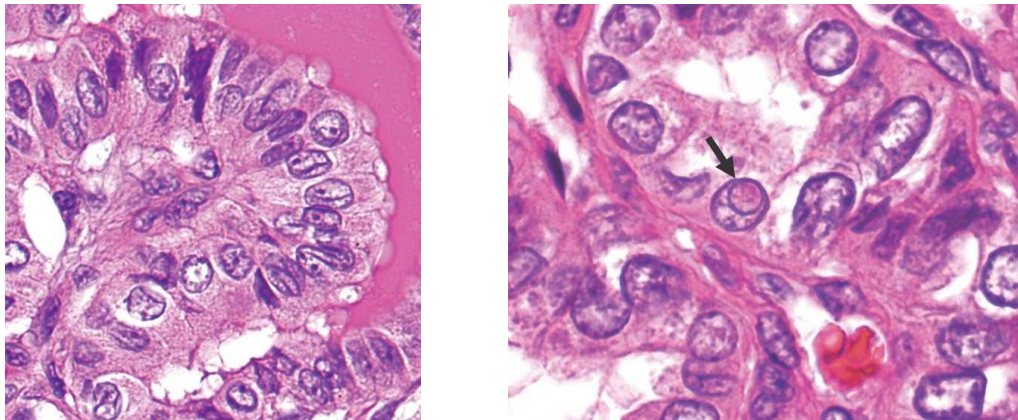


Obr. 3 Typická papilární struktura PTC (Nikiforov et al. 2009)

Pro diagnózu je nezbytná přítomnost typických jaderných znaků PTC. Tzv. matcová jádra jsou 2–3krát větší než jádra okolních nenádorových buněk. Často se překrývají a mohou tvořit shluky. Chromatin je nápadně světlý, uspořádaný kolem

nepravidelné zřetelně konturované jaderné membrány. Běžný je nález podélných jaderných rýh (obr. 4). Dále se objevují intranukleární pseudoinkluze, tvořené invaginací jaderné membrány (obr. 4). Jsou to kulaté oblasti uvnitř jádra se zbarvením okolní cytoplasmy. Právě jaderné pseudoinkluze jsou nejméně častým, ale zato vysoce specifickým jaderným znakem PTC (Adeniran et al. 2006).

Není stanoven žádný konsenzus týkající se minimálního počtu jaderných znaků potřebných pro diagnózu PTC. U většiny PTC tkání se vyskytují čtyři a více těchto znaků, za nejčastější a nejspecifičtější se považují zvětšená jádra a nepravidelné jaderné kontury (Adeniran et al. 2006). Dalším znakem PTC jsou psamomatózní tělíška, kalcifikace nalézané u 40–50 % PTC (Carcangiu et al. 1985; Adeniran et al. 2006). Vznikají pravděpodobně ukládáním depozit vápníku na odumřelé buňky v apikálních částech papil (Johannessen and Sobrinho-Simoes 1980).



Obr. 4 Typické jaderné znaky PTC. Jaderné rýhy (vlevo) a jaderné pseudoinkluze (vpravo) (Nikiforov et al. 2009)

Dalšími mikroskopickými znaky jsou tumorová fibróza a tmavě zbarvený koloid nádorových folikulů. Mohou se objevovat mnohojaderné buňky, pěnové makrofágy, squamozní metaplasie nebo cystické změny. Běžná je peritumorální thyroditida (LiVolsi 1994). Mitotická aktivita je vzácná (Lee et al. 1985).

Ke klasifikaci PTC se používá TNM systém, kde T označuje velikost, popř. rozšíření tumoru, N metastázy v lymfatických uzlinách a M vzdálené metastázy (tab. 1). Na základě těchto charakteristik a věku se určují TNM stadia pokročilosti onemocnění (Patel and Shah 2005). Histopatologický stupeň diferenciace (grading) se u PTC nepoužívá, neboť PTC patří mezi dobře diferencované nádory.

Tabulka 1 TNM klasifikace (Patel and Shah 2005)

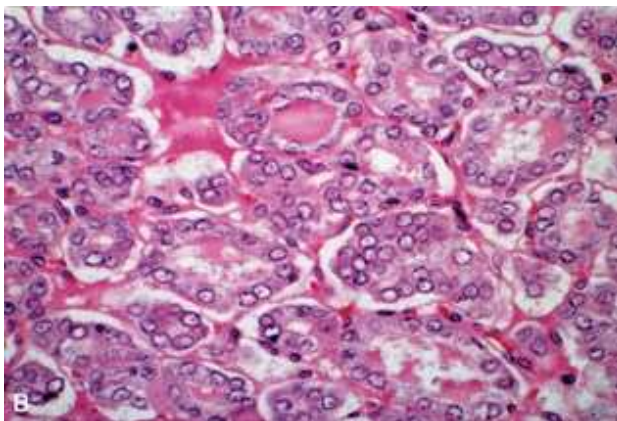
TNM klasifikace	Charakteristika	
T	T0	bez známek primárního nádoru
	T1	≤ 2 cm uvnitř štítné žlázy
	T2	2–4 cm uvnitř štítné žlázy
	T3	> 4 cm nebo minimální extenze
	T4a	podkoží, hrtan, trachea, jícen, n. laryngeus recurrens
	T4b	prevertebrální fascie, cévy mediastina, a. carotis
N	N0	v regionálních mízních uzlinách nejsou metastázy
	N1	metastázy v regionálních mízních uzlinách
	N1a	metastázy v etáži VI
	N1b	jiné regionální metastázy
M	M0	nejsou vzdálené metastázy
	M1	vzdálené metastázy

1.3.2.1 Histologické varianty PTC

Kromě klasického PTC bylo popsáno několik různých histologických variant. Některé z nich jsou rozlišovány pouze na základě mikroskopických znaků, zatímco jiné mají odlišné klinické a prognostické charakteristiky.

1.3.2.1.1 Folikulární varianta

Folikulární varianta (FV) je běžnou variantou, představuje 15–20 % všech PTC (Carcangiu et al. 1985; Lam et al. 2005). Vyznačuje se převládajícím folikulárním růstem bez papil (obr. 5), ale s typickými jadernými znaky PTC a s podobným biologickým chováním. S folikulárními tumory (FTA a FTC) sdílí některé genetické změny, proto se nabízí otázka, zda některé případy nejsou přechodnými typy mezi PTC a FTC.



Obr. 5 Folikulární varianta PTC (Kini 2008)

Rozlišují se tři subtypy. Opouzdřená folikulární varianta je charakterizována úplným opouzdřením, většinou neinvazivním růstem a příznivou prognózou. Oproti tomu vzácná difúzní (multinodulární) folikulární varianta je agresivním nádorem objevujícím se především u mladých žen. Je většinou neopouzdřená, projevuje se infiltrativním růstem a invazí do cév, extrathyroidálním šířením, vzdálenými metastázami a metastázami v lymfatických uzlinách (Ivanova et al. 2002). Nejvzácnější je makrofolikulární varianta s obrovskými tumorovými folikuly.

1.3.2.1.2 Papilární mikrokarcinom

WHO definuje papilární mikrokarcinom jako karcinom menší než 1 cm, který je náhodně nalezen např. po operaci klinicky benigního onemocnění (DeLellis et al. 2004). Mikrokarcinomy jsou běžné a reprezentují nejrychleji rostoucí skupinu PTC. Při pitvě je nalezen mikrokarcinom asi u 7 % zemřelých bez diagnostikovaného onemocnění štítné žlázy (Bondeson and Ljungberg 1984). Většina mikrokarcinomů je menších než 0,3 cm a jejich frekvence neroste s věkem, tzn., že mnohé z nich reprezentují neprogresivní, klinicky tichá onemocnění. Jsou obvykle papilárního nebo folikulárního růstu, popř. smíšeného typu (Roti et al. 2008). Ovšem i tyto nádory mohou metastazovat (Strate et al. 1984), proto je jejich léčba stále kontroverzní. U tumorů detekovaných předoperačně se většinou doporučuje standardní léčba (totální thyroidektomie s následnou terapií radiojodem), a to bez ohledu na jejich velikost. U náhodně nalezených tumorů bez horších charakteristik se volí obvykle mírnější přístup, tzn. méně radikální chirurgický výkon bez následné terapie radiojodem.

1.3.2.1.3 Varianta z vysokých buněk

Varianta z vysokých buněk (tall cell variant) představuje 4–10 % PTC (Lam et al. 2005). Vyznačuje se agresivnějším fenotypem se sklonem k dediferenciaci, extrathyroidálním šířením, vzdálenými metastázami, častější recidivou onemocnění a vyšší mortalitou (Johnson et al. 1988; Moreno Egea et al. 1993). Vyskytuje se spíše u starších lidí (Moreno Egea et al. 1993).

1.3.2.1.4 Další varianty PTC

Další vzácné varianty jsou onkocytární varianta, onkocytární varianta s lymfoidním stromatem (Warthin-like varianta), varianta z jasných buněk, kribriformní varianta, PTC se stromatem podobným nodulární fasciitidě, PTC s fokální inzulinární komponentou, PTC s dlaždicobuněčným a mukoepidermoidním karcinomem a PTC

s vřetenobuněčným a obrovskobuněčným karcinomem. K variantám s agresivnějším chováním patří varianta z cylindrických buněk, solidní a difúzně sklerozující varianta.

1.3.3 Léčba PTC

Přestože se stále vedou spory o radikalitě chirurgického zákroku, v současné době je preferován radikální výkon – totální thyreoidektomie (TTE), tzn. úplné odstranění štítné žlázy. Důvodem je nižší výskyt recidiv, možnost následné léčby radiojodem a monitorování pomocí hladin tyreoglobulinu (Esnaola et al. 2001). Argumentem zastánců méně radikálních výkonů (jako je hemithyreoidektomie) jsou komplikace častěji spojené s TTE – trvalá hypoparathyreóza a pooperační paréza zvratných nervů (Hundahl et al. 2000). Ovšem u zkušených specializovaných chirurgů je incidence pooperačních komplikací minimální (Lamade et al. 1999). V případě podezření na metastázy v lymfatických uzlinách se provádí selektivní disekce uzlin (White et al. 2007).

Poté je pacient uveden do hluboké hypothyreózy, kdy dochází k vzestupu TSH, a tím se vytvoří podmínky pro následnou terapii radiojodem. Toho se docílí 6–8týdenním odstupem od operace bez hormonální substituce nebo podáním rekombinantního lidského TSH (rhTSH) těsně před léčbou, což je pacienty mnohem lépe snášený, ale zato velmi nákladný postup. Následuje terapie radiojodem ^{131}I , smíšeného β - a γ -zářiče s poločasem rozpadu 8 dnů. Cílem je eliminovat zbytky tkáně a případné metastázy, což ulehčuje následné sledování nemoci pomocí tyreoglobulinu. Radiojod ^{131}I se podává perorálně s aktivitou 3,7 GBq, v případě lokálních či vzdálených metastáz jsou aktivity vyšší (4,4–7,4 GBq) (Límanová 2006). Jednou z komplikací této terapie je mírné riziko vzniku sekundárních nádorů (Brown et al. 2008). Za několik dní se provádí celotělová scintigrafie. Aktinoterapie je použita u pacientů s rozsáhlým extrathyroidálním rozšířením a u tumorů, které nemohou být chirurgicky odstraněny.

Následuje trvalá suplementace pacienta tyroxinem, jejíž úlohou je potlačit sekreci TSH a nahradit funkci odstraněné štítné žlázy. Cílem je dosažení hodnot TSH pod dolní hranici normy (kolem 0,03 mIU/l). Karcinomy štítné žlázy recidivují i po 30 letech, proto je nezbytné doživotní sledování pacienta (Tubiana et al. 1985). Dispenzarizace zahrnuje především pravidelné ultrasonografické vyšetření a sledování hladiny tyreoglobulinu v krvi. Zvýšení hladiny tyreoglobulinu slouží jako senzitivní

marker recidivy onemocnění. Jednou za 5–10 let se provádí celotělová scintigrafie radiojodem, popř. kontrolní izotopové vyšetření pomocí ^{99m}Tc značeného MIBI (methoxyisobutyl-isonitřil). Při zvýšené hladině tyreoglobulinu nebo při pozitivní scintigrafii je indikována terapie radiojodem.

1.3.4 Prognóza PTC

Pro určení prognózy onemocnění se používá několik systémů klasifikace. Nejrozšířenější je TNM systém doporučený American Joint Commission on Cancer (AJCC) a International Union Against Cancer (Union Internationale Contre le Cancer [UICC]). Tato klasifikace zahrnuje věk pacienta, velikost tumoru, extrathyroidální rozšíření, vzdálené metastázy a metastázy v lymfatických uzlinách (tab. 2).

Tabulka 2 Stadia PTC dle TNM klasifikace (Patel and Shah 2005)

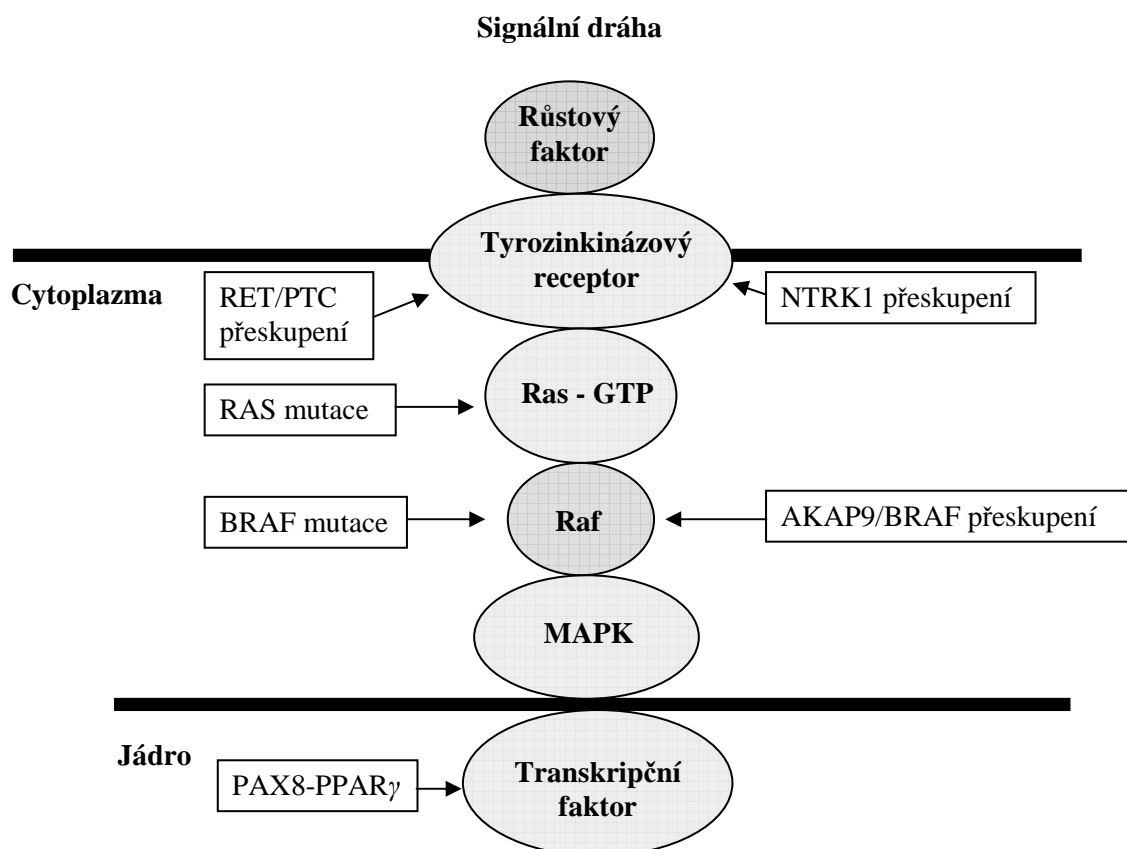
Věk	Stadium	T	N	M
<45 let	Stadium I	jakékoliv T	jakékoliv N	M0
	Stadium II	jakékoliv T	jakékoliv N	M1
≥45 let a starší	Stadium I	T1	N0	M0
	Stadium II	T2	N0	M0
	Stadium III	T3	N0	M0
		T1, T2, T3	N1	M0
	Stadium IVA	T1, T2, T3	N1b	M0
	Stadium IVB	T4b	jakékoliv N	M0
	Stadium IVC	jakékoliv T	jakékoliv N	M1

Prognóza PTC je vcelku příznivá, ale záleží na pokročilosti onemocnění. Zatímco u tumorů v I. stadiu TNM klasifikace 99,8 % pacientů přežívá déle než 10 let, u IV. stadia je to jen 40 % pacientů (Kosary et al. 2007). K recidivě onemocnění dochází u 15–35 % pacientů buď v lůžku štítné žlázy, lymfatických uzlinách nebo ve formě vzdálených metastáz (Mazzaferri and Kloos 2001).

Nezávislými rizikovými faktory ovlivňujícími mortalitu způsobenou karcinomem jsou vyšší věk v době diagnózy, velikost tumoru, extrathyroidální šíření a vzdálené metastázy, především v kostech (Salvesen et al. 1992; Shaha et al. 1996; Mazzaferri and Kloos 2001). Dalším rizikovým faktorem je mužské pohlaví, metastázy v lymfatických uzlinách, multifokalita tumoru, angioinvasze a varianta z cylindrických buněk, z vysokých buněk, solidní a difúzně sklerozující varianta (Mazzaferri and Jhiang 1994; Shaha et al. 1996; Akslen and LiVolsi 2000).

1.3.5 Genetika PTC

Patogeneze PTC zahrnuje poruchu některé ze signálních drah, z nichž zásadní postavení má mitogeny aktivovaná proteinkinázová (MAPK) dráha, která reguluje růst, diferenciaci, apoptózu a přežívání buněk. Aktivace této signální dráhy je způsobena bodovými mutacemi v onkogenech *BRAF* a *RAS*, nebo chromosomálním přeskupením *RET* a *NTRK* onkogenů (obr. 6). Tyto mutace se jen vzácně objevují současně u stejného tumoru a jedna z nich se vyskytuje u více než 70 % PTC (Fagin 2005; Kondo et al. 2006; Riesco-Eizaguirre and Santisteban 2007). Přestože mají všechny zmíněné mutace schopnost aktivovat stejnou signální dráhu, jejich fenotypový projev se liší.



Obr. 6 Genetické změny u PTC a jejich umístění v signalizační dráze

1.3.5.1 *RET/PTC* přeskupení

RET proto-onkogen (*RET* – REarranged during Transfection) kóduje transmembránový tyrozinkinázový receptor. Hraje důležitou roli v proliferaci, diferenciaci a přežívání buněk odvozených od neurální lišty. Je důležitý pro vývoj sympatického, parasympatického a enterického nervového systému, ledvin a spermatogenezi (Arighi et al. 2005; de Groot et al. 2006).

Ve folikulárních buňkách není za normálních okolností exprimován. Je lokalizován na 10. chromozómu (10q11.2) a obsahuje 21 exonů, které kódují extracelulární, transmembránovou a tyrozinkinázovou doménu *RET* proteinu (Hansford and Mulligan 2000).

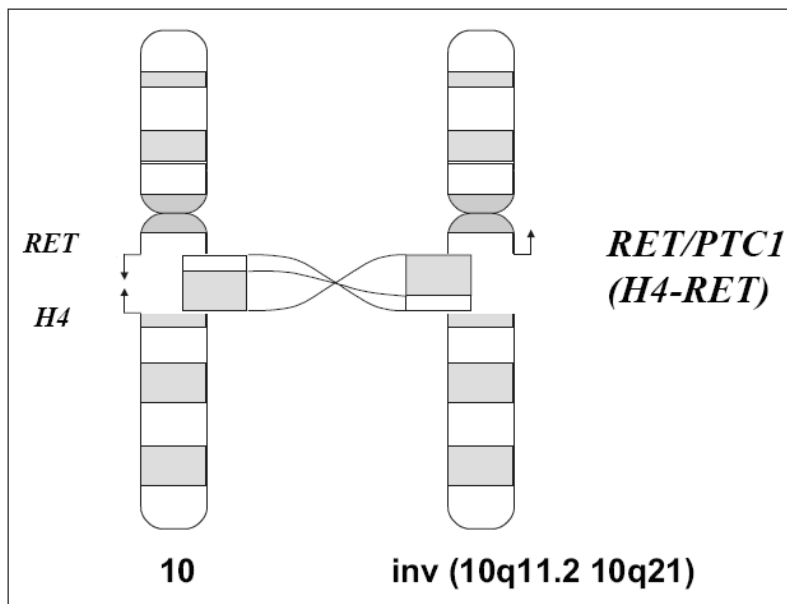
Extracelulární doména (11 exonů) zahrnuje čtyři kadherinu podobné oblasti vázající vápník, které indukují a stabilizují konformační změny nezbytné k navázání ligandů a koreceptorů, a oblast bohatou na cystein, která je zodpovědná za terciální strukturu a dimerizaci proteinu. Transmembránová doména je kódována jediným 12. exonem. Intracelulární tyrozinkinázová doména (13.–21. exon) katalyzuje autofosforylaci tyrozinových zbytků, které poté interagují s dalšími signálními molekulami. Za normálních podmínek je *RET* receptor aktivován pomocí multimolekulárního komplexu. Nejprve ligand z rodiny GDNF (GDNF – glial cell line-derived neurotrophic factor, artemin, persephin a neurturin) interaguje se specifickým koreceptorem z rodiny $GFR\alpha$ 1–4 ($GFR\alpha$ – GDNF family receptor alfa), který je v membráně ukotven prostřednictvím glykosylfosfatidylinositolové vazby. Po navázání komplexu na *RET* receptor dochází k dimerizaci a aktivaci *RET* proteinu (Hansford and Mulligan 2000). Na *RET* protein se váže mnoho signálních a adaptorových proteinů – Shc, ShcC, Grb2 a Grb7/10, PLC γ , Enigma, IRS1/2, FRS2, DOK1/4/5/6, c-Src, SH2-B β , PKC α , Shank3 a STAT3. Vazba proteinů vede k aktivaci signálních drah RAS/RAF/ERK, PI3K/AKT, JNK, p38, ERK5, PLC γ a β -catenin (Arighi et al. 2005; Asai et al. 2006; Murakumo et al. 2006; Gujral et al. 2008; Cassinelli et al. 2009). Stimulace signálních drah je tkáňově specifická (Asai et al. 2006).

Mutace *RET* proto-onkogenu se vyskytují u několika onemocnění. Ztráta funkce genu je typická pro Hirschsprungovu chorobu, onemocnění charakteristické vrozenou absencí parasympatické inervace v intestinálním traktu (Asai et al. 2006). Naopak

nepatřičná aktivace proteinu v důsledku aktivujících bodových mutací *RET* genu je typická pro MTC (de Groot et al. 2006). U PTC je *RET* proto-onkogen aktivován pomocí tzv. *RET/PTC* přeskupení (rearrangements), které vzniká fúzí 3' konce intracelulární tyrozinkinázové domény *RET* genu a 5' konce jiného konstitutivně exprimovaného genu poskytujícího promotor a dimerizační funkci. Tím vzniká stále aktivní chimérická forma receptoru, která je ale lokalizována v cytoplazmě, neboť postrádá transmembránovou doménu.

V současné době je známo 13 různých forem *RET/PTC* vznikajících paracentrickou inverzí nebo balancovanou translokací (tab. 3) (Nikiforov et al. 2009), z nichž nejčastější jsou *RET/PTC1* a *RET/PTC3*. Ke zlomu vždy dochází v 11. intronu *RET* genu, ale konkrétní místa zlomu se liší.

RET/PTC1 vzniká paracentrickou inverzí na dlouhém raménku 10. chromozómu, inv(10) (q11.2 q21) (obr. 7). Dochází k fúzi s genem *CCDC6* (coiled-coil domain containing gene 6, dříve označovaný *H4/D10S170*). Tento typ je nejčastějším *RET/PTC* přeskupením (až 20 % PTC) (Pierotti et al. 1992). Je typický především pro spontánní PTC (tzn. bez vlivu ionizujícího záření) a mikrokarcinomy PTC s klasickou variantou. Byl detekován i v oblasti Černobyly, kde se vyskytoval po delší latentní době (více než deset let po ozáření) a u starších pacientů (Nikiforov et al. 1997; Smida et al. 1999).



Obr. 7 Schéma paracentrické inverze vedoucí ke vzniku fúzní formy *RET/PTC1* (Kreze et al. 2004)

RET/PTC3 vzniká paracentrickou inverzí a fúzí *RET* proto-onkogenu s genem *NcoA4* (nuclear receptor co-activator gene 4, dříve označovaný *RET* fused gene (*RFG*)/*ELE1*/androgen receptor activator 70 (*ARA70*), který patří do „zink-finger“ rodiny označované rfp (Santoro et al. 1994; Klugbauer et al. 1998). *ELE1* kóduje transkripční koaktivátor androgenního receptoru (Yeh and Chang 1996). Byly nalezeny další dvě varianty *RET/PTC3*, u kterých byla část patřící k *ELE1* genu kratší o 144 bp (*RET/PTC3r2*) (Klugbauer et al. 1996) nebo o 18bp (*RET/PTC3r3*) (Klugbauer et al. 1998).

Důvod výskytu *RET/PTC* právě ve folikulárních buňkách není přesně znám. Pravděpodobně je to zapříčiněno uspořádáním chromatinu v thyroideálních buňkách, které je tkáňově specifické a ve folikulárních buňkách způsobí, že geny, které jsou od sebe lineárně vzdálené, si jsou prostorově blízké (Nikiforova et al. 2000; Gandhi et al. 2006).

Vznik *RET/PTC* fúzních forem je spojován s ionizačním zářením. Bylo zjištěno, že X-paprsky přímo indukují vznik *RET/PTC1* (Ito et al. 1993; Mizuno et al. 2000; Mizuno et al. 1997). Dále bylo *RET/PTC* velmi časté u pacientů s historií externího ozáření (Bounacer et al. 1997; Alipov et al. 1999; Collins et al. 2002) a u *PTC* vzniklých v důsledku černobylské havárie (Fugazzola et al. 1995; Nikiforov et al. 1997; Thomas et al. 1999; Rabes et al. 2000; Williams 2002). *RET/PTC3* bylo nalezeno hlavně u *PTC* s krátkou latencí a solidní variantou, zatímco *RET/PTC1* bylo častější u *PTC* s dlouhou latentní dobou (Fugazzola et al. 1995; Nikiforov et al. 1997; Thomas et al. 1999; Rabes et al. 2000; Nikiforov 2002; Williams 2002). Rychlá proliferace thyroideálních buněk u dětí může vysvětlovat obzvláště vysokou senzitivitu ke vzniku radiačně indukovaných *RET/PTC* (Saad et al. 2006). Ovšem i obecně se *RET/PTC* vyskytují častěji u dětí než dospělých (Bongarzone et al. 1996; Powell et al. 2005).

V současné době se uvažuje o dvou mechanismech, kterým ionizující záření indukuje onkogenní mutace. Při ionizujícím záření dochází k poškození chromatinové struktury projevující se jedno- nebo dvouřetězcovými zlomy v DNA nebo poškozením bází. Zlomy mohou být pro buňku letální, nebo mohou být opraveny některým z enzymatických reparačních mechanismů, např. ligací konců přerušovaných řetězců. Nesprávné spojení může vést k chromozomální translokaci nebo inverzi. Uvedený mechanismus ovšem nevysvětluje dlouhé období mezi ozářením a vývojem *PTC*. Proto se uvažuje o druhém způsobu, kdy radiace přímo nezpůsobí vznik fúzního genu, ale

může zapříčinit trvalou genomickou instabilitu, která vede k následným mutacím a tím k tumorové progresi.

V *RET* genu je popisováno několik polymorfismů (SNP – single nucleotide polymorphism) a jejich asociací s vývojem PTC (Lesueur et al. 2002; Ho et al. 2005; Stephens et al. 2005), především polymorfismů A45A, L769L (Lesueur et al. 2002), A432A (Ho et al. 2005), G691S a S904S (Stephens et al. 2005).

