

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta
Katedra antropologie a genetiky člověka

Vlasta Sýkorová

**Molekulárně – genetická analýza
papilárního karcinomu štítné žlázy**

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Běla Bendlová, CSc.
Garant: Doc. RNDr. Ivan Mazura, CSc.

Praha 2007

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Běly Bendlové, CSc. a konzultantky RNDr. Šárky Dvořákové, PhD. v Endokrinologickém ústavu v Praze a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze 3.května 2007

Podpis: 

Poděkování:

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala mé školitelce RNDr. Běle Bendlové, CSc. a mé konzultantce RNDr. Šárce Dvořákové, PhD. za předané zkušenosti, cenné rady, pomoc a podporu při vypracovávání této diplomové práce.

Poděkování patří i celému kolektivu Oddělení molekulární endokrinologie Endokrinologického ústavu za příjemné prostředí a pomoc při práci.

Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Zdeňku Novákovi, CSc., z Endokrinologickém ústavu, Doc. MUDr. Jaromíru Astlovi, CSc., a MUDr. Davidu Veselému z ORL kliniky FN Motol, prim. MUDr. Daniele Kodetové z Ústavu patologie a molekulární medicíny FN Motol, Doc. MUDr. Aleši Ryškovi, Ph.D., a MUDr. Janu Lacovi, Ph.D., z Fingerlandova ústavu patologie v Hradci Králové a Doc. MUDr. Jaroslavě Duškové, CSc., z Ústavu patologie 1.LF a VFN za vstřícnou spolupráci.

V neposlední řadě děkuji také své rodině za podporu a trpělivost během mého studia.

Seznam použitých zkratk

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>
ATP	adenosin trifosfát
BRAF	proto-onkogen, <i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
cDNA	komplementární DNA, <i>complementaryDNA</i>
CT	počítačová tomografie
DNA	deoxyribonukleová kyselina, <i>deoxyribonucleic acid</i>
DSV	difúzní sklerotizující varianta
EC	extracelulární doména
ELE1	gen kódující transkripční koaktivátor androgenního receptoru
ELKS	gen neznámé funkce
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>
FPTC	familiární papilární karcinom štítné žlázy
FTC	folikulární karcinom štítné žlázy
FV	folikulární varianta PTC
GDNF	nervový růstový faktor, <i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GFR α	receptor pro GDNF, <i>GDNF family receptor alfa</i>
GTP	guanosin trifosfát
HGF	hepatocytární růstový faktor, <i>hepatocyte growth factor</i>
HTIF	transkripční faktor, <i>human transcription intermediary factor</i>
KTN1	gen kódující kinetin
LOH	ztráta heterozygosity, <i>loss of heterozygosity</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
met	receptor pro hepatocytární růstový faktor
NGA	nervový růstový faktor

NIS	sodíko-jódidový symportér, <i>Sodium Iodide Symporter</i>
NMR	nukleární magnetická rezonance
NTRK1	receptor pro nervový růstový faktor, <i>neurotrophin tyrosine kinase receptor 1</i>
PAX8	transkripční faktor, <i>paired box gene 8</i>
PCM1	centrozomální protein
PPAR γ	receptor aktivovaný peroxizomovými proliferátory, <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PTC	papilární karcinom štítné žlázy
PTEN	tyrozin fosfatáza, <i>phosphatase and tensin homolog</i>
RAS	gen kódující protein p21
Rb	retinoblastom
RBD	RAS vázající doména, <i>RAS binding domain</i>
RET	proto-onkogen, <i>rearranged during transfection</i>
RET/PTC	fúzní gen vzniklý spojením <i>RET</i> genu s jiným genem
RFG	<i>RET</i> fúzní gen
R1 α	regulační podjednotka cAMP-dependentní proteinkinázy A
RNA	ribonukleová kyselina, <i>ribonucleic acid</i>
SF	rozptylovací faktor, <i>scatter factor</i>
SSCP	screeningová metoda, <i>single strand conformation polymorphism</i>
TAG	Trk aktivační gen
TFG	Trk fúzní gen
TK	tyrozinkinázová doména
TM	transmembránová doména
TNM	klasifikace nádorů, <i>tumor-node-metastasis</i>
TP53	gen kódující protein P53, <i>tumor protein p53</i>
TPM3	nesvalový tropomyosin
TPR	cytoskeletární protein, <i>translocated promotor region</i>
TSH	tyreotropní hormon

Seznam obrázků

Obr. 1 - Cytologický nález typický pro PTC	6
Obr. 2 - Genetické změny u PTC a jejich umístění v signalizační dráze	11
Obr. 3 - <i>RET</i> signalizační komplex a jeho aktivace	12
Obr. 4 - Schéma paracentrické inverze vedoucí ke vzniku fúzní formy <i>RET/PTC1</i>	14
Obr. 5 - Schéma reciproké translokace vedoucí ke vzniku fúzní formy <i>RET/PTC2</i>	15
Obr. 6 - Schématické znázornění <i>RET</i> proto-onkogenu a jeho fúzních genů <i>RET/PTC</i>	16
Obr. 7 - Funkce <i>BRAF</i> mutace v signální transdukční dráze	17
Obr. 8 - Schématické znázornění <i>NTRK1</i> proto-onkogenu a jeho onkogenních variant	19
Obr. 9 - Fotografie elektroforézy optimalizace PCR amplifikace genu <i>GAPDH</i>	46
Obr. 10 - Fotografie elektroforézy optimalizace PCR amplifikace genu <i>PAX8</i>	47
Obr. 11 - Fotografie elektroforézy optimalizace PCR pro TK a EC doménu <i>RET</i> genu	48
Obr. 12 - Fotografie elektroforézy optimalizace PCR amplifikace pro kalcitonin	48
Obr. 13 - Fotografie elektroforézy optimalizace PCR amplifikace pro <i>RET/PTC1</i>	49
Obr. 14 - Fotografie elektroforézy optimalizace PCR amplifikace pro <i>RET/PTC3</i>	49
Obr. 15 - Kvantifikace TK domény <i>RET</i> genu pomocí Real Time PCR	50
Obr. 16 - Analýza TK domény <i>RET</i> genu pomocí melting curve	51
Obr. 17 - Fotografie elektroforézy optimalizace PCR pro 15. exon <i>BRAF</i> genu	52
Obr. 18 - SSCP analýza <i>BRAF</i> proto-onkogenu při 7°C	53
Obr. 19 - SSCP analýza <i>BRAF</i> proto-onkogenu při 7°C	53
Obr. 20 - Sekvence <i>BRAF</i> genu pomocí gelové sekvenace	54
Obr. 21 - Sekvence <i>BRAF</i> mutace V600E pomocí kapilární sekvenace	54
Obr. 22 - Grafy závislosti velikosti primárního nádoru na výskytu <i>BRAF</i> mutace v období mezi roky 2001 – 2007	62
Obr. 23 - Grafy závislosti velikosti primárního nádoru na výskytu <i>BRAF</i> mutace ve všech obdobích	63
Obr. 24 - Grafy závislosti velikosti primárního nádoru na výskytu <i>BRAF</i> mutace	63

Seznam tabulek

Tab. 1 - Klasifikační systém TNM pro karcinomy štítné žlázy	7
Tab. 2 - Typy a počet vyšetřovaných vzorků	29
Tab. 3 - Přehled všech použitých primerů	37
Tab. 4 a, b - Přehled pacientů s RET/PTC přeskupením	56
Tab. 5 - Souhrn klinicko-patologických parametrů u pacientů s PTC a jejich závislosti na přítomnosti RET/PTC přeskupení (RET/PTC1, RET/PTC3 a RET/PTCX)	57
Tab. 6 - Výskyt RET/PTC přeskupení u jednotlivých histologických typů PTC	58
Tab. 7 - Věkové rozložení pacientů s RET/PTC přeskupením a bez něj	58
Tab. 8 - Souhrn klinicko-patologických parametrů a jejich závislost na BRAF mutaci	59
Tab. 9 – Věk pacientů s PTC v jednotlivých obdobích v závislosti na pohlaví	60
Tab. 10 - Výskyt BRAF mutace v jednotlivých obdobích	60
Tab. 11 - Věk pacientů s PTC v jednotlivých obdobích v závislosti na BRAF mutaci	61
Tab. 12 - Výskyt BRAF mutace v jednotlivých obdobích v závislosti na pohlaví	61
Tab. 13 - Velikost primárního nádoru v jednotlivých obdobích v závislosti na výskytu BRAF mutace	62
Tab. 14 - Výskyt BRAF mutace u nejčastějších histologických variant PTC	64

OBSAH:

1. Úvod	1
1.1 Karcinomy štítné žlázy	2
1.1.1 Patologie nádorového růstu	2
1.1.2 Typy karcinomů štítné žlázy	3
1.1.3 Patogenetické faktory	3
1.2 Papilární karcinom štítné žlázy	5
1.2.1 Diagnostika PTC	5
1.2.2 Terapie PTC	8
1.3 Genetická podstata PTC	10
1.3.1 <i>RET/PTC</i> přeskupení	12
1.3.2 <i>BRAF</i> mutace	17
1.3.3 <i>NTRK1</i> přeskupení	19
1.3.4 Amplifikace <i>met</i> proto-onkogenu	20
1.3.5 <i>AKAP9-BRAF</i> přeskupení	20
1.3.6 Další geny účastníci se onkogeneze PTC	21
1.3.7 Familiární PTC	22
1.3.8 Folikulární varianta PTC	23
2. Cíle diplomové práce	24
3. Materiál a metody	25
3.1 Seznam chemikálií a přístrojů	25
3.1.1 Chemikálie	25
3.1.2 Přístroje	27
3.2 Studované soubory pacientů	29
3.3 Izolace nukleových kyselin	30
3.3.1 Izolace DNA z parafinových bločků	30
3.3.1.1 Fenol - chloroformová izolace	30
3.3.1.2 Izolace pomocí kitu	31
3.3.2 Izolace DNA a RNA z čerstvých tkání a biopsií	32
3.3.2.1 Trizolová izolace	32
3.3.3 Izolace RNA z parafinových bločků	33
3.3.3.1 Izolace RNA pomocí kitu	33
3.3.3.2 Izolace RNA pomocí Trizolu	34

3.3.3.3 Fenol - chloroformová izolace RNA	34
3.3.3.4 Modifikovaná fenol - chloroformová izolace RNA	34
3.4 Měření koncentrace	35
3.5 Reverzní transkripce	35
3.6 PCR amplifikace	36
3.7 Elektroforéza	37
3.8 Detekce fúzních genů RET/PTC	38
3.8.1 Exprese kontrolních genů	38
3.8.2 Detekce fúzních forem RET genu	38
3.8.3 Real Time PCR	39
3.9 Detekce mutace V600E v BRAF genu	41
3.9.1 SSCP analýza	41
3.9.2 Sekvenace	42
3.9.2.1 Gelová sekvenace	42
3.9.2.2 Kapilární sekvenace	43
3.10 Statistika a vyhodnocení dat	44
3.10.1. Analýza výběru	45
3.10.1.1 Průzkumová analýza jednorozměrných dat EDA	45
3.10.1.2 Odhady míry polohy, rozptýlení a tvaru	45
3.10.2 Testování hypotéz	45
3.10.2.1 Mann-Whitneyův test	45
3.10.2.2 Fisherův přesný (exaktní) test	45
4. Výsledky	46
4.1 zavedení metodiky	46
4.1.1 Izolace nukleových kyselin	46
4.1.2 Optimalizace reakčních PCR podmínek pro kontrolní a fúzní geny RET/PTC1 a RET/PTC3	46
4.1.3 Detekce TK domény pomocí Real Time PCR	50
4.1.4 Optimalizace podmínek pro PCR BRAF genu	52
4.1.5 SSCP detekce	53
4.1.6 Přímá fluorescenční sekvenace	54
4.2 vyhodnocení	55
4.2.1 Kontrolní geny a RET/PTC přeskupení	55
4.2.2 BRAF V600E mutace	59

5. Diskuze	65
6. Závěr	70
7. Použitá literatura	71
8. Přílohy	81

1. ÚVOD

Štítná žláza (glandula thyreoidea) je žláza s vnitřní sekrecí tvořená dvěma laloky spojenými úzkým můstkem (isthmus). Někdy je vyvinut i rudimentální pyramidový lalok (lobus pyramidalis). Je umístěna v přední části krku v oblasti chrupavky štítné, před a po stranách průdušnice. Štítná žláza vzniká spojením dvou vývojově odlišných struktur: **folikulárních buněk**, vzniklých z primitivního laryngu a **parafolikulárních buněk** (C - buněk), vzniklých z 5. žaberní výchlípků.

Histologicky se skládá z folikulů, v jejichž centru je čirá viskózní tekutina (koloid), produkovaná folikulárními buňkami, které tvoří po obvodu koloidu jednovrstevný epitel. Nachází se zde především protein tyreoglobulin, který je prekurzorem tyroidálních hormonů (thyroxin a trijodthyronin) obsahujících jód. Hormony mají nepostradatelnou funkci v regulaci metabolismu. Jejich tvorba je řízena z předního laloku hypofýzy. Kolem folikulárních buněk jsou parafolikulární buňky produkující hormon kalcitonin, který ovlivňuje hospodaření s vápníkem.

Hlavní choroby štítné žlázy jsou struma, záněty (tyroiditidy), poruchy funkce (hypertyreóza, hypotyreóza) a karcinomy. Karcinomy štítné žlázy tvoří 1,3% všech malignit, ale představují více než 90% endokrinních tumorů. Ve věku 15-45 let patří mezi 5 nejčastějších karcinomů.

1.1 KARCIMOMY ŠTÍTNÉ ŽLÁZY

1.1.1 Patologie nádorového růstu

Nádor se histologicky skládá ze dvou složek - vlastního transformovaného parenchymu a netransformovaného stroma. Stroma slouží k výživě parenchymu a jako kostra pro uspořádání parenchymových buněk. Pro nádorový růst jsou důležité především stromální cévy, které jsou vstupní branou oběhu pro lymfatické i hematogenní metastazování. Nádorový parenchym je vlastní, trvale genotypově transformovanou složkou nádoru.

Nádory se dělí na nádory benigní a maligní. **Benigní** (nezhoubné) nádory nemají buněčné povrchy výrazně změněny oproti ostatním proliferujícím buňkám organismu. Buňky si zachovávají vzájemnou kohezitu a vztah ke stromatu, a proto je jejich růst pouze místně expanzivní, bez podstatného porušení okolních tkání. **Maligní** (zhoubné) nádory rostou vůči obklopující tkáni agresivně a jsou schopny diskontinuálního šíření (metastazování). Nádorové buňky nejsou schopné odpovídat na místní regulace, především díky ztrátě kontaktní inhibice. To vede k propagaci tkáňovými štěrbinami a představuje nižší stupeň agresivního růstu - **infiltrativní růst**. Vyšší formou agresivity nádorové buňky je **růst invazivní**. Je způsoben přítomností proteáz a enzymů štěpících kolagen, proteoglykany a glykosaminoglykany na povrchu nádorových buněk. To vede k destrukci bazálních membrán a okolních tkání. Je často provázen závažnými poruchami funkce postižené tkáně a krvácením z narušených cév.

K neregulovatelnému invazivnímu růstu přispívá vzájemná kohezita mezi maligními buňkami a změněná adhezita nádorových buněk ke tkáňovým membránám. Je to podmíněno poruchou mezibuněčných spojů v rámci změn buněčných povrchů a spojené s poruchami v systému adhezivních molekul typu kadherinů. Tyto změny vedou k získání větší motility nádorové buňky a tím usnadnění prostupu hostitelskou tkání.

Metastazování nádoru je vytváření dceřiných nádorových ložisek v místech vzdálených od primárního nádoru a bez morfologické souvislosti s ním. Tento proces se dělí do tří fází. První fází je uvolnění nádorových buněk z primárního nádoru histolytickými a dalšími povrchovými faktory agresivního růstu. Druhou fází je transport nádorových buněk na nové místo. Transport probíhá v preformovaných dutinách (např. peritoneu, perikardu, kloubních prostorách) nebo lymfatickými a krevními cévami. Ale jen 1 z 1 000 000 uvolněných buněk se uchytí a vznikne nové ložisko. Třetí fází je etablování - nidace uvolněných a transportovaných buněk na novém místě. (1)

1.1.2 Typy karcinomů štítné žlázy

Mezi maligními nádory štítné žlázy jsou nejčastější karcinomy (98%), ale vyskytují se zde i sarkomy, lymfomy a jiné vzácné nádory. Podle WHO se rozlišují 4 typy karcinomů štítné žlázy:

1. Papilární karcinom (PTC) - pomalu rostoucí nádor vycházející z folikulárního epitelu. Má papilární strukturu a metastazuje výhradně lymfatickou cestou do regionálních lymfatických uzlin.

2. Folikulární karcinom (FTC) - vzniká malignizací folikulárního adenomu. Jeho chování je agresivnější. Častá je invaze do cév a hematogenní rozsev metastatických ložisek převážně do plic, jater, ale i mozku. Je obtížně odlišitelný od benigního adenomu.

3. Medulární karcinom - ojedinělý nádor s výraznou familiární zátěží. Vychází z parafolikulárních C - buněk. Často je součástí MEN 2 (mnohočetné endokrinní neoplazie typu 2). Metastazuje krevní i lymfatickou cestou.

4. Anaplastický karcinom - velmi vzácný a velmi agresivní nádor, který patří mezi nejzhoubnější nádory vůbec. Časně metastazuje a infiltruje okolní struktury. Předpokládá se, že vzniká dediferenciací PTC nebo FTC (diferencované karcinomy).