Tabulka 3 Přehled *RET/PTC* přeskupení u PTC

Fúzní forma	Fúzní partner	Alterace
<i>RET/PTC1</i>	<i>H4(CCDC6, D10S170)</i>	inv(10)(q11.2;q21)
<i>RET/PTC2</i>	<i>PRKARIA</i>	t(10;17)(q11.2;q23)
<i>RET/PTC3</i>	<i>NCOA4 (RFG, ELE1)</i>	inv(10)(q11.2;q10)
<i>RET/PTC4</i>	<i>NCOA4 (RFG, ELE1)</i>	inv(10)(q11.2;q10)
<i>RET/PTC5</i>	<i>GOLGA5 (RFG5)</i>	t(10;14)(q11.2;q32)
<i>RET/PTC6</i>	<i>HTIF1 (TRIM24)</i>	t(7;10)(q32;q11.2)
<i>RET/PTC7</i>	<i>TIF1G (RFG7, TRIM33)</i>	t(1;10)(p13;q11.2)
<i>RET/PTC8</i>	<i>KTN1</i>	t(10;14)(q11.2;q22.1)
<i>RET/PTC9</i>	<i>RFG9</i>	t(10;18)(q11.2;q21)
<i>ELKS/RET</i>	<i>ELKS (RAB6IP2)</i>	t(10;12)(q11.2;p13.3)
<i>PCM-1/RET</i>	<i>PCM1</i>	t(8;10)(p21;q11.2)
<i>RFP-RET</i>	<i>RFP (TRIM27)</i>	t(6;10)(p21;q11.2)
<i>HOOK3-RET</i>	<i>HOOK3</i>	t(8;10)(p11.21;q11.2)

1.3.5.2 Mutace genu *BRAF*

Bodová mutace v *BRAF* genu byla poprvé nalezena v tkáni maligního melanomu (80 %) (Pollock and Meltzer 2002) a v menší míře také u karcinomu tlustého střeva, vaječníku, plic, prsu, jater, některých sarkomech (Davies et al. 2002), pigmentových névách (Pollock et al. 2003), tumorech hlavy a krku (Cohen et al. 2003) a karcinomu žaludku (Lee et al. 2003). V roce 2003 byla nalezena bodová mutace také u PTC (Cohen et al. 2003).

Mutace způsobuje aktivaci *BRAF* onkogenu (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) lokalizovaném na 7q24, který patří mezi RAF proteiny. Tyto proteiny jsou velmi konzervované cytoplazmatické serin/threoninové proteinkinázy, které mají důležitou roli v buněčné proliferaci, diferenciaci a programované buněčné smrti (Peyssonnaud and Eychene 2001). Jsou součástí RET-RAS-RAF-MAPK signalizační dráhy (obr. 6).

Mezi RAF proteiny patří tři izoformy: A-Raf, B-Raf a C-Raf (neboli Raf1), lišící se různou expresí v tkáních. Všechny izoformy jsou schopny aktivovat fosforylaci MEK (MAPK kináza 1, mitogen-activated protein kinase kinase 1), která dále aktivuje ERK (MAPK1, mitogen-activated protein kinase 1). Pro aktivaci B-Raf je potřeba pouze Ras protein, C-Raf a A-Raf kromě aktivace Ras proteinem potřebují ještě src-protein tyrosinkinázy (Emuss et al. 2005). B-Raf je hlavní izoforma ve folikulárních buňkách štítné žlázy a je ve fosforylaci MAPK dráhy účinnější než ostatní izoformy (Peyssonnaud and Eychene 2001).

B-RAF je složen ze tří homologních oblastí – CR1, CR2 a CR3. CR1 obsahuje Ras vázající doménu (RBD – RAS binding domain), která váže aktivovaný Ras-GTP, a doménu bohatou na cystein (CRD), která stabilizuje interakci s Ras (Leicht et al. 2007). CR2 je N-terminální regulační doménou obsahující regulační vázebné místo pro kofaktor 14-3-3 (Leicht et al. 2007). CR2 působí autoinhibičně na CR3 a pomáhá udržet B-Raf protein v inaktivním stavu při absenci extracelulárních stimulů (McKay and Morrison 2007). CR3 je C-terminální katalytická doména.

Za normálních podmínek se na B-Raf protein vážou dimery 14-3-3 a udržují ho v inaktivní formě v cytosolu. Zbytky G596-V600 v aktivační doméně B-Raf proteinu tvoří hydrofobní interakci se zbytky G464-V471 v ATP-vazebném místě (P smyčce). Před aktivací je protein fosforylován a dostává se k plasmatické membráně, kde protein-

fosfatázy PP1 a PP2A defosforylují vazebné místo pro 14-3-3 protein. Aktivovaný Ras protein se váže na RBD doménu a fosforyluje B-Raf protein, který dále fosforyluje a aktivuje MAPK (mitogen-associated protein kinase) signalizační dráhu (McKay and Morrison 2007).

Nejčastější mutace *BRAF* genu je výsledkem substituce T→A na pozici 1799 v 15. exonu. Tím dochází k záměně valinu za glutamát na pozici 600 (V600E), dříve označované V599E. Tato mutace, která se nachází v aktivační doméně, destabilizuje inaktivní formu zrušením hydrofobních interakcí mezi aktivační smyčkou a ATP vazebným místem. Vzniknou nové interakce, které vytvoří katalyticky kompetentní strukturu (Wan et al. 2004). Tím dojde ke zvýšení aktivity BRAF, která je nezávislá na RAS stimulaci, což vede k trvalé aktivaci MAPK kinázové dráhy.

V *BRAF* genu bylo nalezeno několik dalších vzácných mutací. U 9 % folikulární varianty PTC byla objevena mutace A→G na pozici 1802 vedoucí k substituci lysinu za glutamát v kodónu 601 (K601E) (Trovisco et al. 2004). Tato mutace má 2,5krát nižší kinázovou aktivitu než V600E (Wan et al. 2004). U jednoho pacienta s folikulární variantou byla detekována mutace G474R (Castro et al. 2006a). Další vzácné mutace jsou delece VK600-1E v solidní variantě PTC (Trovisco et al. 2005b), inserce V599Ins (Carta et al. 2006) a V600D+FGLAT601-605ins, vznikající insercí 18 nukleotidů na pozici T1799 (Hou et al. 2007). Byly nalezeny také dvě tiché mutace, substituce G→A (G1365A) v 11. exonu a G→A v 11. intronu (Frattini et al. 2004). Zvláštní alterací je přeskupení vznikající paracentrickou inverzí dlouhého raménka 7. chromozómu, inv(7)(q21–22q34), a fúzí N-konce *AKAP9* genu (A-kinase anchor protein 9) s C-terminální katalytickou doménou (9.–18. exon) *BRAF* genu (Ciampi et al. 2005), čímž *BRAF* ztrácí regulační domény CR1 a CR2. Vzniká fúzní protein AKAP9-BRAF, který má kinázovou aktivitu nezávislou na RAS stimulaci a je schopen aktivovat MAPK signální dráhu. Toto přeskupení bylo detekováno u dětí z oblasti Černobyli po krátké latentní době (Ciampi et al. 2005).

Mutace V600E *BRAF* genu je nejčastější detekovanou mutací u PTC (29–83 %) (Cohen et al. 2003; Kimura et al. 2003; Namba et al. 2003; Nikiforova et al. 2003a; Xu et al. 2003; Kim et al. 2004). Byla nalezena také u anaplastických karcinomů pravděpodobně vzniklých dediferenciací PTC, ale nebyla nalezena u benigních onemocnění, FTC ani MTC, (Cohen et al. 2003; Fukushima et al. 2003; Kimura et al. 2003; Namba et al. 2003; Nikiforova et al. 2003a; Soares et al. 2003; Xu et al. 2003;

Fugazzola et al. 2004; Salvatore et al. 2004; Xing et al. 2004). Pouze jedna studie udává vysoký výskyt mutace v *BRAF* genu u MTC (40,9 %) (Goutas et al. 2008).

Vliv této mutace na fenotyp není ještě zcela objasněn. Některé studie uvádějí asociaci mutace *BRAF* s klinicko-patologickými parametry (Soares et al. 1998; Kimura et al. 2003; Namba et al. 2003; Nikiforova et al. 2003a; Xu et al. 2003; Fugazzola et al. 2004; Lima et al. 2004; Salvatore et al. 2004; Trovisco et al. 2004; Trovisco et al. 2005a; Xing et al. 2005; Jo et al. 2006; Kim et al. 2006; Riesco-Eizaguirre et al. 2006; Kebebew et al. 2007; Lupi et al. 2007; Oler and Cerutti 2009), především s větší agresivitou nádoru a horší prognózou onemocnění (Namba et al. 2003; Xing et al. 2005; Kim et al. 2006; Riesco-Eizaguirre et al. 2006; Kebebew et al. 2007; Lupi et al. 2007), ovšem některé studie toto nepotvrdily (Liu et al. 2005; Ito et al. 2009).

1.3.5.3 Mutace genů *RAS*

Dalšími geny uplatňujícími se v patogenezi PTC jsou *RAS* proto-onkogeny (5-20 % PTC). Jedná se o tři geny – *HRAS* (11p11), *KRAS* (12p12) a *NRAS* (1p13). Tyto geny jsou zahrnuty v tumorogenezi 30 % všech lidských nádorů (Bos 1989).

RAS geny kódují malé 21-kDa proteiny se vyskytují ve dvou formách: inaktivní forma, která váže guanosin difosfát (GDP) a aktivní forma s vázaným guanosin trifosfátem (GTP). Zprostředkovávají signál z tyrosinkinázových membránových receptorů na MAPK kinázovou signální dráhu, která indukuje transkripci genů zahrnutých v buněčné proliferaci, přežívání a apoptóze (Barbacid 1987).

RAS onkogen je aktivován bodovými mutacemi v GTP vazebné doméně (12. a 13. kodón), kde mutace způsobí zvýšenou afinitu ke GTP, nebo v GTPázové doméně (59. a 61. kodón), kde mutace způsobí inaktivaci GTPázové funkce (Namba et al. 1990a). Oba typy mutací způsobí stabilizaci aktivní formy proteinu a trvalou stimulaci následné signální dráhy (Finney and Bishop 1993).

Mutace genů *RAS* se vyskytují především u tumorů s folikulárním růstem (folikulární karcinom a folikulární varianta PTC) (Zhu et al. 2003). U klasického PTC jsou méně časté, jejich frekvence se ve studiích liší (0–16 %) (Lazzereschi et al. 1997; Sugg et al. 1999; Nikiforova et al. 2003b; Vasko et al. 2003). *RAS* mutace jsou častější v oblastech s jodovým deficitem (Shi et al. 1991). U karcinomů indukovaných ozářením jsou vzácné (Suchy et al. 1998).

1.3.5.4 Další geny účastníci se onkogeneze PTC

1.3.5.4.1 *NTRK1* přeskupení

NTRK1 proto-onkogen (*NTRK1* – neurotrophin tyrosine kinase receptor 1) neboli *TrkA* kóduje receptor pro nervový růstový faktor (NGF) a za normálních okolností je exprimován v periferních nervových gangliích. Je lokalizován na dvou úsecích 1. chromozómu (1q22–24 a 1q32–41). *NTRK1* se vyskytuje asi u 10 % PTC.

TRK onkogeny vznikají inverzí na 1. chromozómu a fúzí 3' konce tyrozinkinázové domény *NTRK1* genu s 5' koncem jiného genu. Na rozdíl od *RET/PTC* přeskupení je zachována transmembránová doména a fúzní protein zůstává v membráně. Jsou známy čtyři formy. *Trk* onkogen vzniká fúzí *NTRK1* genu s genem pro nesvalový tropomyosin *TPM3*, který je lokalizován v oblasti 1q31. *Trk* forma je nejčastější typ *NTRK1* přeskupení (Pierotti et al. 1996). Dalšími formami jsou *Trk-T1* a *Trk-T2* onkogeny lišící se pouze svou velikostí. Vznikají fúzí *NTRK1* proto-onkogenu a *TPR* genu (*TRP* – Translocated Promotor Region) kódující protein, který je součástí cytoskeletu (Greco et al. 1992; Greco et al. 1997). Čtvrtou formou je *Trk-T3* vznikající translokací s *TFG* genem (*TFG* – *Trk*-fused gene), neboli *TAG* (*TAG* – *Trk*-activating gene), který kóduje neznámý cytoplazmatický protein lokalizovaný na 3. chromozómu (Greco et al. 1995).

1.3.5.4.2 *PAX8-PPAR γ* přeskupení

Gen *PAX8* (paired box gene 8) kóduje transkripční faktor, který je nezbytný pro formování folikulárních buněk štítné žlázy (Mansouri et al. 1999). Kromě toho aktivuje expresi dalších genů specifických pro štítnou žlázu (Pasca di Magliano et al. 2000). Gen *PPAR γ* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) patří k jaderným hormonálním receptorům, které vytváří heterodimery s RAR nukleárními receptory pro retinovou kyselinu. Je zahrnut v diferenciaci adipocytů a inzulínovém metabolismu (Desvergne and Wahli 1999). Fúzní gen vzniká spojením 7., 8., nebo 9. exonu *PAX8* genu s 1. exonem genu *PPARG1*, t(2;3)(q13;p25) (Kroll et al. 2000). Přesný mechanismus působení tohoto přeskupení není znám, ale předpokládá se, že chimérický protein *PAX8-PPAR γ* působí jako dominantní inaktivátor transkripční aktivity normálního *PPAR γ* , který je pravděpodobně tumor supresorem (Kroll et al. 2000).

PAX8-PPAR γ přeskupení je časté u FTC a předpokládalo se, že by mohlo představovat specifický marker pro diagnózu FTC (Kroll et al. 2000), ovšem později byla tato změna opakovaně nalezena také u FTA (Cheung et al. 2003; Nikiforova et al. 2002; Marques et al. 2002). U PTC je spojen s folikulární variantou (37,5 %) (Castro et al. 2006a). Tato alterace nebyla nalezena u špatně diferencovaného karcinomu a anaplastického karcinomu. Byla popsána asociace tohoto přeskupení s vaskulární invazí u FTC (Nikiforova et al. 2002).

2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem disertační práce bylo:

1. Sběr vzorků zamražených nádorových tkání, vzorků biopsií tenkou jehlou a vzorků parafinových bločků odoperovaných pacientů s nádory štítné žlázy. Tvorba databáze klinicko-patologických dat.
2. Detekce hlavních genetických alterací u PTC: mutace genu *BRAF* a *RET/PTC* přeskupení.
3. Studium vztahu mezi genetickými změnami a jejich fenotypickými projevy, hledání prognostických ukazatelů.
4. Studium role polymorfismů *RET* proto-onkogenu jako modifikujících faktorů v patogenezi PTC.
5. Detekce mutací v *RAS* genech u folikulární varianty PTC, FTC a folikulárních adenomů (FTA) štítné žlázy u českých pacientů.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 STUDOVANÉ SOUBORY

3.1.1 Soubor pacientů s nádory štítné žlázy

Zpracovávaný soubor tvořily tři typy vzorků – zamražené odoperované čerstvé tkáně, aspirační biopsie tenkou jehlou a parafinové bločky získané od odoperovaných pacientů.

Vzorky čerstvých tkání byly odebírány v rámci chirurgické léčby pacientů s nádory štítné žlázy na Klinice ORL a chirurgie hlavy a krku 1.LF UK a FN Motol (Prof. J. Betka, CSc; Doc. MUDr. J. Astl, CSc.) a Chirurgické klinice 2.LF UK (Prof. MUDr. J. Hoch, CSc; As. MUDr. S. Smutný). Vzorky byly shromažďovány a histologicky vyhodnoceny v Ústavu patologie a molekulární medicíny (Prof. MUDr. R. Kodet, CSc.; Prim. MUDr. D. Kodetová, CSc. aj.). V roce 2008 byla navázána nová spolupráce a vzorky začaly být odebírány také na Oddělení ORL Nemocnice Na Homolce (MUDr. J. Lukáš).

Dále byly retrospektivně vyhledány parafinové bločky (Doc. MUDr. J. Dušková, CSc. – Ústav patologie 1.LF UK; Doc. MUDr. A. Ryška, CSc. – Fingerlandův ústav patologie, Hradec Králové; MUDr. Alice Hlobilková, Ph.D. – Laboratoř molekulární patologie LF, UP Olomouc).

Ze vzorků byly nařezány tenké řezy a ověřena přítomnost nádorových buněk. K izolaci DNA a RNA byly použity tkáně obsahující více než 70 % nádorových buněk.

Ve spolupráci s MUDr. Z. Novákem, CSc. a s MUDr. J. Vrbíkovou, PhD. z Endokrinologického ústavu byly v rámci diagnostiky odebrány a cytologicky ověřeny vzorky aspiračních biopsií tenkou jehlou.

Během disertační práce se podařilo nashromáždit celkem 392 nových tkání (362 čerstvých tkání, 22 parafinových bloček a 8 biopsií), z toho bylo 229 tkání papilárního karcinomu (216 čerstvých tkání, 12 parafinových bloček a 1 biopsie).

Tkáně štítné žlázy se na Oddělení molekulární endokrinologie sbírají již od roku 2003 a v současné době disponujeme nebývale velkým souborem tkání od 870 pacientů s onemocněním štítné žlázy (660 čerstvých tkání, 148 parafinových bločků, 62 biopsií), z toho 457 PTC, 75 FTA, 48 MTC, 13 FTC, 6 ATC a 271 ostatních onemocnění štítné žlázy. Pacienti před chirurgickou léčbou podepsali informovaný souhlas s genetickou analýzou pro vědecké účely. Studie byla schválena Etickou komisí Endokrinologického ústavu.

Od kliniků a patologů byla získávána, často i zpětně, podrobná klinicko-patologická data – pohlaví, věk, velikost tumoru, histologická varianta, invaze nádoru, přítomnost vzdálených metastáz a metastáz v lymfatických uzlinách, multifokalita nádoru, opouzdření, angioinvaze a recidiva onemocnění.

PTC vzorky byly rozděleny do následujících histologických kategorií: klasická papilární varianta, folikulární varianta, smíšená folikulárně-klasická varianta a skupina vzácných variant. PTC byl klasifikován jako klasická varianta, pokud převládala papilární struktura a byly přítomny typické jaderné znaky PTC. Do této kategorie byla pro podobné biologické vlastnosti zahrnuta i Warthin-like varianta, onkocytární varianta, cystická varianta a PTC s fokální dlaždicobuněčnou metaplasíí. Kritériem pro diagnózu folikulární varianty PTC byla folikulární struktura, která se vyskytovala nejméně v 80 % nádoru, a přítomnost typických jaderných znaků PTC. Do skupiny smíšené folikulárně-klasické varianty byly zahrnuty vzorky s typickými jadernými znaky PTC vykazující folikulární strukturu v méně než 80 % tumoru.

Podle klinických a histologických zpráv bylo na základě 6. edice UICC/AJCC TNM klasifikace (Patel and Shah 2005) určeno TNM stadium I.–IV. Pro lepší zhodnocení vlivu jednotlivých mutací na prognózu onemocnění byli pacienti rozděleni do dvou skupin – stadium I + II a stadium III+IV.

Klinicko-patologická data byla následně statisticky vyhodnocena a korelována s detekovanými mutacemi.

3.1.2 Kontrolní soubor

Za účelem porovnání frekvenčního zastoupení studovaných polymorfismů s jejich výskytem u zdravé české populace bylo třeba zkompletovat soubor kontrolních zdravých osob bez rodinné anamnézy onemocnění štítné žlázy. Využili jsme dobrovolníků, kteří k nám přicházejí na funkční testy a u nichž jsou k dispozici velmi podrobná anamnestická data. Všichni podepsali informovaný souhlas s genetickou studií. Kontrolní soubor tvořilo 172 osob (86 mužů a 86 žen), které byly především z Prahy a Středočeského kraje.

3.2 MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ ANALÝZA

Molekulárně genetická analýza byla během disertační práce provedena celkem u 234 PTC tkání, 8 špatně diferencovaných karcinomů, 3 anaplastických karcinomů, 23 MTC, 6 FTC a 1 FTA.

3.2.1 Izolace nukleových kyselin

3.2.1.1 Izolace DNA z parafinových bločků

DNA z parafinových bločků jsme izolovali pomocí kitu QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN). Nejprve bylo nařezáno 10 řezů o šířce 5 μm z každého bločku. K vzorku byl přidán 1 ml xylenu a vzorek byl centrifugován 5 min při plné rychlosti. Byl odstraněn supernatant a k peletě byl přidán 1 ml 96% ethanolu. Následovala 5min centrifugace při stejných podmínkách. Extrakce byla zopakována a vzorky byly vysušeny v termobloku při 37°C. Následovala resuspendace se 180 μl inkubačního pufru (1xPCR pufr bez MgCl_2 , Sigma, St. Louis, USA) a inkubace při 70 °C s 20 μl proteasy (protease Solvent, QIAamp DNA Blood Mini Kit) a 200 μl AL pufru (QIAamp DNA Blood Mini Kit) dokud tkáň nelyzovala. Třikrát denně jsme přidali nový alikvot proteasy. Poté jsme pomocí kitu izolovali DNA. Koncentrace a čistota DNA byly srovnatelné s DNA z čerstvých tkání. DNA byla použita pro PCR amplifikaci.

Izolace DNA ze zmražených tkání a bioptických vzorků byla provedena Trizolovou izolací dle firemního návodu (Invitrogene, Carlsbad, USA). Získaná DNA byla kvalitní a srovnatelná s izolovanou DNA z periferní krve.

3.2.1.2 Izolace DNA a RNA z čerstvých tkání a biopsií

Izolace RNA ze zmražených tkání a bioptických vzorků byla provedena Trizolovou izolací společně s izolací DNA dle firemního návodu (Invitrogene, Carlsbad, USA). Postup je pro naše účely velice výhodný – z jedné izolace můžeme získat v dobré kvalitě DNA i RNA.

Trizol je roztok fenolu a guanidín isothiokyanátu. Během homogenizace udržuje integritu RNA, lyzuje buňky a rozpouští buněčné komponenty. Přidáním chloroformu a centrifugací se směs rozdělí na dvě fáze – horní vodnou s RNA a spodní organickou fází obsahující proteiny. Mezi fázemi je vrstva sražené DNA. RNA se z vodné fáze získá vysrážením s isopropyl alkoholem. DNA se vysráží přidáním ethanolu.

Hlavním problémem při izolaci RNA jsou RNázy, proto byla pracovní plocha ošetřena roztokem RNase away (Invitrogene, Carlsbad, USA). Také veškerá manipulace s materiálem určeným pro izolaci RNA byla prováděna v laminárním boxu za dodržování maximální opatrnosti ochraňující RNA před degradací RNázami.

Vzorek z biopsie tenkou jehlou byl nejprve centrifugován 15 min při 12 000 RPM. Poté byl odstraněn supernatant a k vzorku byl přidán 1 ml Trizolu. 50–100 mg zamražené čerstvé tkáně bylo vloženo do 1 ml Trizolu a homogenizováno ve zkumavkách MagNA Lyser Green Beads (Roche) pomocí homogenizátoru MagNA Lyser (Roche) 3krát 30 s při 5 000 RPM. Následovala 5min inkubace při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 200 μ l chloroformu, řádně protřepáno a 3 min inkubováno při pokojové teplotě. Vzorek byl centrifugován 15 min při 12 000xg a 4 °C. Pipetou byla odebrána horní fáze obsahující RNA a bylo k ní přidáno 500 μ l isopropylalkoholu. Vzorek byl inkubován 1 h v –80 °C.

Do další zkumavky byla odebrána mezivrstva, ze které byla pomocí 300 μ l 96% ethanolu vysrážena DNA. Vzorek byl inkubován 3 min při pokojové teplotě. Následovala 5min centrifugace při 2 000xg a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a k peletě byl přidán 1 ml promývacího roztoku (0,1M sodium citrát v 10% ethanolu).

Následovalo 20min třepání a 5min centrifugace při 2 000xg a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a postup s promývacím roztokem byl zopakován. Poté byl k vzorku přidán 1 ml 75% ethanolu a vzorek byl centrifugován 5 min při 2 000xg a 4 °C. Dále byl vzorek vysušen při 45 °C a resuspendován v 100 µl sterilní H₂O. Poté byla DNA inkubována 1 h při 55 °C.

Po inkubaci horní fáze s RNA, byl vzorek centrifugován 10 min při 12 000xg a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a k vzorku byl přidán 1 ml 75% ethanolu. Následovala 5 min centrifugace při 7 500xg a 4 °C. Vzorek byl vysušen při pokojové teplotě a resuspendován v 40 µl sterilní H₂O.

3.2.1.3 Izolace DNA z periferní krve

Genomická DNA byla izolována z periferních leukocytů fenol-chloroformovou metodou, precipitována ethanolem a rozpuštěna v TE pufru. Později byl používán kit pro izolace DNA z krve (NucleoSpin Blood kit, Macherey-Nagel, Germany).

3.2.1.4 Měření koncentrace

Po izolaci a resuspendování nukleových kyselin byla změřena koncentrace (Gene Quant II, Pharmacia Biotech). Čistota vzorku a kontaminace proteiny byla změřena pomocí poměru absorbancí (DNA 260nm/proteiny 280nm). Výtěžek i čistota nukleových kyselin byly pro naši analýzu dostačující.

RNA byla použita pro reverzní transkripci. DNA byla naředěna na pracovní koncentraci 10ng/µl a použita pro PCR amplifikaci.

3.2.2 Reverzní transkripce

RNA byla reverzní transkripcí převedena na cDNA pomocí AMV reverzní transkriptázy (Promega). Nejdříve bylo k 8 μg RNA přidáno 4 μg random primerů a doplněno H_2O do celkového objemu 40 μl . Směs byla zahřáta na 70 $^\circ\text{C}$ po dobu 5 min a poté zchlazena na ledu. Ke směsi bylo přidáno 60 μl master mixu (20 μl 5x reakčního pufru, 10 mM dNTP, 160U RNasin Ribonuclease inhibitoru, 120U AMV reverzní transkriptázy). Reakční směs byla inkubována při 37 $^\circ\text{C}$ po dobu 60 min. cDNA byla uchovávána při -20 $^\circ\text{C}$ a používána k detekci exprese kontrolních genů a k detekci fúzních genů. Vždy byla zařazena do série reverzní transkripce voda jako negativní kontrola.

3.2.3 Detekce bodových změn

3.2.3.1 High Resolution Melting (HRM) analýza

Pro analýzu mutací v genech *RAS* jsme nejprve zaváděli HRM analýzu. Byly optimalizovány reakční podmínky pro 1. a 2. exon *RAS* genů (tab. 5). Poté byla provedena 11,5 μl reakce. Do 96-jamkové destičky byly naneseny vzorky DNA po 1,5 μl a přidáno 10 μl master mixu obsahujícího 0,78 μl sterilní H_2O , 0,92 μl 25mM MgCl_2 (pro koncentraci 2mM), 5,75 μl MasterMixu (Roche LC 480 HRM Master), 1,15 μl forward primeru, 1,15 μl reverse primeru a 0,25 μl wild-type DNA (pro lepší rozlišení minoritních homozygotních variant). Analýza byla provedena na přístroji Light Cycler 480 (Roche, USA), amplifikace probíhaly za následujících podmínek: počáteční denaturace při 95 $^\circ\text{C}$ 10 min, následovalo 5 cyklů (denaturace při 95 $^\circ\text{C}$ 10 s, annealing při 62 $^\circ\text{C}$ 15 s, elongace při 72 $^\circ\text{C}$ 25 s) a dále 45 cyklů amplifikace (denaturace při 95 $^\circ\text{C}$ 10 s, annealing při optimalizované teplotě 15 s, elongace při 72 $^\circ\text{C}$ 25 s), poslední syntetická fáze byla prodloužena na 5 min. Nakonec proběhla high resolution melting fáze – 95 $^\circ\text{C}$ 1 min, 40 $^\circ\text{C}$ 1 min a 65 $^\circ\text{C}$ 1 min. Při analýze byly použity negativní kontroly.

Výsledky však nebyly uspokojivé, proto jsme zavedli sekvenaci všech *RAS* genů. PCR produkty s výše zmíněnými páry primerů byly pro sekvenaci krátké, proto jsme použili některé nové primery pro získání delších produktů (tab. 6).

3.2.3.2 Sekvenace

Somatické mutace byly detekovány sekvenací v *BRAF* genu (15. exon) a ve třech genech *RAS* (1. a 2. exon *H-RAS*, *K-RAS* a *N-RAS* genu). Sekvenační postup byl identický pro zamražené tkáně a bioptické vzorky. Pouze u DNA izolované z parafinových bločků bylo potřeba postup modifikovat, protože kvalita DNA závisela na délce inkubace tkáně ve formolu, přidavku kyseliny pikrové a na stáří bločku. U některých vzorků se proto pro amplifikaci použila neředěná DNA a v několika případech se PCR produkt musel ještě reamplifikovat. Pro detekci mutace *BRAF* v některých parafinových bločcích s degradovanou DNA byl použit forward primer pro amplifikaci kratšího PCR produktu.

Genomická DNA byla amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), pro níž byly optimalizovány reakční podmínky. Jejich přehled spolu se sekvencemi primerů je uveden v tab. 6. Každá reakce byla provedena v objemu 15 μ l: 1x PCR Buffer II (10mM Tri-HCl pH 8,3, 50mM KCl), 160 μ M dNTP (deoxynucleotid trifosfát), 0,1 μ M primer (forward, reverse), 0,25 U polymerázy (AmpliTaq Gold polymeráza, Perkin Elmer, USA), 30 ng DNA a optimalizovaná koncentrace $MgCl_2$. Amplifikace probíhaly za následujících podmínek: počáteční denaturace při 95 °C 10 min a 95 °C 20 s, následovalo 5 cyklů (denaturace při 95 °C 20 s, annealing při 62,5 °C 30 s, elongace při 72 °C 1 min) a 35 cyklů (denaturace při 95 °C 20 s, annealing při optimalizované teplotě 30 s, elongace při 72 °C 1 min) a konečná elongace při 72 °C 10 min (termocykler Biometra, Germany). Čistota PCR produktů byla ověřena elektroforézou na 1.5% agarózovém gelu, obarveném ethidium bromidem a analyzovaném pod UV světlem (za podmínek: 85 V, 60 min, s použitím 0,5x Tris-borát-EDTA pufry). Při amplifikaci DNA byla vždy použita negativní kontrola.

PCR produkty byly před sekvenační reakcí přečištěny na Agencourt SPRIPlate magnetu pomocí purifikačního kitu Agencourt Ampure (Beckman Coulter, USA). Sekvenační reakce byla provedena s 4,4 μ l přečištěného PCR produktu, 1,6 μ l neznačeného forward či reverse primeru pro daný exon a 4 μ l DTCS (Dye Terminator Cycle Sequencing) Quick Start Master Mixu, který je součástí DTCS Quick Start Kitu (Beckman Coulter, USA). Následovala vlastní sekvenační reakce, která probíhala v termocykleru v počtu 30 cyklů (20 s 96 °C, 20 s 50 °C, 4 min 60 °C). Po sekvenační reakci byly PCR produkty znovu přečištěny na Agencourt SPRIPlate magnetu pomocí

purifikačního kitu Agencourt CleanSEQ (Beckman Coulter, USA) a rozpuštěny ve 40 µl Sample Loading Solution pufru. Vzorčky byly poté naneseny na destičku, překryty 1 kapkou minerálního oleje a vloženy do kapilárního sekvenátoru CEQ 8000 (Beckman Coulter, USA), kde byla provedena sekvenační analýza. Data byla vyhodnocena pomocí softwaru pro CEQ 8000.

3.2.3.3 Genotypizace polymorfismů

Pro genotypizaci pěti polymorfismů *RET* proto-onkogenu A432A, G691S, L769L, S836S a S904S (tab. 4) byly navrženy TaqMan sondy (Applied Biosystems, USA). Do 96-jamkové destičky byly naneseny vzorky DNA po 1,5 µl a přidány 4 µl master mixu připraveného pro jednu reakci z 2,5 µl TaqMan Genotyping Master Mixu (Applied Biosystems, USA), 0,125 µl TaqMan sondy a 0,875 µl sterilní H₂O. Analýza byla provedena na přístroji Light Cycler 480 (Roche, USA), amplifikace probíhaly za následujících podmínek: počáteční denaturace při 95 °C 10 min a poté 50 cyklů (92 °C 15 s, 60 °C 1 min). Pro větší rozlišení jednotlivých genotypů byla pro každý polymorfismus provedena barevná kompenzace (95 °C 10 s, 50 °C 30 s a 70 °C dále). Při analýze byly vždy použity negativní kontroly a předem známé kontrolní vzorky pro heterozygotní variantu a obě homozygotní varianty konkrétního polymorfismu. Analýza byla provedena Endpoint genotypizací (rozdělení genotypů podle míry fluorescence na konci reakce) (obr. 8).

Tabulka 4 Stanovované polymorfismy *RET* proto-onkogenu

Exon	Polymorfismus*	rs	Nukleotidová záměna
Exon 7	A432A (<u>A</u> /G)	rs1800860	GCG/GCA
Exon 11	G691S (<u>A</u> /G)	rs1799939	GGT/AGT
Exon 13	L769L (T/ <u>G</u>)	rs1800861	CTT/CTG
Exon 14	S836S (C/ <u>T</u>)	rs1800862	AGC/AGT
Exon 15	S904S (C/ <u>G</u>)	rs1800863	TCC/TCG

* *Minoritní alela je podtržena*

Tabulka 5 Optimalizace reakčních podmínek primerů určených pro detekci *RAS* mutací pomocí HRM analýzy

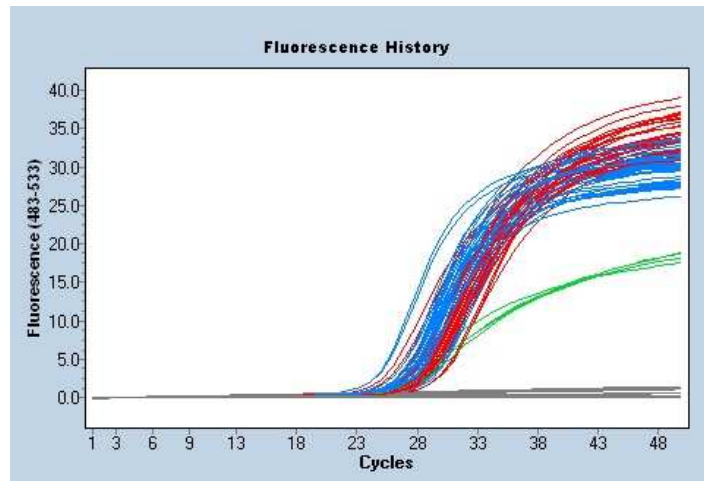
Gen	Exon	Primery	PCR produkt	Annealing	MgCl₂
<i>H-RAS</i>	1	F: 5'-ATG ACG GAA TAT AAG CTG GT-3' R: 5'-CTC TAT AGT GGG GTC GTA TT-3'	123 bp	58,9 °C	2 mM
	2	F: 5'-AGG TGG TCA TTG ATG GGG AG-3' R: 5'-AGG AAG CCC TCC CCG GTG CG-3'	178 bp	58,9 °C	2 mM
<i>K-RAS</i>	1	F: 5'-GGC CTG CTG AAA ATG ACT GAA-3' R: 5'-GGT CCT GCA CCA GTA ATA TGC-3'	164 bp	58,9 °C	2 mM
	2	F: 5'-CAG GAT TCC TAC AGG AAG CAA GTA G-3' R: 5'-CAC AAA GAA AGC CCT CCC CA-3'	133 bp	58,9 °C	2 mM
<i>N-RAS</i>	1	F: 5'-ATG ACT GAG TAC AAA CTG GT-3' R: 5'-CTC TAT GGT GGG ATC ATA TT-3'	112 bp	55,1 °C	3 mM
	2	F: 5'-TCT TAC AGA AAA CAA GTG GT-3' R: 5'-GTA GAG GTT AAT ATC CGC AA-3'	176 bp	55,1 °C	3 mM

Tabulka 6 Použité primery a reakční podmínky PCR reakcí pro detekci mutací v *BRAF* a *RAS* genech pomocí sekvenace

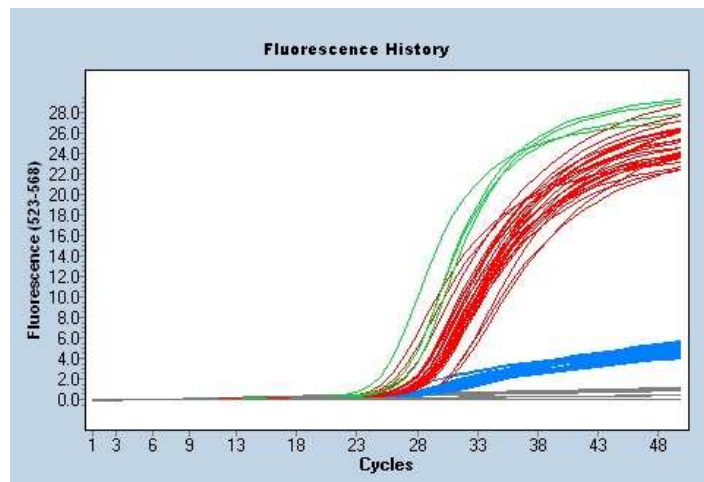
Gen	Exon	Primery	PCR produkt	Annealing	MgCl ₂
<i>BRAF</i>	15	F: 5'-TCA TAA TGC TTG CTC TGA TAG GA-3' R: 5'-GGC CAA AAA TTT AAT CAG TGG A-3'	224 bp	57,5 °C	2 mM
		*F: 5'-TTT CCT TTA CTT ACT ACA CCT CA-3' *R: 5'-GGC CAA AAA TTT AAT CAG TGG A-3'	185 bp	57,5 °C	2 mM
<i>H-RAS</i>	1	F: 5'-GGA GAC CCT GTA GGA GGA CC-3' R: 5'-GAG GAA GCA GGA GAC AGG G-3'	282 bp	57,5 °C	1,5 mM
	2	F: 5'-GAG AGG TAC CAG GGA GAG GC-3' R: 5'-ACA TGC GCA GAG AGG ACA G-3'	358 bp	57,5 °C	1 mM
<i>K-RAS</i>	1	F: 5'-GAT ACA CGT CTG CAG TCA ACT G-3' R: 5'-GGT CCT GCA CCA GTA ATA TGC-3'	340 bp	57,5 °C	2 mM
	2	F: 5'-GTC TTT TCA AGT CCT TTG CCC-3' R: 5'-CAC AAA GAA AGC CCT CCC CA-3'	250 bp	57,5 °C	2 mM
<i>N-RAS</i>	1	F: 5'-GAT GTG GCT CGC CAA TTA AC-3' R: 5'-GGT AAA GAT GAT CCG ACA AGT G-3'	232 bp	56,4 °C	2 mM
	2	F: 5'-CCC TTA CCC TCC ACA CCC-3' R: 5'-CCT CAT TTC CCC ATA AAG ATT C-3'	268 bp	56,4 °C	3 mM

*pár primerů použitý pro degradovanou DNA z parafinových bločků

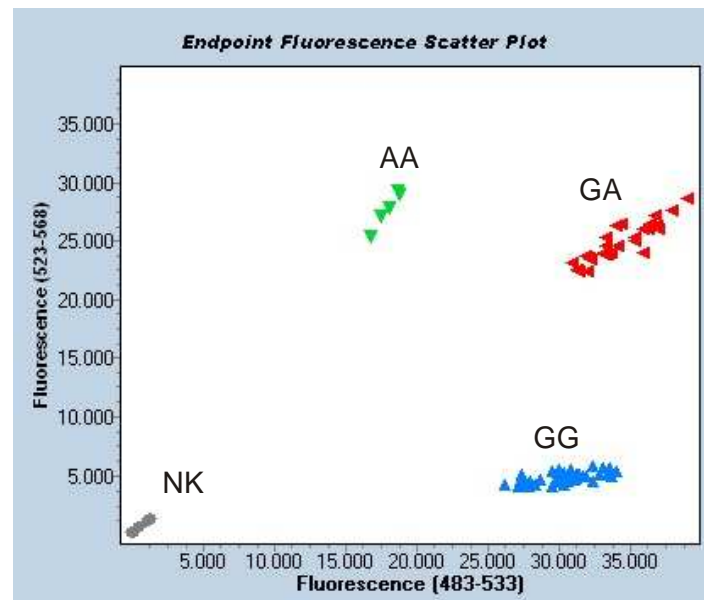
a)



b)



c)



Obr. 8 Genotypizace polymorfismu A432A (G/A) pomocí Real Time PCR. a) průběh reakce při detekčním filtru 483-533 nm (FAM), b) průběh reakce při detekčním filtru 523-568 nm (Hex), c) Endpoint genotypizace. NK - negativní kontrola

3.2.4 Detekce exprese genů

Pro analýzu *RET/PTC* přeskupení jsme detekovali expresi několika kontrolních genů a dva nejčastější fúzní typy *RET/PTC1* a *RET/PTC3*. Primery a reakční podmínky udává tab. 7.

Pro kontrolu přítomnosti a dobré kvality cDNA byla provedena detekce exprese ubikvitárního genu *GAPDH*. Původ buněk byl potvrzen detekcí genu *PAX8*, který se exprimuje jen ve folikulárních buňkách štítné žlázy. Dále jsme provedli detekci exprese extracelulární domény (EC) *RET* genu a kalcitoninu, jejichž nepřítomnost vyloučila medulární karcinom štítné žlázy. Detekce genů byla provedena elektroforézou na 1,5% nebo 3% agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem. Pro každou analýzu byla zařazena pozitivní a negativní kontrola.

Ke zjištění přítomnosti fúzní formy *RET* genu jsme provedli detekci exprese tyrozinkinázové domény (TK) *RET* genu, který se za normálních podmínek ve folikulárních buňkách štítné žlázy neexprimuje. K jeho aktivaci dochází právě v případě vzniku fúzní formy. Pokud byla TK doména pozitivní, jednalo se o *RET/PTCX* formu, tzn. blíže neurčenou formu. Dále jsme detekovali dvě nejčastější fúzní formy – *RET/PTC1* a *RET/PTC3*. Analýzu jsme vždy prováděli s pozitivní a negativní kontrolou. Expresi genů jsme detekovali elektroforézou na 3% agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem.

Dále jsme provedli optimalizaci reakčních podmínek relativní kvantifikace *RET/PTC* přeskupení a kontrolních genů (EC a TK domény *RET* genu) pomocí Real Time PCR na nově zakoupeném Light Cycleru 480 (Roche). Reakce byla provedena v objemu 16 μ l obsahující 3,2 μ l cDNA, 8 μ l TaqMan Gene Expression Master Mixu a primery a sondy uvedené v tab. 8. Reakční podmínky byly: inkubace 2 min při 50 °C, denaturace 10 min při 95 °C, dále 50 cyklů (denaturace při 95 °C 15 s, annealing při 60 °C 1 min). V reakci byly použity pozitivní a negativní kontroly a byla vytvořena standardní křivka každého genu provedená v tripletech v rozmezí pěti řádů.

Protože pro metodu Real Time PCR je zapotřebí většího množství genetického materiálu, tedy i pozitivních kontrol, rozhodli jsme se vyzkoušet TransPlex Whole Transcriptome Amplification Kit (Sigma-Aldrich) pro amplifikaci pozitivních kontrol. Reverzní transkripce byla provedena v 25 μ l reakci. K 300 ng RNA bylo přidáno

2,5 µl WTA Library Synthesis Buffer, 2,5 µl WTA Library Stabilization Solution a objem byl doplněn vodou do 24 µl. Následovala 5min inkubace při 70 °C a zchlazení na ledu. Byl přidán 1 µl WTA Library Synthesis Enzyme. Následovala reakce při podmínkách: 15 min při 25 °C, 2 hod při 42 °C a 5 min při 95 °C. Poté následovaly dvě amplifikační reakce v 75 µl za použití 5 µl cDNA, 7,5 µl WTA Amplification Master Mix, 1,5 µl dNTP a 12,5 U GoldTaq DNA polymerázy. Reakční podmínky byly tyto: 10 min při 95 °C a cyklus 20 s při 94 °C a 5 min při 65 °C v počtu 17 cyklů u první amplifikace a 13 cyklů u druhé amplifikace. Optimalizace reakcí proběhla pomocí Real Time PCR za použití SYBRgreenu. Po každé amplifikační reakci následovala purifikace PCR produktů na Agencourt SPRIPlate magnetu pomocí purifikačního kitu Agencourt Ampure (Beckman Coulter, USA). Bohužel výsledky nebyly uspokojivé ani reprodukovatelné.

3.3 STATISTICKÁ ANALÝZA

Statistické zhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí programu NCSS 2004 (Statistical Solutions, Saugus, Ma, USA). Rozdíly byly považovány za statisticky významné při $p < 0.05$. Korelace mezi nalezenými mutacemi (*BRAF*, *RET/PTC*) a klinicko-patologickými parametry byly zhodnoceny pomocí neparametrického Mann-Whitneyho testu (kontinuální proměnné) nebo Fisherova exaktního testu (kategorické proměnné).

U polymorfismů v *RET* genu byla pomocí Haploview 4.1. (Barrett et al. 2005) provedena analýza vazebné nerovnováhy a korelačních koeficientů mezi jednotlivými polymorfismy (SNP). Jednotlivé haplotypy a jejich kombinace byly generovány pomocí programu PHASE verze 2.1. (<http://stephenslab.uchicago.edu/software.html>) (Stephens and Donnelly 2003). Relativní riziko bylo určeno jako odds ratios (OR) s 95% konfidenčními intervaly (CI).

Pro zhodnocení *BRAF* mutace byla data dále transformována použitím statistického softwaru Statgraphics Centurion, verze XV ze Statpoint Inc. (Herndon, Virginia, USA). U transformovaných dat byla použita multivariantní regrese pomocí metody oboustranné ortogonální projekce latentních struktur (O2PLS). Pro analýzu dat byl použit statistický software SIMCA-P v.11.5 z Umetrics AB (Umeå, Sweden).

Tabulka 7 Použité primery a reakční podmínky PCR reakcí pro detekci exprese kontrolních genů a *RET/PTC* na agarózovém gelu

Gen	Primery	PCR produkt	Annealing	MgCl ₂
<i>GAPDH</i>	F: 5'-CCA TGG AGA AGG CTG GGG-3' R: 5'-CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC-3'	198 bp	57 °C	2 mM
<i>PAX8</i>	F: 5'-GGC CAC CAA GTC CCT GAG TC-3' R: 5'-GGG GGT TTC CTG CTT TAT G-3'	493 bp	57 °C	2 mM
EC <i>RET</i>	F: 5'-GGC GGC CCA AGT GTG CCG AAC TT-3' R: 5'-CCC AGG CCG CCA CAC TCC TCA CA-3'	180 bp	64 °C	1,5 mM
Kalcitonin	F: 5'-CCT TCC TGG CTC TCA GCA TC-3' R: 5'-GAG TTT AGT TGG CAT TCT GG-3'	408 bp	60 °C	2mM
TK <i>RET</i>	F: 5'-GGA GCC AGG GTC GGA TTC CAG TTA-3' R: 5'-CCG CTC AGG AGG AAT CCC AGG ATA-3'	150 bp	64 °C	2 mM
<i>RET/PTC1</i>	F: 5'-GTC GGG GGG CAT TGT CAT CT-3' R: 5'-AAG TTC TTC CGA GGG AAT TC-3'	204 bp	55 °C	2 mM
<i>RET/PTC3</i>	F: 5'-AAG CAA ACC TGC CAG TGG-3' R: 5'-TGG CTT ATC CAA AAG CAG AC-3'	242 bp	55 °C	2 mM

Tabulka 8 Použité primery, sondy a reakční podmínky pro detekci exprese kontrolních genů a *RET/PTC* pomocí Real Time PCR

Gen	Primery	PCR produkt	Annealing	Koncentrace
<i>Beta-actin</i>	F: 5'-AGC CTC GCC TTT GCC GA-3'	115 bp	60 °C	300 nM
	R: 5'-CTG GTG CCT GGG GCG-3'			900 nM
	P: 5'-VIC-CCGGCTTCGCGGGCGAC-TAMRA-3'			200 nM
TK <i>RET</i>	F: 5'-CGG TGG CCG TGA AGA TG-3'	64 bp	60 °C	900 nM
	R: 5'-TCT GAC AGC AGG TCT CGA AGC-3'			900 nM
	P: 5'-6FAM-TGAAAGAGAACGCCTCCCCGAGTG-TAMRA-3'			200 nM
EC <i>RET</i>	F: 5'-TGC TTC TGC GAG CCC G-3'	62 bp	60 °C	50 nM
	R: 5'-ATC ACC GTG CGG CAC AG-3'			900 nM
	P: 5'-6FAM-CATCCAGGATCCACTGTGCGACGA-TAMRA-3'			250 nM
<i>RET/PTC1</i>	F: 5'-CGC GAC CTG CGC AAA-3'	66 bp	60 °C	300 nM
	R: 5'-CAA GTT CTT CCG AGG GAA TTC C-3'			900 nM
	P: 5'-6FAM-CAAGCGTAACCATCGAGGATCCAAAGT-TAMRA-3'			250 nM
<i>RET/PTC3</i>	F: 5'-CCC CAG GAC TGG CTT ACC C-3'	81 bp	60 °C	900 nM
	R: 5'-CAA GTT CTT CCG AGG GAA TTC C-3'			300 nM
	P: 5'-6FAM-AAAGCAGACCTTGGAGAACAGTCAGGAGG-TAMRA-3'			250 nM

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 ALTERACE GENU *RET*

4.1.1 Výsledky

K detekci *RET/PTC* přeskupení byly použity pouze vzorky zamražených čerstvých tkání a biopsií. *RET/PTC* přeskupení bylo detekováno na základě exprese několika kontrolních genů a fúzních variant. U všech vzorků byly exprimovány geny *GAPDH* a *PAX8*. Dále byla detekována TK a EC doména *RET* genu a dvě fúzní varianty – *RET/PTC1* a *RET/PTC3*. Na základě přítomnosti TK domény *RET* genu byly detekovány blíže neurčené fúzní formy *RET/PTCX*.

Celkem jsme v našem souboru 101 vzorků odoperovaných čerstvých tkání pacientů s PTC detekovali 26 *RET/PTC* přeskupení (25,5 %) – 2 *RET/PTC1* (2 %), 2 *RET/PTC3* (2 %) a 22 blíže neurčených fúzních forem *RET/PTCX* (21,5 %).

Nebyly nalezeny žádné asociace mezi přítomností *RET/PTC* přeskupení a klinicko-patologickými daty – pohlaví, věk, velikost tumoru, histologická varianta, invaze nádoru, přítomnost vzdálených metastáz a metastáz v lymfatických uzlinách, multifokalita nádoru, opouzdření, angioinvaze, TNM stadium a recidiva onemocnění (tab. 9).

Bylo genotypizováno pět polymorfismů v *RET* genu – A432A (7. exon), G691S (11. exon), L769L (13. exon), S836S (14. exon) a S904S (15. exon). Vyšetřovaný soubor tvořilo 234 pacientů s PTC (101 čerstvých zamražených tkání, 133 parafinových bločků) a 172 zdravých kontrol bez osobní a rodinné anamnézy onemocnění štítné žlázy (vzorky periferní krve).

Frekvence genotypů všech stanovených polymorfismů odpovídaly Hardy-Weinbergově rovnováze. Mezi skupinou pacientů a kontrol nebyly nalezeny žádné rozdíly ve frekvenci polymorfismů (tab. 10) ani distribuci haplotypů. Ale našli jsme významné rozdíly ve skupině pacientů, ve které minoritní alela A polymorfismu A432A (G/A) byla méně častá u mužů v porovnání se ženami (22,3 % vs. 33,8 %, $p = 0,080$; Fisherův exaktní test) a signifikantně méně častá u pacientů s *RET/PTC* přeskupením (19,2 % vs. 41,2 %, $p = 0,004$; Fisherův exaktní test) (tab. 11). Homozygoti s majoritní

alelou G tohoto polymorfismu měli dokonce více než 4x větší riziko vzniku *RET/PTC* přeskupení (OR 4,5; CI 95%: 1,73–11,54; $p = 0,003$) oproti ostatním pacientům. Naopak nosičství minoritní alely A je spojeno s protektivitou ve vztahu k *RET/PTC* přeskupení (OR 0,22; CI 95%: 0,09–0,58; $p = 0,003$). Minoritní alela G polymorfismu L769L byla signifikantně častější u pacientů s *RET/PTC* v porovnání s pacienty bez této alterace (36,5 % vs. 21,5 %, $p = 0,041$; Fisherův exaktní test) a nositelé alely G (genotypy TG a GG) měli 3x větší riziko *RET/PTC* přeskupení (OR 3,0; CI 95%: 1,16–7,57; $p = 0,036$) oproti nositelům alely T. Tyto výsledky demonstrují obrázky 9–10. Zjistili jsme 100% kosegregaci G691S a S904S, což potvrzuje, že tyto dva polymorfismy jsou ve vazebné nerovnováze.

Za pomoci programu PHASE 2.1. byly na základě zadaných genotypových dat jednotlivých polymorfismů generovány u každého jedince oba haplotypy, tj. nejpravděpodobnější kombinace polymorfismů na rodičovských chromozomech. Program v celkovém souboru vygeneroval 10 haplotypů, z toho 7 haplotypů se vyskytovalo s frekvencí nad 1 % a 4 s frekvencí nad 10 %. Nejčastější byl haplotyp GGTCC s frekvencí 29 % u pacientů i kontrol. Haplotyp GATTG se vyskytoval jen u jedné zdravé kontroly a haplotyp GATCC pouze u jednoho pacienta s PTC. V souboru pacientů bylo vygenerováno 8 haplotypů, mezi nimiž haplotypy GATTG a GATTG chyběly. Obě rizikové alely polymorfismů A432A (alela G) a L769L (alela G) byly obsaženy ve dvou haplotypech – GGGCC a GGGTG, naopak obě protektivní alely (alela A u A432A a alela T u L769L) byly zahrnuty v haplotypech AGTCC a AATG.

Nebyly zjištěny rozdíly v zastoupení haplotypů u pacientů s PTC a kontrol, ale ve skupině pacientů program PHASE vyhodnotil signifikantní rozdíly v distribuci haplotypů v závislosti na pohlaví pacientů ($p = 0,04$) a přítomnosti *RET/PTC* ($p = 0,02$). Nosičství rizikových haplotypů (GGGCC a GGGTG – nesoucí obě rizikové alely) bylo signifikantně asociováno s *RET/PTC* přeskupením (OR 2,1; CI 95%: 1,33–3,30; $p = 0,002$) (obr. 11). Distribuci haplotypů u mužů a žen v závislosti na *RET/PTC* přeskupení ukazuje obr. 12.