1.1.3 Patogenetické faktory

V posledních desetiletích incidence karcinomů štítné žlázy celosvětově vzrůstá ve všech věkových kategoriích. Mezi důležité faktory patří:

1) Zevní ozáření

Je to způsobeno především zvýšenou radiosenzitivitou štítné žlázy oproti okolním krčním a dalším endokrinním tkáním. Tato senzitivita se s rostoucím věkem snižuje, proto jsou ionizujícím zářením ohroženy především děti do 10 let (2, 3).

a) Zevní aktinoterapie krku byla dříve prováděna v mnoha zemích pro řadu benigních onemocnění, zejména pro hyperplazii thymu. To vedlo k výraznému vzestupu benigních i maligních nádorů, až 80% nádorů štítné žlázy bylo v té době radiačně podmíněno (4).

b) Pokusy jaderných zbraní v Tichomoří. Při pokusném výbuchu vodíkové zbraně na Bikinách nedošlo kvůli náhlé změně počasí k postupu radioaktivního mraku na moře, ale k jeho návratu na Marshallské souostroví a následnému radioaktivnímu spadu na obydlenou oblast. Po 20 letech měly všechny exponované děti rakovinu štítné žlázy (4).

- c) K velkému nárůstu PTC došlo po výbuchu jaderné elektrárny v Černobylu 26. dubna 1986, kdy se do atmosféry uvolnilo ohromné množství radioaktivních isotopů (radioaktivní jód a cesium). U dětí do 4 let vzrostl počet PTC na Ukrajině a v Bělorusku po roce 1986 více než 80krát (2, 3).
- 2) Dalším rizikovým faktorem je **resekce benigní strumy**, zejména pokud nebyla podávána tyreoidální suprese. Docházelo zde k recidivám, z nichž část byla velmi agresivní. Frekvence maligní recidivy po operaci benigního nádoru je 1,5 - 2,5% (4).
 - 3) U několika rodin se vyskytuje **familiární výskyt** nemedulárního karcinomu, genetické faktory zatím nejsou příliš jasné.
 - 4) **Faktory životního prostředí**. V poslední době se ukazuje, že na výskytu nádorů štítné žlázy se může podílet i znečištění životního prostředí a potravinového řetězce látkami typu pesticidů, insekticidů, některých průmyslově vyráběných chemikálií (např. polychlorované bifenyly) nebo vedlejších produktů chemické výroby (dioxiny, furany a další) (4).
 - 5) **Tyreotropní hormon (TSH)** může výrazně stimulovat růst nádoru (4).
 - 6) **Příjem jódu**. V oblastech s jodovým deficitem je častější výskyt folikulárního karcinomu štítné žlázy (4).
 - 7) **Pohlaví**. Karcinomy štítné žlázy jsou častější u žen (2-3:1), ale u mužů se projevuje vyšší agresivita a mortalita (4).

1.2 PAPILÁRNÍ KARCINOM ŠTÍTNÉ ŽLÁZY

PTC je nejčastějším karcinomem štítné žlázy (80-85%). Vyskytuje se ve všech věkových skupinách, ale nejčastější je ve 3.-5. dekádě života. Vyznačuje se poměrně nízkou agresivitou, lokálním růstem nebo infiltrativním šířením do tkání a orgánů v okolí štítné žlázy. V 60-80% se objevují mikrometastázy v druhém laloku. PTC se na rozdíl od FTC šíří především lymfatickou cestou. Metastázy se lymfatickými cévami nebo přímo histolytickým prostupem nádoru dostávají do regionálních uzlin. Jsou častější u dětí a mladistvých bez ohledu na velikost primárního nádoru. Po zničení regionálních uzlin nádorovou metastázou je možné lymfogenní šíření do dalších systémů lymfatických uzlin, vzácně do krve cestou ductus thoracicus nebo přestupem do krevních cév přímo v infiltrované uzlině. Vzdálené metastázy se vyskytují hlavně u dětí a mladistvých. Prognóza u PTC je příznivá vzhledem k tomu, že 80-95% pacientů přežívá déle než 10 let.

PTC se podle WHO (2004) dělí na několik histologických typů: klasický PTC, folikulární varianta PTC (většinou opouzdřený), makrofolikulární varianta, onkocytární varianta, světlobuněčná varianta, difúzní sklerotizující varianta PTC (horší prognóza, časté recidivy, regionální a vzdálené metastázy), varianta PTC z vysokých buněk - tall cell (často větší rozměry, angioinvaze, agresivnější), varianta PTC z válcových buněk - columnar cell (vzácný, často vzdálené metastázy), solidní varianta, kribiformní karcinom, PTC s fasciitis-like stroma, PTC s fokální inzulární komponentou, PTC s dlaždicobuněčným a mukopidermoidním karcinomem, PTC s vřetenobuněčným a velkokobuněčným karcinomem, kombinovaný papilární a medulární karcinom a papilární mikrokarcinom.

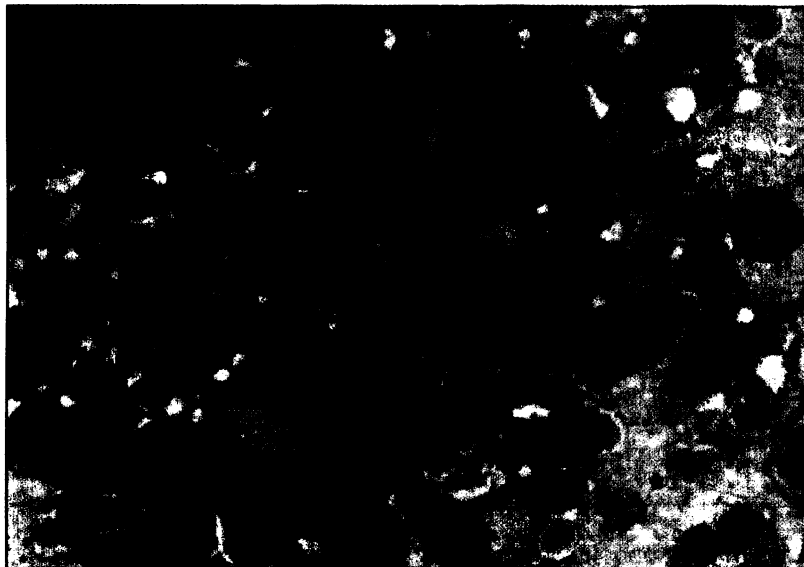
1.2.1 Diagnostika PTC

První indikací k možnosti malignity štítné žlázy je nález hmatného uzlu. PTC bývá v 70% větší než 1,5 cm, je tuhé konzistence a často neopouzdřený. Tumory menší než 1,5 cm se nazývají mikrokarcinomy. Ve většině případů nejsou klinicky zřejmé a bývají objeveny náhodně patologem nebo po operaci pro jiné než maligní onemocnění štítné žlázy. Přes svou výbornou prognózu i nádory o velikosti několika milimetrů mohou metastazovat do uzlin či vzdálených orgánů.

Mezi první diagnostická vyšetření při podezření na karcinom štítné žlázy je indikována **sonografie** krční oblasti. Základním principem této metody je vysílání ultrazvukových vln a jejich odraz od anatomického rozhraní. Sonografie zatěžuje nemocného zcela minimálně a lze

ji provést bez jakékoliv přípravy. Získané informace se týkají hlavně anatomických parametrů patologického ložiska a jeho vztahu k okolním tkáním. Vytváří indikaci pro cytologické nebo histologické vyšetření.

Pro cytologické stanovení je nezbytná **aspirační biopsie tenkou jehlou** (FNAB – fine-needle aspiration biopsy). Je to vyšetření technicky jednoduché, bezpečné, přesné (přesnost 90-95%) a snadno opakovatelné. Provádí se pod sonografickou kontrolou. Typickým mikroskopickým obrazem PTC je nádorový epitel obklopující fibrovaskulární stopku. Epitel je nejčastěji kubický, jednovrstevný, vzácněji vícevrstevný. Důležitým znakem PTC jsou tzv. psammomatózní tělíska, jejichž etiologie není zcela jasná. Tato tělíska jsou pravděpodobně tvořena ložiskovými infarkty buněk na vrcholu papil. Mrtvé buňky vážou kalcium a s přibýváním infarktových změn na papile dochází k vrstvení kalcifikovaných deposit. Psammomatózní tělíska se nacházejí hlavně ve stromatu papil. Nevyskytují se ale u folikulární varianty PTC. Dalším charakteristickým znakem PTC jsou tzv. matnicová jádra, která jsou kulatého či oválného tvaru. Jsou světlá a mají velké oblasti, které zcela postrádají nebo jsou chudé na chromatin. Jádra se často překrývají a vyskytují se v nich struktury podobné dělicím štěrbinám s invaginací cytoplazmy do jádra (tzv. ptačí oka) (obr.1).



Obr. 1 Cytologický nález typický pro PTC, intranukleární pseudoinkluze (tzv. ptačí oka) (4).

Celotělová scintigrafie dříve využívala radiojód, ale většina uzlů se chovala jako ložiska s chybějící ložiskovou akumulací, jako tzv. studené uzly a maligní uzly měly často normální nález. Nevýhodou byla také velká zátěž radiojódem. Proto se dnes používá $^{99m}\text{TcO}_4$ - technecistan, který je také vychytáván jodidovou pumpou - membránovým proteinem NIS

(Natrium Iodide Symporter), a radiační zátěž je nízká. Scintigrafie se používá pooperačně k diagnostice vzdálených metastáz, zbytků nádoru nebo recidivy karcinomu.

Počítačová tomografie (CT) slouží ke zhodnocení tvaru, velikosti a struktury tkáně, k detekci zbytků štítné žlázy a metastáz po operaci, ke zhodnocení lokální invaze nádoru a k lokalizaci vzdálených metastáz.

Nukleární magnetická rezonance (NMR) se indikuje vzácně a používá se jako druhotné vyšetření. Určuje šíření nádoru do okolních struktur, vztah nádoru k okolním cévám a hodnotí morfologii nádoru a postižení uzlin. Nevýhodou tohoto vyšetření je jeho finanční náročnost.

K biochemickému vyšetření patří detekce zvýšené hladiny několika markerů. Nádorové markery jsou makromolekuly, které se vyskytují a mění svou koncentraci v závislosti na nádorovém onemocnění. Jsou to proteiny produkované nádorem, nebo jsou odpovědí organismu na přítomnost nádoru. U PTC se vyšetřuje především **tyreoglobulin**, glykoprotein, produkovaný folikulárními buňkami. V období růstu primárního nádoru jeho hladina v séru vícenásobně stoupá, až na hodnoty několika set ng/ml (normální rozmezí hodnot: 0,10 – 85ng/ml). Po úspěšném chirurgickém zákroku by jeho koncentrace měla klesnout až pod hranici detekovatelnosti. Jeho zvýšená hladina tak ukazuje na recidivu nádoru, nebo na výskyt metastáz. Jako nádorové markery u PTC mohou být použity také **cytokeratin a vimetin**.

V současné době se rozvíjí **DNA diagnostika**, která je založena na detekci specifických mutací v určitých genech a na expresích určitých genů.

Stadium rakoviny štítné žlázy se určuje podle **TNM klasifikace** (tab. 1), která hodnotí primární tumor (T), lymfatické uzliny (N) a vzdálené metastázy (M) (5).

Tab. 1 Klasifikační systém TNM pro karcinomy štítné žlázy (4, upraveno).

T	T0	primární karcinom nenalezen
	T1	primární karcinom je velikosti pod 10mm (event. pod 15mm) - mikrokarcinom T1a - primární karcinom štítné žlázy jen v jednom ložisku T1b - karcinom ve dvou nebo více ložiscích
	T2	primární karcinom větší než 10 (event. 15 mm až 40mm) T2a, T2b - podle stejného pravidla jako u T1
	T3	primární karcinom větší než 41 mm neprorůstá do okolí štítné žlázy T3a, T3b - podle stejného pravidla jako u T1
	T4	primární karcinom o jakékoliv velikosti, který prorůstá mimo štítnou žlázu
N	N1	při postižení lymfatických uzlin N1a - na straně nádoru N1b - oboustranné nebo kontralaterální uzlinové metastázy event. metastázy ve střední čáře, zvláště v mediastinu
M	M1	prokázaná přítomnost vzdálených metastáz bez dalšího odlišení

1.2.2 Terapie PTC

Škála typů operačních výkonů je v současné době redukována na **lobektomii** (úplné odstranění jednoho laloku štítné žlázy včetně isthmu) a subtotální a totální **tyreoidektomii** (odstranění štítné žlázy). Od dříve používaných lokálních a méně radikálních výkonů bylo pro zvýšený výskyt recidiv ustoupeno. Pokud jsou zvětšené lymfatické uzliny, mohou se také vyjmout.

Po 6 - 8 týdnech od operace, které jsou potřeba k vyvolání hypotyreózy, se většinou začíná s terapií **radioaktivním jódem** ^{131}I . Tato metoda využívá skutečnosti, že folikulární buňky vychytávají jód. Jeho poločas rozpadu je 8,05 dne a vyzařuje beta a gama paprsky. Výhodou je dobrá tolerance léčby a to, že okolní tkáň dostává jen malé dávky záření. Radiojód je podáván perorálně, v horních partiích tenkého střeva je vstřebáván a poté vychytáván štítnou žlázou. Folikulárními buňkami je přenesen do koloidu, takže k ozáření buněk dochází zevnitř. Po zabudování do hormonálních vazeb dochází k vylučování radiojodu ve formě tyreoidálních hormonů. Používá se jako doplňující léčba po operaci nebo u nádorů, které nelze operovat. Cílem léčby je odstranění zbytků primárního tumoru, detekce recidivy, diagnóza a odstranění regionálních i vzdálených metastáz a zmírnění bolesti v nich.

Léčba **zevním ozářením** štítné žlázy je komplikovaná a používá se jen u zbytků karcinomů, které nelze odstranit operativně.

PTC patří mezi tzv. hormonálně dependentní nádory. **Hormonální supresivní léčba** využívá tlumícího účinku L-thyroxinu na produkci TSH, který stimuluje růst nádoru a jehož hladina po úplném odstranění tkáň prudce stoupá. Tím se zamezí jeho vlivu na zbývající nádorové buňky, čímž dojde ke zpomalení nebo zastavení růstu nádoru. Cílem hormonální léčby je detekce a léčba metastáz a prevence recidiv tumoru. Zároveň nahrazuje funkci odstraněné štítné žlázy.

Chemoterapie se používá vzácně a její účinnost je omezena. Je vhodná u nemocných s pokročilým stádiem rakoviny ke zmírnění příznaků způsobených tumorem, uchování životně důležitých funkcí nebo při rychlém vývoji tumoru. Většinou se indikuje až po použití všech zmíněných možnostech léčby (5).

Prognostické faktory pro přežití pacienta:

- věk (úmrtnost pacientů mladších 40 let je výjimečná)
- pohlaví (některá data udávají horší prognózu u mužů)
- velikost tumoru (větší tumory jsou spojeny s horší prognózou)
- šíření do okolních tkání (horší prognóza)

- opouzdření tumoru (pozitivní faktor)
- metastázy (vzdálené metastázy výrazně zhoršují prognózu) (6)

1.3 GENETICKÁ PODSTATA PTC

Proces onkogeneze je úzce spjat s kontrolou buněčné proliferace, diferenciaci a programované buněčné smrti. Pro vývoj karcinomů štítné žlázy je důležitá aktivace dvou typů genů. Jedná se o **onkogeny** a **tumor-supresorové geny**.

1) **Onkogeny** jsou mutované formy normálních genů, proto-onkogenů, které kontrolují buněčnou proliferaci a diferenciaci. Většinou se jedná o komponenty signální transdukční dráhy (růstové faktory, povrchové receptory růstových faktorů, monomerní G-proteiny, tyrozinkinázy nebo jaderné transkripční faktory). Za normálních okolností nemají vztah k nádorovému procesu. Změny zodpovědné za přeměnu proto-onkogenů na onkogeny jsou buď změny ve struktuře genů, které způsobují syntézu abnormálního genového produktu (onkoproteinu) se změněnou funkcí, nebo změny ovlivňující regulaci genové exprese vedoucí ke zvýšené nebo nepřiměřené produkci strukturně nezměněné formy normálního proteinu podporujícího růst v nevhodnou dobu. K aktivaci onkogenů dochází několika způsoby:

- bodovou mutací (mutace v jedné alele je schopna změnit fenotyp buňky na maligní)
- chromozómovou přestavbou (translokace nebo inverze)
- virovou inzercí (např. papilomaviry u cervikální rakoviny)
- amplifikace proto-onkogenu (gen se vyskytuje ve více kopiích na mnoha místech genomu)
- zvýšenou expresí proto-onkogenu

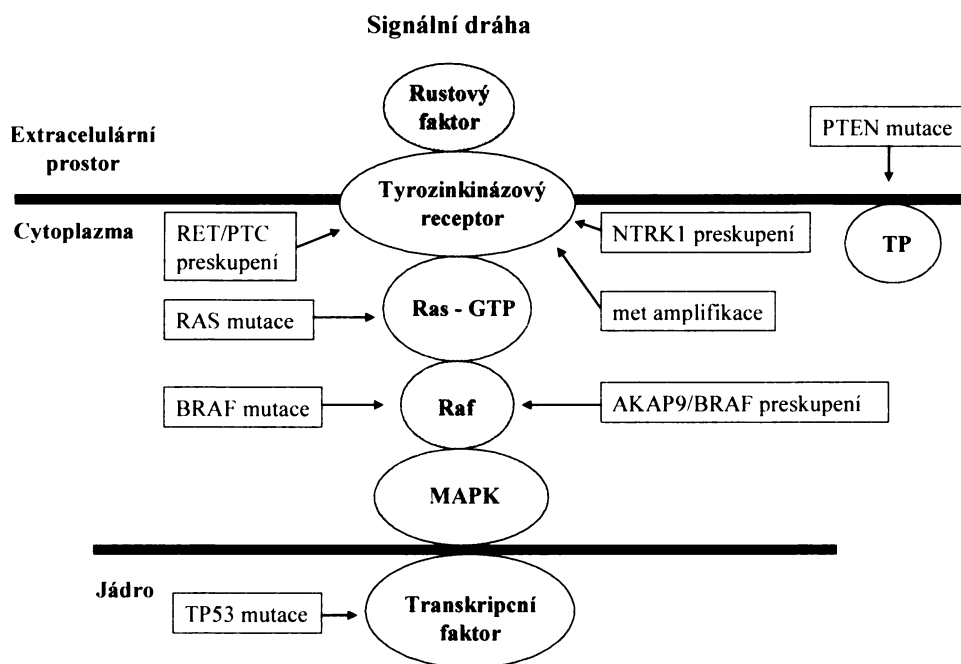
K těmto mutacím dochází v somatických buňkách a mají dominantní účinek, to znamená, že k stimulaci maligní transformace stačí pouze jedna mutovaná alela.