Tabulka 9 Korelace *RET/PTC* přeskupení s klinicko-patologickými parametry

	Celkem	<i>RET/PTC</i>+ n (%)	<i>RET/PTC</i>- n (%)	p
PTC pacienti	101			
Muži	20	8 (40,0)	12 (60,0)	0,151
Ženy	81	18 (22,2)	63 (77,8)	
Věk operace	100			
< 20	11	6 (54,5)	5 (45,5)	0,195
20–30	18	4 (22,2)	14 (77,8)	
31–40	19	4 (21,1)	15 (78,9)	
> 40	52	12 (23,1)	40 (76,9)	
Velikost nádoru	93			
< 15 mm	35	6 (17,1)	29 (82,9)	0,397
15–40 mm	51	15 (29,4)	36 (70,6)	
> 40 mm	7	2 (28,6)	5 (71,4)	
Histologická varianta PTC	98			
Klasická	26	8 (30,8)	18 (69,2)	0,724
Folikulární	23	7 (30,4)	16 (69,6)	
Smíšená	43	9 (20,9)	34 (79,1)	
Ostatní	6	1 (16,7)	5 (83,3)	
Invaze	88			
Ne	67	20 (29,9)	47 (70,1)	0,083
Ano	21	2 (9,5)	19 (90,5)	
Metastázy v lymf. uzlinách	98			
Ne	57	15 (26,3)	42 (73,7)	0,644
Ano	41	9 (22,0)	32 (78,0)	
Vzdálené metastázy	96			
Ne	89	21 (23,6)	68 (76,4)	0,361
Ano	7	3 (42,9)	4 (57,1)	
Multifokalita	95			
Unifokální	62	14 (22,6)	48 (77,4)	0,461
Multifokální	33	10 (30,3)	23 (69,7)	
Opouzdření	89			
Ne	42	11 (26,2)	31 (73,8)	1,000
Ano	47	12 (25,5)	35 (74,5)	
Angioinvaze	89			
Ne	82	22 (26,8)	60 (73,2)	0,672
Ano	7	1 (14,3)	6 (85,7)	
TNM stadium	100			
I–II	78	23 (29,5)	55 (70,5)	0,056
III–IV	22	2 (9,1)	20 (90,9)	
Recidiva	96			
Ne	95	24 (25,3)	71 (74,7)	1,000
Ano	1	0 (0)	1 (100)	

Tabulka 10 Frekvence minoritních alel polymorfismů u pacientů s PTC a u zdravých kontrol

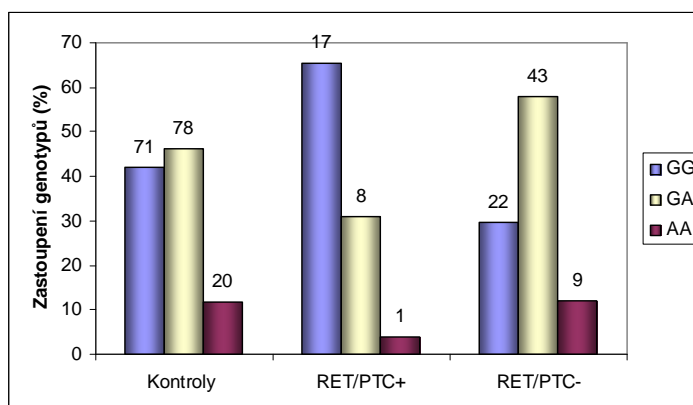
Exon	Polymorfismus	PTC	Kontroly	p*	OR	95% CI	p [†]
7. exon	A432A (G/A)	0,31	0,35	0,323	0,86	0,64–1,15	0,342
11. exon	G691S (G/A)	0,22	0,22	1,000	0,99	0,70–1,39	0,984
13. exon	L769L (T/G)	0,24	0,21	0,269	1,21	0,87–1,70	0,299
14. exon	S836S (C/T)	0,04	0,03	0,691	1,21	0,54–2,71	0,784
15. exon	S904S (C/G)	0,22	0,22	0,931	0,98	0,70–1,38	0,992

* Fisherův exaktní test, OR – odds ratio, CI – konfidenční interval, † Yatesova korekce

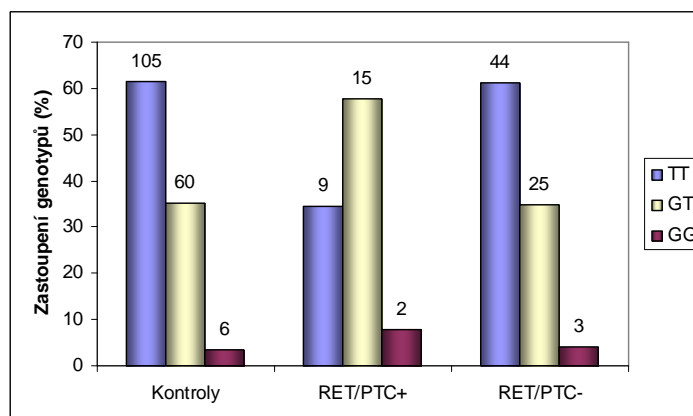
Tabulka 11 Frekvence minoritních alel polymorfismů u pacientů s PTC v závislosti na přítomnosti *RET/PTC* přeskupení

Exon	Polymorfismus	<i>RET/PTC</i> +	<i>RET/PTC</i> -	p*	OR	95% CI	p [†]
7. exon	A432A (G/A)	0,19	0,41	0,004	0,34	0,16–0,73	0,007
11. exon	G691S (G/A)	0,17	0,24	0,439	0,66	0,29–1,49	0,420
13. exon	L769L (T/G)	0,37	0,22	0,041	2,10	1,05–4,19	0,052
14. exon	S836S (C/T)	0,06	0,04	0,699	1,45	0,35–6,02	0,901
15. exon	S904S (C/G)	0,16	0,25	0,242	0,57	0,25–1,33	0,264

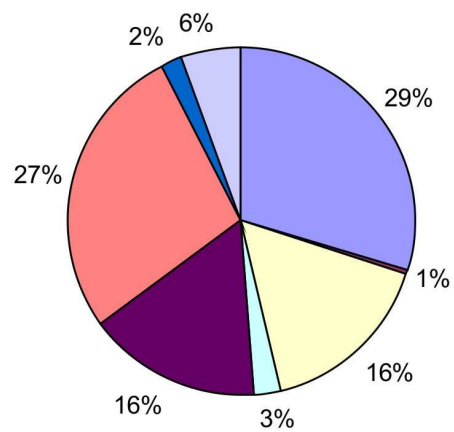
* Fisherův exaktní test, OR – odds ratio, CI – konfidenční interval, † Yatesova korekce



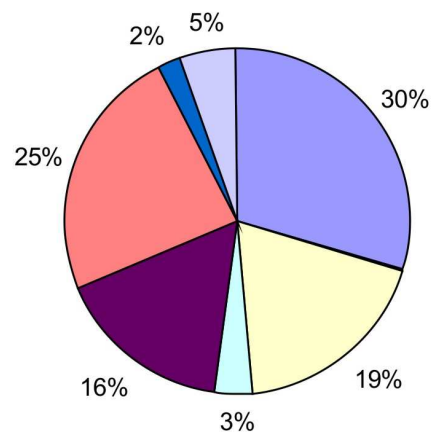
Obr. 9 Zastoupení polymorfismu A432A (G/A) u zdravých kontrol a pacientů s *RET/PTC* přeskupením a bez této alterace



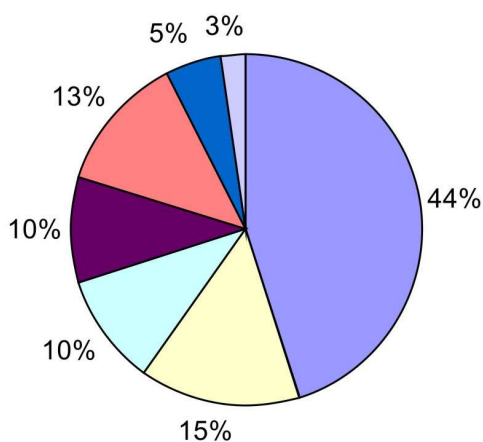
Obr. 10 Zastoupení polymorfismu L769L (T/G) u zdravých kontrol a pacientů s *RET/PTC* přeskupením a bez této alterace



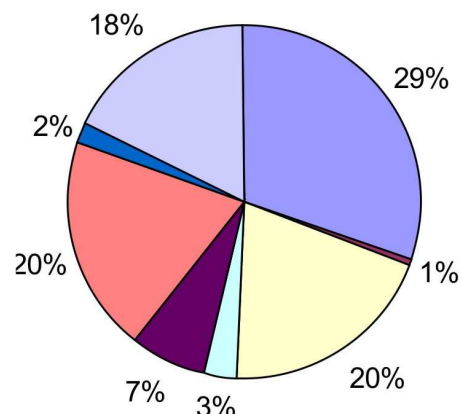
Kontroly



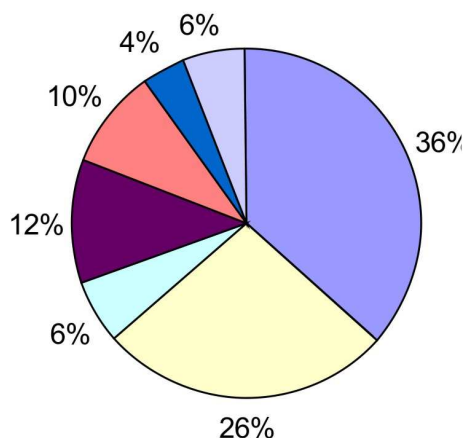
Pacienti s PTC



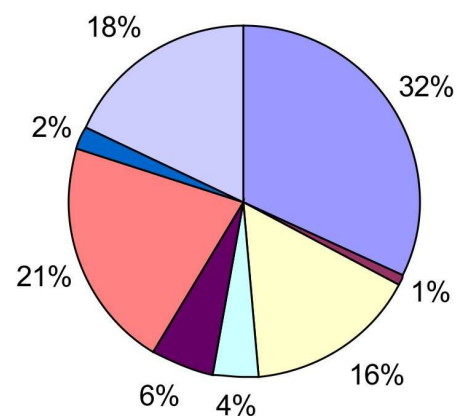
Pacienti s PTC – muži



Pacienti s PTC – ženy

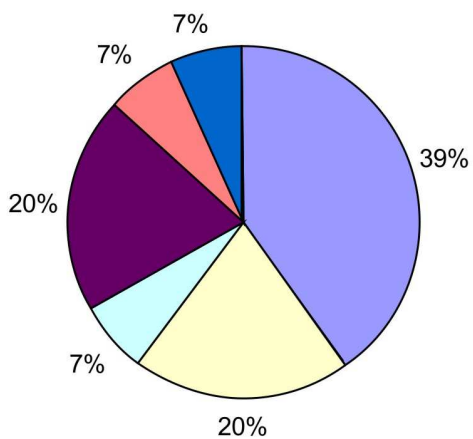


Pacienti s *RET/PTC*

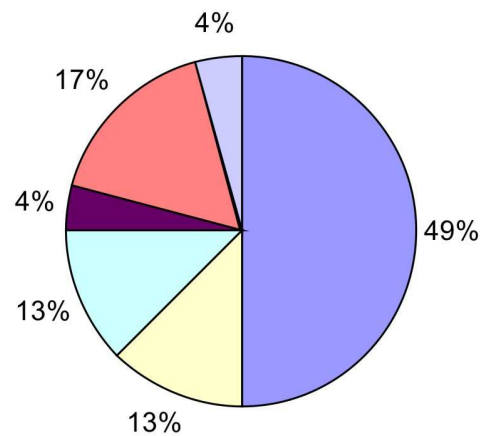


Pacienti bez *RET/PTC*

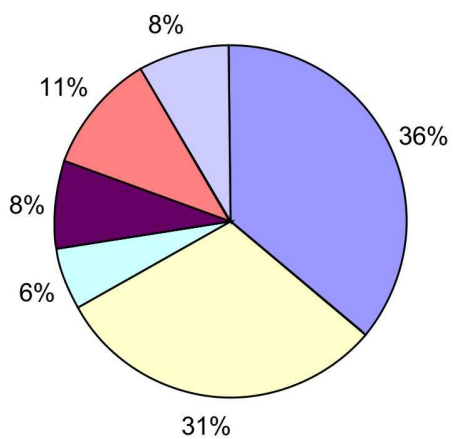
Obr. 11 Zastoupení jednotlivých haplotypů u zdravých kontrol, pacientů a ve skupině pacientů v závislosti na pohlaví a přítomnosti *RET/PTC* přeskupení. Haplotypy nesoucí obě rizikové alely jsou haplotypy GGGCC (žlutě) a GGGTC (bledě modře)



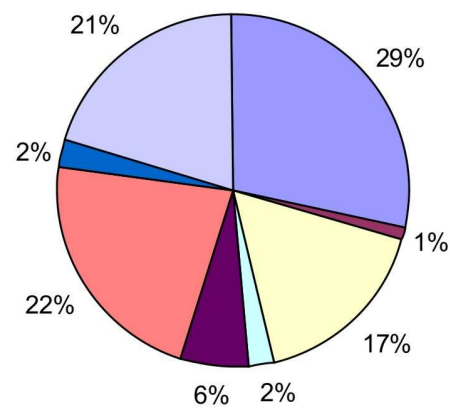
Pacienti – muži s *RET/PTC*



Pacienti – muži bez přeskupení



Pacienti – ženy s *RET/PTC*



Pacienti – ženy bez přeskupení

Obr. 12 Zastoupení jednotlivých haplotypů u mužů a žen s PTC v závislosti na přítomnosti *RET/PTC* přeskupení. Haplotypy nesoucí obě rizikové alely jsou haplotypy GGGCC (žlutě) a GGGTC (bledě modře)

4.1.2 Diskuze

RET/PTC se vyskytuje hlavně u papilárního karcinomu, několik studií uvádí jeho výskyt také u FTA, ale nejsou žádné zprávy o detekci této alterace u FTC nebo MTC (Tallini and Asa 2001; Nikiforov 2002; Kondo et al. 2006). Jeho výskyt u PTC je velmi variabilní. Pohybuje se v širokém rozmezí u 5–70 % PTC, byly pozorovány velké geografické rozdíly a závislost na metodice stanovení (Jhiang 2000). *RET/PTC* je spojováno především s klasickou variantou PTC (hlavně *RET/PTC1*) (Nikiforov et al. 1997; Adeniran et al. 2006) a mikrokarcinomy (Fusco et al. 2002), u folikulární varianty jsou naopak vzácné (Adeniran et al. 2006).

V našem souboru jsme detekovali dvě nejčastější přeskupení – *RET/PTC1* a *RET/PTC3*. Dále jsme na základě exprese TK domény *RET* genu detekovali zatím blíže neurčená *RET/PTCX* přeskupení. TK doména se může exprimovat z několika důvodů – jako součást *RET/PTC* přeskupení, při expresi celého *RET* genu či v případě smíšeného papilárního a medulárního karcinomu. Předpokládá se, že *RET* gen se ve folikulárních buňkách ani u PTC za normálních okolností neexprimuje. Při vzniku *RET/PTC* přeskupení dochází k fúzi 3' konce intracelulární tyrozinkinázové domény *RET* genu s 5' koncem jiného konstitutivně exprimovaného genu, proto přítomnost TK domény *RET* genu naznačuje přítomnost některé z fúzních forem. Některé studie však uvádějí, že u PTC se může vyskytovat *RET/PTC* fúzní gen společně s nepřeskupěným *RET* genem (Bunone et al. 2000; Fluge et al. 2001). *RET* gen je exprimován také makrofágy (Gattei et al. 1999), které se vyskytují při poškození nebo tumorech štítné žlázy (Sugg et al. 1998). Proto jsme provedli detekci EC domény *RET* genu. Abychom vyloučili přítomnost medulárního karcinomu, provedli jsme u vzorků pozitivních pro TK i EC doménu amplifikaci genu pro kalcitonin. Všechny vzorky byly negativní. U těchto vzorků se tedy nejspíše exprimoval celý *RET* gen a tyto vzorky nebyly z hlediska *RET/PTC* přeskupení považovány za pozitivní. Vzorky pozitivní pro TK doménu a negativní pro EC doménu jsme považovali za důkaz přítomnosti *RET/PTC* přeskupení.

V našem souboru bylo detekováno celkem 26 *RET/PTC* přeskupení (25,5 %) ze 101 vzorků pacientů s PTC – 2 *RET/PTC1* (2 %), 2 *RET/PTC3* (2 %) a 22 *RET/PTCX* (21,5 %). Do analýzy jsme zahrnuli pouze vzorky čerstvých zamražených tkání, neboť se nám zatím nepodařilo izolovat RNA z parafinových

bločků. Nenalezli jsme žádnou asociaci mezi přítomností *RET/PTC* a histologickou variantou.

Prognostická důležitost *RET/PTC* přeskupení je stále kontroverzní. Některé studie uvádějí asociace mezi přeskupením a agresivním fenotypem nádoru (Jhiang et al. 1992) se vzdálenými metastázami (Sugg et al. 1996), zatímco jiní tuto změnu spojují s pomalejším růstem tumoru, který nevede k progresi směrem ke špatně diferencovanému nebo anaplastickému karcinomu (Soares et al. 1998; Tallini et al. 1998; Nikiforov 2002). V našem souboru jsme sice nenalezli žádné signifikantní asociace mezi *RET/PTC* přeskupením a klinicko-patologickými parametry, ale je patrné, že u pacientů bez *RET/PTC* přeskupení se častěji vyskytovalo vyšší stadium TNM a invaze nádoru. V tomto ohledu naše data svědčí spíše pro menší agresivitu PTC nádoru s detekovaným *RET/PTC* přeskupením, oproti PTC s jinými genetickými alteracemi.

Několik studií se věnovalo frekvenci polymorfismů v *RET* genu. Byly nalezeny asociace *RET* polymorfismů s MTC a Hirschprungovou chorobou. U PTC byla nalezena asociace s polymorfismy A45A, L769L (Lesueur et al. 2002), A432A (Ho et al. 2005), G691S a S904S (Stephens et al. 2005). Majoritní alela G polymorfismu A45A a minoritní alela G polymorfismu L769L byly shledány rizikové pro vznik PTC. Také haplotyp GGCC (2., 13., 14. a 15. exon) nesoucí obě rizikové alely byl predisponující pro vznik sporadického PTC, zatímco haplotyp GGTC byl protektivní pro familiární PTC (Lesueur et al. 2002). Heterozygoti pro polymorfismus A432A měli dvakrát vyšší riziko vzniku DTC oproti normálním homozygotům (Ho et al. 2005). Minoritní alela A polymorfismu G691S byla signifikantně častější u pacientů s PTC starších 30 let (Stephens et al. 2005), naopak v jiné studii byla častější u žen s PTC mladších 38 let (Lonn et al. 2007). Polymorfismus G691S byl asociován s hyperplazií C-buněk u radiačně indukovaných DTC (Bounacer et al. 2002). Minoritní alela polymorfismu S836S byla asociována se zvýšeným rizikem thyroidálních uzlů, podobně tomu bylo u PTC, ale vyšetřovaný soubor byl malý (25 pacientů) (Sigurdson et al. 2009).

Zatím není jasné, jakým mechanismem mohou polymorfismy působit, ale předpokládá se, že mohou modifikovat expresi *RET* genu například alternativním sestřihem proteinu. Je také možné, že některé tiché polymorfismy mohou zvýšit náchylnost genu *RET* na poškození enviromentálními faktory, jako je radiační záření.

V našem souboru jsme detekovali pět polymorfismů v *RET* genu, které jsou v kódující oblasti a v populaci se vyskytují ve více než v 5 %. Kromě záměnného (missence) polymorfismu G691S v 11. exonu se jedná se o tiché polymorfismy. Vedle čerstvých tkání jsme vyšetřovali i vzorky parafinových bločků. Co se týče frekvencí, nebyl nalezen žádný rozdíl mezi souborem pacientů s PTC a kontrolní skupinou, ale ve skupině pacientů jsme objevili několik zajímavých rozdílů. Minoritní alela A polymorfismu A432A (G/A) byla méně častá u mužů v porovnání se ženami (toto ale nebylo signifikantní) a signifikantně méně častá u pacientů s *RET/PTC* přeskupením. Naopak minoritní alela G polymorfismu L769L byla u pacientů s *RET/PTC* signifikantně častější než u pacientů bez přeskupení. Zdá se tedy, že majoritní alela G polymorfismu A432A a minoritní alela G polymorfismu L769L jsou asociovány s vysokým rizikem *RET/PTC* přeskupení. Byla nalezena vazebná nerovnováha mezi polymorfismy G691S a S904S, což bylo prokázáno i u jiných souborů (Borrego et al. 1999). Pomocí programu PHASE byly vygenerovány haplotypy. Distribuce haplotypů mezi pacienty a kontrolami se nelišila, ale opět jsme našli rozdíly v závislosti na pohlaví a přítomnosti *RET/PTC* přeskupení. Nositelé rizikových haplotypů, tzn. s oběma rizikovými alelami měli více jak 2krát větší riziko vzniku *RET/PTC* přeskupení.

4.1.3 Shrnutí

Naším prioritním zjištěním je, že polymorfismy *RET* genu hrají roli při vzniku fúzních forem *RET/PTC*. Pokud by byly naše poznatky potvrzeny i u jiných souborů a zejména funkční studií, je možné vyvodit doporučení, aby se nositelé zmíněných rizikových alel *RET* genu pokud možno vyvarovali zevnímu ozáření krku (diagnostické či terapeutické účely) pro zvýšené riziko vzniku *RET/PTC* přeskupení a tedy PTC.

Výsledky byly průběžně prezentovány na českých i zahraničních konferencích, připravuje se publikace.

4.1.4 Prezentace výsledků

Sýkorová V., Dvořáková Š., Laco J., Ryška A., Kodetová D., Astl J., Veselý D., Novák Z., Dušková J., Bendlová B. (2008): Diagnostika genetických změn u papilárního karcinomu štítné žlázy. Konference DNA analýza V, Novotel Praha, 4.–5.6.2008 (vyzvaná přednáška) **Příloha č. 8**

Sýkorová V., Václavíková E., Dvořáková Š., Kodetová D., Astl J., Betka J., Ryška A., Smutný S., Vlček P., Bendlová B. (2008): Asociace polymorfismu A432A v *RET* genu s *RET/PTC* přeskupením u papilárního karcinomu štítné žlázy. XXXI. Endokrinologické dni, Štrbské Pleso, 2.–4.10.2008. Sborník abstrakt, A31:91. (prezentovaný poster) **Příloha č. 10**

Sykorova V., Vaclavikova E., Dvorakova S., Kodetova D., Kodet R., Astl J., Vesely D., Betka J., Hoch J., Smutny S., Vlcek P., Bendlova B. (2009): Association of A432A *RET* polymorphism with *RET/PTC* in patients with papillary thyroid carcinoma. 34th Annual meeting of the European Thyroid Association (ETA), Lisbon, Portugal, Sept 5–9, 2009. Acta Med Port 22 (1):P082:76 (presented poster) **Příloha č. 11**

Sýkorová V., Dvořáková Š., Ryška A., Včelák J., Václavíková E., Laco J., Kodetová D., Kodet R., Cibula D., Dušková J., Hlobilková A., Astl J., Veselý D., Betka J., Hoch J., Smutný S., Čáp J., Vlček P., Novák Z., Bendlová B. (2009): Asociace polymorfismů v *RET* genu se vznikem *RET/PTC* přeskupení u papilárního karcinomu štítné žlázy. XXXII. Endokrinologické dny, Český Krumlov, 24.–26. září 2009. Sborník abstrakt: 130–131 (diskutovaný poster) **Příloha č. 12**

Sykorova V., Vaclavikova E., Dvorakova S., Ryska A., Kodetova D., Vlcek P., Bendlova B. (2010) Polymorphisms in *RET* gene are associated with *RET/PTC* rearrangements in papillary thyroid carcinoma (PTC). 12th ECE 2010, Prague, April 24–28, 2010 (přijat abstrakt) **Příloha č. 13**

4.2 MUTACE GENU *BRAF*

4.2.1 Výsledky

Aktivační mutace genu *BRAF* je nejčastější genetickou alterací nacházenou u papilárních karcinomů štítné žlázy. Cílem naší studie bylo zjistit frekvenční zastoupení mutace V600E v *BRAF* genu u nádorových tkání získaných od pacientů s PTC z období 1960–2007 a korelovat ji s klinicko-patologickými parametry.

DNA byla izolována z odoperovaných nádorových tkání a detekovaná pomocí sekvenace. Velmi pracné a časově náročné bylo získání potřebných klinicko-patologických dat, vzorky byly znovu vyhledány a popsány podle jednotných pravidel. U PTC pacientů jsme hodnotili pohlaví, věk, velikost tumoru, histologickou variantu, invazi nádoru, přítomnost vzdálených metastáz a metastáz v lymfatických uzlinách, multifokalitu nádoru, opouzdření, angioinvazi, TNM stadium a recidivu onemocnění. Poměr pohlaví pacientů byl 4,3:1. Medián věku při operaci byl 47 let s rozmezím 6–81, medián velikosti tumoru byl 16 mm s rozmezím 3–80 mm. Pacienti byli sledováni od 1 do 207 měsíců s mediánem 40 měsíců.

Nejvíce pacientů s PTC bylo ze Středočeského kraje a Prahy (108), dále z Královéhradeckého (31), Ústeckého (11), Libereckého (9), Pardubického (8), Jihomoravského (3), Plzeňského (3), Jihočeského (2), Vysočiny (2), Karlovarského (1), Moravskoslezského (1), Olomouckého (1) a Zlínského (1).

Celkem náš soubor tvořilo 272 pacientů s nádory štítné žlázy – 109 čerstvých zamražených tkání (101 PTC, 4 MTC a 4 špatně diferencované karcinomy), 156 parafinových bločků (135 PTC, 18 MTC, 1 ATC a 2 špatně diferencované karcinomy) a 7 biopsií tenkou jehlou – FNAB (6 PTC a 1 MTC). Celkem byla v našem souboru 242 PTC tkání detekována *BRAF* mutace u 81 pacientů (33,5 %). Všechny detekované mutace byly substituce valinu za glutamát v pozici 600 (V600E) a kromě jedné pacientky byli všichni heterozygoti.

Pacienti byli podle data operace rozděleni do šesti období – jedno období před černobylskou havárií (1960–duben 1986) a pět období po černobylské havárii (květen 1986–1990, 1991–1995, 1996–2000, 2001–2005, 2006–2007). Zastoupení

jednotlivých typů vzorků bylo následující: v letech 1960–2000: 77 parafinových bločků; 2001–2005: 58 parafinových bločků a 31 čerstvých zamražených tkání; 2006–2007: 70 čerstvých zamražených tkání a 6 biopsií tenkou jehlou.

Pacienti s *BRAF* mutací byli mírně starší (medián 49 let) než pacienti bez mutace (medián 45 let) ($p = 0,049$). Nejmladším pacientem s detekovanou mutací byla 16letá dívka, nejstarší byla 81letá žena. Pacienti s mutací měli signifikantně větší velikost nádoru (medián 20 mm) než pacienti bez mutace (medián 15 mm) ($p = 0,041$).

Tato mutace byla mnohem méně častá u folikulární varianty PTC (13,2 %) ve srovnání s klasickou variantou (46,4 %) a smíšenou folikulárně-klasickou variantou PTC (28,6 %) ($p = 0,001$). *BRAF* mutace signifikantně korelovala s vyšší agresivitou nádoru – přítomností metastáz v lymfatických uzlinách ($p = 0,029$), pokročilejším TNM stadiem ($p = 0,014$) a recidivou onemocnění ($p = 0,008$) (tab. 12).

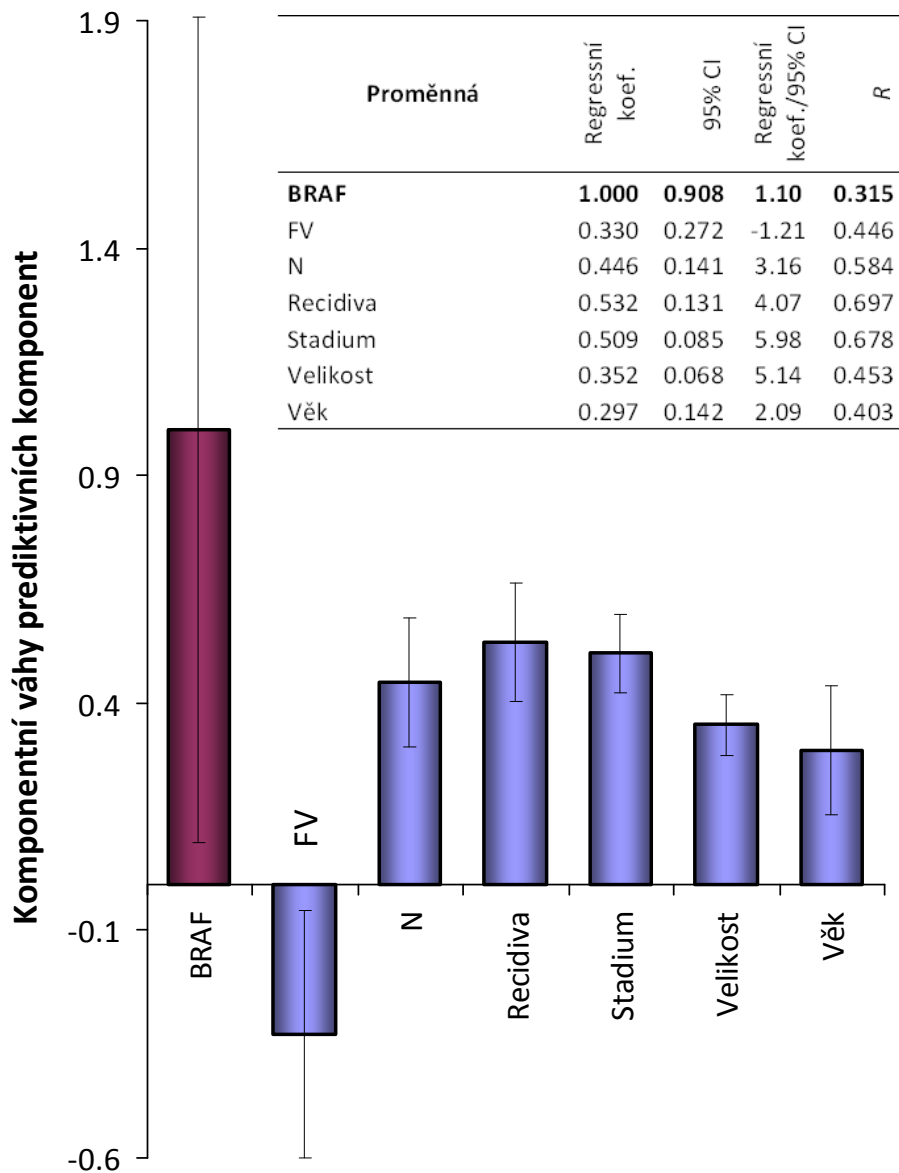
Dále byla provedena multivariantní analýza. Data byla nejdříve transformována použitím statistického softwaru Statgraphics Centurion, verze XV ze Statpoint Inc. (Herndon, Virginia, USA). U transformovaných dat byla použita multivariantní regrese pomocí metody oboustranné ortogonální projekce latentních struktur (O2PLS) (Trygg et al. 2007). V našem modelu byla *BRAF* mutace zvolena jako jediná závislá proměnná, zatímco klinicko-patologické parametry reprezentovaly nezávislé proměnné. O2PLS model umožnil najít nejlepší prediktory a jejich kombinace. Tato metoda je obousměrná, to znamená, že z přítomnosti *BRAF* mutace lze predikovat jednotlivé parametry a naopak. Parametry jsou signifikantně asociovány s *BRAF* mutací, když poměr regresního koeficientu a 95% konfidenčního intervalu je větší než ± 1 . Pro analýzu dat byl použit statistický software SIMCA-P v.11.5 z Umetrics AB (Umeå, Sweden). *BRAF* mutace negativně korelovala s folikulární variantou a pozitivně s věkem pacienta, velikostí tumoru, přítomností metastáz v lymfatických uzlinách, TNM stadiem a recidivou onemocnění. Nejvíce korelovala s TNM stadiem, který v sobě zahrnuje jak věk pacienta, tak velikost nádoru a přítomnost vzdálených metastáz a metastáz v lymfatických uzlinách (obr. 13).

V našem souboru máme pět pacientů, u kterých byla detekována *BRAF* mutace současně s *RET/PTCX* přeskupením (tab. 13 a 14).

Tabulka 12 Korelace *BRAF* mutace s klinicko-patologickými parametry

	Celkem	<i>BRAF</i>^{V600E} n (%)	<i>BRAF</i>^{WT} n (%)	p[†]
PTC pacienti	242			
Muži	46	19 (41,3)	27 (58,7)	0,227
Ženy	196	62 (31,6)	134 (68,4)	
Věk operace	242			
< 45 let	109	30 (27,5)	79 (72,5)	0,100
≥ 45 let	133	51 (38,3)	82 (61,7)	
Velikost nádoru	227			
< 15 mm	106	41 (38,7)	65 (61,3)	0,837
15–40 mm	103	42 (40,8)	61 (59,2)	
> 40 mm	18	6 (33,3)	12 (66,7)	
Histologická varianta PTC	231			
Klasická	56	26 (46,4)	30 (53,6)	0,001
Folikulární	53	7 (13,2)	46 (86,8)	
Smíšená	63	18 (28,6)	45 (71,4)	
Ostatní	59	24 (40,7)	35 (59,3)	
Invaze	208			
Ne	136	42 (30,9)	94 (69,1)	0,128
Ano	72	30 (41,7)	42 (58,3)	
Metastázy v lymf. uzlinách	206			
Ne	131	34 (26,0)	97 (74,0)	0,029
Ano	75	31 (41,3)	44 (58,7)	
Vzdálené metastázy	191			
Ne	179	62 (34,6)	117 (65,4)	0,754
Ano	12	3 (25,0)	9 (75,0)	
Multifokalita	219			
Unifokální	153	58 (37,9)	95 (62,1)	0,164
Multifokální	66	18 (27,3)	48 (72,7)	
Opouzdření	209			
Ne	85	32 (37,7)	53 (62,3)	0,659
Ano	124	42 (33,9)	82 (66,1)	
Angioinvaze	216			
Ne	195	65 (33,3)	130 (66,7)	0,469
Ano	21	9 (42,9)	12 (57,1)	
TNM stadium	213			
I–II	164	45 (27,4)	119 (72,6)	0,014
III–IV	49	23 (46,9)	26 (53,1)	
Recidiva	200			
Ne	189	59 (31,2)	130 (68,8)	0,008
Ano	11	8 (72,7)	3 (27,3)	

† Fisherův exaktní test



Obr. 13 O2PLS model vztahu *BRAF* mutace s klinicko-patologickými parametry. Jednotlivé sloupce představují regresní koeficienty a úsečky ukazují jejich 95% konfidenční intervaly. FV – folikulární varianta, N – přítomnost metastáz v lymfatických uzlinách, Stadium – TNM stadium, Velikost – velikost tumoru, Věk – věk operace, CI – konfidenční interval, R – příspěvek komponent vyjádřený jako korelační koeficient mezi proměnnou a prediktivním faktorem

Tabulka 13 Společný výskyt *BRAF* mutace a *RET/PTC* přeskupení – výsledky molekulárně-genetické analýzy

Vzorek	Pohlaví	Rok operace	Věk	<i>BRAF</i>	<i>RET/PTC</i>	Exon 7*	Exon 11*	Exon 13*	Exon 14 *	Exon 15*
50	žena	2005	72	V600E	<i>RET/PTCX</i>	GA	GA	TT	CC	CG
87	muž	2005	59	V600E	<i>RET/PTCX</i>	GG	GG	GT	CC	CC
159	žena	2006	34	V600E	<i>RET/PTCX</i>	GG	GG	GT	CC	CC
181	muž	2007	26	V600E	<i>RET/PTCX</i>	GG	AA	TT	CC	GG
252	muž	2007	55	V600E	<i>RET/PTCX</i>	GG	GG	GT	CC	CC

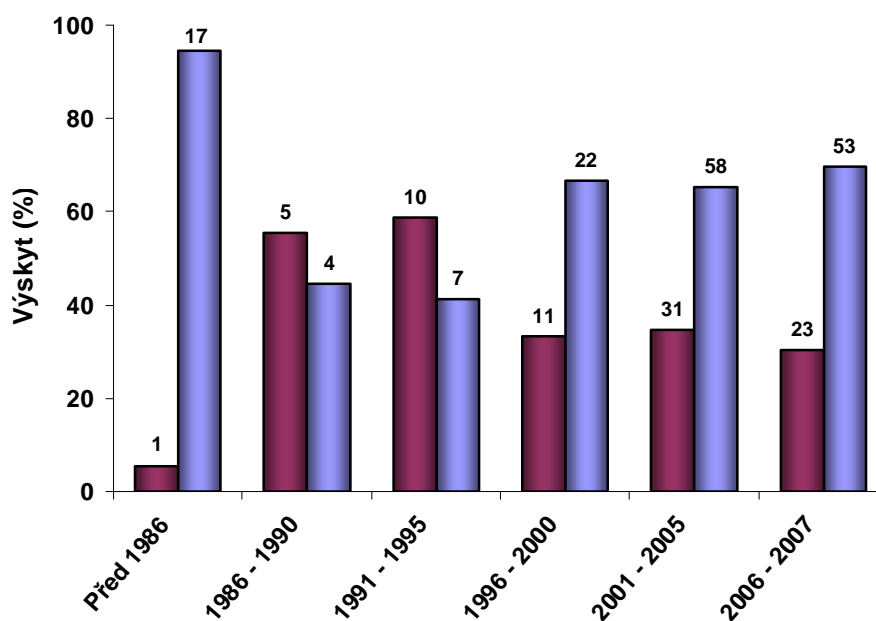
*polymorfismy v jednotlivých exonech *RET* genu

Tabulka 14 Společný výskyt *BRAF* mutace a *RET/PTC* přeskupení – klinicko-patologická data

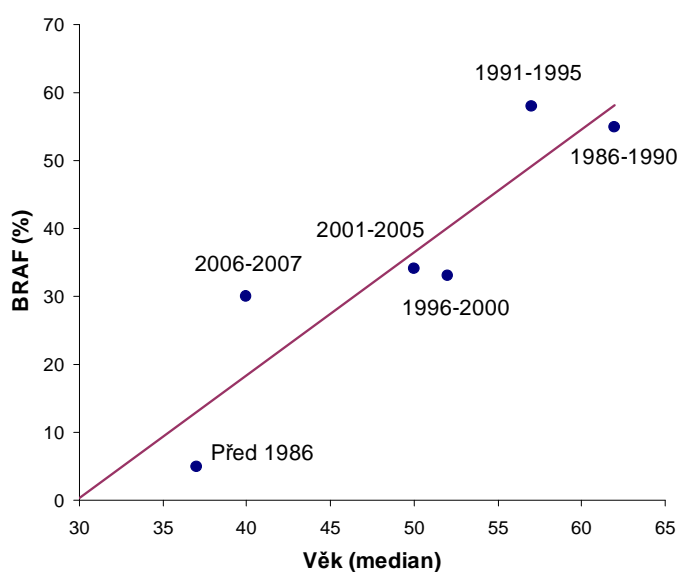
Vzorek	Varianta	Velikost (mm)	TNM	Fokalita	Pouzdro	Invaze	Angioinvaze	TNM stadium	Recidiva	Follow up (měsíce)
50	K	20	T3N0M0	M	ne	ne	ne	III+IV	ne	39
87	FVK	22	T2N0M0	U	ano	ne	ne	II	ne	39
159	K	25	T2N1M0	M	ano	ne	ne	I	ne	18
181	FVK	9	T1N0M0	U	ne	ne	ne	I	ne	27
252	FVK	20	T1N1M0	U	ano	ne	ne	III+IV	ne	23

K – klasická varianta, *FVK* – smíšená folikulárně-klasická varianta, *M* – multifokální, *U* – unifokální, *follow up* – doba dispenzarizace pacienta

Prevalence mutace V600E *BRAF* genu byla překvapivě mnohem nižší před černobylskou havárií jaderné elektrárny, než po ní ($p = 0,008$). Před rokem 1986 byla detekovaná pouze jedna mutace z 18 pacientů s PTC (5,6 %), v následujících obdobích byla detekovaná u 80 ze 224 pacientů (35,7 %), nejvyšší frekvence byla v letech 1986–1995 (obr 14). Ovšem před rokem 1986 byla vyšetřovaná skupina pacientů nejmladší a v letech 1986–1995 naopak nejstarší (obr. 15).



Obr. 14 Procentuální výskyt *BRAF* mutace (červené sloupce) v jednotlivých obdobích. Čísla nad sloupci udávají absolutní počet pacientů



Obr. 15 Medián věku pacientů v jednotlivých obdobích před a po černobylské havárii

Mutace *BRAF* byla signifikantně častější u pacientů, kteří byli v době černobylské havárie starší 4 let (36,3 %), než u mladších (19,0 %) ($p = 0,032$). Medián věku v období černobylské havárie byl 38 let u pacientů s mutací oproti 31,5 let u pacientů bez mutace. Medián doby mezi černobylskou havárií a manifestací onemocnění byl 17 let u pacientů s mutací vs. 18 let u pacientů bez mutace.

4.2.2 Diskuze

V naší retrospektivní studii byla *BRAF*^{V600E} mutace v 15. exonu nalezena u 81 ze 242 pacientů (33,5 %). Tyto výsledky jsou v souladu s ostatními studiemi, které udávají prevalenci v širokém rozmezí 29–83 % PTC (Cohen et al. 2003; Kimura et al. 2003; Namba et al. 2003; Nikiforova et al. 2003a; Xu et al. 2003; Kim et al. 2004), příčinou je pravděpodobně použití rozdílné metodiky, různé zastoupení histologických variant nebo epidemiologické faktory.

V našem souboru 23 pacientů s MTC nebyla nalezena žádná mutace. *BRAF* mutace byla detekována u jednoho špatně diferencovaného karcinomu a jednoho anaplastického karcinomu. Všechny špatně diferencované karcinomy, i anaplastický karcinom, vzešly pravděpodobně z PTC, jak naznačovaly dobře diferencované okrsky PTC uvnitř PDC nebo ATC. Zdá se, že *BRAF* mutace je specifická pro PTC a z něj vycházejících tumorů, třebaže v jedné studii byl uveden vysoký výskyt této mutace u pacientů s MTC (Goutas et al. 2008).

V některých studiích byla popsána asociace s vyšším věkem pacientů (Nikiforova et al. 2003a; Trovisco et al. 2005a; Kebebew et al. 2007). Dospěli jsme k podobnému výsledku. I ve skupině pacientů mladších 18 let byl věk diagnózy PTC signifikantně vyšší u pacientů s *BRAF* mutací. To se shoduje s výsledky publikací, které udávají, že výskyt mutace je vzácný u dětí (Lima et al. 2004).

U českých pacientů s PTC byla *BRAF* mutace asociována s klasickou papilární variantou. Tomu odpovídají i výsledky ostatních publikací, ve kterých je mutace běžná u klasického PTC (Kimura et al. 2003; Nikiforova et al. 2003a; Salvatore et al. 2004; Trovisco et al. 2004) a vzácná u folikulární varianty (Nikiforova et al. 2003a; Salvatore et al. 2004; Trovisco et al. 2004). Klasická varianta je považována za agresivnější formu než folikulární (Xing et al. 2005), proto by *BRAF* mutace svědčila pro větší agresivitu.

Nalezli jsme signifikantně větší velikost nádoru u *BRAF* pozitivních vzorků, stejně jako několik dalších publikací (Jo et al. 2006; Kim et al. 2006). Jedna publikace nalezla *BRAF* mutaci naopak u menších tumorů (Xing et al. 2005).

BRAF mutace je v některých studiích spojována s vyšším výskytem u mužů (Xu et al. 2003), lokální invazí (Oler and Cerutti 2009; Nikiforova et al. 2003a; Xing et al. 2005; Riesco-Eizaguirre et al. 2006; Lupi et al. 2007), pokročilým stadiem onemocnění (Namba et al. 2003; Nikiforova et al. 2003a; Xing et al. 2005; Riesco-Eizaguirre et al. 2006; Kebebew et al. 2007; Lupi et al. 2007), přítomností metastáz v lymfatických uzlinách (Xing et al. 2005; Kim et al. 2006; Kebebew et al. 2007; Lupi et al. 2007; Oler and Cerutti 2009), absencí pouzdra (Lupi et al. 2007), vzdálenými metastázami (Namba et al. 2003; Kebebew et al. 2007), recidivou onemocnění (Oler and Cerutti 2009) nebo vyšší mortalitou (Oler and Cerutti 2009). Jsou i práce, které nenalezly žádné významné asociace s těmito klinicko-patologickými parametry (Fugazzola et al. 2004; Trovisco et al. 2005a; Jo et al. 2006). V naší studii jsme zjistili signifikantní asociaci mezi *BRAF* mutací a přítomností lymfatických metastáz, pokročilým TNM stadiem a recidivou onemocnění.

Vyšší věk pacienta, větší velikost tumoru, metastázy v lymfatických uzlinách a pokročilé stadium nemoci jsou klasické vysoce rizikové faktory, které jsou asociovány s progresí, recidivou, morbiditou a mortalitou thyroideálních nádorů (Lundgren et al. 2006; Xing 2007). Navíc byla *BRAF* mutace detekována u pacientů, kteří jsou rezistentní k léčbě radiojodem. To je pravděpodobně způsobeno sníženou expresí natrium jodidového symportéru (NIS) pozorovanou u pacientů s mutací *BRAF* (Oler and Cerutti 2009). NIS je nezbytný pro přenos jodu ve folikulárních buňkách, tzn. nezbytný pro léčbu radiojodem. U těchto pacientů by mohla pomoci cílená terapie, jejímuž vývoji je poslední dobou věnována velká pozornost. Slibným kandidátem je především sorafenib, bis-aryl urea, který inhibuje *BRAF* a několik tyrosinkináz jako je *VEGFR-2*, *VEGFR-3*, *PDGFR-β*, *Flt-3* a *c-Kit* (Wilhelm et al. 2004). Sorafenib se zdá být účinný také u karcinomů s alteracemi v *RET* genu (Henderson et al. 2008).

Společný výskyt *BRAF* mutace a *RET/PTCX* přeskupení jsme detekovali celkem u pěti pacientů. Případy s oběma detekovanými mutacemi jsou vzácné (Xu et al. 2003) (Henderson et al. 2009), ve většině publikací se mutace nepřekrývají (Kumagai et al. 2004; Lima et al. 2004). Pacienti s oběma mutacemi byli starší a měli pokročilejší stadium onemocnění (Henderson et al. 2009). U našich pacientů jsme neshledali žádné

společné klinicko-patologické rysy, které by svědčily pro větší agresivitu nádoru, oproti pacientům s jednou detekovanou změnou.

Za poslední desetiletí dochází k velkému nárůstu incidence PTC. Jednou z možných příčin je vedle lepší diagnostiky i černobylská havárie (26. duben 1986), kdy se do ovzduší uvolnilo obrovské množství radioaktivního materiálu, především radioaktivní jod a cesium, který se pak ve třech vlnách dostal do Evropy. Štítná žláza využívá jod pro tvorbu thyroidálních hormonů (trijodthyronin a tyroxin), proto byl radioaktivní jod štítnou žlázou selektivně vychytáván. Na Ukrajině a v Bělorusku tato událost způsobila u dětí prudký nárůst výskytu papilárních karcinomů štítné žlázy (Kazakov et al. 1992; Likhtarev et al. 1995; Tronko et al. 1999), který byl do té doby u dětí diagnostikován jen vzácně. Přestože zasažení tehdejšího Československa nebylo tak výrazné, byl vliv černobylské havárie na českou populaci prokázán (Peterka et al. 2007) a od roku 1990 zde dochází k nárůstu incidence nádorů štítné žlázy (Murbeth et al. 2004).

Černobylská havárie byla dosud spojována pouze se vznikem přeskupení *RET/PTC* a *AKAP9/BRAF*. Výskyt mutace *BRAF* byl popisován především u sporadických PTC (Lima et al. 2004; Nikiforova et al. 2004). V jedné studii autoři prokázali podobnou incidenci *BRAF* mutace u sporadických a radiačně indukovaných PTC, ovšem vyšetřovaný soubor byl poměrně malý (18 vs. 20 PTC) (Xing et al. 2004). Dosud nikdo nevyšetřoval výskyt *BRAF* mutace u pacientů operovaných před černobylskou havárií. V naší studii jsme sledovali frekvenci této mutace během posledních 47 let. Pro lepší zhodnocení vlivu černobylské havárie jsme pacienty podle roku operace rozdělili do šesti období – jedno období před a pět období po černobylské havárií (obr. 14). Nalezli jsme signifikantně nižší výskyt *BRAF* mutace před rokem 1986 a nárůst výskytu této mutace během posledních dvaceti let. Bohužel věkové rozložení pacientů v jednotlivých obdobích nebylo rovnoměrné. Zatímco v období před černobylskou havárií byli pacienti v době operace nejmladší, v následujících dvou obdobích (1986–1995) byli naopak nejstarší (obr. 15). A protože *BRAF* mutace je častější u starších pacientů, je možné, že její nízký výskyt před rokem 1986 je způsoben právě nízkým věkem pacientů, stejně tak jako vysoký výskyt u starších pacientů v letech 1986–1995. K objasnění této otázky je proto zapotřebí rozšířit soubor pacientů, především před rokem 1986.

4.2.3 Shrnutí

Výsledky naší studie prokázaly, že *BRAF* mutace je spojena s vyšší agresivitou nádoru, především s přítomností lymfatických metastáz, pokročilým TNM stadiem a recidivou onemocnění. Vliv černobylské havárie se zatím prokázat nepodařilo.

Výsledky byly publikovány v impaktovaném časopise a průběžně prezentovány na českých i zahraničních konferencích.

4.2.4 Prezentace výsledků

Sýkorová V., Dvořáková Š., Laco J., Ryška A., Kodetová D., Astl J., Veselý D., Novák Z., Dušková J., Bendlová B. (2008): Diagnostika genetických změn u papilárního karcinomu štítné žlázy. Konference DNA analýza V, Novotel Praha, 4.–5.6.2008 (vyzvaná přednáška) **Příloha č. 8**

Sykorova V., Dvorakova S., Vaclavikova E., Ryska A., Kodetova D., Astl J., Duskova J., Smutny S., Vlcek P., Bendlova B. (2008): Correlation between *BRAF* V600E mutation and clinical and pathological features of papillary thyroid carcinomas in the Czech Republic. 33rd Annual Meeting of the European Thyroid Association, Thessaloniki-Chalkidiki, Greece, September 20–24, 2008. Hormones, 7 (suppl. 1): P020:48 (prezentovaný poster) **Příloha č. 9**

Sýkorová V., Dvořáková Š., Ryška A., Laco J., Kodetová D., Kodet R., Cibula A., Dušková J., Hlobílková A., Astl J., Veselý D., Betka J., Hoch Jiří, Smutný S., Čáp J., Vlček P., Bendlová B. (2009): *BRAF*^{V600E} Mutation in the Pathogenesis of a Large Series of Papillary Thyroid Carcinoma in Czech Republic. J Endocrinol Invest. [Epub ahead of print]. (IF = 1,888) **Příloha č. 6**

4.3 MUTACE GENŮ RAS

4.3.1 Výsledky

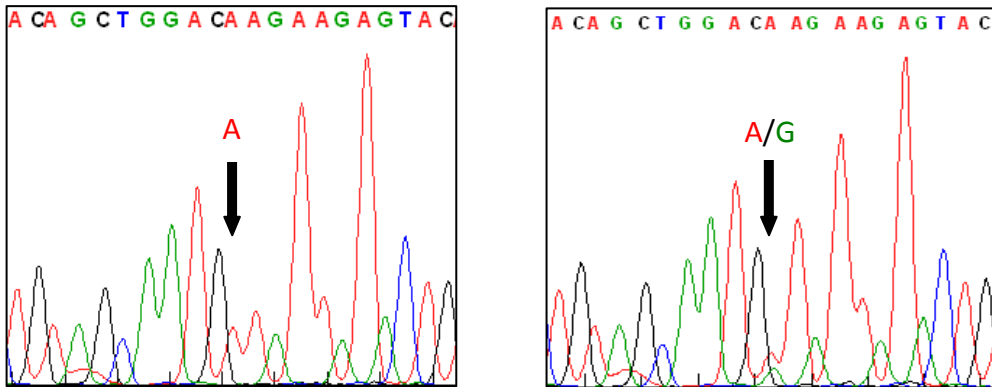
Mutace v 1. a 2. exonu *RAS* genů (*H-RAS*, *K-RAS* a *N-RAS*) byly vyšetřeny celkem u 80 pacientů (1 FTA, 62 PTC, 6 FTC, 8 špatně diferencovaných karcinomů a 3 ATC.). V souboru PTC bylo zastoupeno 47 folikulárních variant, 13 smíšených klasicko-folikulárních variant a 2 klasické varianty. Celý soubor byl tvořen 29 parafinovými bločky, 50 čerstvými tkáněmi a 1 biopsií. Poměr pohlaví byl 1:5,2 ve prospěch žen, medián věku pacientů byl 52 let.

U tří pacientů jsme detekovali heterozygotní mutaci Q61R v GTPásové doméně *N-RAS* genu (obr. 16). Všichni pacienti měli folikulární variantu PTC. Prvním pacientem byla 39letá žena s multifokálním neopouzdrěným neinvazivním PTC (T2N0M0), 73 měsíců bez recidivy. Druhým byla 32letá žena s unifokálním opouzdrěným neinvazivním PTC (T1N0M0), 25 měsíců bez recidivy. Třetí mutace byla nalezena u 64leté ženy s multifokálním PTC (T3N1M1) invazujícím do cév a okolních tkání, 19 měsíců bez recidivy. V GTPásové doméně genu *K-RAS* jsme našli mutaci Q61K spolu s tichou mutací G60G (obr. 24). Jednalo se o 35letou pacientku s multifokálním opouzdrěným, ale invazivním PTC (T3N0M0), histologicky ověřenou folikulární variantou, 24 měsíců bez recidivy. Všechny tyto mutace byly heterozygotní.

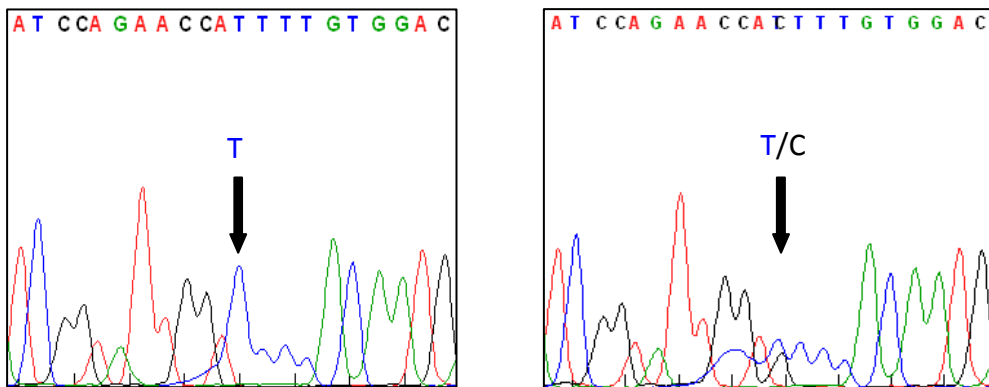
Dále byly detekovány polymorfismy H27H (obr. 17) a P42P (obr. 18) v 1. exonu *H-RAS* genu celkem u 27 pacientů ve skupinách všech vyšetřovaných typů nádorů, z nichž u dvou pacientů byly přítomny oba polymorfismy a tři pacienti byli homozygoti pro polymorfismus H27H.

V 1. exonu *K-RAS* genu byla detekována heterozygotní substituce Q3K (1. exon) (obr. 19) a v 2. exonu heterozygotní substituce P35S (obr. 20) a homozygotní substituce T50I (obr. 21). Byly nalezeny ojedinělé polymorfismy či tiché mutace v 2. exonu téhož genu – Y40Y (heterozygot) (obr. 22) a L56L (homozygot) (obr. 23). Všechny tyto změny byly nalezeny pouze u folikulární varianty PTC. Z těchto změn byly T50I a L56L detekovány u stejné pacientky.