2) **Tumor-supresorové geny** (antionkogeny) blokují abnormální růst a maligní transformaci. Alely se chovají recesivně, proto je k nádorovému bujení nutná inaktivace obou alel. K inaktivaci jedné alely může dojít už v zárodečné buňce (všechny buňky organismu nesou mutaci) nebo až v buňce somatické. K inaktivaci druhé alely dochází vždy až na somatické úrovni a vede to k poruše regulace buněčného růstu. K její inaktivaci může docházet několika způsoby:

- bodovou mutací nebo delecí (např. P53)
- chromozómovou přestavbou (translokace nebo inverze)
- mitotickou rekombinací (buňka má dvě nefunkční alely tumor-supresorového genu)
- mitotickou nondisjunkcí (ztráta celého chromozómu s normální alelou)

- genovou amplifikací (nadměrná exprese určitých proteinů, které inaktivují proteiny produkované tumor-supresorovými geny)

U PTC se uplatňují genetické defekty zejména 4 genů kódujících kinázy: *RET* proto-onkogenu, *NTRK1* proto-onkogenu, *met* proto-onkogenu a *BRAF* proto-onkogenu (obr. 2). Všechny jsou součástí signalizační dráhy navazující na MAP (Mitogen Activated Protein) kinázu, která stimuluje proliferaci buněk, avšak současně i jejich dediferenciaci.

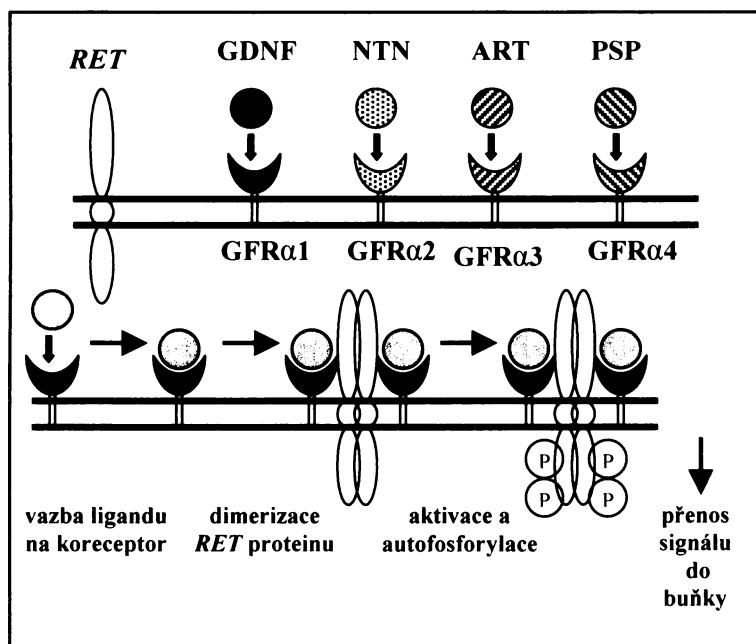


Obr. 2 Genetické změny u PTC a jejich umístění v signalizační dráze. TP - tyrozin fosfatáza

1.3.1 *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. 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 (7).

Extracelulární doména (11 exonů) zahrnuje kadherinu podobnou oblast vázající vápník a oblast bohatou na cystein. 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 multikomponentního 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 (7) (obr. 3).



Obr. 3 *RET* signální komplex a jeho aktivace.

GDNF – glial cell line-derived neurotrophic factor, NTN – neurturin, ART – artemin, PSP – persephin, $GFR\alpha$ – GDNF – family receptor alfa. $GFR\alpha$ jsou pro jednotlivé ligandy specifické (7).

RET proto-onkogen je u PTC 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 (obr. 6). Tím vzniká stále aktivní chimérická forma receptoru, která je lokalizována v cytoplazmě, neboť postrádá transmembránovou doménu. Ale interakcí s transmembránovými proteiny (jako PDZ a LIM domény proteinu Enigma nebo umístovacího proteinu FRS2) mohou *RET/PTC* proteiny působit také jako membránové kompartmenty (8, 9).

RET/PTC je spojován s agresivnější formou PTC a častou tvorbou vzdálených metastáz (10). Jeho výskyt je velmi variabilní. Pohybuje se v širokém rozmezí u 5 – 70% PTC, byly pozorovány velké geografické rozdíly a také závislost na metodice stanovení (11). U PTC, které vznikly po černobylské havárii (26. duben 1986), jsou často detekovány právě *RET/PTC* přeskupení (57 – 76% PTC) (2, 12-14).

Přesný mechanismus, kterým ionizující záření indukuje onkogenní mutace jako je přeskupování, není znám. V současné době se uvažuje o dvou mechanismech:

1) Radiace může přímo způsobit mutaci jako výsledek špatně opraveného DNA poškození. Při ionizujícím záření dochází k poškození chromatinové struktury projevující se jedno- nebo dvouřetězcovými zlomy v DNA nebo poškozením bází. Zlomy v DNA mohou být pro buňku letální nebo mohou být opraveny některým z enzymatických reparačních mechanismů, jako je ligace konců přerušovaných řetězců. Nesprávné spojení může vést k chromozomálním aberacím jako je chromozomální translokace a inverze, kterými vznikají fúzní *RET/PTC* geny (14). Uvedený mechanismus ovšem nevysvětluje dlouhé období mezi ozářením a vývojem PTC.

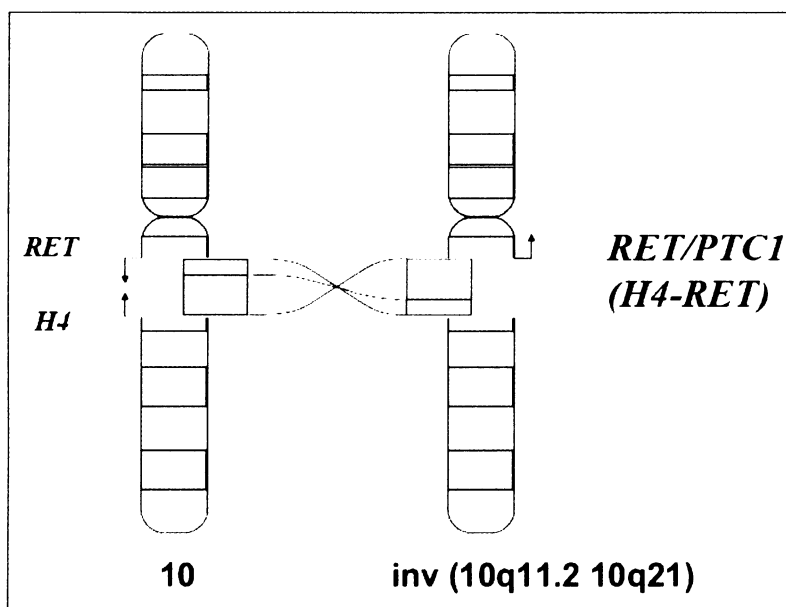
2) Proto se uvažuje o druhém způsobu, kdy radiace přímo nezpůsobí vznik fúzního genu, ale může zapříčinit trvalou genomickou instabilitu, která nakonec vytvořením mutací vede k tumorové progresi.

Není znám přesný důvod, proč k přeskupení způsobeném ozářením dochází tak často právě v thyroïdních buňkách. Jedním z důvodů je prostorové umístění genů, které vytváří fúzní protein. Zatímco lineárně jsou od sebe geny často velmi vzdáleny, v interfázových jádrech je jejich vzájemná pozice díky umístění na určitých chromozomálních doménách jiná. Buněčná lokalizace jednotlivých chromozomálních oblastí se liší mezi různými fázemi buněčného cyklu a různými typy buněk. V thyroïdních buňkách se tak mohou fúzní geny vyskytovat vedle sebe a po radiaci se snadno rekombinují. Dalším důvodem může být

zvýšená radiosenzitivita štítné žlázy oproti okolním tkáním (štítná žláza je až 20krát citlivější).

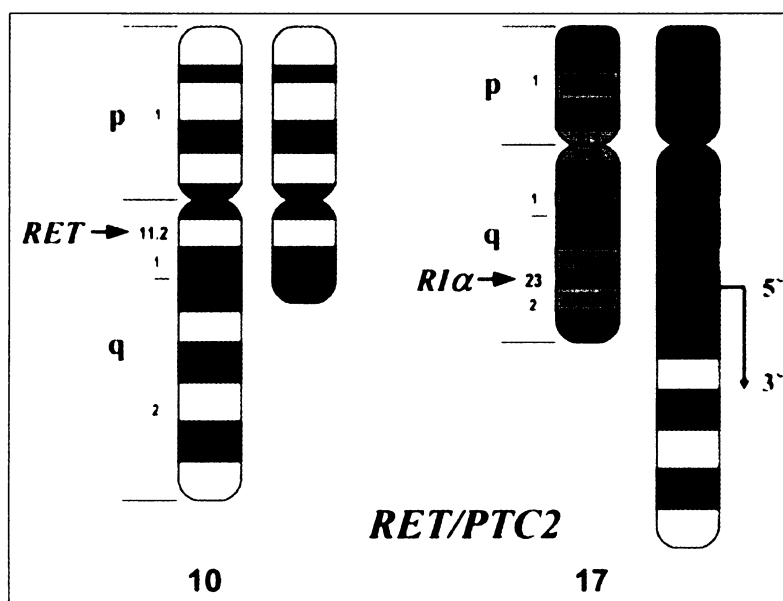
V současné době je známo několik forem *RET/PTC* vznikajících inverzí nebo translokací.

RET/PTC1 označovaný také jako *RET/H4* vzniká paracentrickou inverzí na dlouhém raménku 10. chromozómu, *inv(10)(q11.2 q21)* (obr. 4). Dochází ke zlomu v 11. intronu *RET* proto-onkogenu a fúzi s neznámým genem (homologním k superrodině myosinů) označeným H4 sondou na lokusu D10S170. Tento typ je nejčastějším *RET/PTC* přeskupením (až 20% PTC) (15). Je typický především pro spontánní PTC (tzn. bez vlivu ionizujícího záření) a mikrokarcinomy PTC s klasickou variantou. Ale byl detekován i v oblasti Černobylu, kde se vyskytoval po delší latentní době (více než deset let po ozáření) a u starších pacientů (3, 12).



Obr. 4 Schéma paracentrické inverze vedoucí ke vzniku fúzní formy *RET/PTC1* (4).

RET/PTC2 (až 10% PTC) vzniká reciprokou translokací mezi 10. a 17. chromozómem, *t(10;17)(q11.2;q23)* (obr. 5). Dochází k fúzi *RET* genu s genem kódujícím regulační podjednotku (RI α) cAMP-dependenční proteinkinázy A (16).



Obr. 5 Schéma reciproké translokace vedoucí ke vzniku fúzní formy *RET/PTC2* (4).

RET/PTC3 vzniká paracentrickou inverzí na dlouhém raménku 10. chromozómu. Dochází k fúzi *RET* proto-onkogenu (zlom v 11. intronu) s genem *ELE1* (zlom v 5. intronu) označovaným také jako *RFG* (*RFG* – *RET* Fused Gene), který patří do „zink-finger“ rodiny označované rfp (17, 18). *ELE1* kóduje transkripční koaktivátor androgenního receptoru (19). Kromě toho byly nalezeny varianty *RET/PTC3*, u kterých byla část patřící k *ELE1* genu kratší o 144 bp (*RET/PTC3r2*) (20) nebo o 18bp (*RET/PTC3r3*) (18) v porovnání s typickou formou. *RET/PTC3* je nejčastější u pacientů s PTC, kterým bylo v době výbuchu v Černobylu méně než 10 let (až 70%). Je detekován hlavně v nejhůře postižených oblastech Gomel, Brest a Minsk. Tento typ přeskupení je spojován s neagresivnější formou PTC, která se vyznačuje především rychlým růstem, větší velikostí, tvorbou vzdálených metastáz, nízkou diferenciací a velmi špatnou prognózou. Vyvíjí se po kratší latentní době (do deseti let po ozáření) a je většinou charakterizován jako solidní varianta PTC (3, 12).

RET/PTC4 vzniká inverzí a následnou fúzí *RET* genu s *ELE1* genem (10q11.2). Je to v podstatě delší forma *RET/PTC3*, ke zlomu dochází v 11. exonu *RET* proto-onkogenu (20, 21).

RET/PTC5 vzniká inverzí s *RFG-5* (*RET* Fused Gene 5) genem neznámé lokalizace. *RFG-5* gen kóduje integrální membránový protein Golgiho aparátu, který se podílí na umístění vezikulů a podobně jako u předchozího typu je detekován u dětí z oblasti Černobylu (22).

Forma *RET/PTC6* vzniká translokací mezi *RET* genem a *HTIF 1* genem kódujícím transkripční faktor HTIF 1 (HTIF 1 – human transcription intermediary factor 1), t(7;10)(q32;q11.2) (23).

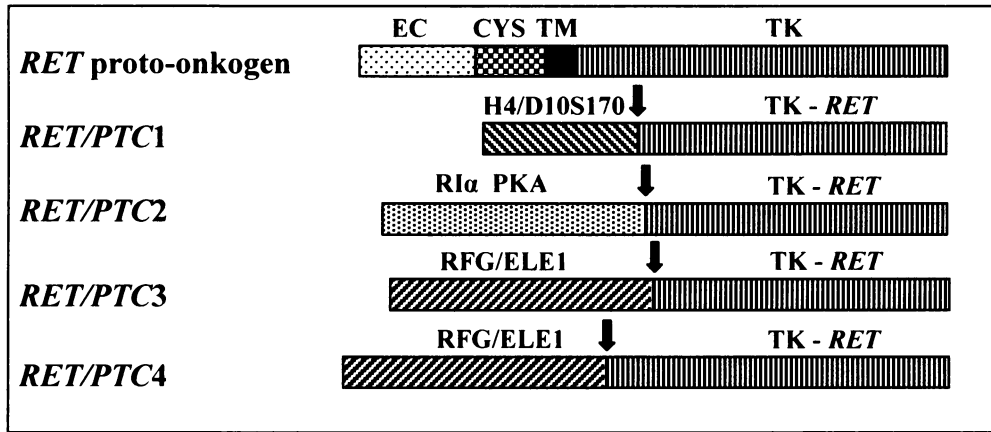
RET/PTC7 vzniká translokací mezi *RET* genem a genem *HTIF1γ* kódujícím transkripční koaktiavátor pro jaderné receptory 6 a 7, t(1;10)(p13;q11.2) (24).

RET/PTC8 je výsledkem translokace mezi *RET* proto-onkogenem a genem *KTNI1*, který kóduje kinetin, t(10;14)(q11.2;q22.1) (25). Kinetin je receptor v endoplasmatickém retikulu pro kinesin, který zajišťuje transport vezikulů a organel podél mikrotubulů.

RET/PTC9 vzniká chromozomální translokací mezi *RET* genem a *RFG9* genem (*RFG* – *RET* Fused gene) lokalizovaným na 18. chromozómu (18q21-22). *RFG9* kóduje protein, který je lokalizován v cytoplazmě a pravděpodobně se účastní intracelulárního transportu (26).

Dalším typem je *RET/ELKS*, který vzniká translokací mezi *RET* genem a *ELKS* genem, t(10;12)(q11;p13). Funkce tohoto genu je zatím neznámá (27).

RET/PCMI vzniká fúzí *RET* genu s *PCMI* genem lokalizovaným na 8q21-22, který kóduje centrozomální protein (28).

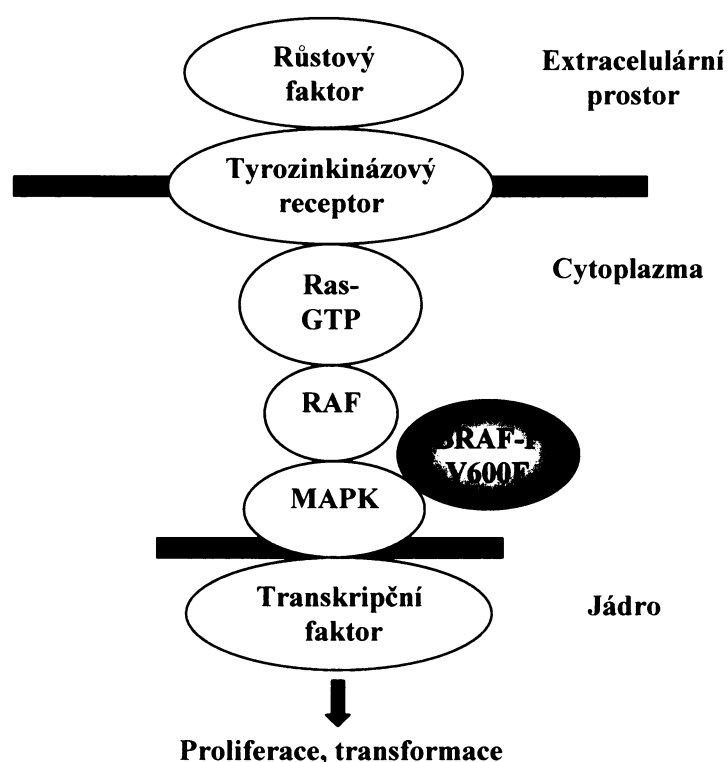


Obr. 6 Schématické znázornění *RET* proto-onkogenu a jeho fúzních genů *RET/PTC1*, -2, -3, -4. EC – extracelulární doména, CYS – doména bohatá na cystein, TM – transmembránová doména, TK – tyrozinkinázová doména, D10S170 – lokus genu značený H4 sondou, RI α – regulační podjednotka proteinkinázy A, *ELE1* – gen lokalizovaný na 10. chromozómu, označovaný také jako *RFG* (*RET* Fused Gene). Šipky označují fúzní body *RET/PTC* přeskupení (29).