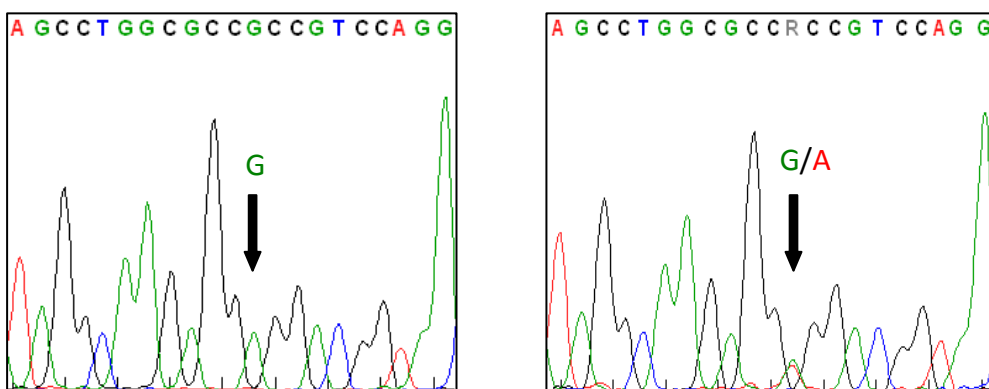
Všechny detekované alterace byly ověřeny sekvenací druhého vlákna (revers). Nalezené změny a jejich frekvence udává tab. 15



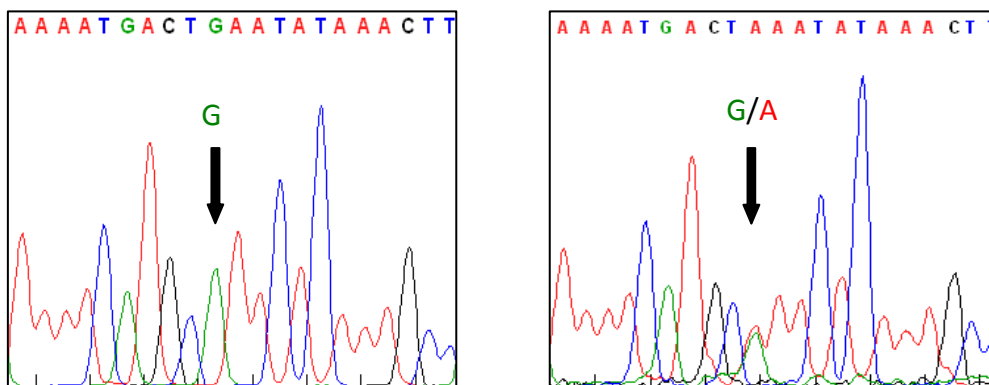
Obr. 16 Sekvence 2. exonu *N-RAS* genu – mutace Q61R
 a) bez mutace, b) mutace Q61R (CAA/CGA)



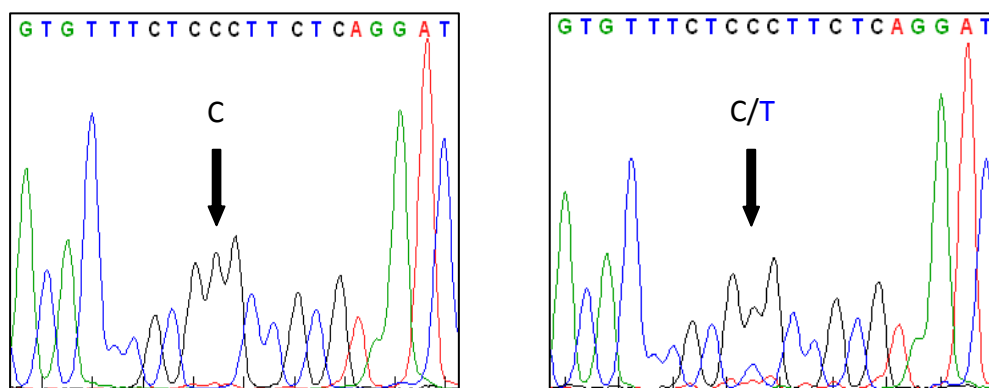
Obr. 17 Sekvence 1. exonu *H-RAS* genu – polymorfismus H27H
 a) bez polymorfismu, b) s detekovaným polymorfismem H27H (CAT/CAC)



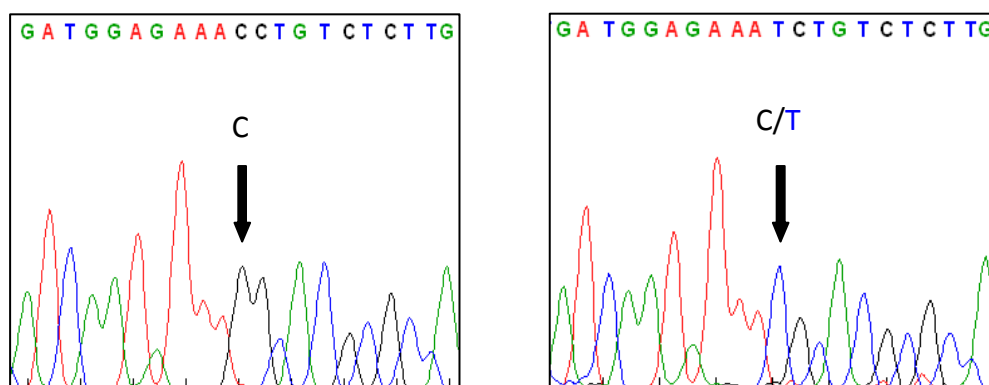
Obr. 18 Sekvence 1. exonu *H-RAS* genu – polymorfismus P42P
 a) bez polymorfismu, b) s detekovaným polymorfismem P42P (CCG/CCA)



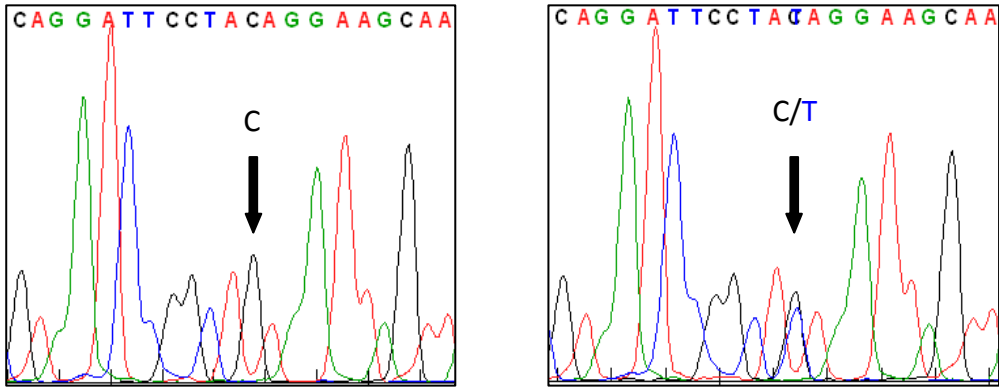
Obr. 19 Sekvence 1. exonu *K-RAS* genu – substituce Q3K
 a) bez mutace b) s detekovanou substitucí Q3K (CAA/AAA)



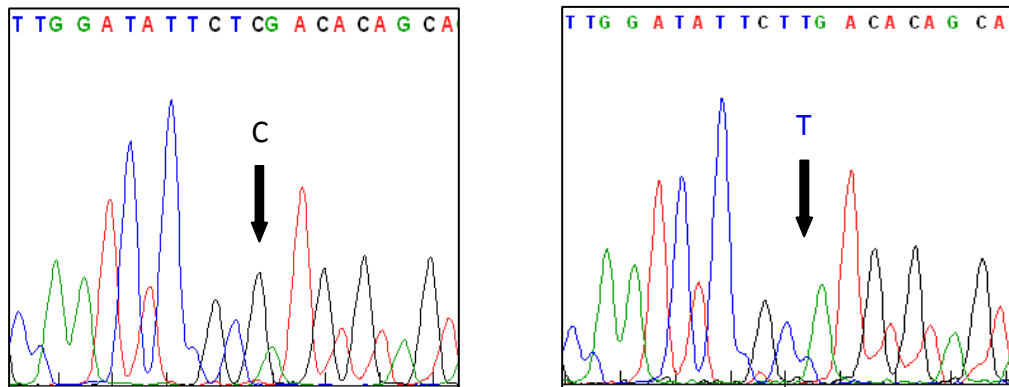
Obr. 20 Sekvence 2. exonu *K-RAS* genu – substituce P35S
 a) bez mutace b) s detekovanou substitucí P35S (CCT/TCT)



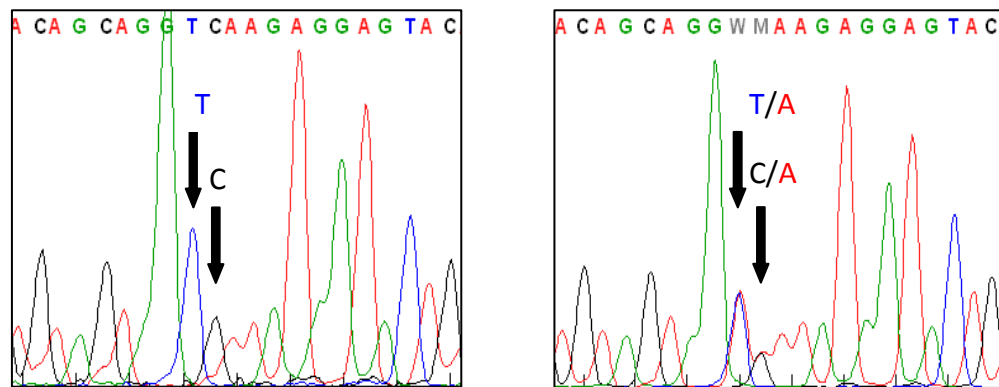
Obr. 21 Sekvence 2. exonu *K-RAS* genu – substituce T50I
 a) bez mutace b) s detekovanou substitucí T50I (homozygot) (ACC/ATC)



Obr. 22 Sekvence 2. exonu *K-RAS* genu – tichá mutace Y40Y
 a) bez mutace b) s detekovanou tichou mutací Y40Y (TAC/TAT)



Obr. 23 Sekvence 2. exonu *K-RAS* genu – tichá mutace L56L
 a) bez mutace b) s detekovanou tichou mutací L56L (homozygot) (CTC-CTT)



Obr. 24 Sekvence 2. exonu *K-RAS* genu s mutacemi G60G a Q61K
 a) bez mutace b) s detekovanou tichou mutací G60G (GGT/GGA) a mutací Q61K (CAA-AAA)

Tabulka 15 Výsledky detekce mutací v *RAS* genech

	Exon	Změna	Prevalence	%
<i>H-RAS</i>	1	H27H	20/46	43,5
		P42P	5/46	10,9
		H27H+P42P	2/46	4,3
	2	0	0/26	0
<i>K-RAS</i>	1	Q3K	1/51	2,0
	2	P35S	1/78	1,3
		Y40Y	1/78	1,3
		T50I+L56L	1/78	1,3
		G60G+Q61K	1/78	1,3
<i>N-RAS</i>	1	0	0/54	0
	2	Q61R	3/51	5,9
Celkem		10	35/306	11,4

4.3.2 Diskuze

Mutace *RAS* genů jsou časté u FTA a FTC (Zhu et al. 2003). U PTC se vyskytují hlavně ve folikulární variantě (>25 %) (Castro et al. 2006a; Zhu et al. 2003), u klasického PTC jsou méně časté (0–16 %) (Lazzereschi et al. 1997; Sugg et al. 1999; Nikiforova et al. 2003b; Vasko et al. 2003). Proto jsme se u PTC zaměřili především na folikulární variantu. Dále jsme analyzovali 1 FTA, 6 FTC, 8 špatně diferencovaných karcinomů a 3 ATC.

U PTC jsou nejčastější mutace v 61. kodónu *N-RAS* genu (Vasko et al. 2003). Mutaci v tomto kodónu jsme detekovali u tří pacientů, kteří měli histologicky potvrzenou folikulární variantu PTC. Neshledali jsme u nich žádné společné klinicko-patologické rysy svědčící pro větší agresivitu. Dále jsme našli mutaci v 61. kodónu *K-RAS* genu. Role *RAS* mutací v progresi tumoru je zatím nejasná, některé studie uvádějí podobnou prevalenci v benigních i maligních nádorech štítné žlázy, což by ukazovalo na časnou genetickou událost (Namba et al. 1990b). Některé publikace uvádějí, že *RAS* mutace indukují proliferaci bez ztráty diferenciace (Gire and Wynford-Thomas 2000), zatímco jiné ukazují, že vysoká hladina exprese *RAS* genů indukuje jak růst, tak dediferenciaci nádoru a inhibuje aktivitu thyroideálního transkripčního faktoru

1 (TitF1) a PAX8 (De Vita et al. 2005). *RAS* mutace jsou časté u PDC (55 %) a ATC (52 %), proto se předpokládá, že predisponují k dediferenciaci nádoru směrem k anaplastickému karcinomu (Garcia-Rostan et al. 2003). Další studie spojují *RAS* mutace (hlavně v 61. kodonu *N-RAS* genu) s progresí tumoru, vyšší agresivitou a vzdálenými metastázami (Hara et al. 1994; Ezzat et al. 1996; Esapa et al. 1999; Basolo et al. 2000; Motoi et al. 2000; Garcia-Rostan et al. 2003; Vasko et al. 2003).

U folikulární varianty jsme dále detekovali substituce Q3K (1. exon), P35S a T50I (2. exon) *K-RAS* genu a ojedinělé polymorfismy či tiché mutace v 2. exonu téhož genu. Tyto změny se nenacházejí v aktivních místech *RAS* genů, proto není jasné, jakou roli mohou v patogenezi PTC hrát.

Dále byly detekovány polymorfismy H27H a P42P v 1. exonu *H-RAS* genu ve skupinách všech vyšetřovaných typů nádorů. V literatuře je polymorfismus H27H označován jako 81T→C a je spojen s predispozicí k několika typům nádorů – karcinomu močového měchýře (Johns et al. 2003), ústní dutiny (Sathyan et al. 2006) a žaludku (Zhang et al. 2008). U thyroideálních nádorů byla popsána významná asociace mezi tímto polymorfismem a výskytem aneuploidie za současného zvýšení exprese genu (Castro et al. 2006b). U thyroideálních nádorů není souvislost mezi aneuploidií a prognózou zcela objasněná, ale několik studií udává, že přítomnost aneuploidie je horším prognostickým faktorem (Sturgis et al. 1999).

4.3.3 Shrnutí

V naší studii jsme našli u čtyř pacientů mutace v GTPázových doménách genů *N-RAS* a *K-RAS*. Dále jsme detekovali několik dalších genetických změn, z nichž zajímavý je především polymorfismus H27H v genu *H-RAS*, která je spojen s predispozicí k několika typům nádorů a u thyroideálních karcinomů je spojen s aneuploidií.

Výsledky budou prezentovány v Endokrinologickém ústavu v rámci postgraduálního kurzu Vybrané problémy endokrinologie a metabolismu a budou zpracovány pro publikaci.

5 ZÁVĚR

Tato práce přímo navázala na mou diplomovou práci, ve které byly zavedeny metody k detekci *BRAF* mutace a *RET/PTC* přeskupení u papilárního karcinomu štítné žlázy. V disertační práci jsem se kromě výše zmíněných hlavních genetických alterací zaměřila i na mutace v *RAS* genech a polymorfismy *RET* proto-onkogenu, jako modifikujících faktorů, které mohou ovlivňovat riziko vzniku karcinomů štítné žlázy. Kromě nejčastějšího nádoru štítné žlázy – PTC, jsem se věnovala i dalším typům nádorů, jako je folikulární adenom, folikulární karcinom, medulární karcinom, špatně diferencovaný karcinom a anaplastický karcinom.

Během disertační práce byl soubor vzorků vyšetřených pro *RET/PTC* přeskupení rozšířen na 101 pacientů. *RET/PTC* přeskupení bylo detekováno u 25,5 % pacientů s PTC – 2 *RET/PTC1*, 2 *RET/PTC3* a 22 *RET/PTCX*. Nebyly nalezeny signifikantní asociace mezi přítomností *RET/PTC* přeskupení a klinicko-patologickými daty. Naše výsledky spíše svědčí pro to, že *RET/PTC* alterace je spojena s menší agresivitou PTC, alespoň co se týče stadia TNM a invazivity nádoru. Studovala jsem i možný vliv polymorfismů *RET* proto-onkogenu na patogenezi PTC. Mezi souborem pacientů s PTC a kontrolní skupinou nebyl nalezen rozdíl ve frekvencích. Ale ve skupině pacientů nositelství majoritní alely G polymorfismu A432A a minoritní alely G polymorfismu L769L asociovalo s vysokým rizikem vzniku *RET/PTC* přeskupení. Tomu odpovídá i distribuce haplotypů, které kromě *RET/PTC* přeskupení asociují i s pohlavím pacientů.

Zdá se tedy, že některé polymorfismy v *RET* genu mohou predisponovat ke vzniku *RET/PTC*, a protože *RET/PTC* přeskupení může vznikat jako následek radiačního ozáření, nabízí se otázka, zda polymorfismy *RET* genu nemohou modifikovat jeho radiosenzitivitu. Této skutečnosti by bylo v budoucnu možné využít při prevenci PTC, který se může vyvinout jako následek terapeutického ozařování. V současné době proto domlouváme spolupráci s univerzitou v Barceloně, kde se zabývají rozdílnou senzitivitou diferencovaných karcinomů štítné žlázy k radiačnímu záření.

Náš rozsáhlý soubor bych ráda využila k retrospektivní studii vlivu černobylské havárie na výskyt *RET/PTC* přeskupení. Bohužel náš soubor pacientů před rokem 2003 tvoří pouze parafinové bločky, ze kterých je získání dostatečně kvalitní RNA velice obtížné, neboť je daleko více nestabilní a náchylnější k poškození než je tomu u DNA.

Třebaže jsem vyzkoušela již několik metodik k izolaci RNA z tohoto materiálu, zatím se nepodařilo izolovat dostatečně kvalitní RNA vhodnou pro další analýzy. K tomu by mohla dopomoci nově zavedená metodika Real Time PCR, která je daleko citlivější a je možné detekovat expresi genů již v malém množství genetického materiálu.

Dále jsem zhodnotila roli mutace V600E genu *BRAF* v patogenezi PTC. Během disertační práce byl soubor vyšetřených vzorků rozšířen na 272 pacientů. Kromě PTC jsem se věnovala detekci mutace i u ostatních typů nádorů. V celkovém souboru 242 PTC tkání byla mutace detekována u 33,5 % pacientů. Dále u 1 ze 6 špatně diferencovaných karcinomů a jednoho anaplastického karcinomu. Mutace byla daleko méně častá u folikulární varianty PTC než u klasické. Nalezla jsem asociaci mutace s vyšším věkem diagnózy, větší velikostí nádoru a vyšší agresivitou, především s přítomností metastáz v lymfatických uzlinách, pokročilejším TNM stadiem a recidivou onemocnění. Dále jsem se zabývala otázkou vlivu černobylské havárie na výskyt mutace *BRAF*. Přestože byla prevalence mutace před rokem 1986 signifikantně nižší a po roce 1986 došlo k prudkému nárůstu, nebylo možné potvrdit přímou souvislost mezi tímto trendem a havárií jaderné elektrárny kvůli věkovému rozložení pacientů v jednotlivých obdobích. Tato otázka zůstává nevyřešená, proto bych se chtěla i nadále snažit o rozšíření souboru, především o pacienty operované před rokem 1986. Ovšem i přes obrovské úsilí spolupracujících patologů je vyhledávání takových vzorků obtížné a zdlouhavé. U starších vzorků navíc často chybí podrobná klinicko-patologická data, vzorky se tak musí znovu prohlédnout a histologicky vyšetřit podle současných diagnostických kritérií. Také práce s genetickým materiálem z desítek let starých vzorků je obtížnější, kvůli většímu poškození DNA, způsobeného fixací tkáně.

Ve své disertační práci jsem zavedla detekci mutací v 1. a 2. exonu *RAS* genů (*H-RAS*, *K-RAS* a *N-RAS*). Z celkem 80 vyšetřených pacientů s různými typy nádorů štítné žlázy jsem u tří detekovala mutaci Q61R v GTPásové doméně *N-RAS* genu a u jednoho Q61K v GTPásové doméně *K-RAS* genu. Dále byly detekovány polymorfismy H27H a P42P v 1. exonu *H-RAS* genu celkem u 27 pacientů ve skupinách všech vyšetřovaných typů nádorů. U folikulární varianty PTC byly nalezeny substituce Q3K (1. exon), P35S a T50I (2. exon) *K-RAS* genu a ojedinělé polymorfismy či tiché mutace v 2. exonu téhož genu. Nenacházejí se v aktivních místech, proto bez funkční studie není možné odhadnout, jaký vliv mohou na patogenezi PTC mít. Ale zajímavý je

polymorfismus H27H, v literatuře popisovaný jako 81T→C, který byl v několika studiích popsán jako predisponující faktor k vývoji různých typů nádorů a u karcinomů štítné žlázy je popisován v souvislosti s aneuploidií. Proto bych se na něj chtěla v budoucnu zaměřit a objasnit jeho roli v patogenezi karcinomů štítné žlázy.

Nedávno byly popsány další polymorfismy, především v genech účastnících se procesů opravy DNA (*ATM*, *XRCC1*, *ADPRT*) (Chiang et al. 2008; Akulevich et al. 2009), kontroly buněčného cyklu (*TP53*) (Akulevich et al. 2009) a endogenního, hormonálního a xenobiotického metabolismu (*GSTM1*, *NAT2*) (Hernandez et al. 2008; Guilhen et al. 2009). Velmi silnou asociaci s PTC vykazuje varianta rs1867277 v regulační oblasti genu kódujícího transkripční faktor *FOXE1*, která ovlivňuje jeho expresi. *FOXE1* je centrem regulační sítě transkripčních faktorů a kofaktorů, která řídí iniciaci diferenciaci tyroidálních buněk, je nezbytný pro vznik štítné žlázy a pro udržení diferencovaného stavu thyroideálních buněk v dospělosti (Landa et al. 2009). Tento gen se nachází v oblasti 9q22.23, která byla identifikována celogenomovou asociační studií pro silnou asociaci s PTC a FTC (Gudmundsson et al. 2009). Předpokládá se, že tyto polymorfismy mohou ovlivňovat náchylnost ke vzniku diferencovaných nádorů štítné žlázy (PTC a FTC). Všechny tyto geny jsou vedle hlavních genetických změn (*RET/PTC*, *BRAF*, *RAS*, *PAX8-PPARγ*) předmětem naší nově podané grantové žádosti.

Během disertační práce byl rozšířen náš soubor tkání, který nyní čítá již 870 vzorků onemocnění štítné žlázy. Chtěla bych i nadále pokračovat ve sběru tkání a prohlubovat spolupráci s kliniky, chirurgy a pathology. V nedávné době se nám podařilo získat přístup k databázi CATHY, která obsahuje podrobná klinická data osmi tisíc pacientů z celé České republiky léčených pro onemocnění štítné žlázy ve fakultní nemocnici Motol. Na základě těchto dat bychom rádi provedli epidemiologickou studii incidence rakoviny štítné žlázy v jednotlivých oblastech ČR ve vztahu k radioaktivnímu spadu po černobylské havárii a nalezeným mutacím.

Nádory štítné žlázy patří k nejčastějším endokrinním malignitám a jejich incidence neustále stoupá. Proto věřím, že poznání genetické podstaty onemocnění nemá pouze vědecký výstup, ale že znalost hlavních genetických příčin a porozumění vlivu kandidátních genů může v budoucnu přispět k lepší předoperační diagnostice z biopsie tenkou jehlou, přesnějšímu určení prognózy onemocnění a individuálnímu léčebnému přístupu a cílené genové terapii u pacientů, u kterých selže standardní léčebný postup.

LITERATURA

- Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL, Fidler JP, Giordano TJ, Biddinger PW, Nikiforov YE (2006) Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol* 30:216–222
- Akslen LA, LiVolsi VA (2000) Prognostic significance of histologic grading compared with subclassification of papillary thyroid carcinoma. *Cancer* 88:1902–1908
- Akulevich NM, Saenko VA, Rogounovitch TI, Drozd VM, Lushnikov EF, Ivanov VK, Mitsutake N, Kominami R, Yamashita S (2009) Polymorphisms of DNA damage response genes in radiation-related and sporadic papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 16:491–503
- Alipov G, Ito M, Prouglo Y, Takamura N, Yamashita S (1999) Ret proto-oncogene rearrangement in thyroid cancer around Semipalatinsk nuclear testing site. *Lancet* 354:1528–1529
- Arighi E, Borrello MG, Sariola H (2005) RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:441–467
- Asai N, Jijiwa M, Enomoto A, Kawai K, Maeda K, Ichihara M, Murakumo Y, Takahashi M (2006) RET receptor signaling: dysfunction in thyroid cancer and Hirschsprung's disease. *Pathol Int* 56:164–172
- Barbacid M (1987) ras genes. *Annu Rev Biochem* 56:779–827
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263–265
- Basolo F, Pisaturo F, Pollina LE, Fontanini G, Elisei R, Molinaro E, Iacconi P, Miccoli P, Pacini F (2000) N-ras mutation in poorly differentiated thyroid carcinomas: correlation with bone metastases and inverse correlation to thyroglobulin expression. *Thyroid* 10:19–23
- Belfiore A, La Rosa GL, Padova G, Sava L, Ippolito O, Vigneri R (1987) The frequency of cold thyroid nodules and thyroid malignancies in patients from an iodine-deficient area. *Cancer* 60:3096–3102
- Boikos SA, Stratakis CA (2006) Carney complex: pathology and molecular genetics. *Neuroendocrinology* 83:189–199
- Bondeson L, Ljungberg O (1984) Occult papillary thyroid carcinoma in the young and the aged. *Cancer* 53:1790–1792
- Bongarzone I, Fugazzola L, Vigneri P, Mariani L, Mondellini P, Pacini F, Basolo F, Pinchera A, Pilotti S, Pierotti MA (1996) Age-related activation of the tyrosine kinase receptor protooncogenes RET and NTRK1 in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 81:2006–2009
- Borrego S, Saez ME, Ruiz A, Gimm O, Lopez-Alonso M, Antinolo G, Eng C (1999) Specific polymorphisms in the RET proto-oncogene are over-represented in patients with Hirschsprung disease and may represent loci modifying phenotypic expression. *J Med Genet* 36:771–774
- Bos JL (1989) ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. *Cancer Res* 49:4682–4689
- Bounacer A, Du Villard JA, Wicker R, Caillou B, Schlumberger M, Sarasin A, Suarez HG (2002) Association of RET codon 691 polymorphism in radiation-induced human thyroid tumours with C-cell hyperplasia in peritumoural tissue. *Br J Cancer* 86:1929–1936

- Bounacer A, Wicker R, Caillou B, Cailleux AF, Sarasin A, Schlumberger M, Suarez HG (1997) High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumors from patients who had received external radiation. *Oncogene* 15:1263–1273
- Brown AP, Chen J, Hitchcock YJ, Szabo A, Shrieve DC, Tward JD (2008) The Risk of Second Primary Malignancies up to Three Decades after the Treatment of Differentiated Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 93:504–515
- Bunone G, Uggeri M, Mondellini P, Pierotti MA, Bongarzone I (2000) RET Receptor Expression in Thyroid Follicular Epithelial Cell-derived Tumors. *Cancer Res* 60:2845–2849
- Burgess JR, Tucker P (2006) Incidence trends for papillary thyroid carcinoma and their correlation with thyroid surgery and thyroid fine-needle aspirate cytology. *Thyroid* 16:47–53
- Canzian F, Amati P, Harach HR, Kraimps JL, Lesueur F, Barbier J, Levillain P, Romeo G, Bonneau D (1998) A gene predisposing to familial thyroid tumors with cell oxyphilia maps to chromosome 19p13.2. *Am J Hum Genet* 63:1743–1748
- Carcangiu ML, Zampi G, Pupi A, Castagnoli A, Rosai J (1985) Papillary carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 241 cases treated at the University of Florence, Italy. *Cancer* 55:805–828
- Carta C, Moretti S, Passeri L, Barbi F, Avenia N, Cavaliere A, Monacelli M, Macchiarulo A, Santeusano F, Tartaglia M, Puxeddu E (2006) Genotyping of an Italian papillary thyroid carcinoma cohort revealed high prevalence of BRAF mutations, absence of RAS mutations and allowed the detection of a new mutation of BRAF oncoprotein (BRAF(V599Ins)). *Clin Endocrinol (Oxf)* 64:105–109
- Cassinelli G, Favini E, Degl'Innocenti D, Salvi A, De Petro G, Pierotti MA, Zunino F, Borrello MG, Lanzi C (2009) RET/PTC1-driven neoplastic transformation and proinvasive phenotype of human thyrocytes involve Met induction and beta-catenin nuclear translocation. *Neoplasia* 11:10–21
- Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhaes J, Roque L, Trovisco V, Vieira de Castro I, Cardoso-de-Oliveira M, Fonseca E, Soares P, Sobrinho-Simoes M (2006a) PAX8-PPAR γ Rearrangement Is Frequently Detected in the Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 91:213–220
- Castro P, Soares P, Gusmao L, Seruca R, Sobrinho-Simoes M (2006b) H-RAS 81 polymorphism is significantly associated with aneuploidy in follicular tumors of the thyroid. *Oncogene* 25:4620–4627
- Ciampi R, Knauf J, Kerler R, Gandhi M, Zhu Z, Nikiforova M, Rabes H, Fagin J, Nikiforov Y (2005) Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest* 115:94–101
- Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, Beller U, Westra WH, Ladenson PW, Sidransky D (2003) BRAF Mutation in Papillary Thyroid Carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 95:625–627
- Collins BJ, Chiappetta G, Schneider AB, Santoro M, Pentimalli F, Fogelfeld L, Gierlowski T, Shore-Freedman E, Jaffe G, Fusco A (2002) RET Expression in Papillary Thyroid Cancer from Patients Irradiated in Childhood for Benign Conditions. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3941–3946
- D'Avanzo B, La Vecchia C, Franceschi S, Negri E, Talamini R (1995) History of thyroid diseases and subsequent thyroid cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4:193–199

- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, et al. (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949
- de Groot JWB, Links TP, Plukker JTM, Lips CJM, Hofstra RMW (2006) RET as a Diagnostic and Therapeutic Target in Sporadic and Hereditary Endocrine Tumors. *Endocr Rev* 27:535–560
- De Vita G, Bauer L, da Costa VMC, De Felice M, Baratta MG, De Menna M, Di Lauro R (2005) Dose-Dependent Inhibition of Thyroid Differentiation by RAS Oncogenes. *Mol Endocrinol* 19:76–89
- DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C (2004) World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. Lyon: IARC Press
- Desvergne B, Wahli W (1999) Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocr Rev* 20:649–688
- Dinneen SF, Valimaki MJ, Bergstralh EJ, Goellner JR, Gorman CA, Hay ID (1995) Distant metastases in papillary thyroid carcinoma: 100 cases observed at one institution during 5 decades. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2041–2045
- Emuss V, Garnett M, Mason C, The Cancer Genome P, Marais R (2005) Mutations of C-RAF Are Rare in Human Cancer because C-RAF Has a Low Basal Kinase Activity Compared with B-RAF. *Cancer Res* 65:9719–9726
- Esapa CT, Johnson SJ, Kendall-Taylor P, Lennard TW, Harris PE (1999) Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 50:529–535
- Esnaola NF, Cantor SB, Sherman SI, Lee JE, Evans DB (2001) Optimal treatment strategy in patients with papillary thyroid cancer: a decision analysis. *Surgery* 130:921–930
- Ezzat S, Zheng L, Kolenda J, Safarian A, Freeman JL, Asa SL (1996) Prevalence of activating ras mutations in morphologically characterized thyroid nodules. *Thyroid* 6:409–416
- Fagin JA (2002) Minireview: Branded from the Start-Distinct Oncogenic Initiating Events May Determine Tumor Fate in the Thyroid. *Mol Endocrinol* 16:903–911
- Fagin JA (2005) Genetics of papillary thyroid cancer initiation: implications for therapy. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 116:259–269; discussion 269–271
- Finney RE, Bishop JM (1993) Predisposition to neoplastic transformation caused by gene replacement of H-ras1. *Science* 260:1524–1527
- Fluge O, Haugen DR, Akslen LA, Marstad A, Santoro M, Fusco A, Varhaug JE, Lillehaug JR (2001) Expression and alternative splicing of c-ret RNA in papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 20:885–892
- Franceschi S, Boyle P, Maisonneuve P, La Vecchia C, Burt AD, Kerr DJ, MacFarlane GJ (1993) The epidemiology of thyroid carcinoma. *Crit Rev Oncog* 4:25–52
- Frattini M, Ferrario C, Bressan P, Balestra D, De Cecco L, Mondellini P, Bongarzone I, Collini P, Gariboldi M, Pilotti S, Pierotti MA, Greco A (2004) Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene* 23:7436–7440
- Fugazzola L, Mannavola D, Cirello V, Vannucchi G, Muzza M, Vicentini L, Beck-Peccoz P (2004) BRAF mutations in an Italian cohort of thyroid cancers. *Clin Endocrinol (Oxf)* 61:239–243
- Fugazzola L, Pilotti S, Pinchera A, Vorontsova TV, Mondellini P, Bongarzone I, Greco A, Astakhova L, Butti MG, Demidchik EP, Pacini F, Pierotti MA (1995)

Oncogenic Rearrangements of the RET Proto-Oncogene in Papillary Thyroid Carcinomas from Children Exposed to the Chernobyl Nuclear Accident. *Cancer Res* 55:5617–5620

- Fukushima T, Suzuki S, Mashiko M, Ohtake T, Endo Y, Takebayashi Y, Sekikawa K, Hagiwara K, Takenoshita S (2003) BRAF mutations in papillary carcinomas of the thyroid. *Oncogene* 22:6455–6457
- Fusco A, Chiappetta G, Hui P, Garcia-Rostan G, Golden L, Kinder BK, Dillon DA, Giuliano A, Cirafici AM, Santoro M, Rosai J, Tallini G (2002) Assessment of RET/PTC Oncogene Activation and Clonality in Thyroid Nodules with Incomplete Morphological Evidence of Papillary Carcinoma: A Search for the Early Precursors of Papillary Cancer. *Am J Pathol* 160:2157–2167
- Gandhi M, Medvedovic M, Stringer JR, Nikiforov YE (2006) Interphase chromosome folding determines spatial proximity of genes participating in carcinogenic RET/PTC rearrangements. *Oncogene* 25:2360–2366
- Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, Pollan M, Herrero A, Pardo J, Wu R, Carcangiu ML, Costa J, Tallini G (2003) ras Mutations Are Associated With Aggressive Tumor Phenotypes and Poor Prognosis in Thyroid Cancer. *J Clin Oncol* 21:3226–3235
- Gattei V, Degan M, Rossi FM, De Iuliiis A, Mazzocco FT, Cesa E, Aldinucci D, Zagonel V, Pinto A (1999) The RET receptor tyrosine kinase, but not its specific ligand, GDNF, is preferentially expressed by acute leukaemias of monocytic phenotype and is up-regulated upon differentiation. *Br J Haematol* 105:225–240
- Gire V, Wynford-Thomas D (2000) RAS oncogene activation induces proliferation in normal human thyroid epithelial cells without loss of differentiation. *Oncogene* 19:737–744
- Goutas N, Vlachodimitropoul D, Bouka M, Lazaris AC, Nasioulas G, Gazouli M (2008) BRAF and K-RAS mutation in a Greek papillary and medullary thyroid carcinoma cohort. *Anticancer Res* 28:305–308
- Greco A, Mariani C, Miranda C, Lupas A, Pagliardini S, Pomati M, Pierotti MA (1995) The DNA rearrangement that generates the TRK-T3 oncogene involves a novel gene on chromosome 3 whose product has a potential coiled-coil domain. *Mol Cell Biol* 15:6118–6127
- Greco A, Miranda C, Pagliardini S, Fusetti L, Bongarzone I, Pierotti MA (1997) Chromosome 1 rearrangements involving the genes TPR and NTRK1 produce structurally different thyroid-specific TRK oncogenes. *Genes Chromosomes Cancer* 19:112–123
- Greco A, Pierotti MA, Bongarzone I, Pagliardini S, Lanzi C, Della Porta G (1992) TRK-T1 is a novel oncogene formed by the fusion of TPR and TRK genes in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 7:237–242
- Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, Jonasson JG, Sigurdsson A, Bergthorsson JT, He H, et al. (2009) Common variants on 9q22.33 and 14q13.3 predispose to thyroid cancer in European populations. *Nat Genet* 41:460–464
- Guilhen ACT, Bufalo NE, Morari EC, Leite JL, Assumpcao LVM, Tincani AJA, Ward LS (2009) Role of the N-Acetyltransferase 2 Detoxification System in Thyroid Cancer Susceptibility. *Clin Cancer Res* 15:406–412
- Gujral TS, van Veelen W, Richardson DS, Myers SM, Meens JA, Acton DS, Dunach M, Elliott BE, Hoppener JWM, Mulligan LM (2008) A Novel RET Kinase- β -Catenin Signaling Pathway Contributes to Tumorigenesis in Thyroid Carcinoma. *Cancer Res* 68:1338–1346

- Hansford JR, Mulligan LM (2000) Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet* 37:817–827
- Hara H, Fulton N, Yashiro T, Ito K, DeGroot LJ, Kaplan EL (1994) N-ras mutation: an independent prognostic factor for aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 116:1010–1016
- Harach HR, Escalante DA, Day ES (2002) Thyroid cancer and thyroiditis in Salta, Argentina: a 40-yr study in relation to iodine prophylaxis. *Endocr Pathol* 13:175–181
- Harach HR, Williams GT, Williams ED (1994) Familial adenomatous polyposis associated thyroid carcinoma: a distinct type of follicular cell neoplasm. *Histopathology* 25:549–561
- Hemminki K, Eng C, Chen B (2005) Familial Risks for Nonmedullary Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 90:5747–5753
- Henderson YC, Ahn S-H, Kang Ya, Clayman GL (2008) Sorafenib Potently Inhibits Papillary Thyroid Carcinomas Harboring RET/PTC1 Rearrangement. *Clin Cancer Res* 14:4908–4914
- Henderson YC, Shellenberger TD, Williams MD, El-Naggar AK, Fredrick MJ, Cieply KM, Clayman GL (2009) High Rate of BRAF and RET/PTC Dual Mutations Associated with Recurrent Papillary Thyroid Carcinoma. *Clin Cancer Res* 15:485–491
- Hernandez A, Xamena N, Surralles J, Galofre P, Velazquez A, Creus A, Marcos R (2008) Role of GST and NAT2 polymorphisms in thyroid cancer. *J Endocrinol Invest* 31:1025–1031
- Ho T, Li G, Zhao C, Wei Q, Sturgis EM (2005) RET polymorphisms and haplotypes and risk of differentiated thyroid cancer. *Laryngoscope* 115:1035–1041
- Hoie J, Stenwig AE, Kullmann G, Lindegaard M (1988) Distant metastases in papillary thyroid cancer. A review of 91 patients. *Cancer* 61:1–6
- Hou P, Liu D, Xing M (2007) Functional characterization of the T1799–1801del and A1799–1816ins BRAF mutations in papillary thyroid cancer. *Cell Cycle* 6:377–379
- <http://seer.cancer.gov/data>
- Hundahl SA, Cady B, Cunningham MP, Mazzaferri E, McKee RF, Rosai J, Shah JP, Fremgen AM, Stewart AK, Holzer S (2000) Initial results from a prospective cohort study of 5583 cases of thyroid carcinoma treated in the united states during 1996. U.S. and German Thyroid Cancer Study Group. An American College of Surgeons Commission on Cancer Patient Care Evaluation study. *Cancer* 89:202–217
- Cheung L, Messina M, Gill A, Clarkson A, Learoyd D, Delbridge L, Wentworth J, Philips J, Clifton-Bligh R, Robinson BG (2003) Detection of the PAX8-PPAR γ Fusion Oncogene in Both Follicular Thyroid Carcinomas and Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 88:354–357
- Chiang F-Y, Wu C-W, Hsiao P-J, Kuo W-R, Lee K-W, Lin J-C, Liao Y-C, Juo S-HH (2008) Association between Polymorphisms in DNA Base Excision Repair Genes XRCC1, APE1, and ADPRT and Differentiated Thyroid Carcinoma. *Clin Cancer Res* 14:5919–5924
- Ishikawa Y, Sugano H, Matsumoto T, Furuichi Y, Miller RW, Goto M (1999) Unusual features of thyroid carcinomas in Japanese patients with Werner syndrome and possible genotype-phenotype relations to cell type and race. *Cancer* 85:1345–1352

- Ito T, Seyama T, Iwamoto KS, Hayashi T, Mizuno T, Tsuyama N, Dohi K, Nakamura N, Akiyama M (1993) In Vitro Irradiation Is Able to Cause RET Oncogene Rearrangement. *Cancer Res* 53:2940–2943
- Ito Y, Yoshida H, Maruo R, Morita S, Takano T, Hirokawa M, Yabuta T, Fukushima M, Inoue H, Tomoda C, Kihara M, Uruno T, Higashiyama T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Miyauchi A (2009) BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma in a Japanese population: its lack of correlation with high-risk clinicopathological features and disease-free survival of patients. *Endocr J* 56:89–97
- Ivanova R, Soares P, Castro P, Sobrinho-Simoes M (2002) Diffuse (or multinodular) follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of ten cases of an aggressive form of differentiated thyroid carcinoma. *Virchows Arch* 440:418–424
- Jhiang SM (2000) The RET proto-oncogene in human cancers. *Oncogene* 19:5590–5597
- Jhiang SM, Caruso DR, Gilmore E, Ishizaka Y, Tahira T, Nagao M, Chiu IM, Mazzaferri EL (1992) Detection of the PTC/retTPC oncogene in human thyroid cancers. *Oncogene* 7:1331–1337
- Jo YS, Li S, Song JH, Kwon KH, Lee JC, Rha SY, Lee HJ, Sul JY, Kweon GR, Ro H-k, Kim J-M, Shong M (2006) Influence of the BRAF V600E Mutation on Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Papillary Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3667–3670
- Johannessen JV, Sobrinho-Simoes M (1980) The origin and significance of thyroid psammoma bodies. *Lab Invest* 43:287–296
- Johne A, Roots I, Brockmoller J (2003) A Single Nucleotide Polymorphism in the Human H-ras Proto-oncogene Determines the Risk of Urinary Bladder Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:68–70
- Johnson TL, Lloyd RV, Thompson NW, Beierwaltes WH, Sisson JC (1988) Prognostic implications of the tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol* 12:22–27
- Kazakov VS, Demidchik EP, Astakhova LN (1992) Thyroid cancer after Chernobyl. *Nature* 359:21
- Kebebew E, Weng J, Bauer J, Ranvier G, Clark OH, Duh QY, Shibrud D, Bastian B, Griffin A (2007) The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Ann Surg* 246:466–470; discussion 470–461
- Kim J, Giuliano AE, Turner RR, Gaffney RE, Umetani N, Kitago M, Elashoff D, Hoon DS (2006) Lymphatic mapping establishes the role of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg* 244:799–804
- Kim KH, Kang DW, Kim SH, Seong IO, Kang DY (2004) Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei Med J* 45:818–821
- Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA (2003) 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* 63:1454–1457
- Kini SR (2008) *Thyroid Cytopathology: An Atlas and Text*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- Klugbauer S, Demidchik EP, Lengfelder E, Rabes HM (1998) Molecular analysis of new subtypes of ELE/RET rearrangements, their reciprocal transcripts and

breakpoints in papillary thyroid carcinomas of children after Chernobyl. *Oncogene* 16:671–675

- Klugbauer S, Lengfelder E, Demidchik EP, Rabes HM (1996) A new form of RET rearrangement in thyroid carcinomas of children after the Chernobyl reactor accident. *Oncogene* 13:1099–1102
- Kondo T, Ezzat S, Asa SL (2006) Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 6:292–306
- Kosary CL, Ries LAG, Young JL, Keel GE, Eisner MP, Lin YD, Horner MJ (2007) SEER Survival Monograph: Cancer Survival Among Adults: U.S. SEER Program, 1988–2001, Patient and Tumor Characteristics. Cancer of the thyroid. Bethesda, MD; National Cancer Institute, SEER Program NIH Pub No 07–6215:217–225
- Kreze A, Langer P, Klimeš I, Stárka L, Payer J, Michálek J (2004) Všeobecná a klinická endokrinológia. Academic Electronic Press, s.r.o., Bratislava
- Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen C-J, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA (2000) PAX8-PPARgamma 1 Fusion in Oncogene Human Thyroid Carcinoma. *Science* 289:1357–1360
- Kumagai A, Namba H, Saenko VA, Ashizawa K, Ohtsuru A, Ito M, Ishikawa N, Sugino K, Ito K, Jeremiah S, Thomas GA, Bogdanova TI, Tronko MD, Nagayasu T, Shibata Y, Yamashita S (2004) Low Frequency of BRAFT1796A Mutations in Childhood Thyroid Carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4280–4284
- Lam AK, Lo CY, Lam KS (2005) Papillary carcinoma of thyroid: A 30-yr clinicopathological review of the histological variants. *Endocr Pathol* 16:323–330
- Lamade W, Renz K, Willeke F, Klar E, Herfarth C (1999) Effect of training on the incidence of nerve damage in thyroid surgery. *Br J Surg* 86:388–391
- Landa I, Ruiz-Llorente S, Montero-Conde C, Inglada-Perez L, Schiavi F, Leskela S, Pita G, et al. (2009) The variant rs1867277 in FOXE1 gene confers thyroid cancer susceptibility through the recruitment of USF1/USF2 transcription factors. *PLoS Genet* 5:e1000637
- Lazzereschi D, Mincione G, Coppa A, Ranieri A, Turco A, Baccheschi G, Pelicano S, Colletta G (1997) Oncogenes and antioncogenes involved in human thyroid carcinogenesis. *J Exp Clin Cancer Res* 16:325–332
- Lee SH, Lee JW, Soung YH, Kim HS, Park WS, Kim SY, Lee JH, Park JY, Cho YG, Kim CJ, Nam SW, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ (2003) BRAF and KRAS mutations in stomach cancer. *Oncogene* 22:6942
- Lee TK, Myers RT, Marshall RB, Bond MG, Kardon B (1985) The significance of mitotic rate: a retrospective study of 127 thyroid carcinomas. *Hum Pathol* 16:1042–1046
- Leicht DT, Balan V, Kaplun A, Singh-Gupta V, Kaplun L, Dobson M, Tzivion G (2007) Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1773:1196–1212
- Lesueur F, Corbex M, McKay JD, Lima J, Soares P, Griseri P, Burgess J, Ceccherini I, Landolfi S, Papotti M, Amorim A, Goldgar DE, Romeo G (2002) Specific haplotypes of the RET proto-oncogene are over-represented in patients with sporadic papillary thyroid carcinoma. *J Med Genet* 39:260–265
- Likhtarev IA, Sobolev BG, Kairo IA, Tronko ND, Bogdanova TI, Oleinic VA, Epshtein EV, Beral V (1995) Thyroid cancer in the Ukraine. *Nature* 375:365
- Lima J, Trovisco V, Soares P, Maximo V, Magalhaes J, Salvatore G, Santoro M, Bogdanova T, Tronko M, Abrosimov A, Jeremiah S, Thomas G, Williams D,

- Sobrinho-Simoes M (2004) BRAF Mutations Are Not a Major Event in Post-Chernobyl Childhood Thyroid Carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4267–4271
- Límanová Z (2006) Štítná žláza. Vlček P: *Nádory štítné žlázy*, 299–314. Galén, Praha
 - Liu RT, Chen YJ, Chou FF, Li CL, Wu WL, Tsai PC, Huang CC, Cheng JT (2005) No correlation between BRAFV600E mutation and clinicopathological features of papillary thyroid carcinomas in Taiwan. *Clin Endocrinol (Oxf)* 63:461–466
 - LiVolsi VA (1994) The pathology of autoimmune thyroid disease: a review. *Thyroid* 4:333–339
 - Lonn S, Bhatti P, Alexander BH, Pineda MA, Doody MM, Struewing JP, Sigurdson AJ (2007) Papillary Thyroid Cancer and Polymorphic Variants in TSHR- and RET-Related Genes: a Nested Case-Control Study within a Cohort of U.S. Radiologic Technologists. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:174–177
 - Lundgren CI, Hall P, Dickman PW, Zedenius J (2006) Clinically significant prognostic factors for differentiated thyroid carcinoma: a population-based, nested case-control study. *Cancer* 106:524–531
 - Lupi C, Giannini R, Ugolini C, Proietti A, Berti P, Minuto M, Materazzi G, Elisei R, Santoro M, Miccoli P, Basolo F (2007) Association of BRAF V600E Mutation with Poor Clinicopathological Outcomes in 500 Consecutive Cases of Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 92:4085–4090
 - Malchoff CD, Malchoff DM (2006) Familial nonmedullary thyroid carcinoma. *Cancer Control* 13:106–110
 - Malchoff CD, Sarfarazi M, Tendler B, Forouhar F, Whalen G, Joshi V, Arnold A, Malchoff DM (2000) Papillary Thyroid Carcinoma Associated with Papillary Renal Neoplasia: Genetic Linkage Analysis of a Distinct Heritable Tumor Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1758–1764
 - Mansouri A, St-Onge L, Gruss P (1999) Role of Genes in Endoderm-derived Organs. *Trends Endocrinol Metab* 10:164–167
 - Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, Leite V (2002) Expression of PAX8-PPAR γ 1 Rearrangements in Both Follicular Thyroid Carcinomas and Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3947–3952
 - Mazzaferri EL, Jhiang SM (1994) Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med* 97:418–428
 - Mazzaferri EL, Kloos RT (2001) Current Approaches to Primary Therapy for Papillary and Follicular Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1447–1463
 - McKay JD, Lesueur F, Jonard L, Pastore A, Williamson J, Hoffman L, Burgess J, et al. (2001) Localization of a susceptibility gene for familial nonmedullary thyroid carcinoma to chromosome 2q21. *Am J Hum Genet* 69:440–446
 - McKay MM, Morrison DK (2007) Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 26:3113–3121
 - Mizuno T, Iwamoto KS, Kyoizumi S, Nagamura H, Shinohara T, Koyama K, Seyama T, Hamatani K (2000) Preferential induction of RET/PTC1 rearrangement by X-ray irradiation. *Oncogene* 19:438–443
 - Mizuno T, Kyoizumi S, Suzuki T, Iwamoto KS, Seyama T (1997) Continued expression of a tissue specific activated oncogene in the early steps of radiation-induced human thyroid carcinogenesis. *Oncogene* 15:1455–1460
 - Moreno Egea A, Rodriguez Gonzale JM, Sola Perez J, Soria Cogollos T, Parrilla Paricio P (1993) Prognostic value of the tall cell variety of papillary cancer of the thyroid. *Eur J Surg Oncol* 19:517–521

- Motoi N, Sakamoto A, Yamochi T, Horiuchi H, Motoi T, Machinami R (2000) Role of ras mutation in the progression of thyroid carcinoma of follicular epithelial origin. *Pathol Res Pract* 196:1–7
- Murakumo Y, Jijiwa M, Asai N, Ichihara M, Takahashi M (2006) RET and neuroendocrine tumors. *Pituitary* 9:179–192
- Murbeth S, Rousarova M, Scherb H, Lengfelder E (2004) Thyroid cancer has increased in the adult populations of countries moderately affected by Chernobyl fallout. *Med Sci Monit* 10:300–306
- Namba H, Gutman RA, Matsuo K, Alvarez A, Fagin JA (1990a) H-Ras Protooncogene Mutations in Human Thyroid Neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 71:223–229
- Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, Ohtsuru A, Saenko VA, Kanematsu T, Yamashita S (2003) Clinical Implication of Hot Spot BRAF Mutation, V599E, in Papillary Thyroid Cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4393–4397
- Namba H, Rubin SA, Fagin JA (1990b) Point Mutations of Ras Oncogenes are an Early Event in Thyroid Tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 4:1474–1479
- Negri E, Dal Maso L, Ron E, La Vecchia C, Mark SD, Preston-Martin S, McTiernan A, Kolonel L, Yoshimoto Y, Jin F, Wingren G, Rosaria Galanti M, Hardell L, Glatte E, Lund E, Levi F, Linos D, Braga C, Franceschi S (1999) A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. II. Menstrual and reproductive factors. *Cancer Causes Control* 10:143–155
- Nikiforov YE (2002) RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocr Pathol* 13:3–16
- Nikiforov YE (2006) Radiation-induced thyroid cancer: what we have learned from chernobyl. *Endocr Pathol* 17:307–317
- Nikiforov YE, Biddinger PW, Thompson LD (2009) Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid. Lippincott Williams & Wilkins:448
- Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, Monforte-Munoz H, Fagin JA (1997) Distinct Pattern of ret Oncogene Rearrangements in Morphological Variants of Radiation-induced and Sporadic Thyroid Papillary Carcinomas in Children. *Cancer Res* 57:1690–1694
- Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, Kroll TG, Nikiforov YE (2002) PAX8-PPAR γ rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol* 26:1016–1023
- Nikiforova MN, Ciampi R, Salvatore G, Santoro M, Gandhi M, Knauf JA, Thomas GA, Jeremiah S, Bogdanova TI, Tronko MD, Fagin JA, Nikiforov YE (2004) Low prevalence of BRAF mutations in radiation-induced thyroid tumors in contrast to sporadic papillary carcinomas. *Cancer Lett* 209:1–6
- Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Fagin JA, Nikiforov YE (2003a) BRAF Mutations in Thyroid Tumors Are Restricted to Papillary Carcinomas and Anaplastic or Poorly Differentiated Carcinomas Arising from Papillary Carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5399–5404
- Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW, II, Tallini G, Kroll TG, Nikiforov YE (2003b) RAS Point Mutations and PAX8-PPAR γ Rearrangement in Thyroid Tumors: Evidence for Distinct Molecular Pathways in Thyroid Follicular Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2318–2326

- Nikiforova MN, Stringer JR, Blough R, Medvedovic M, Fagin JA, Nikiforov YE (2000) Proximity of Chromosomal Loci That Participate in Radiation-Induced Rearrangements in Human Cells. *Science* 290:138–141
- Oler G, Cerutti JM (2009) High prevalence of BRAF mutation in a Brazilian cohort of patients with sporadic papillary thyroid carcinomas: correlation with more aggressive phenotype and decreased expression of iodide-metabolizing genes. *Cancer* 115:972–980
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55:74–108
- Pasca di Magliano M, Di Lauro R, Zannini M (2000) Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation. *PNAS* 97:13144–13149
- Patel SG, Shah JP (2005) TNM Staging of Cancers of the Head and Neck: Striving for Uniformity Among Diversity. *CA Cancer J Clin* 55:242–258
- Peterka M, Peterkova R, Likovsky Z (2007) Chernobyl: relationship between the number of missing newborn boys and the level of radiation in the Czech regions. *Environ Health Perspect* 115:1801–1806
- Peyssonnaud C, Eychene A (2001) The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell* 93:53–62
- Pierotti MA, Bongarzone I, Borello MG, Greco A, Pilotti S, Sozzi G (1996) Cytogenetics and molecular genetics of carcinomas arising from thyroid epithelial follicular cells. *Genes Chromosomes Cancer* 16:1–14
- Pierotti MA, Santoro M, Jenkins RB, Sozzi G, Bongarzone I, Grieco M, Monzini N, Miozzo M, Herrmann MA, Fusco A, Hay ID, Porta GD, Vecchio G (1992) Characterization of an Inversion on the Long Arm of Chromosome 10 Juxtaposing D10S170 and RET and Creating the Oncogenic Sequence RET/PTC. *PNAS* 89:1616–1620
- Plail RO, Bussey HJ, Glazer G, Thomson JP (1987) Adenomatous polyposis: an association with carcinoma of the thyroid. *Br J Surg* 74:377–380
- Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P, Kallioniemi O, Hayward NK, Trent JM, Meltzer PS (2003) High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 33:19–20
- Pollock PM, Meltzer PS (2002) A genome-based strategy uncovers frequent BRAF mutations in melanoma. *Cancer Cell* 2:5
- Powell N, Jeremiah S, Morishita M, Dudley E, Bethel J, Bogdanova T, Tronko M, Thomas G (2005) Frequency of BRAF T1796A mutation in papillary thyroid carcinoma relates to age of patient at diagnosis and not to radiation exposure. *J Pathol* 205:558–564
- Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, Lengfelder E, Beimfohr C, Hoelzel D, Klugbauer S (2000) Pattern of Radiation-induced RET and NTRK1 Rearrangements in 191 Post-Chernobyl Papillary Thyroid Carcinomas: Biological, Phenotypic, and Clinical Implications. *Clin Cancer Res* 6:1093–1103
- Riesco-Eizaguirre G, Gutierrez-Martinez P, Garcia-Cabezas MA, Nistal M, Santisteban P (2006) The oncogene BRAFV600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane. *Endocr Relat Cancer* 13:257–269
- Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P (2007) New insights in thyroid follicular cell biology and its impact in thyroid cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 14:957–977

- Ron E, Lubin JH, Shore RE, Mabuchi K, Modan B, Pottern LM, Schneider AB, Tucker MA, Boice JD (1995) Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies. *Radiat Res* 141:259–277
- Roti E, degli Uberti EC, Bondanelli M, Braverman LE (2008) Thyroid papillary microcarcinoma: a descriptive and meta-analysis study. *Eur J Endocrinol* 159:659–673
- Saad AG, Kumar S, Ron E, Lubin JH, Stanek J, Bove KE, Nikiforov YE (2006) Proliferative Activity of Human Thyroid Cells in Various Age Groups and Its Correlation with the Risk of Thyroid Cancer after Radiation Exposure. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2672–2677
- Salvatore G, Giannini R, Faviana P, Caleo A, Migliaccio I, Fagin JA, Nikiforov YE, Troncone G, Palombini L, Basolo F, Santoro M (2004) Analysis of BRAF Point Mutation and RET/PTC Rearrangement Refines the Fine-Needle Aspiration Diagnosis of Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 89:5175–5180
- Salvesen H, Njolstad PR, Akslen LA, Albrektsen G, Soreide O, Varhaug JE (1992) Papillary thyroid carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors including an evaluation of the p-TNM staging system. *Eur J Surg* 158:583–589
- Santoro M, Dathan NA, Berlingieri MT, Bongarzone I, Paulin C, Grieco M, Pierotti MA, Vecchio G, Fusco A (1994) Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. *Oncogene* 9:509–516
- Sathyan KM, Nalinakumari KR, Abraham T, Kannan S (2006) Influence of single nucleotide polymorphisms in H-Ras and cyclin D1 genes on oral cancer susceptibility. *Oral Oncol* 42:607–613
- Shaha AR, Shah JP, Loree TR (1996) Risk group stratification and prognostic factors in papillary carcinoma of thyroid. *Ann Surg Oncol* 3:534–538
- Shi Y, Zou M, Schmidt H, Juhasz F, Stensky V, Robb D, Farid NR (1991) High Rates of ras Codon 61 Mutation in Thyroid Tumors in an Iodide-deficient Area. *Cancer Res* 51:2690–2693
- Schneider AB, Ron E, Lubin J, Stovall M, Gierlowski TC (1993) Dose-response relationships for radiation-induced thyroid cancer and thyroid nodules: evidence for the prolonged effects of radiation on the thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 77:362–369
- Sigurdson AJ, Land CE, Bhatti P, Pineda M, Brenner A, Carr Z, Gusev BI, Zhumadilov Z, Simon SL, Bouville A, Rutter JL, Ron E, Struwing JP (2009) Thyroid nodules, polymorphic variants in DNA repair and RET-related genes, and interaction with ionizing radiation exposure from nuclear tests in Kazakhstan. *Radiat Res* 171:77–88
- Smida J, Salassidis K, Hieber L, Zitzelsberger H, Kellerer AM, Demidchik EP, Negele T, Spelsberg F, Lengfelder E, Werner M, Bauchinger M (1999) Distinct frequency of ret rearrangements in papillary thyroid carcinomas of children and adults from Belarus. *Int J Cancer* 80:32–38
- Soares P, Fonseca E, Wynford-Thomas D, Sobrinho-Simoes M (1998) Sporadic ret-rearranged papillary carcinoma of the thyroid: a subset of slow growing, less aggressive thyroid neoplasms? *J Pathol* 185:71–78
- Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, Maximo V, Botelho T, Seruca R, Sobrinho-Simoes M (2003) BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 22:4578–4580