1.3.2 *BRAF* mutace

BRAF somatické mutace byly poprvé nalezeny v maligním melanomu (80%) (30) a v menší míře také u karcinomu tlustého střeva (5%), vaječníku a plic (1-3%) (31). V roce 2003 byla objevena bodová mutace v tomto genu také u PTC.

Jedná se o aktivaci *BRAF* onkogenu (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1), 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 (32). Jsou součástí RET-RAS-RAF-MAPK signalizační dráhy (obr. 7).



Obr. 7 Funkce *BRAF* mutace v signální transdukční dráze.

Po vazbě růstového faktoru na tyrozinkinázový receptor dochází k fosforylaci ras proteinu, dále Rafu, MAPK kináz až k aktivaci transkripčních faktorů v jádře. *BRAF* mutace způsobuje aktivaci MAPK kináz a transkripčních faktorů nezávislou na růstových faktorech (29).

Při aktivaci RAF proteiny nejprve asociují s RAS vázající doménou RBD (RBD – RAS binding domain), která je v N-terminální regulační oblasti RAS proteinu. Poté dochází k stimulaci jejich serin/threoninové kinázové aktivity a k následné fosforylaci a aktivaci MAPK (mitogen-associated protein kinase) signalizační dráhy (33).

Mezi RAF proteiny patří tři izoformy: A-Raf, B-Raf a C-Raf (neboli Raf1), lišící se různou expresí v tkáních. Ačkoli všechny izoformy jsou schopny aktivovat fosforylaci MEK (MAPK kináza 1, mitogen-activated protein kinase kinase 1), která dále aktivuje ERK (MAPK1, mitogen-activated protein kinasa 1), jsou odlišně aktivovány RAS proteinem. C-Raf a A-Raf pro svou plnou aktivitu potřebují další fosforylaci serinu a tyrozinu v N-oblasti kinázové domény (34). B-Raf má vyšší afinitu pro MAPK kinázu (MEK)1 a MEK2 a je ve fosforylaci MAPK dráhy účinnější než ostatní izoformy (32). B-Raf je hlavní typ ve folikulárních buňkách štítné žlázy.

BRAF bodová mutace v PTC je výsledkem substituce T→A na pozici 1799 v 15. exonu. Tím dochází k substituci valinu za glutamát na pozici 600 (V600E), dříve označované V599E. Tato mutace, která je v aktivační doméně, destabilizuje inaktivní formu zrušením hydrofobních interakcí mezi aktivační smyčkou a ATP vazebným místem. Vzniknou nové interakce, které vytvoří katalyticky kompetentní strukturu (35). Tím dojde ke zvýšení aktivity BRAF, která je nezávislá na RAS stimulaci.

BRAF T1799A mutace je nejčastější mutací u PTC (29 – 83%) (36-43). Tato mutace koreluje s vyšším stupněm TNM klasifikace, agresivnější formou nádoru a s horší prognózou onemocnění. Častěji se také vyskytují lokální metastázy. *BRAF* mutace je častěji detekována u spontánních PTC dospělých pacientů (29-69%), zatímco u dětí je méně častá (12-16%) (44, 45).

U 9% folikulární varianty PTC byla objevena další mutace v *BRAF* genu způsobená záměnou A→G na pozici 1802 vedoucí k substituci lysinu za glutamát v kodónu 601 (46). Tato mutace má stejný efekt jako V600E, protože se nachází také v aktivačním segmentu, ale narozdíl od ní má 2,5krát nižší kinázovou aktivitu (35).

U mikrofolikulární/solidní varianty PTC byla nalezena delece tripletu bází v aktivačním segmentu způsobující záměnu valinu a lysinu glutamátem - VK600-601E (47).

Další mutací je inserce valinu v kodónu 599 (V599Ins) (48).

Byly nalezeny také dvě tiché mutace, tzn. že nezpůsobují změnu aminokyseliny v proteinu a na fenotypu buňky se tak vůbec neprojeví. Jedná se o substituce G→A (G1365A) v 11. exonu a G→A v 11. intronu (49).

1.3.3 *NTRK1* přeskupení

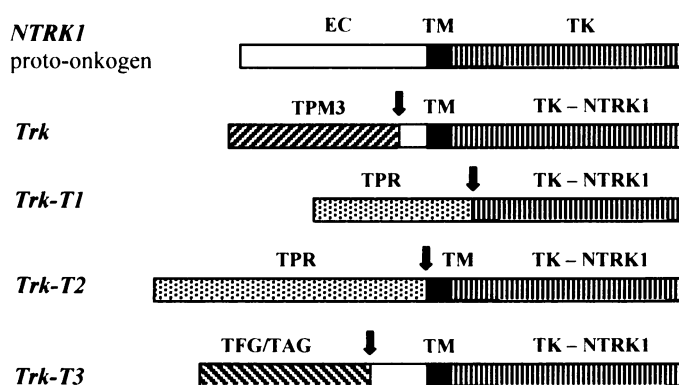
NTRK1 proto-onkogen (*NTRK1* – neurotrophin tyrosine kinase receptor 1) neboli *TrkA* kóduje receptor pro nervový růstový faktor (NGF) a za normálních okolností je exprimován v periferních nervových gangliích. Je lokalizován na dvou úsecích 1. chromozómu (1q22-24 a 1q32-41). *NTRK1* se vyskytuje asi u 10% PTC. U pacientů z oblasti Černobylu se vyskytuje *NTRK1* přeskupení jen vzácně (3,3% PTC) (50).

TRK onkogeny vznikají intrachromozomální inverzí na 1. chromozómu. Dochází k fúzi 3' konce tyrozinkinázové domény *NTRK1* genu s 5' koncem jiného genu (obr. 8). Na rozdíl od *RET/PTC* přeskupení je zachována transmembránová doména a fúzní protein zůstává v membráně. *NTRK1* přeskupení bylo detekováno u 5-25%, především spontánních, PTC.

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 (51).

Dalšími formami jsou *Trk-T1* a *Trk-T2* onkogeny lišící se pouze svou velikostí. Vznikají fúzí *NTRK1* proto-onkogenu a *TPR* genu (*TPR* – Translocated Promotor Region) kódující protein, který je součástí cytoskeletu (52, 53).

Další 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 (54).



Obr. 8 Schématické znázornění *NTRK1* proto-onkogenu a jeho onkogenních variant: *Trk*, *Trk-T1*, *Trk-T2*, *Trk-T3*. EC – extracelulární doména, TM – transmembránová doména, TK - tyrozinkinázová doména, *TPM3* – gen pro nesvalový tropomyosin, *TPR* - Translocation Promotor Region, *TFG* – *Trk*-Fused Gene, *TAG* – *Trk*-activating gene. Šipky označují fúzní body *TRK* přeskupení (29).

1.3.4 Amplifikace *met* proto-onkogenu

Met proto-onkogen (7q21-q31) kóduje vysoce afinitní transmembránový tyrozinkinázový receptor pro hepatocytární růstový faktor HGF (HGF – hepatocyte growth factor) neboli rozptylovací faktor SF (SF – scatter factor), který patří mezi cytokiny (55). Tento protein je potenciálním mitogenem pro epitelové buňky a promotorem buněčné migrace a invaze (4). Skládá se ze dvou podjednotek - extracelulární (α) a transmembránové (β) spojených disulfidickou vazbou (56). Podjednotka α je lokalizována extracelulárně a je vysoce glykosylovaná. Podjednotka β se skládá z extracelulární složky s doménou podílející se na vazbě ligandu, z transmembránové domény a cytoplazmatické části s tyrozinkinázovou doménou (4). Receptor vzniká z polypeptidového prekurzoru, který podstupuje ko- a posttranslační glykosylaci a endoproteolytické štěpení urokinázou. Receptor je exprimován hlavně v epiteliálních tkáních, kde může být aktivován ligandem produkovaným sousední mezenchymatickou tkání pomocí parakrinní interakce (57).

Až u 70% PTC byla detekována zvýšená amplifikace *met* onkogenu indukující proliferaci, buněčnou motilitu a invazi do dalších tkání. Zvýšená exprese tohoto genu souvisí s vysokou malignitou PTC a je považována za sekundární změnu ve vývoji nádoru až po přeskupení *RET* nebo *NTRK1* genů (58, 59).

1.3.5 *AKAP9-BRAF* přeskupení

V roce 2005 se objevila zpráva o novém onkogenu v PTC. Tento onkogen vzniká 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) serin/threoninové kinázy *BRAF* (60). *BRAF* protein ztrácí dvě regulační domény: CR1 (obsahuje RAS-GTP vazebnou doménu) a CR2, které mají na kinázovou aktivitu autoinhibiční účinek (61). Vzniká fúzní protein *AKAP9-BRAF*, který má kinázovou aktivitu nezávislou na RAS stimulací a je schopen aktivovat MAPK signální dráhu. *AKAP9* protein je schopen vázat typ II regulační podjednotky $RI\alpha$ cAMP-dependentní proteinkinázy A.

Dříve byl výskyt mutace v *BRAF* genu spojován hlavně se spontánním PTC a přeskupení indukované ionizačním zářením bylo vyhrazeno *RET* genu. Nyní se ukazuje, že také *BRAF* gen je spojen s přeskupením stimulovaném radiací. Toto přeskupení bylo detekováno u dětí z oblasti Černobyli po krátké latentní době (60).

1.3.6 Další geny účastníci se onkogeneze PTC

U 5-21% PTC byla nalezena LOH (loss of heterozygosity) na 10q23, kde je lokus *PTEN* genu, který kóduje protein tyrozin fosfatázu (62). Byla detekována také jeho snížená exprese.

Dalším genem, jehož mutace byly detekovány u pacientů s PTC, je *RAS* onkogen (5-20% PTC). Patří mezi časté onkogeny. Vyskytuje se u 10-20% lidských nádorů (1). Kóduje malý membránový GTP-vazebný protein p21, který má důležitou funkci v regulaci buněčného cyklu při přechodu z G₀ fáze do S fáze, kde je tento protein zodpovědný za kontrolu hladiny cyklín dependentních kináz (1). Jsou známy tři Ras proteiny: H-, K- a N-Ras. Jsou zakotveny na vnitřní straně membrány. *RAS* onkogen je aktivován bodovými mutacemi v GTP vazebné doméně (12. a 13. kodón) a v GTPázové doméně (59. a 61. kodón) (63). Tyto mutace jsou časté především u folikulární varianty PTC (43%) (64). Podílejí se na časném vývoji tumoru a jsou často detekovány v tumorech s metastázami. Mutace v tomto genu jsou spojovány s horší prognózou PTC (65).

Dalším genem uplatňujícím se v patogenezi PTC je tumor-supresorový gen *TP53* (tumor protein p53) na lokusu 17p13.1, který kóduje jaderný P53 fosfoprotein. Tento gen je nejčastěji mutovaným genem v lidských nádorech. Protein zabraňuje přechodu z G1 fáze do S fáze a aktivuje transkripci genů, které opraví poškozenou DNA. Pokud je poškození příliš rozsáhlé, protein navodí programovanou buněčnou smrt - apoptózu (aktivuje *Bax* gen a inhibuje *Bcl-2* gen) (66). Pro P53 inaktivaci je typická ztráta jedné alely spolu s bodovou somatickou mutací v alele druhé. Nejvíce mutací způsobujících onkogenezi je v DNA vazebné doméně (5-8. exon). Mutovaný P53 se vyskytuje u 0-75% PTC, podílí se zejména na dediferenčním procesem (67).

Ve většině maligních buněk štítné žlázy se zjistila delece v genu *Rb* (retinoblastom). Nachází se na lokusu 13q14 a kóduje tumor-supresorový jaderný fosfoprotein pRb. Protein je transkripčním faktorem a regulátorem buněčného dělení, kde brání postupu buněk z G1 fáze do S fáze (4).

U difúzní sklerotizující varianty PTC byla objevena inaktivace E - kadherin/kateninového komplexu. E - kadherin/kateninový komplex reguluje buněčnou adhezi a motilitu. Předpokládá se, že je supresorem invaze buněk. E - kadherin (epiteliální) je vápníkem regulovaný transmembránový protein, který interaguje s E-kadherinem sousední buňky. Intracelulární doména interaguje s cytoplazmatickým kateninem (cadherin-associated protein), který přenáší adhezní signál k aktinovému cytoskeletu. Difúzní sklerotizující

varianta (DSV) je vzácný, vysoce invazivní typ PTC, u kterého narušení mezibuněčné adheze může hrát významnou roli (68).

1.3.7 Familiární PTC

PTC je z převážné většiny sporadického původu (95%), jen asi u 5% PTC se vyskytuje familiárně (FPTC). Je charakterizovaný agresivnějším fenotypem než u sporadického PTC. Je obvykle multifokální a objevuje se v časnějším věku. Způsob dědičnosti, stejně jako genetická a molekulární podstata nejsou ještě přesně známy. U několika rodin s FPTC bylo detekováno *RET/PTC* přeskupení, ale předpokládá se, že *RET* mutace nejsou predispozicí k vývoji PTC. Za vývoj tumoru jsou pravděpodobně zodpovědné jiné geny (69).

PTC je také spojován s některými dědičnými nádorovými syndromy. Jedná se o Cowdenův syndrom a familiární adenomatózní polypózu (FAP), včetně jejího subtypu Gardnerova syndromu. Jsou častěji multifokální, ale do uzlin či vzdálených orgánů metastazují jen vzácně. Pacienti s těmito syndromy mají 100krát větší riziko PTC než ostatní populace.

Familiární adenomatózní polypóza je autozomálně dominantně dědičné onemocnění tlustého střeva s výskytem mnohočetných polypů – adenomů v tlustém střevě, které později malignizují. Za FAP odpovídá tumor-supresorový gen *APC* gen (adenomatous polyposis coli) na lokusu 5q21. Kóduje protein, jehož centrální doména se napojuje na β - katenin, ulehčuje jeho degradaci, čímž inhibuje aktivaci genů podílejících se na proliferaci. Nejčastějšími mutacemi jsou delece a inserce na 5'konci (4).

Cowdenův syndrom je autozomálně dominantní onemocnění, které je typické přítomností mnohočetných intestinálních hemartomů (střevních nádorů), poruchami kostního systému a 50% rizikem karcinomem prsu. U 50% případů může být přítomna makrocefalie a mentální subnormalita. Toto onemocnění způsobuje zárodečná mutace v *PTEN* genu (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) na lokusu 10q23.3, který kóduje fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát 3-fosfatázu.

1.3.8 Folikulární varianta PTC

Zajímavým a stále kontroverzním typem PTC je folikulární varianta (FV). Je to stejně jako PTC pomalu rostoucí tumor metastázující především do lymfatických uzlin na rozdíl od FTC, který metastazuje hlavně krevní cestou. Narozdíl od klasického PTC ale metastazuje také do plic (70). Folikulární varianta má jaderné znaky typické pro PTC spolu s folikulárním růstem.

U folikulární varianty byly objeveny mutace popsané u FTC. Ve 43% FV byly detekovány *RAS* mutace (64). Podobný vysoký výskyt je pozorován u FTC, narozdíl od PTC, kde se vyskytuje jen u 5 - 20%.

U 9% folikulární varianty PTC byla objevena již zmíněná mutace v *BRAF* genu Lys601Glu (46) a u jednoho vzorku FV byla detekována mutace G474R (71).

U FV byl detekován také fúzní gen *PAX8-PPAR γ* typický pro FTC (72-74). Gen *PPAR γ* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) patří k jaderným receptorům, které vytváří heterodimery s RAX nukleárními receptory pro retinovou kyselinu. Hraje důležitou roli při kontrole lipidového a sacharidového metabolismu (4). Předpokládá se, že je zahrnut v diferenciaci adipocytů. Gen *PAX8* (paired box gene 8) kóduje transkripční faktor, který je nezbytný pro formování folikulárních buněk štítné žlázy (75). Kromě toho aktivuje expresi dalších genů specifických pro štítnou žlázu (76). Fúzní gen vzniká spojením DNA vázající domény *PAX8* genu s doménami A až F genu *PPARG1* - t(2;3)(q13;p25) (77). Fúzní protein inhibuje *PPAR γ* a pravděpodobně se naruší i diferenciační funkce *PAX8* genu (4).

2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo:

1. Zavedení metody detekce přítomnosti fúzních genů *RET/PTC1* a *RET/PTC3*.
2. Zavedení metody detekce somatické *BRAF* mutace.
3. Zjistit frekvenci těchto mutací v české populaci, neboť tyto údaje zatím zcela chybí.
4. Porovnat genotyp s fenotypem a zjistit klinické projevy jednotlivých mutací.
5. Vyvinout metodiku pro izolaci genetického materiálu z biopsií štítné žlázy tenkou jehlou a metody detekce mutací, což by umožnilo časně indikovat druh nádoru a tudíž i nutnost a rozsáhlost chirurgického výkonu.
6. Provést retrospektivní studii z parafinových bločků pro zjištění vlivu černobylské havárie (26. duben 1986) na vývoj PTC v České republice.