- Stephens LA, Powell NG, Grubb J, Jeremiah SJ, Bethel JA, Demidchik EP, Bogdanova TI, Tronko MD, Thomas GA (2005) Investigation of loss of heterozygosity and SNP frequencies in the RET gene in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 15:100–104
- Stephens M, Donnelly P (2003) A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 73:1162–1169
- Strate SM, Lee EL, Childers JH (1984) Occult papillary carcinoma of the thyroid with distant metastases. *Cancer* 54:1093–1100
- Sturgis CD, Caraway NP, Johnston DA, Sherman SI, Kidd L, Katz RL (1999) Image analysis of papillary thyroid carcinoma fine-needle aspirates: significant association between aneuploidy and death from disease. *Cancer* 87:155–160
- Sugg SL, Ezzat S, Rosen IB, Freeman JL, Asa SL (1998) Distinct Multiple RET/PTC Gene Rearrangements in Multifocal Papillary Thyroid Neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4116–4122
- Sugg SL, Ezzat S, Zheng L, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL (1999) Oncogene profile of papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 125:46–52
- Sugg SL, Zheng L, Rosen IB, Freeman JL, Ezzat S, Asa SL (1996) ret/PTC-1, -2, and -3 oncogene rearrangements in human thyroid carcinomas: implications for metastatic potential? *J Clin Endocrinol Metab* 81:3360–3365
- Suchy B, Waldmann V, Klugbauer S, Rabes HM (1998) Absence of RAS and p53 mutations in thyroid carcinomas of children after Chernobyl in contrast to adult thyroid tumours. *Br J Cancer* 77:952–955
- Suster S (2006) Thyroid tumors with a follicular growth pattern: problems in differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 130:984–988
- Tallini G, Asa SL (2001) RET oncogene activation in papillary thyroid carcinoma. *Adv Anat Pathol* 8:345–354
- Tallini G, Santoro M, Helie M, Carlomagno F, Salvatore G, Chiappetta G, Carcangiu ML, Fusco A (1998) RET/PTC oncogene activation defines a subset of papillary thyroid carcinomas lacking evidence of progression to poorly differentiated or undifferentiated tumor phenotypes. *Clin Cancer Res* 4:287–294
- Thomas GA, Bunnell H, Cook HA, Williams ED, Nerovnya A, Cherstvoy ED, Tronko ND, Bogdanova TI, Chiappetta G, Viglietto G, Pentimalli F, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Vecchio G (1999) 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* 84:4232–4238
- Tronko MD, Bogdanova TI, Komissarenko IV, Epstein OV, Oliynyk V, Kovalenko A, Likhtarev IA, Kairo I, Peters SB, LiVolsi VA (1999) Thyroid carcinoma in children and adolescents in Ukraine after the Chernobyl nuclear accident: statistical data and clinicomorphologic characteristics. *Cancer* 86:149–156
- Trovisco V, Soares P, Preto A, de Castro IV, Lima J, Castro P, Maximo V, Botelho T, Moreira S, Meireles AM, Magalhaes J, Abrosimov A, Cameselle-Teijeir J, Sobrinho-Simoes M (2005a) Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness. *Virchows Arch* 446:589–595
- Trovisco V, Soares P, Soares R, Magalhaes J, Sa-Couto P, Sobrinho-Simoes M (2005b) A new BRAF gene mutation detected in a case of a solid variant of papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol* 36:694–697

- Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, Maximo V, Silva P, Magalhaes J, Abrosimov A, Guiu XM, Sobrinho-Simoes M (2004) BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *J Pathol* 202:247–251
- Trygg J, Holmes E, Lundstedt T (2007) Chemometrics in metabonomics. *J Proteome Res* 6:469–479
- Tubiana M, Schlumberger M, Rougier P, Laplanche A, Benhamou E, Gardet P, Caillou B, Travagli JP, Parmentier C (1985) Long-term results and prognostic factors in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Cancer* 55:794–804
- Uchino S, Noguchi S, Kawamoto H, Yamashita H, Watanabe S, Yamashita H, Shuto S (2002) Familial nonmedullary thyroid carcinoma characterized by multifocality and a high recurrence rate in a large study population. *World J Surg* 26:897–902
- Vasko V, Ferrand M, Di Cristofaro J, Carayon P, Henry JF, de Micco C (2003) Specific Pattern of RAS Oncogene Mutations in Follicular Thyroid Tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2745–2752
- Venkatesh YS, Ordonez NG, Schultz PN, Hickey RC, Goepfert H, Samaan NA (1990) Anaplastic carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 121 cases. *Cancer* 66:321–330
- Walker RP, Paloyan E (1990) The relationship between Hashimoto's thyroiditis, thyroid neoplasia, and primary hyperparathyroidism. *Otolaryngol Clin North Am* 23:291–302
- Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R (2004) Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116:855–867
- White ML, Gauger PG, Doherty GM (2007) Central lymph node dissection in differentiated thyroid cancer. *World J Surg* 31:895–904
- Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, et al. (2004) BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the RAF/MEK/ERK Pathway and Receptor Tyrosine Kinases Involved in Tumor Progression and Angiogenesis. *Cancer Res* 64:7099–7109
- Williams D (2002) Cancer after nuclear fallout: lessons from the Chernobyl accident. *Nat Rev Cancer* 2:543–549
- Williams ED (1995) Mechanisms and pathogenesis of thyroid cancer in animals and man. *Mutat Res* 333:123–129
- Williams ED, Doniach I, Bjarnason O, Michie W (1977) Thyroid cancer in an iodide rich area: a histopathological study. *Cancer* 39:215–222
- www.svod.cz
- Xing M (2007) BRAF Mutation in Papillary Thyroid Cancer: Pathogenic Role, Molecular Bases, and Clinical Implications. *Endocr Rev* 28:742–762
- Xing M, Vasko V, Tallini G, Larin A, Wu G, Udelsman R, Ringel MD, Ladenson PW, Sidransky D (2004) BRAF T1796A Transversion Mutation in Various Thyroid Neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1365–1368
- Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, Carson KA, Vasko V, Larin A, Tallini G, Tolaney S, Holt EH, Hui P, Umbricht CB, Basaria S, Ewertz M, Tufano AP, Califano JA, Ringel MD, Zeiger MA, Sidransky D, Ladenson PW (2005) BRAF Mutation Predicts a Poorer Clinical Prognosis for Papillary Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6373–6379

- Xu X, Quiros RM, Gattuso P, Ain KB, Prinz RA (2003) High Prevalence of BRAF Gene Mutation in Papillary Thyroid Carcinomas and Thyroid Tumor Cell Lines. *Cancer Res* 63:4561–4567
- Yeh S, Chang C (1996) Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *PNAS* 93:5517–5521
- Zhang Y, Jin M, Liu B, Ma X, Yao K, Li Q, Chen K (2008) Association between H-RAS T81C genetic polymorphism and gastrointestinal cancer risk: a population based case-control study in China. *BMC Cancer* 8:256
- Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE (2003) Molecular Profile and Clinical-Pathologic Features of the Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: An Unusually High Prevalence of ras Mutations. *Am J Clin Pathol* 120:71–77

Seznam použitých zkratek

AJCC	<i>American Joint Commission on Cancer</i>
AKAP9	gen kódující A-kinázový kotvící protein 9, <i>A-kinase anchor protein 9</i>
APC	gen familiární adenomatózní polypózy, <i>adenomatous polyposis coli</i>
ATC	anaplastický karcinom, <i>anaplastic thyroid carcinoma</i>
ATP	adenosin trifosfát
BRAF	proto-onkogen, <i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
CCDC6	<i>coiled-coil domain containing gene 6</i>
cDNA	komplementární DNA, <i>complementaryDNA</i>
CI	konfidenční interval, <i>confidence interval</i>
CT	počítačová tomografie
DNA	deoxyribonukleová kyselina, <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	deoxynucleotid trifosfát
DTC	diferencované karcinomy štítné žlázy, <i>differentiated thyroid carcinoma</i>
EC	extracelulární doména <i>RET</i> genu
ELE1	gen kódující transkripční koaktivátor androgenního receptoru
ERK	MAPK 1, mitogen aktivující proteinkináza 1, <i>mitogen-activated protein kinase1</i>
FAP	familiární adenomatózní polypóza
FNAB	aspirační biopsie tenkou jehlou, <i>fine-needle aspiration biopsy</i>
FTA	folikulární adenom štítné žlázy, <i>follicular thyroid adenoma</i>
FTC	folikulární karcinom štítné žlázy, <i>follicular thyroid carcinoma</i>
FV	folikulární varianta PTC
GDNF	nervový růstový faktor, <i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GDP	guanosindifosfát
GFR α	receptor pro GDNF, <i>GDNF family receptor alfa</i>
GTP	guanosintrifosfát
HRM	analýza <i>High Resolution Melting</i>
MAPK	proteinkináza aktivovaná mitogeny, <i>mitogen-associated protein kinase</i>
MEK	MAPKK 1, mitogen aktivující proteinkináza kináza 1, <i>mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
MEN	mnohočetná endokrinní neoplazie

MIBI	methoxyisobutylisonitril
MTC	medulární karcinom, <i>medullary thyroid carcinoma</i>
NGA	nervový růstový faktor
NIS	natrium-jodidový symportér, <i>Sodium Iodide Symporter</i>
NTRK1	receptor pro nervový růstový faktor, <i>neurotrophin tyrosine kinase receptor 1</i>
OR	podíl šancí, pravděpodobnost výskytu jevu vůči jeho nevýskytu, <i>odds ratio</i>
PAX8	transkripční faktor, <i>paired box gene 8</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDC	špatně diferencované karcinomy, <i>poorly differentiated carcinoma</i>
PPAR γ	receptor aktivovaný peroxizomovými proliferátory, <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PTC	papilární karcinom štítné žlázy, <i>papillary thyroid carcinoma</i>
RAS	gen kódující protein p21
RBD	RAS vázající doména, <i>RAS binding domain</i>
RET	proto-onkogen, <i>rearranged during transfection</i>
RET/PTC	fúzní gen vzniklý spojením RET genu s jiným genem
RFG	RET fúzní gen
RNA	ribonukleová kyselina, <i>ribonucleic acid</i>
SNP	jednonukleotidový polymorfismus, <i>single nucleotide polymorphisms</i>
TAG	Trk aktivační gen
TFG	Trk fúzní gen
TK	tyrozinkinázová doména RET genu
TNM	systém klasifikace nádorů, <i>tumor-node-metastasis</i>
TPM3	gen pro nesvalový tropomyosin
TPR	cytoskeletární protein, <i>translocated promotor region</i>
TSH	tyreotropní hormon
TTE	totální thyreoidektomie
UICC	<i>International Union Against Cancer (Union Internationale Contre le Cancer)</i>
USG	ultrasonografie
WHO	Světová zdravotnická organizace, <i>World Health Organisation</i>

Seznam obrázků

Obr. 1	Histologie normálních folikulů štítné žlázy.....	7
Obr. 2	Vývoj incidence nádorů štítné žlázy.....	9
Obr. 3	Typická papilární struktura.....	13
Obr. 4	Typické jaderné znaky PTC.....	14
Obr. 5	Folikulární varianta PTC.....	15
Obr. 6	Genetické změny u PTC a jejich umístění v signalizační dráze.....	19
Obr. 7	Schéma paracentrické inverze vedoucí ke vzniku fúzní formy <i>RET/PTC1</i>	21
Obr. 8	Genotypizace polymorfismu A432A (G/A) pomocí Real Time PCR.....	40
Obr. 9	Zastoupení polymorfismu A432A (G/A) u zdravých kontrol a pacientů s <i>RET/PTC</i> přeskupením a bez této alterace.....	48
Obr. 10	Zastoupení polymorfismu L769L (T/G) u zdravých kontrol a pacientů s <i>RET/PTC</i> přeskupením a bez této alterace.....	48
Obr. 11	Zastoupení jednotlivých haplotypů u zdravých kontrol, pacientů a ve skupině pacientů v závislosti na pohlaví a přítomnosti <i>RET/PTC</i> přeskupení.....	49
Obr. 12	Zastoupení jednotlivých haplotypů u mužů a žen s PTC v závislosti na přítomnosti <i>RET/PTC</i> přeskupení.....	50
Obr. 13	O2PLS model vztahu BRAF mutace s klinicko-patologickými parametry	58
Obr. 14	Procentuální výskyt BRAF mutace v jednotlivých obdobích.....	60
Obr. 15	Medián věku pacientů v jednotlivých obdobích před a po černobylské havárii.....	60
Obr. 16	Sekvenace 2. exonu N-RAS genu – mutace Q61R.....	66
Obr. 17	Sekvenace 1. exonu H-RAS genu – polymorfismus H27H.....	66
Obr. 18	Sekvenace 1. exonu H-RAS genu – polymorfismus P42P.....	66
Obr. 19	Sekvenace 1. exonu K-RAS genu – substitucí Q3K.....	67
Obr. 20	Sekvenace 2. exonu K-RAS genu – substituce P35S.....	67
Obr. 21	Sekvenace 2. exonu K-RAS genu – substituce T50I.....	67

Obr. 22	Sekvence 2. exonu K-RAS genu – tichá mutace Y40Y.....	68
Obr. 23	Sekvence 2. exonu K-RAS genu – tichá mutace L56L.....	68
Obr. 24	Sekvence 2. exonu K-RAS genu s mutacemi G60G a Q61K.....	68

Seznam tabulek

Tabulka 1	TNM klasifikace.....	15
Tabulka 2	Stadia PTC dle TNM klasifikace.....	18
Tabulka 3	Přehled RET/PTC přeskupení u PTC.....	23
Tabulka 4	Stanovované polymorfismy <i>RET</i> proto-onkogenu.....	37
Tabulka 5	Optimalizace reakčních podmínek primerů určených pro detekci <i>RAS</i> mutací pomocí HRM analýzy.....	38
Tabulka 6	Použité primery a reakční podmínky PCR reakcí pro detekci mutací v <i>BRAF</i> a <i>RAS</i> genech pomocí sekvenace.....	39
Tabulka 7	Použité primery a reakční podmínky PCR reakcí pro detekci exprese kontrolních genů a <i>RET/PTC</i> přeskupení na agarózovém gelu.....	43
Tabulka 8	Použité primery, sondy a reakční podmínky pro detekci exprese kontrolních genů a <i>RET/PTC</i> přeskupení pomocí Real Time PCR.....	44
Tabulka 9	Korelace <i>RET/PTC</i> přeskupení s klinicko-patologickými parametry...	47
Tabulka 10	Frekvence minoritních alel polymorfismů u pacientů s PTC a u zdravých kontrol.....	48
Tabulka 11	Frekvence minoritních alel polymorfismů u pacientů s PTC v závislosti na přítomnosti <i>RET/PTC</i> přeskupení.....	48
Tabulka 12	Korelace <i>BRAF</i> mutace s klinicko-patologickými parametry.....	57
Tabulka 13	Společný výskyt <i>BRAF</i> mutace a <i>RET/PTC</i> přeskupení – výsledky molekulárně-genetické analýzy.....	59
Tabulka 14	Společný výskyt <i>BRAF</i> mutace a <i>RET/PTC</i> přeskupení – klinicko-patologická data.....	59
Tabulka 15	Výsledky detekce mutací v <i>RAS</i> genech.....	69

Publikační a prezentační aktivita

V této části je uveden seznam grantové, publikační a prezentační činnosti po dobu doktorského studia (2007–2010).

Spoluúčast na grantových projektech

- Hlavní genetické příčiny a modifikující faktory v patogenezi nádorů štítné žlázy. 2007–2009, IGA MZ ČR NR/9165-3
- Incidence of metabolic syndrome – its prevention by timely diagnostics and treatment of child obesity. 2008–2011, CZ0123, Evropský rámcový program – projekt COPAT (Childhood Obesity Prevalence And Treatment)

Publikace v impaktovaných časopisech

- Dvorakova S., E. Vaclavikova, V. Sykorova, J. Vcelak, Z. Novak, J. Dusikova, A. Ryska, J. Laco, J. Cap, D. Kodetova, R. Kodet, L. Krskova, P. Vlcek, J. Astl, D. Vesely, B. Bendlova (2008): Somatic Mutations in the *RET* proto-oncogene in Sporadic Medullary Thyroid Carcinomas. *Mol Cell Endocrinol.* 284 (1–2): 21–27. IF = 3,611
- Vaclavikova E., Dvorakova S., Sykorova V., Bilek R., Dvorakova K., Vlcek P., Skaba R., Zelinka T., Bendlova B. (2009): *RET* mutation – Tyr791Phe – the genetic cause of different diseases derived from neural crest. *Endocrine.* 36(3): 419–424. IF = 1,842
- Sýkorová V., Dvořáková Š., Ryška A., Laco J., Kodetová D., Kodet R., Cibula A., Dušková J., Hlobílková A., Astl J., Veselý D., Betka J., Hoch Jiří, Smutný S., Čáp J., Vlček P., Bendlová B. (2009): *BRAF*^{V600E} Mutation in the Pathogenesis of a Large Series of Papillary Thyroid Carcinoma in Czech Republic. *J Endocrinol Invest.* [Epub ahead of print]. IF = 1,888

Prezentace na zahraničních konferencích

- Sykorova V., Dvorakova S., Vaclavikova E., Ryska A., Kodetova D., Astl J., Duskova J., Smutny S., Vlcek P., Bendlova B. (2008): Correlation between *BRAF* V600E mutation and clinical and pathological features of papillary thyroid carcinomas in the Czech Republic. 33rd Annual Meeting of the European Thyroid Association, Thessaloniki-Chalkidiki, Greece, September 20–24, 2008. *Hormones*, 7 (suppl. 1):P020:48 (presented poster)
- Vaclavikova E., Dvorakova S., Sykorova V., Strakova V., Vlcek P., Bendlova B. (2008): Screening of *RET* proto-oncogene polymorphisms in patients with medullary thyroid carcinoma. 33rd Annual Meeting of the European Thyroid Association, Thessaloniki-Chalkidiki, Greece, September 20–24, 2008. *Hormones*, 7 (suppl. 1):P122:95 (presented poster)
- Sýkorová V., Václavíková E., Dvořáková Š., Kodetová D., Astl J., Betka J., Ryška A., Smutný S., Vlček P., Bendlová B. (2008): Asociace polymorfismu A432A v *RET* genu s *RET/PTC* přeskupením u papilárního karcinomu štítné žlázy. XXXI. Endokrinologické dni, Štrbské Pleso, 2.–4.10.2008. Sborník abstrakt, A31:91. (prezentovaný poster)
- Václavíková E., Dvořáková Š., Sýkorová V., Vlček P., Bendlová B. (2008): Screening polymorfismů *RET* proto-onkogenu u pacientů s medulárním karcinomem štítné žlázy. XXXI. Endokrinologické dni, Štrbské Pleso, 2.–4.10.2008. Sborník abstrakt, A42:102. (prezentovaný poster)
- Sykorova V., Vaclavikova E., Dvorakova S., Kodetova D., Kodet R., Astl J., Vesely D., Betka J., Hoch J., Smutny S., Vlcek P., Bendlova B. (2009): Association of A432A *RET* polymorphism with *RET/PTC* in patients with papillary thyroid carcinoma. 34th Annual meeting of the European Thyroid Association (ETA), Lisbon, Portugal, Sept 5–9, 2009. *Acta Med Port* 22 (1):P082:76 (presented poster)
- Vaclavikova E., Sykorova V., Dvorakova S., Dvorakova K., Holub V., Novak Z., Vlcek P., Bendlova B. (2009): Molecular genetic analysis of medullary and papillary thyroid carcinomas – unusual cases. 34th Annual meeting of the European Thyroid Association (ETA), Lisbon, Portugal, Sept 5–9, 2009. *Acta Med Port* 22 (1):P080:75 (presented poster)

- Sykorova V., Vaclavikova E., Dvorakova S., Ryska A., Kodetova D., Vlcek P., Bendlova B. (2010) Polymorphisms in *RET* gene are associated with *RET/PTC* rearrangements in papillary thyroid carcinoma (PTC). 12th ECE 2010, Prague, April 24–28, 2010. Přijat abstrakt.
- Vaclavikova E., Sykorova V., Dvorakova S., Vlcek P., Bendlova B. (2010): Intronic polymorphism IVS14-24G/A of the *RET* proto-oncogene seems to be protective for sporadic medullary thyroid carcinoma development. 12th ECE 2010, Prague, April 24–8, 2010. Přijat abstrakt.

Prezentace na domácích konferencích

- Bendlová B., Dvořáková Š., Václavíková E., Sýkorová V. (2007): Genetické příčiny nádorů štítné žlázy. XXVIII. Imunoanalytické dny, České Budějovice, 1.–3.4.2007. Sborník abstrakt:O-14:25 (vyzvaná přednáška)
- Sýkorová V., Dvořáková Š., Laco J., Ryška A., Kodetová D., Astl J., Veselý D., Novák Z., Dušková J., Bendlová B. (2007): Diagnostika genetických změn u papilárního karcinomu štítné žlázy. XXX. Endokrinologické dny s mezinárodní účastí, Špindlerův Mlýn, 4.–6.10.2007. Sborník:17 (panelová diskuse)
- Sýkorová V., Dvořáková Š., Laco J., Ryška A., Kodetová D., Astl J., Veselý D., Novák Z., Dušková J., Bendlová B. (2008): Diagnostika genetických změn u papilárního karcinomu štítné žlázy. Konference DNA analýza V, Novotel Praha, 4.–5.6.2008 (vyzvaná přednáška)
- Bendlová B., Václavíková E., Sýkorová V., Vlček P., Dvořáková Š. (2008): 15leté zkušenosti s molekulárně genetickou diagnostikou nádorů štítné žlázy. XII. Onkogenetický den SLG ČLS JEP, Lékařský dům, Praha, 12.6.2008 (vyzvaná přednáška)
- Bendlová B., Václavíková E., Vlček P., Sýkorová V., Dvořáková Š. (2008): 15leté zkušenosti s molekulárně genetickou diagnostikou nádorů štítné žlázy. Onemocnění štítné žlázy a slinných žláz. Diagnostika, léčba a komplikace. VIII. Odborný celodenní seminář ORL oddělení Nemocnice Na Homolce, Praha, 6.11.2008 (vyzvaná přednáška)

- Sýkorová V., Dvořáková Š., Ryška A., Včelák J., Václavíková E., Laco J., Kodetová D., Kodet R., Cibula D., Dušková J., Hlobilková A., Astl J., Veselý D., Betka J., Hoch J., Smutný S., Čáp J., Vlček P., Novák Z., Bendlová B. (2009): Asociace polymorfismů v *RET* genu se vznikem *RET/PTC* přeskupení u papilárního karcinomu štítné žlázy. XXXII. Endokrinologické dny, Český Krumlov, 24.–26. září 2009. Sborník abstrakt:130–131 (diskutovaný poster)
- Václavíková E., Sýkorová V., Dvořáková Š., Dvořáková K., Novák Z., Holub V., Vlček P., Kodetová D., Bendlová B. (2009): Molekulárně genetická analýza medulárního a papilárního karcinomu štítné žlázy: neobvyklé případy. XXXII. Endokrinologické dny, Český Krumlov, 24.–26. září 2009. Sborník abstrakt:130–131 (diskutovaný poster)
- Sýkorová V. Genetické příčiny papilárního karcinomu štítné žlázy. Postgraduální kurz Vybrané problémy endokrinologie, Endokrinologický ústav, 19. dubna 2010 (vyzvaná přednáška)

Seznam příloh

V přílohách jsou zahrnuty všechny publikace, na kterých jsem se podílela během diplomové a disertační práce, a prezentační činnost po dobu doktorského studia.

Publikační činnost	Strana:
1. <u>Sýkorová V</u> , Dvořáková Š, Kodetová D, Astl J, Ryška A, Dušková J, Vlček P, Novák Z, Bendlová B 2007 Genetické příčiny vzniku papilárního karcinomu štítné žlázy Diab Metab Endokrinol Výživa 1: 30-35.	101–106
2. Dvorakova S, Vaclavikova E, <u>Sykorova V</u> , Duskova J, Vlcek P, Ryska A, Novak Z, Bendlova B 2006 New multiple somatic mutations in the RET proto-oncogene associated with a sporadic medullary thyroid carcinoma. Thyroid 16: 311-316.	107–112
3. Bendlová B, Dvořáková S, Václavíková E, <u>Sýkorová V</u> , Vlček P, Škába R 2006 Nádory štítné žlázy a Hirschsprungova choroba: desetileté zkušenosti s molekulárně genetickou diagnostikou <i>RET</i> proto-okogenu. Vnitř Lek 52: 926-934.	113–121
4. Dvorakova S., E. Vaclavikova, <u>V. Sykorova</u> , J. Vcelak, Z. Novak, J. Duskova, A. Ryska, J. Laco, J. Cap, D. Kodetova, R. Kodet, L. Krskova, P. Vlcek, J. Astl, D. Vesely, B. Bendlova (2008): Somatic Mutations in the <i>RET</i> proto-oncogene in Sporadic Medullary Thyroid Carcinomas. Mol Cell Endocrinol. 284 (1–2): 21–27. IF = 3,611	122–129
5. Vaclavikova E., Dvorakova S., <u>Sykorova V.</u> , Bilek R., Dvorakova K., Vlcek P., Skaba R., Zelinka T., Bendlova B. (2009): <i>RET</i> mutation – Tyr791Phe – the genetic cause of different diseases derived from neural crest. Endocrine. 36(3): 419–424. IF = 1,842	130–135
6. <u>Sýkorová V.</u> , Dvořáková Š., Ryška A., Laco J., Kodetová D., Kodet R., Cibula A., Dušková J., Hlobílková A., Astl J., Veselý D., Betka J., Hoch Jiří, Smutný S., Čáp J., Vlček P., Bendlová B. (2009): <i>BRAF</i> ^{V600E} Mutation in the Pathogenesis of a Large Series of Papillary Thyroid Carcinoma in Czech Republic. J Endocrinol Invest. [Epub ahead of print]. IF = 1,888	136–157

Prezentační činnost

Strana:

7. Sýkorová V., Dvořáková Š., Laco J., Ryška A., Kodetová D., Astl J., Veselý D., Novák Z., Dušková J., Bendlová B. (2007): Diagnostika genetických změn u papilárního karcinomu štítné žlázy. XXX. Endokrinologické dny s mezinárodní účastí, Špindlerův Mlýn, 4.–6.10.2007. Sborník:17 (panelová diskuse) 158–160
8. Sýkorová V., Dvořáková Š., Laco J., Ryška A., Kodetová D., Astl J., Veselý D., Novák Z., Dušková J., Bendlová B. (2008): Diagnostika genetických změn u papilárního karcinomu štítné žlázy. Konference DNA analýza V, Novotel Praha, 4.–5.6.2008 (vyzvaná přednáška) 161
9. Sykorova V., Dvorakova S., Vaclavikova E., Ryska A., Kodetova D., Astl J., Duskova J., Smutny S., Vlcek P., Bendlova B. (2008): Correlation between *BRAF* V600E mutation and clinical and pathological features of papillary thyroid carcinomas in the Czech Republic. 33rd Annual Meeting of the European Thyroid Association, Thessaloniki-Chalkidiki, Greece, September 20–24, 2008. *Hormones*, 7 (suppl. 1): P020:48 (presented poster) 162–164
10. Sýkorová V., Václavíková E., Dvořáková Š., Kodetová D., Astl J., Betka J., Ryška A., Smutný S., Vlček P., Bendlová B. (2008): Asociace polymorfismu A432A v *RET* genu s *RET/PTC* přeskupením u papilárního karcinomu štítné žlázy. XXXI. Endokrinologické dny, Štrbské Pleso, 2.–4.10.2008. Sborník abstrakt, A31:91. (prezentovaný poster) 165–167
11. Sykorova V., Vaclavikova E., Dvorakova S., Kodetova D., Kodet R., Astl J., Vesely D., Betka J., Hoch J., Smutny S., Vlcek P., Bendlova B. (2009): Association of A432A *RET* polymorphism with *RET/PTC* in patients with papillary thyroid carcinoma. 34th Annual meeting of the European Thyroid Association (ETA), Lisbon, Portugal, Sept 5–9, 2009. *Acta Med Port* 22 (1):P082:76 (presented poster) 168–170
12. Sýkorová V., Dvořáková Š., Ryška A., Včelák J., Václavíková E., Laco J., Kodetová D., Kodet R., Cibula D., Dušková J., Hlobilková A., Astl J., Veselý D., Betka J., Hoch J., Smutný S., Čáp J., Vlček P., Novák Z., Bendlová B. 171–173

(2009): Asociace polymorfismů v *RET* genu se vznikem *RET/PTC* přeskupení u papilárního karcinomu štítné žlázy. XXXII. Endokrinologické dny, Český Krumlov, 24.–26. září 2009. Sborník abstrakt:130–131 (diskutovaný poster)

13. Sykorova V., Vaclavikova E., Dvorakova S., Ryska A., Kodetova D., Vlcek P., Bendlova B. (2010) Polymorphisms in *RET* gene are associated with *RET/PTC* rearrangements in papillary thyroid carcinoma (PTC). 12th ECE 2010, Prague, April 24–28, 2010. Přijat abstrakt. 174–175

PŘÍLOHY