Práce je podporována granty IGA MZ ČR NR/7806-3 a NR/9165-3.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 SEZNAM CHEMIKÁLIÍ A PŘÍSTROJŮ

3.1.1 Chemikálie

Izolace nukleových kyselin:

xylén – Riedel-de Haen

1x PCR pufr bez MgCl₂ – Sigma, St. Louis, USA

2- Mercaptoethanol – Fluka, Buchs, Švýcarsko

RNase away – Invitrogene, Carlsbad, USA

proteináza K – Boehringer, Mannheim, Germany

fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1) – Fluka, Buchs, Švýcarsko

octan sodný

QIAamp DNA Blood Mini Kit – QIAGEN

DEPC (diethylpyrokarbonát) – Sigma, USA

TRIzol Reagent – Invitrogene, Carlsbad, USA

chloroform

isopropylalkohol

sodium citrát

Rneasy Micro Kit – QIAGEN, Valencia, USA

Tris-HCl

EDTA

SDS guanidium isothiocyante

N-lauroyl sarcosine

Reverzní transkripce:

Random Primers Promega, USA

RNasin Plus RNase Inhibitor Promega, USA

AMV Reverse Transcriptase + pufr Promega, USA

dNTP MBI Fermentas, Litva

PCR amplifikace:

Gold Taq DNA Polymerase + pufr - Perkin Elmer, USA

MgCl₂ – Perkin Elmer, USA

dNTPs MBI Fermentas, Litva

navržené primery (forward a reverse) - PharmaTech, Praha, Česká republika

Horizontální agarózová elektroforéza:

PCR agaróza - Top-Bio, Česká republika

ethidium bromid – Serva, SRN

kys. boritá

EDTA– ICN, USA

TRIS báze – ICN, USA

Dextran Blue 2000 – Amersham Pharmacia Biotech, USA

DNA marker Gene Ruler 100 bp– MBI Fermentas, Litva

SSCP analýza:

akrylamid - ICN, USA

kys. boritá

EDTA– ICN, USA

TRIS báze – ICN, USA

TEMED – Fluka, Buchs, Švýcarsko

APS – Sigma-Aldrich, USA

formamid

fuchsin – ICN, USA

Sekvenace:

DNA and Gel Band Purification Kit – Amersham Biosciences, UK

Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Thermo Sequenase DNA Polymerase, ddNTP

Termination Mix – 7-deaza, Stop Solution, Reactin Buffer) – USB, USA

močovina– ICN, USA

Long Ranger – Cambrex, USA

kys. boritá

EDTA– ICN, USA

TRIS báze – ICN, USA

TEMED – Fluka, Buchs, Švýcarsko

APS - Sigma-Aldrich, USA

DTCS Quick Start Master Mix – BeckmanCoulter, Fullerton, USA

glykogen

octan sodný

3.1.2 Přístroje

Izolace nukleových kyselin:

laminární box HERA KS 12 – Kendro, Hannau, Německo

centrifuga - Hettich

spektrofotometr GeneQuant II – Pharmacia Biotech

hybridizační pec – Amersham

homogenizátor Polytron PT 1200, Littau, Švýcarsko

vyhřívací box – PMC

Reverzní transkripce:

DNA Thermal Cycler – Perkin Elmer, USA

PCR amplifikace:

Termocykler, Tgradient 96 – Biometra, NSR

Horizontální agarózová elektroforéza:

Hoeffer SE 600 – Amersham Pharmacia Biotech, USA

Zdroj: Bio-rad EF 250 220V – Biorad, USA

SSCP analýza, sekvenace:

ALFExpress II - Amersham Pharmacia Biotech, USA

Chladicí jednotka: Multitemp II - Amersham Pharmacia Biotech, USA

CEQ8000 – BeckmanCoulter, Fullerton, USA

k vyhodnocení SSCP analýzy:

- software ALFwin Fragment Analyser 1.00.35 - Amersham Pharmacia Biotech, USA

k vyhodnocení sekvenace:

- ALFwin Software – Amersha Pharmacia Biotech, USA
- CEQ 8000, Genetic analysis system, BeckmanCoulter, Fullerton, USA

3.2 STUDOVANÉ SOUBORY PACIENTŮ

Soubor pacientů s PTC tvoří tři typy vzorků - zamražené odoperované čerstvé tkáně, aspirační biopsie tenkou jehlou a parafinové bločky (tab. 2).

Sběr vzorků čerstvých tkání probíhá zejména ve spolupráci s Doc. MUDr. Jaromírem Astlem, CSc., a MUDr. Davidem Veselým z ORL kliniky FN Motol, kde se pacienti s papilárním karcinomem štítné žlázy operují a s prim. MUDr. Danielou Kodetovou z Ústavu patologie a molekulární medicíny FN Motol, kde se vzorky sbírají a patologicky vyhodnocují.

Vzorky biopsií odebírá MUDr. Zdeněk Novák, CSc., z Endokrinologického ústavu, který aspirační biopsie tenkou jehlou provádí.

Vzorky parafinových bloček byly získány s pomocí Doc. MUDr. Aleše Ryšky, Ph.D., a MUDr. Jana Laca, Ph.D., z Fingerlandova ústavu patologie v Hradci Králové a s pomocí Doc. MUDr. Jaroslavy Duškové, CSc., z Ústavu patologie 1.LF a VFN.

K vzorkům byly k dispozici klinické nebo patologické zprávy, k mnoha vzorkům byly lékařské zprávy zpětně dohledávány. Fenotyp pacientů byl konzultován s výše uvedenými lékaři.

Tab. 2 Typy a počet vyšetřovaných vzorků

Typ tkáně	Počet
Čerstvé tkáně	63
Parafinové bločky	133
Biopsie	9
Celkem	205

3.3 IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN

3.3.1 Izolace DNA z parafinových bločků

3.3.1.1 Fenol - chloroformová izolace

Tradiční fenol-chloroformová metoda ponechává nukleové kyseliny rozpuštěné ve vodném prostředí (pufru) a odstraňuje ostatní složky lyzátu, především proteiny. K lyzátu je přidána směs fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu (FCHA). Chloroform je organické rozpouštědlo, které extrahuje lipidy. Nemísí se s vodným roztokem lyzátu, takže se směs rozdělí na dvě fáze – horní vodnou a dolní chloroformovou. Fenol při promíchání fází sráží proteiny přítomné ve vodném lyzátu. Izoamylalkohol zvyšuje rozpustnost fenolu v chloroformu, takže po protřepávání přejde fenol do chloroformové fáze. Po centrifugaci se na rozhraní mezi fázemi objeví bílá vrstva sražených proteinů. Horní vodná fáze obsahuje nukleové kyseliny. K dokonalému odstranění proteinů je třeba extrakci s FCHA opakovat, dokud se nepřestane objevovat bílá proteinová sraženina. Pro úplné odstranění fenolu, který by mohl narušit funkčnost enzymů v navazujících biochemických reakcích, je nutné přidat směs chloroformu s izoamylakoholem. DNA se vysráží přidáním koncentrovaného ethanolu. S nukleovými kyselinami se srážejí i soli, které zvyšují účinnost srážení nukleových kyselin. Soli je pak třeba odmyt méně koncentrovaným ethanolem.

K izolaci DNA z parafinových bločků jsme použili postup izolace modifikovaný podle Fox EA (1994): Preparation of DNA from fixed, paraffin-embedded tissue. *Current Protocols in Human Genetics* A.3I.1-A.3I.5.

Nejprve bylo nařezáno 10 řezů o šířce 5 μm od každého bločku. Parafin byl odstraněn 3 x 5min extrakcí s 1 ml xylenu. Po každém přidání xylenu následovalo 5 min třepání a 5 min centrifugace při 10 000 RPM. Pro odstranění xylenu byl přidán 1,5 ml 96% ethanolu. Následovalo 5 min třepání, 20 min inkubace při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 5 min centrifugace při 10 000 RPM. Poté byl znovu přidán 1,5 ml ethanolu. Následovalo lehké protřepání a 10 min centrifugace při 10 000 RPM. Vzorky byly vysušeny v termobloku při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a resuspendovány v 200 μl inkubačního pufru (1xPCR pufr bez MgCl_2 , Sigma, St. Louis, USA) s 200 $\mu\text{g/ml}$ proteinázy K (Boehringer, Mannheim, Germany) a byly inkubovány 3 dny při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nový aliquot proteinázy K byl přidáván každý den ráno a večer. Proteináza K byla inhibována 10 min inkubací při $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ a vzorek byl centrifugován 5 min při 13 200 RPM. Poté byla DNA izolována fenol-chloroformovou extrakcí.

Nejdříve bylo odebráno 250 μ l supernatantu, smícháno s 250 μ l FCHA (fenol - chloroform - isoamylalkohol, 25:24:1) a centrifugováno 5 min při 13 200 RPM. Poté byla horní vodní fáze odebrána do nové zkumavky a k organické fázi bylo přidáno 250 μ l TE pufru (pH 8). Vzorek byl centrifugován 10 min při 14 000 RPM. Vodní fáze byla odebrána, spojena k předešlé fázi a k ní bylo přidáno 400 μ l FCHA. Následovala 5 min centrifugace při 13 200 RPM. Pokud se ve vzorku vyskytovala mezivrstva proteinů opakovali jsme extrakci s 350 μ l FCHA. Poté bylo k vzorku přidáno 300 μ l CHA (chloroform - isoamylalkohol, 24:1) a vzorek byl centrifugován 5 min při 13 200 RPM. Pak následovala precipitace ethanolom. Nejdříve bylo odebráno 225 μ l vodní fáze a k ní bylo přidáno 23 μ l octanu sodného (CH_3COONa , 3M) a 500 μ l 96% ethanolu. Následovala inkubace přes noc při -20 $^{\circ}\text{C}$. Druhý den byl vzorek centrifugován 15 min při 14 000 RPM a 4 $^{\circ}\text{C}$. K peletě bylo přidáno 500 μ l 75% ethanolu a centrifugováno 15 min při 13 200 RPM a 4 $^{\circ}\text{C}$. Vzorek byl vysušen v termobloku při 37 $^{\circ}\text{C}$ a resuspendován v 100 μ l sterilní H_2O . Poté byla DNA inkubována 1 h při 55 $^{\circ}\text{C}$ a byla změřena koncentrace.

3.3.1.2 Izolace pomocí kitu

Bohužel výtěžek, kvalita a čistota DNA byly nízké. Z tohoto důvodu a také kvůli vysoké časové náročnosti jsme později zavedli izolaci pomocí kitu QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN). Odpadla tak práce s organickými rozpouštědly.

Nejdříve byl ze vzorků odstraněn parafin pomocí xylenu. Vysušené vzorky byly resuspendovány s 180 μ l inkubačního pufru (1xPCR pufr bez MgCl_2 , Sigma, St. Louis, USA). Následovala inkubace při 70 $^{\circ}\text{C}$ s 20 μ l proteázy (protease Solvent, QIAamp DNA Blood Mini Kit) a 200 μ l AL pufru (QIAamp DNA Blood Mini Kit) dokud tkáň nezlyzovala. 2-3krát denně bylo přidáno 20 μ l proteázy.

Poté byla DNA izolována pomocí kitu. Nejdříve byl vzorek centrifugován 5 min při 13 200 RPM, supernatant byl odebrán do nové zkumavky a k němu bylo přidáno 200 μ l ethanolu. Směs byla přelita na kolonku a centrifugována 1 min při 8 000 RPM. Kolonka byla přendána do nové zkumavky, na kolonku bylo nanášeno 500 μ l AW1 pufru a centrifugováno 1 min při 8 000 RPM. Kolonka byla znovu přendána do nové zkumavky a na kolonku bylo nanášeno 500 μ l AW2 pufru. Vzorek byl centrifugován 3 min při plné rychlosti. Kolonka byla přenesena do nové zkumavky a centrifugována 1 min při plné rychlosti. Po přendání do nové zkumavky bylo do středu kolonky nanášeno 50 μ l pufru AE, který byl zahřátý na 70 $^{\circ}\text{C}$.

Následovala 5 min inkubace při pokojové teplotě a 1 min centrifugace při 8 000 RPM. Znovu bylo přidáno 50 μ l AE pufru a vzorek byl inkubován a centrifugován při stejných podmínkách. Poté byla změřena koncentrace.

3.3.2 Izolace DNA a RNA z čerstvých tkání a biopsií

Hlavním problémem při izolaci RNA jsou RNázy - všudypřítomné a velmi odolné enzymy, štěpící RNA. Proto všechny vodné roztoky a materiál, které přišly do styku se zpracovávaným vzorkem, byly zbaveny RNáz pomocí DEPC (diethylpyrokarbonát). Pracovní plocha byla ošetřena s roztokem RNase away. Také veškerá manipulace s materiálem určeným pro izolaci RNA byla prováděna v laminárním boxu za dodržování maximální opatrnosti ochraňující RNA před degradací RNázami.

3.3.2.1 Trizolová izolace

Trizol je roztok fenolu a guanidin isothiocyantu. 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.

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 (Invitrogene). 50 – 100 mg zamražené čerstvé tkáně bylo vloženo do 1 ml Trizolu a homogenizováno pomocí homogenizátoru. Následovala 5 min 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 přendána do nové zkumavky. K ní bylo 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 5 min 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 20 min třepání a 5 min 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.

3.3.3 Izolace RNA z parafinových bločků

Izolace RNA z tkání fixovaných v parafinu je velmi obtížná. Vzorky jsou fixovány ve formaldehydu a RNA je velmi degradovaná, obzvláště u starších vzorků.

3.3.3.1 Izolace RNA pomocí kitu

Nejdříve byl ze vzorků odstraněn parafin pomocí xylenu. Poté jsme RNA izolovali pomocí Rneasy Micro kitu (QIAGEN).

Nejprve byla tkáň resuspendována v 150 µl RLT pufru a bylo přidáno 280 µl sterilní H₂O zbavené Rnas a 20 µl proteinázy K. Jeden vzorek byl inkubován 10 min při 55 °C, druhý při 37 °C přes noc. Poté byly vzorky centrifugovány 3 min při 10 000xg. 450 µl supernatantu bylo přepipetováno do nové zkumavky a smícháno s 220 µl 96% ethanolu. Směs byla přenesena na kolonku a centrifugována 1 min při 10 000xg. Kolonka byla přendána do nové zkumavky. Na kolonku bylo nanášeno 350 µl RW1 pufru a centrifugováno 1 min při 10 000xg. Kolonka byla přenesena do nové zkumavky. Do další zkumavky byla připravena směs z 10 µl Dnase 1 zásobního roztoku a 70 µl RDD pufru. 80 µl směsi bylo nanášeno na kolonku a inkubováno 15 min při pokojové teplotě. Na kolonku bylo nanášeno 350 µl RW1 pufru a centrifugováno 1 min při 10 000xg. Kolonka byla přendána do nové zkumavky a na kolonku bylo nanášeno 500 µl RPE pufru. Následovala 1 min centrifugace při 10 000xg. Kolonka byla znovu přenesena do nové zkumavky, bylo na ni nanášeno 500 µl 80% ethanolu a byla centrifugována 2 min při 10 000xg. Kolonka byla přenesena do nové zkumavky a centrifugována na maximální rychlost po dobu 5 min. Kolonka byla opět přendána do nové zkumavky a do středu kolonky bylo nanášeno 14 µl sterilní H₂O zbavené RNáz. Po 10 min inkubaci při pokojové teplotě následovala 1 min centrifugace při maximální rychlosti. Byla změřena koncentrace RNA a poměr RNA/protein. Bohužel koncentrace byla téměř nulová.

3.3.3.2 Izolace RNA pomocí Trizolu

Nejdříve jsme vzorky zbavili parafinu pomocí xylenu. Přidali jsme 1 ml Trizolu, tkáň zhomogenizovali a pokračovali postupem popsáním u izolace čerstvých tkání a biopsií (kapitola 3.3.2.1).

Bohužel vzorky neobsahovaly téměř žádnou RNA.

3.3.3.3 Fenol - chloroformová izolace RNA

Proto jsme použili jiný způsob izolace. Nejdříve jsme odstranili ze vzorků parafin pomocí xylenu. Vzorky byly vysušeny a resuspendovány v 450 μ l T500E20N10 0,5% SDS roztoku (Tris 500mM, EDTA 20 mM, NaCl 10mM, SDS 0,5%, pH 8). Bylo přidáno 20 μ l proteázy a inkubováno při 45 °C 16 - 20 hodin. Následovala centrifugace po dobu 5 min při 15 000 RCF a přidání 1/10 objemu 3M sodium acetátu (CH₃COONa, pH 4,8). Poté byla provedena dvojnásobná extrakce s 600 μ l FCHA (fenol:chloroform:isoamylalkohol - 25:24:1) a extrakce s 600 μ l CH:I (chloroform: isoamylalkohol, 24:1). Po každé extrakci následovala 5 min centrifugace při 15 000 RCF. Dále bylo přidáno 2 μ l glykogenu, precipitováno 0,8 objemem isopropylalkoholem a vzorky byly inkubovány dvě hodiny při 70 °C. Následovala 20min centrifugace při 4 °C a 15 000 RCF. Vzorky byly precipitovány s 75% ethanolem a resuspendovány v 10 μ l sterilní H₂O. 5 μ l RNA bylo použito na následnou reverzní transkripci. Bohužel RNA byla velmi degradovaná a pro expresi genů nepoužitelná.

3.3.3.4 Modifikovaná fenol - chloroformová izolace RNA

Proto jsme zkusili další způsob izolace RNA. Nejdříve bylo nařezáno 5-20 sekcí o šířce 15-20 μ m. Parafin byl ze vzorku odstraněn trojnásobnou extrakcí xylemem. K vzorku byl přidán vždy 1 ml xylenu a vzorek byl inkubován 10 min při 65°C. Následovala 5 min centrifugace při 16 000xg. Byl odstraněn supernatant a postup se dvakrát opakoval. Poté byl xylén odstraněn trojnásobnou extrakcí s 1 ml 100%, 80% a 50% ethanolu. Po každé extrakci následovalo třepání při pokojové teplotě a 5 min centrifugace při 16 000xg. Poté bylo přidáno 500 μ l vody ošetřené s DEPC (diethyl pyrocarbonate) a vzorek byl inkubován na třepačce 5 min při pokojové teplotě. Následovala 5 min centrifugace při 16 000xg. Byl odstraněn supernatant a peleta byla resuspendována v 0,5 ml roztoku 0,1M TRIS-HCL, 25mM EDTA a 1% SDS (pH 7.3). K vzorku bylo přidáno 500 μ g proteázy K a vzorek byl inkubován při 52 °C, dokud tkáň nelyzovala. Následovala centrifugace při 16 000xg po dobu 5 min. Poté bylo přidáno 0,5 ml roztoku D (4M guanidium isothiocyanate, 25mM sodium citrate – pH7.0,

0,5% N-lauroyl sarcosine a 0,1M mercaptoethanol), 50 μ l sodium acetatu (pH 4.0) a 150 μ l FCHA (fenol: chloroform: isoamylalkohol, 25:24:1). Vzorek byl umístěn 15 min na ledu a centrifugován 20 min při 4 °C a 16 000xg. Byla odebrána horní vodná fáze, ke které bylo přidáno 150 μ l CH:I (chloroform: isoamylalkohol, 24:1). Následovala centrifugace po dobu 5 min při 16 000xg a 4 °C. K vodní fázi byl přidán isopropylalkohol v poměru 1:1 a vzorek byl inkubován 1 h při -80 °C. Poté následovala 10 min centrifugace při 4 °C a 12 000xg. Supernatant byl odstraněn a k peletě byl přidán 1 ml 75% ETOH. Vzorek byl centrifugován 5 min při 4 °C a 7 500xg. Supernatant byl odstraněn a peleta byla vysušena při pokojové teplotě. Poté byla peleta resuspendována ve 40 μ l vody. 5 μ l bylo použito na změření koncentrace.

Koncentrace RNA v obou vzorcích byla vysoká. K vzorkům bylo proto přidáno 4 μ l Rnasin Ribonuclease inhibitoru a byla provedena reverzní transkripce.

3.4 MĚŘENÍ KONCENTRACE

Měření koncentrace pomocí spektrofotometru je založeno na skutečnosti, že aromatické struktury bází specificky absorbují UV-záření určitých vlnových délek. Pokud jsou v roztoku pouze nukleové kyseliny, pak míra specifické absorpce odpovídá koncentraci nukleových kyselin v roztoku. Nukleové kyseliny jsou však často kontaminovány bílkovinami, které obsahují aromatické aminokyseliny fenylalanin a tyrosin, které také specificky absorbují UV-záření. Intenzita absorpce UV-záření nukleovými kyselinami a bílkovinami se liší při různých vlnových délkách, čistotu vzorku lze tedy posoudit z poměru absorbancí při 260 nm a 280 nm.

Po izolaci a resuspendování nukleových kyselin byla změřena koncentrace (Gene Quant II, Pharmacia Biotech). DNA byla naředěna 20 krát a poté použita na PCR reakce. RNA byla naředěna 60 krát. Poté byla provedena reverzní transkripce.

3.5 REVERZNÍ TRANSKRIPCE

Při reverzní transkripci dochází k syntéze tzv. complementary DNA (cDNA) zkopírováním genetické informace z mRNA do DNA pomocí enzymu reverzní transkriptáza. Enzym se evolučně vyvinul u retrovirů, které mají genetickou informaci uloženu v RNA. Při infekci ji potřebují přepsat do DNA, kterou poté začlení do DNA hostitelské buňky. Při

laboratorním použití reverzní transkriptáza nejprve vytvoří nové vlákno DNA podle templátového vlákna mRNA. Poté dochází k syntéze druhého komplementárního vlákna a odbourávání původního vlákna mRNA. Tím vzniká plnohodnotná dvojvláknová cDNA se sekvencí odpovídající původní mRNA.

Nejdříve bylo k 2 µg RNA přidáno 4 µg random primerů a doplněno sterilní H₂O do celkového objemu 40 µl. Směs byla zahřata na 70 °C po dobu 5 min a poté zchlazena na ledu. Ke směsi byl přidán master mix z 20 µl 5x reakčního pufru, 10mM dNTP, 160u RNasin Ribonuclease inhibitoru, 120u AMW reverzní transkriptázy a doplněn H₂O do celkového objemu 60 µl. Reakční směs byla zahřata na 37 °C po dobu 60 min. cDNA byla použita ke zjištění exprese kontrolních genů a k detekci fúzních genů.

3.6 PCR AMPLIFIKACE

Polymerázová řetězová reakce - PCR (Polymerase Chain Reaction) je biochemická reakce, která využívá enzym DNA-polymerázu ke kopírování DNA. DNA-polymeráza je schopná syntetizovat komplementární vlákno podle templátu jednovláknové DNA tak, že přidává k existujícímu úseku druhého vlákna nové nukleotidy ve směru 5' → 3'. Potřebuje k tomu dva krátké oligonukleotidy, tzv. primery, které nasedají na komplementární sekvence ve dvou templátových vláknech. Templátová vlákna vznikají denaturací původně dvouvláknové DNA. Primery na tato vlákna nasedají v protisměrné orientaci, takže po opakovaných cyklech denaturace, nasedání primeru a extenze primeru DNA-polymerázou vznikají produkty, které slouží jako templáty pro nový reakční cyklus.

Sekvence primerů byly navrženy podle literárních dat. Takto navržené primery byly nasyntetizovány firmou PharmaTech (Praha, Česká republika). Přehled sekvence primerů je uveden v tabulce 3. Optimalizace reakčních podmínek PCR amplifikace byla provedena na několika vybraných vzorcích DNA na gradientovém cykleru (Tgradient 96 – Biometra, NSR).

Podle nalezených optimálních podmínek byla amplifikována DNA/cDNA pacientů.

Tab. 3 Přehled všech použitých primerů

Gen	Primery	Velikost PCR produktu
<i>GAPDH</i>	F: 5' - CCA TGG AGA AGG CTG GGG - 3' R: 5' - CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC - 3'	198 bp
<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
<i>EC 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
<i>TK 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
<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
<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
Kalcitonin	F: 5' - CCT TCC TGG CTC TCA GCA TC - 3' R: 5' - GAG TTT AGT TGG CAT TCT GG - 3'	408 bp
<i>BRAF</i> exon 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

3.7 ELEKTROFORÉZA

Elektroforéza se provádí na agarozovém gelu, který tvoří prostorovou síť vláken. Volný prostor mezi vlákny polymeru je vyplněn vodným roztokem, ve kterém se rozpouští nukleové kyseliny. Gel se umístí do elektrického pole mezi kladně a záporně nabitou elektrodu. Protože jsou nukleové kyseliny záporně nabité (fosfát odštěpuje vodík), jsou přitahovány ke kladně nabitě elektrodě. Přitom se malé molekuly DNA pohybují rychleji než větší. Gel je obarven ethidium bromidem, fluorescenčním barvivem, které svou plochou molekulou interkaluje mezi ploché páry bází v molekule DNA. Poté, co se molekuly DNA rozdělí podle velikosti, gel položí se na UV-transluminátor a díky ethidium bromidu DNA molekuly v gelu září.

Čistota PCR produktů byla ověřena elektroforézou na 1,5% nebo 3% agarozovém gelu, obarveném ethidium bromidem (za podmínek: 85 V, 45 min. s použitím 0,5x TBE). Vzorky byly nanášeny spolu s 6x koncentrovaným nanášecím barvicím roztokem.

Výsledek elektroforézy byl odečten pod UV světlem a byly vyhodnoceny optimální reakční podmínky pro PCR amplifikaci.

3.8 DETEKCE FÚZNÍCH GENU *RET/PTC*

Zavedli jsme expresi kontrolních genů a detekci dvou nejčastějších forem *RET/PTC* přeskupení - *RET/PTC1* a *RET/PTC3*.

3.8.1 Exprese kontrolních genů

Podmínky pro PCR jednotlivých genů byly optimalizovány. Pro analýzu z cDNA jsme provedli expresi několika kontrolních genů.

Pro kontrolu přítomnosti cDNA byla provedena exprese všudypřítomného genu *GAPDH*. Tento gen kóduje glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu, která je důležitá v metabolismu sacharidů.

Původ buněk byl potvrzen expresí genu *PAX8*. Tento gen kóduje transkripční faktor, který má klíčovou roli v diferenciaci folikulárních buněk.

Dále jsme provedli expresi extracelulární domény (EC) *RET* genu, jejíž přítomnost ukazuje, že se jedná o medulární karcinom štítné žlázy a nikoliv PTC. Je to proto, že *RET* proto-onkogen se za normálních okolností ve folikulárních buňkách štítné žlázy neexprimuje. Pokud dojde k přeskupení a vzniku *RET/PTC* formy, *RET* onkogen extracelulární doménu ztrácí a exprimuje se pouze tyrozinkinázová doména.

Při pozitivní EC doméně byla provedena PCR amplifikace kalcitoninu, který se exprimuje u medulárního karcinomu štítné žlázy.

Při amplifikaci genu *GAPDH* a *PAX8* byla použita negativní kontrola, při amplifikaci kalcitoninu a EC domény *RET* genu byla použita ještě také pozitivní kontrola.

Detekce genů byla provedena elektroforézou na 1,5% (*GAPDH*, kalcitonin) nebo 3% (*PAX8*, EC) agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem.

3.8.2 Detekce fúzních forem *RET* genu

Ke zjištění přítomnosti fúzní formy *RET* genu jsme provedli expresi tyrozinkinázové domény (TK) *RET* genu. Dále jsme zavedli detekci dvou nejčastějších fúzních forem - *RET/PTC1* a *RET/PTC3*. Amplifikaci jsme vždy prováděli s pozitivní a negativní kontrolou. Expresi genů jsme detekovali elektroforézou na 3% agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem.

3.8.3 Real Time PCR

Množství produktu, vytvořeného amplifikací, závisí v každé PCR na množství templátové DNA, která je přidána do reakce. Real Time PCR monitoruje množství PCR produktu během amplifikace v její exponenciální fázi. Využívá k tomu fluorescenčního barviva. Speciální termocyklery, určené pro kvantitativní PCR v reálném čase, jsou schopny v průběhu PCR ozařovat vzorek excitačním zářením, které vybudí fluorescenci uvolněného barviva. Tuto fluorescenci přístroj po každém cyklu změří a výsledek předá řídicímu softwaru, který zobrazuje průběžně - v reálném čase - množství uvolněné fluorescence, které odpovídá množství vzniklého produktu.

SYBR Green I je fluorescenční barvivo, které je schopné začlenit se do dvouřetězcové DNA. Jen navázané barvivo je schopno záření. V počáteční fázi reakce je hodnota fluorescence závislá na koncentraci cílové DNA sekvence. K měření fluorescence dochází v každém cyklu a to na konci elongační fáze.

Dále se využívá sonda, která má sekvenci specifickou pro určitý produkt. Na sondu je napojen tzv. reporter - R (fluorescenční barvivo) a quencher - Q (zhášeč). Pokud je reporter navázán na sondě v blízkosti Q, není schopen fluorescence. Tato sonda je navržena tak, aby hybridizovala s templátovou DNA za stejných podmínek jako primery. Během PCR nasedne na templátovou DNA uvnitř cílové sekvence. DNA-polymeráza, která provádí extenzi jednoho ze dvou primerů, narazí při syntéze komplementárního vlákna na sondu. Protože má kromě schopnosti syntetizovat komplementární vlákno také tzv. exonukleázovou aktivitu, štěpí vnitřní sondu na jednotlivé nukleotidy. Tím se reporter dostane z těsné blízkosti zhášeče a je schopen fluorescence. Množství zachycené fluorescence je tak přímo úměrné množství nově vzniklého produktu.

Na stáži na Singleton Hospital a University of Wales, Swansea ve Velké Británii jsem pomocí Real Time PCR (LightCycler 2.0 System, Roche) analyzovala expresi TK domény *RET* genu (příloha, End report). Množství PCR produktu jsem detekovala pomocí SYBR Green I.

50 ng RNA bylo přidáno k reakční směsi obsahující 3,25mM Mn(OAc)₂, 0,3uM každého primeru (F - cgg tgg ccg tga aga tg, R - tct gac agc agg tct cga a, délka 64bp) a 1x koncentrovaného reakčního mixu (Light Cycler RNA Master SYBR Green). Real Time PCR byla provedena na cykleru (Light Cycler, Roche) za podmínek: reverzní transkripce (20 min při 61 °C), denaturace (30 s při 95 °C), 45 cyklů amplifikace: denaturace (1 s při 95 °C), nasednutí primerů - annealing (5 s při 60 °C), prodloužení - extension (13 s při 72 °C)

a akvizice (1 s při 77 °C), tání (melting curve): denaturace (5 s při 95 °C), annealing (15 s při 65 °C) a melting při 95 °C. Vždy jsem Real Time PCR prováděla s negativní kontrolou (H₂O) a pozitivní kontrolou v počátečním množství 50 ng, 5 ng a 0,5 ng RNA. Každý vzorek byl zároveň amplifikován ve dvou reakcích pro kontrolu specifity a senzitivity Real Time PCR.

Vzorky byly hodnoceny pomocí softwaru (Roche) z kvantifikační křivky a tzv. melting curve, která ukazuje rozdíly při tání DNA. I jednonukleotidová záměna může způsobit změnu bodu tání, která se na melting curve projeví.

3.9 DETEKCE MUTACE V600E V *BRAF* GENU

Vyizolovaná DNA z čerstvých tkání, biopsií a parafinových bločků byla použita pro PCR amplifikaci 15. exonu *BRAF* proto-onkogenu v 10 μ l PCR reakci s Cy5 značenými primery uvedenými v tabulce 3 a reakčními podmínkami získanými optimalizací.

3.9.1 SSCP analýza

Mutace v *BRAF* genu byla detekována pomocí screeningové metody SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism).

SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) je velice senzitivní screeningová metoda sloužící k detekci mutací typu záměny jedné báze. Zachycuje téměř 100 % mutací v DNA fragmentech menších než 200 bp a okolo 80 % mutací v DNA fragmentech o velikosti 200 až 400 bp. Je založena na principu různé migrace jednovláknových molekul DNA, které se liší svou sekundární i terciární strukturou. Provádí se na nedenačním polyakrylamidovém gelu, který je možno použít pro 10 analýz a na který se nanesou zdenaturované PCR produkty. Jednovláknové fragmenty DNA zaujmou unikátní konformaci, která je dána intramolekulárními interakcemi uvnitř DNA sekvence, a jakékoli změny v sekvenci fragmentu DNA způsobí změny v konformaci a jsou detekovány.

K PCR produktům bylo přidáno 25 μ l fuchsinové denaturační barvičky. 5 μ l bylo použito na kontrolní elektroforézu. Tepelná denaturace PCR produktů byla provedena při 94 °C po dobu 4 minut na termocykleru, poté byly vzorky zchlazeny na ledu po dobu 5 min. Následně byly 4 μ l směsi naneseny na 10% nedenační polyakrylamidový gel. Současně byla nanesena také pozitivní a negativní kontrola. Analýza probíhala při 7 °C na přístroji ALFExpress II (Amersham Pharmacia Biotech, USA) a vyhodnocena softwarem ALFwin Fragment Analyser 1.00.35 (Amersham Pharmacia Biotech, USA).

3.9.2 Sekvenace

Pozitivní a nejasné vzorky byly ověřeny pomocí přímé fluorescenční sekvenace. Sekvenace je velmi přesná metoda, s jejíž pomocí lze identifikovat nukleotidové pořadí u DNA fragmentů. Existují dvě metody sekvenace - metoda chemická (dle Maxama a Gilberta) a metoda enzymatická (dle Sangera). Pro potřeby klinické diagnostiky se dnes výlučně používá metoda enzymatická.

Při vlastní sekvenační reakci se využívá tzv. asymetrická PCR, při které je v reakci pouze jeden primer, v našem případě opatřený fluorescenční značkou (Cy5). Cíleně se tak amplifikuje pouze požadovaný řetězec DNA. V přesném molárním poměru se přidávají dideoxynukleotidy (ddNTP), které jsou do DNA inkorporovány DNA polymerázou. Po začlenění do rostoucího vlákna se růst řetězce zastaví a další nukleotid již nemůže být navázán. Sangerovy sekvenační reakce se účastní sekvenované vlákno (jednořetězcová DNA připravená často asymetrickou PCR reakcí s nadbytkem jednoho primeru), primer komplementární s jeho koncem, jeden zvolený dNTP a jemu odpovídající ddNTP v přesně zvoleném poměru a ostatní tři typy dNTP. Reakce probíhá ve čtyřech mikrozkušnicích, vždy v přítomnosti jednoho ze čtyř ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP). Vznikne tak série značených řetězců, jejichž délka závisí na relativní vzdálenosti příslušné báze od konce DNA. Fragmenty jsou separovány na denaturačním 5,5% polyakrylamidovém gelu a následně fluorescenčně detekovány. Z jejich pořadí je odečtena sekvence.

3.9.2.1 Gelová sekvenace

BRAF gen jsme amplifikovali v 30 μ l reakci s Cy5 značenými primery a reakčními podmínkami zjištěnými optimalizací. 5 μ l PCR produktu jsme použili na kontrolní 1,5% elektroforézu. Poté jsme provedli purifikaci produktu přes kolonky (DNA and Gel Band Purification Kit – Amersham Biosciences, UK). Do kolonek s filtrem bylo nanášeno 500 μ l Capture Buffer a 25 μ l PCR produktu a směs byla zcentrifugována při 13000g po dobu 1 min. Kolonky byly přemístěny do nových zkumavek a bylo přidáno 500 μ l Wash Buffer. Následovala centrifugace za stejných podmínek. Kolonky byly přeneseny do nových zkumavek a centrifugovány po dobu 2 min. Poté byly kolonky znovu přemístěny do nových zkumavek a do středu filtru bylo nanášeno 27 μ l sterilní H₂O. Vzorek byl inkubován po dobu 5 min při pokojové teplotě. Nakonec byl vzorek centrifugován 5 min při maximální rychlosti. Přečištěný PCR produkt byl použit pro sekvenační reakci.

Vlastní sekvenační reakce byla provedena s použitím Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kitu (USB, USA). Pro každý vzorek byly připraveny 4 mikrozkušavky, do kterých se nanoslo 4 μl jednoho ze čtyř ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP). Ve vedlejší mikrozkušavce byl připraven mix, který obsahoval 2 μl Reaction Buffer, 1 μl forward primeru, 2 μl Thermo Sequenase DNA polymerase a 12,5 μl purifikovaného DNA templátu. Mix byl po 4 μl rozpipetován do mikrozkušavek s ddNTP. Sekvenační reakce probíhala na termocykleru naprogramovaném na 50 cyklů (30 s 95 °C, 30 s 55 °C, 90 s 72 °C) a byla zastavena přidáním 4 μl Stop Solution (USB, USA). Fragменты byly po denuraci (3 min při 75 °C) a po 5 min chlazení na ledu nanášeny po 4 μl do jamek polyakrylamidového gelu. Analýza probíhala při 55 °C na automatickém fluorescenčním sekvenátoru ALFExpress II (Amersham Pharmacia Biotech, USA) a byla vyhodnocena pomocí ALFwin Software (Amersham Pharmacia Biotech, USA).

3.9.2.2 Kapilární sekvenace

Později jsme sekvenaci převedli na kapilární sekvenátor CEQ 8000 (BeckmanCoulter). Amplifikace genu byla provedena v 30 μl reakci s neznačenými primery a s reakčními podmínkami zjištěnými optimalizací. DNA byla purifikována pomocí kitu (DNA and Gel Band Purification Kit – Amersham Biosciences, UK) stejným způsobem jako u předešlé sekvenace s tím rozdílem, že na kolonku bylo nanoseno 10 μl PCR produktu a navázaná DNA byla rozpuštěna ve 20 μl sterilní H_2O (u vzorků, které při kontrolní elektroforéze vykazovaly slabou koncentraci PCR produktu, bylo použito jen 10 μl H_2O). Poté byla provedena sekvenační reakce s 4,4 μl přečištěného PCR produktu, 1,6 μl neznačeného forward primeru (tabulka) a 4 μl DTCS (Dye Terminator Cycle Sequencing) Quick Start Master Mixu. Následovala vlastní sekvenační reakce s podmínkami: 20 s při 96 °C, 20 s při 50 °C (30 cyklů) a 4 min při 60 °C.

Poté byla DNA vysrážena pomocí ethanolu. Nejdříve byl připraven čerstvý Stop Solution/Glycogen mixture: 2 μl 3M octanu sodného (pH 5.2), 2 μl 100 mM Na_2EDTA (pH 8) a 1 μl 20 mg/ml glykogenu na jednu sekvenační reakci. Do každé zkušavky bylo dáno 5 μl této směsi a k ní byla přidána sekvenační směs. Poté bylo k směsi nanoseno 60 μl ledového 95% ethanolu a centrifugováno při 14000 RPM a 4 °C po dobu 15 min. Supernatant byl odstraněn. Peleta byla dvakrát promyta 200 μl ledovým 70% ethanolem. Vždy následovala centrifugace při 14000 RPM a 4 °C po dobu 2 min. Byl odstraněn supernatant a peleta byla

vysušena. Poté byla peleta resuspendována v 40 μl Sample Loading Solution a inkubována 10 min při pokojové teplotě. Vzorky byly přeneseny na destičku.

Později jsme ethanolové srážení nahradili rychlejším postupem pomocí magnetu Agencourt Clean. Amplifikace, purifikace a sekvenační reakce byly provedeny podle postupu popsaneho výše. Poté byl připraven čerstvý Stop Solution: 50 μl sterilní H_2O , 20 μl 3M octanu sodného, 20 μl 100mM Na_2EDTA a 10 μl 20mg/ml glykogenu na 1 řadu (8 vzorků). Do každého vzorku (10 μl) bylo přidáno 5,5 μl Stop Solution, 10 μl roztoku s magnetickými částicemi a 42 μl 85% ethanolu. Následovala 10 min inkubace při pokojové teplotě a 3 min inkubace na magnetu. Ze zkumavek uložených v magnetu byl odstraněn supernatant a ke každému vzorku bylo přidáno 100 μl 85% ethanolu. Následovala 30 s inkubace na magnetu a odstranění supernatantu. Zkumavky byly odebrány z magnetu a vysušeny 10 min při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 40 μl SLS ke každému vzorku a vzorky byly 5 min inkubovány při pokojové teplotě. Následně byly zkumavky vloženy na magnet a 3 min inkubovány. Poté bylo odebráno 35 μl vzorku a přeneseno na destičku.

Každý vzorek byl překryt 1 kapkou minerálního oleje. Destička byla vložena do kapilárního sekvenátoru CEQ 8000 a byla provedena sekvenační analýza. Data byla vyhodnocena pomocí softwaru.

3.10 STATISTIKA A VYHODNOCENÍ DAT

V současné době je základem vyhodnocení experimentálních měření interaktivní statistická analýza dat na počítači, která umožňuje získat z dat maximální množství užitečné informace. Současné počítačové postupy rozšířily klasické statistické testy o grafické diagnostiky dat a zároveň o celou škálu neparametrických metod vhodných pro data vykazující odchylky od normálního rozdělení. V lékařských vědách většinou neočekáváme normální rozložení dat s nepřítomností odlehlých bodů. Zároveň ale nemůžeme osoby vybočující z našeho výběru (tzv. odlehlé hodnoty) ze statistických analýz vyloučit, protože obsahují cennou informaci o onemocnění. Proto je nutné použít robustní neparametrické statistické metody, nebo data před testováním vhodně transformovat (78).

Statistické zhodnocení výsledků bylo provedeno s pomocí programů NCSS 2004, QC.Expert 2.7 a Microsoft Excel 2000.

3.10.1. Analýza výběru

3.10.1.1 Průzkumová analýza jednorozměrných dat EDA

Grafické diagnostiky statistických zvláštností výběru dat: Diagramy rozptýlení, kvantilový graf, graf k porovnání distribuční funkce výběru se standardizovanou distribuční funkcí normálního rozdělení (pravděpodobnostní graf), graf pro diagnostiku normality a odlehlých měření (kvantil-kvantilový graf), graf rozptýlení s kvantily, histogram (histogram četností dat v jednotlivých třídách) pomohly identifikovat typ rozdělení výběru a nalézt vybočující hodnoty.

3.10.1.2 Odhady míry polohy, rozptýlení a tvaru

Pomocí výše uvedeného softwaru byly stanoveny tyto základní statistiky: počet, průměr, výběrovou směrodatnou odchylku, medián, percentily, kvartily, konfidenční intervaly, maximální a minimální hodnotu, modus.

3.10.2 Testování hypotéz

Při testování hypotéz je nezbytné vycházet z informací získaných z analýzy výběru a na základě toho zvolit správné metody. U výběrů, kde počty osob jsou velmi malé, je třeba obezřetnosti při výběru metody a interpretaci výsledků. Nulové hypotézy byly testovány na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

3.10.2.1 Mann-Whitneyův test

Pro porovnání rozdílu sledovaných parametrů mezi skupinami byl použit Mann-Whitneyův test, který pracuje s pořadím hodnot. Normální rozložení se u tohoto testu nepředpokládá, proto byl zvolen jako nejvhodnější (79).

3.10.2.2 Fisherův přesný (exaktní) test

Míru asociace v kategoriálních datech lze zkoumat pomocí různých testů. Základním testem je chí-kvadrát test o vzájemné nezávislosti v kontingenční tabulce. Je založen na porovnání empirických a očekávaných četností v kontingenční tabulce. V případě malého rozsahu výběru (pod 20 pozorování) je pro kontingenční tabulky přesnější použít Fisherův exaktní test. Jako testovací kritérium byl zvolen Pearsonův Chí-kvadrát se stupni volnosti vždy odpovídajícím rozsahu kontingenční tabulky (79).

4. VÝSLEDKY

4.1 ZAVEDENÍ METODIKY

4.1.1 Izolace nukleových kyselin

V této diplomové práci byly zavedeny metody pro izolaci DNA z biopsií tenkou jehlou, čerstvých tkání a parafinových bločků a izolaci RNA z čerstvých tkání a biopsií.

RNA z parafinových bločků se podařilo izolovat pouze pomocí modifikované fenol - chloroformové izolace. Koncentrace RNA ve vzorcích byla vysoká. Po provedení reverzní transkripce byly exprimovány kontrolní a fúzní geny u kontrolních vzorků, ale u cDNA z parafinových bločků byl detekován pouze kontrolní *GAPDH* gen. Ostatní kontrolní ani fúzní geny se nepodařilo detekovat. Může to být zapříčiněno velkou fragmentací RNA vzhledem ke stáří vzorků a inkubaci tkáně ve formolu.

4.1.2 Optimalizace reakčních PCR podmínek pro kontrolní a fúzní geny *RET/PTC1* a *RET/PTC3*

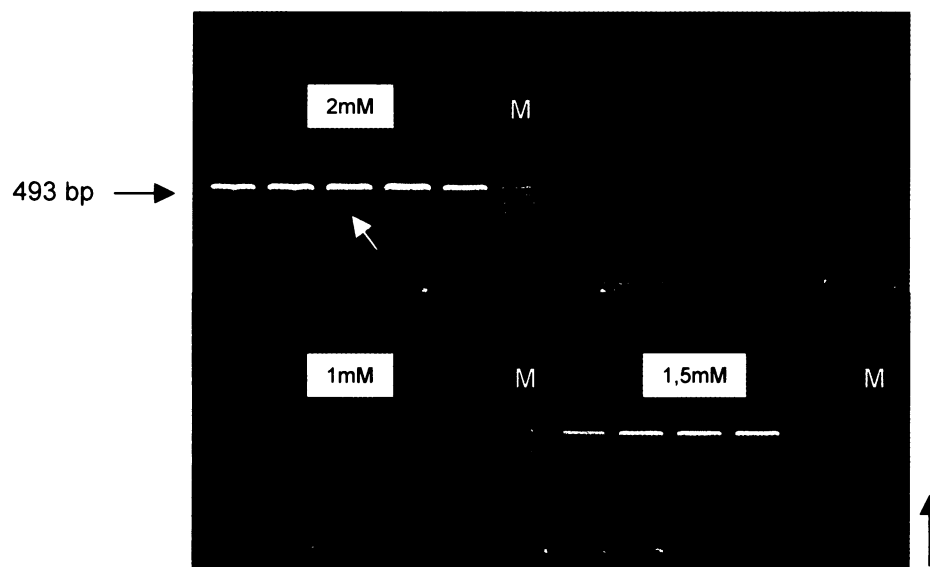
Nalezení optimálních podmínek pro PCR amplifikaci je důležitým krokem, na kterém závisí úspěšnost dalších analýz. Optimalizace reakčních podmínek byla provedena na vybraných vzorcích DNA pozitivních pro určitý gen.

Nejdříve jsme optimalizovali stanovení exprese *GAPDH* genu, který jsme následně používali jako kontrolu kvality RNA, úspěšného provedení reverzní transkripce a přítomnosti cDNA. Pro optimalizaci jsme použili náhodně vybraný vzorek cDNA. Vybrali jsme tyto reakční podmínky: 2mM MgCl₂ a 57 °C (obr. 9).



Obr. 9 Fotografie elektroforézy optimalizace PCR amplifikace genu *GAPDH* na 3% agarózovém gelu. Teploty nasedání primerů (annealing) zleva u každé koncentrace: 50 °C; 55,1 °C; 57 °C; 64 °C. M – hmotnostní marker. Černé šipky ukazují velikost PCR produktu a směr elektroforézy, bílá šipka označuje nalezené optimální podmínky reakce.

Dalším optimalizovaným genem byl gen *PAX8*. Tento gen jsme používali jako kontrolu původu nádoru z folikulárních buněk štítné žlázy. Pro optimalizaci jsme použili náhodný vzorek cDNA izolovaný z PTC. Výsledkem optimalizace byly tyto podmínky: 2mM MgCl₂ a 57 °C (obr.2).

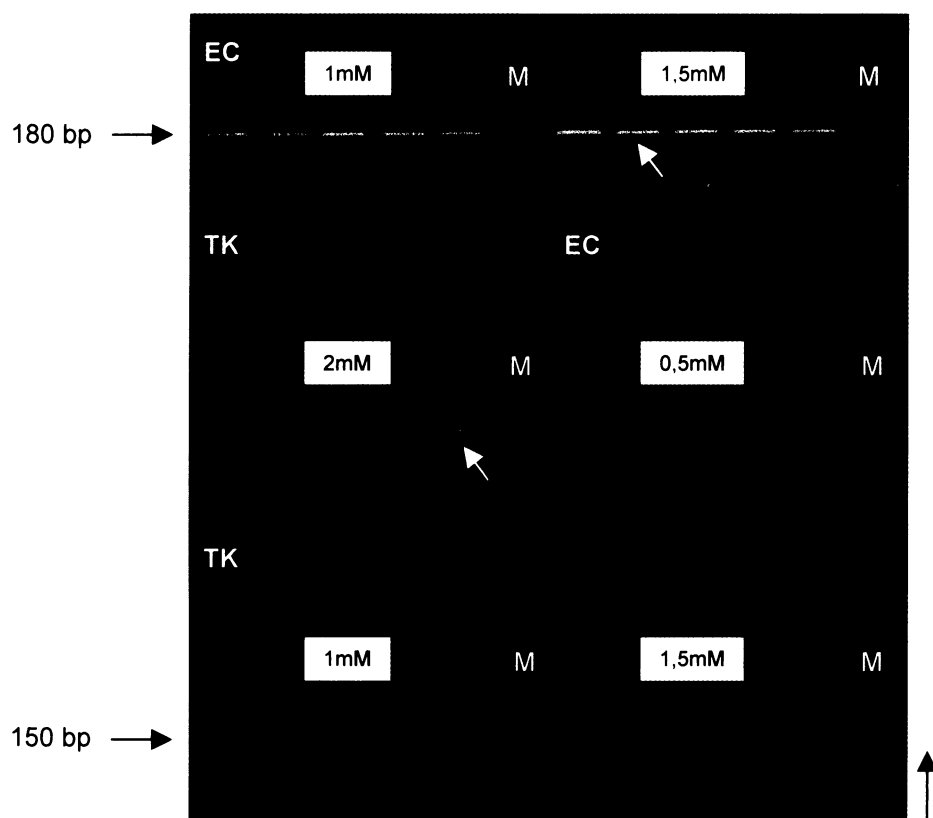


Obr. 10 Fotografie elektroforézy optimalizace PCR amplifikace genu *PAX8* na 1,5% agarózovém gelu. Teploty nasedání primerů (annealing) jsou vzestupně zleva u každé koncentrace: 50 °C; 55,1 °C; 57 °C; 60,8 °C; 64 °C. M – hmotnostní marker. Černé šipky ukazují velikost PCR produktu a směr elektroforézy, bílá šipka označuje nalezené optimální podmínky reakce.

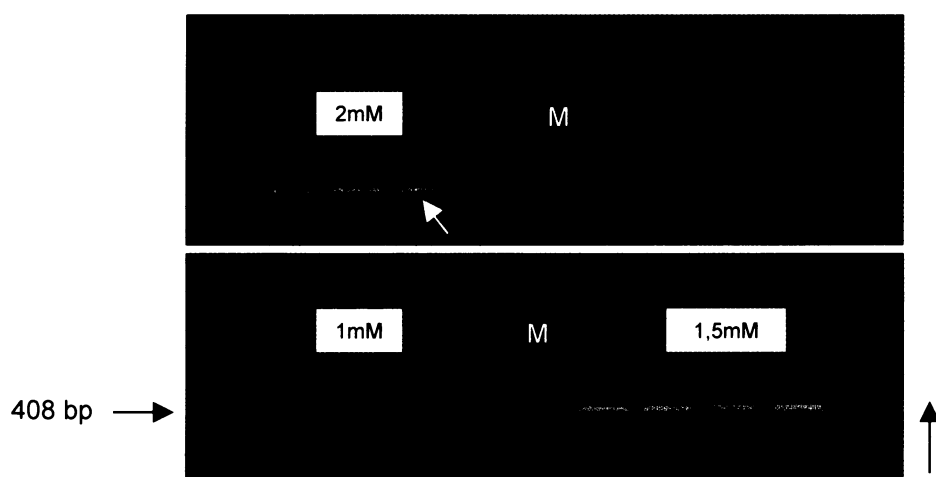
Dále jsme optimalizovali PCR amplifikaci dvou domén *RET* genu – EC a TK domény. Přítomnost EC domény naznačuje, že se jedná o medulární karcinom odvozený z parafolikulárních buněk štítné žlázy, v případě PTC by se EC doména neměla exprimovat. U *RET/PTC* přeskupení se exprimuje pouze TK doména, její přítomnost tedy naznačuje, že se jedná o nějakou fúzní formu *RET/PTCX* (blíže neurčený typ fúzního genu).

Pro optimalizaci těchto dvou domén *RET* genu jsme si vybrali cDNA z MTC, kde se exprimuje celý *RET* gen. Za optimální podmínky reakce jsme určili tyto: EC doména – 1,5mM MgCl₂ a 64 °C, TK doména - 2mM MgCl₂ a 64 °C (obr. 11).

Dalším optimalizovaným genem byl gen pro kalcitonin, který jsme používali v případě pozitivní EC domény jako kontrolu, že se nejedná o MTC, ve kterém se kalcitonin exprimuje. Optimalizaci jsme provedli na cDNA izolované z MTC. Za optimální jsme určili tyto podmínky: 2mM MgCl₂ a 60 °C (obr. 12).

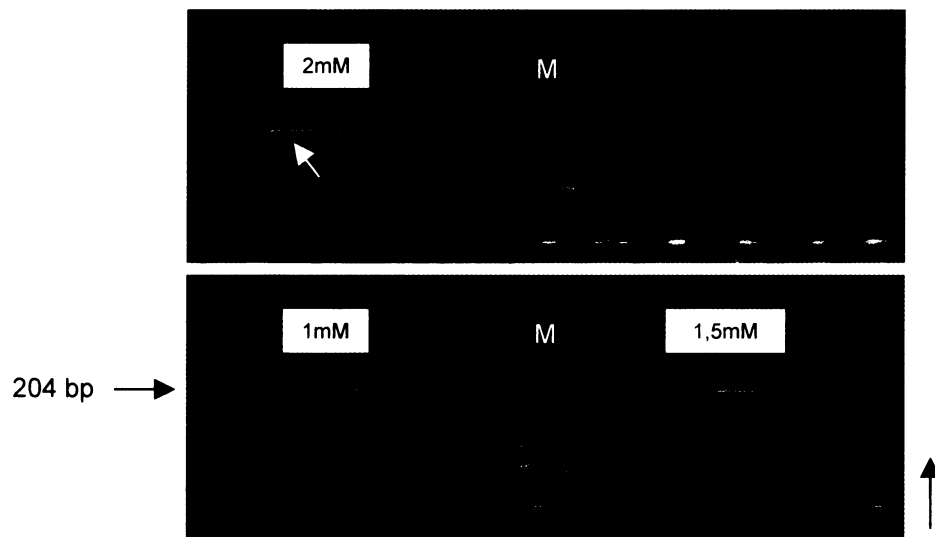


Obr. 11 Fotografie elektroforézy optimalizace PCR amplifikace pro TK a EC doménu *RET* genu na 3% agarózovém gelu. TK doména – teploty annealingu zleva u každé koncentrace: 50 °C; 55,1 °C; 57 °C; 60,8 °C; 64 °C. EC doména – teploty annealingu zleva u každé koncentrace: 63 °C; 64,9 °C; 66,8 °C; 68,7 °C; 70,5 °C. M – hmotnostní marker. Černé šipky ukazují velikost PCR produktu a směr elektroforézy, bílá šipka označuje nalezené optimální podmínky reakce.

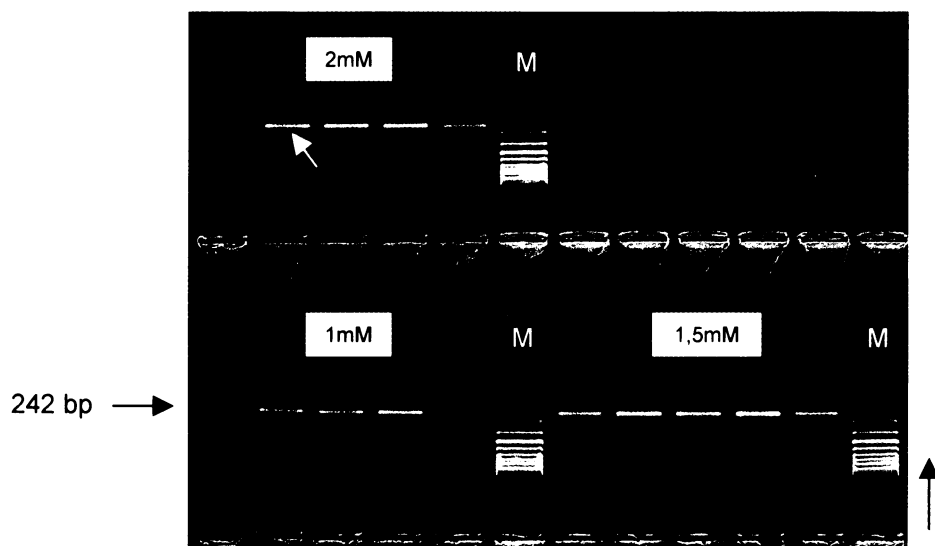


Obr. 12 Fotografie elektroforézy optimalizace PCR amplifikace pro kalcitonin na 1,5% agarózovém gelu. Teploty annealingu zleva u každé koncentrace: 50 °C; 55,1°C; 57 °C; 60,8 °C; 64 °C. M – hmotnostní marker. Černé šipky ukazují velikost PCR produktu a směr elektroforézy, bílá šipka označuje nalezené optimální podmínky reakce.

Dále jsme optimalizovali detekci dvou nejčastějších *RET/PTC* přeskupení – *RET/PTC1* a *RET/PTC3*. Optimalizaci jsme provedli na vzorcích přivezených z Itálie (Prof. R. Elisei, University of Pisa), které jsou pozitivní pro tyto formy. Nalezené optimální podmínky reakce byly u obou forem stejné: 2mM MgCl₂ a 55 °C (obr. 13 a 14).



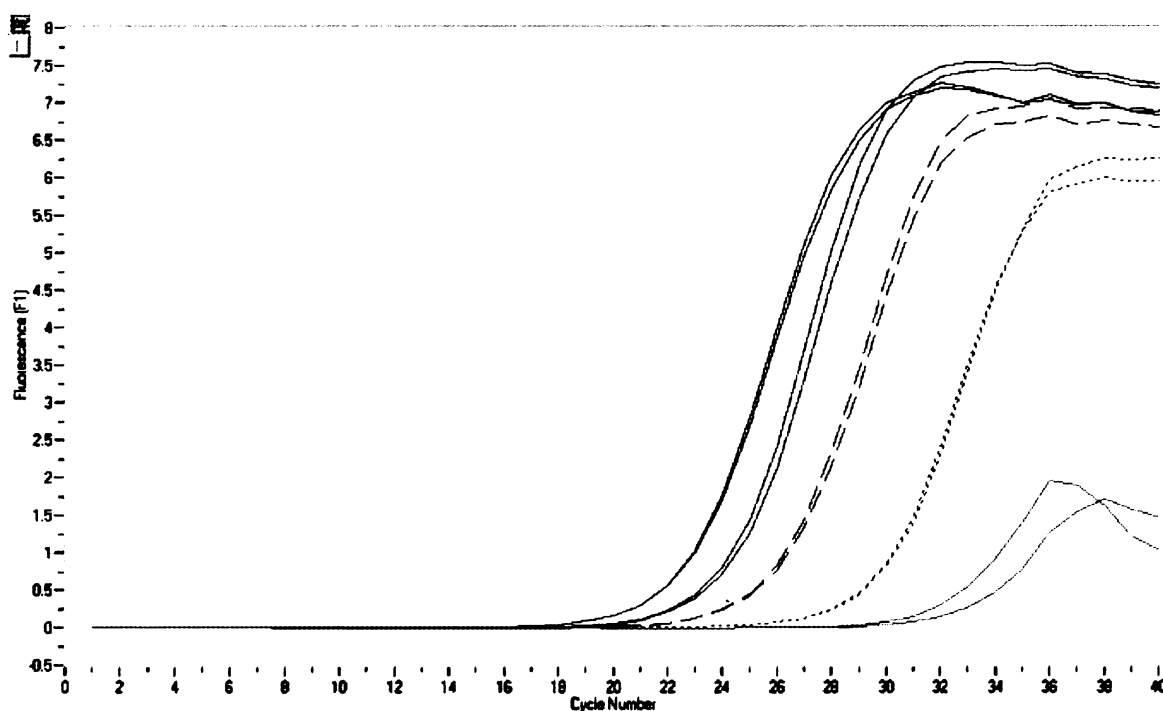
Obr. 13 Fotografie elektroforézy optimalizace PCR amplifikace pro *RET/PTC1* přeskupení na 3% agarózovém gelu. Teploty annealingu zleva u každé koncentrace: 50 °C; 55,1 °C; 57 °C; 60,8 °C; 64 °C. M – hmotnostní marker. Černé šipky ukazují velikost PCR produktu a směr elektroforézy, bílá šipka označuje nalezené optimální podmínky reakce.



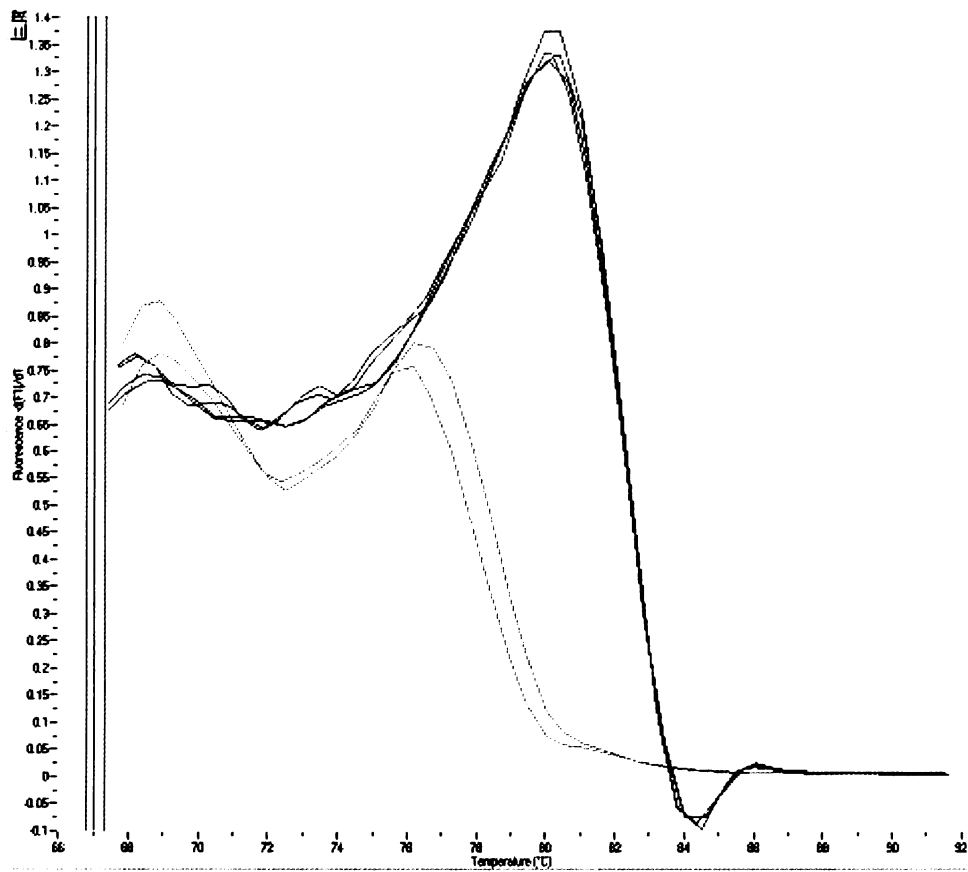
Obr. 14 Fotografie elektroforézy optimalizace PCR amplifikace pro *RET/PTC3* přeskupení na 1,5% agarózovém gelu. Teploty annealingu zleva u každé koncentrace: 50 °C; 55,1 °C; 57 °C; 60,8 °C; 64 °C. M – hmotnostní marker. Černé šipky ukazují velikost PCR produktu a směr elektroforézy, bílá šipka označuje nalezené optimální podmínky reakce.

4.1.3 Detekce TK domény pomocí Real Time PCR

Optimalizaci Real Time PCR pro TK doménu *RET* genu jsme provedli pomocí dvou různých primerů, dvou pozitivních kontrol, různých koncentrací $Mn(OAc)_2$ a rozdílných teplot pro nasednutí primerů a přírůstku teplot (acquisition) (podrobně v příloze, End Report). Pro každou analýzu jsme používali pozitivní kontrolu ve třech počátečních množstvích: 50ng, 5ng, 0,5ng (RNA z buněčné linie SHSY) a negativní kontrolu H_2O . Každý vzorek byl analyzován paralelně ve dvou reakcích. Vzorky byly hodnoceny podle kvantifikační křivky (obr. 15) i podle rozdílného bodu tání – tzv. melting curve (obr. 16). Výsledky jsou uvedeny v End Report (příloha). Stanovení exprese výše zmíněných genů a fúzních forem pomocí Real Time PCR bude v brzké době zavedeno v Endokrinnologickém ústavu.



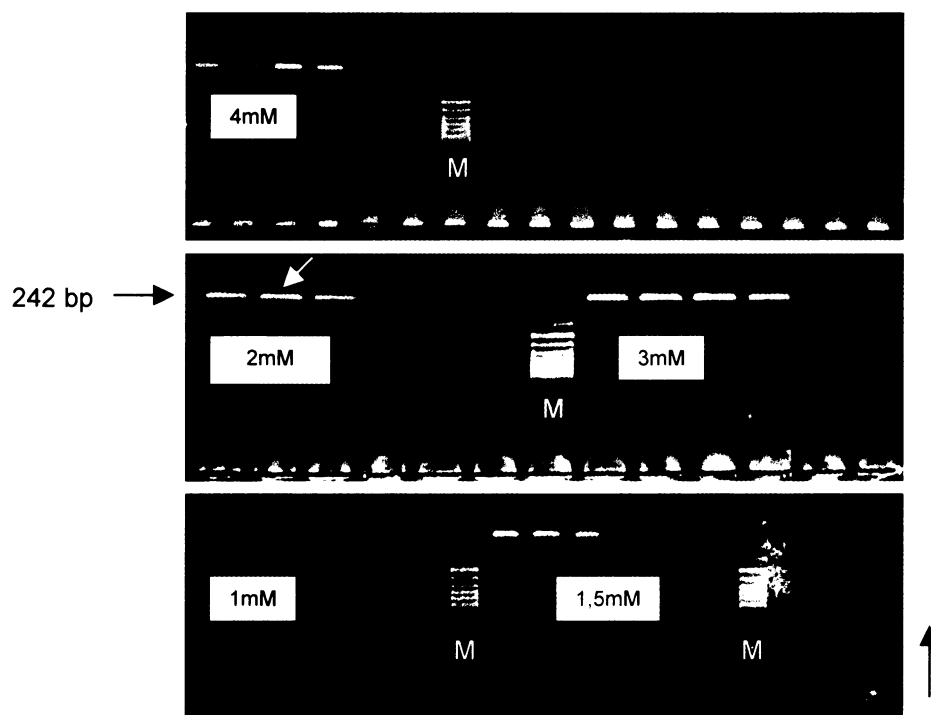
Obr. 15 Kvantifikace TK domény *RET* genu pomocí Real Time PCR. Červeně: pozitivní kontroly SHSY (cell line) - zleva: 50ng, 5 ng, 0,5 ng. Modře - analyzovaný vzorek (pozitivní), šedě - H_2O (negativní kontrola).



Obr. 16 Analýza TK domény *RET* genu pomocí melting curve. Červeně – pozitivní kontrola SHSY (cell line) 50 ng. Modře – analyzovaný vzorek (pozitivní). Šedě – H₂O (negativní kontrola)

4.1.4 Optimalizace podmínek pro PCR *BRAF* genu

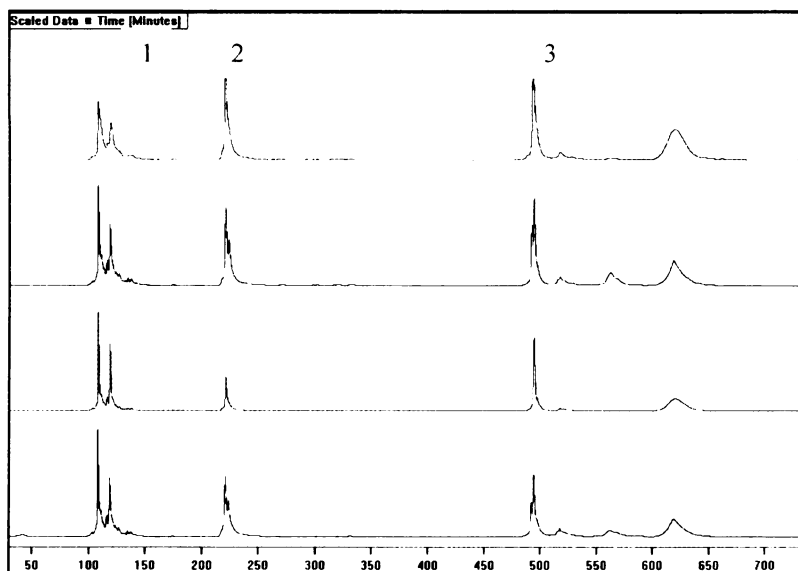
PCR amplifikaci 15. exonu *BRAF* genu jsme optimalizovali pomocí náhodně vybraných vzorků DNA. Za optimální jsme určili tyto podmínky: teplota annealingu - 57,5 °C, a koncentrace MgCl₂ - 2 mM (obr. 17).



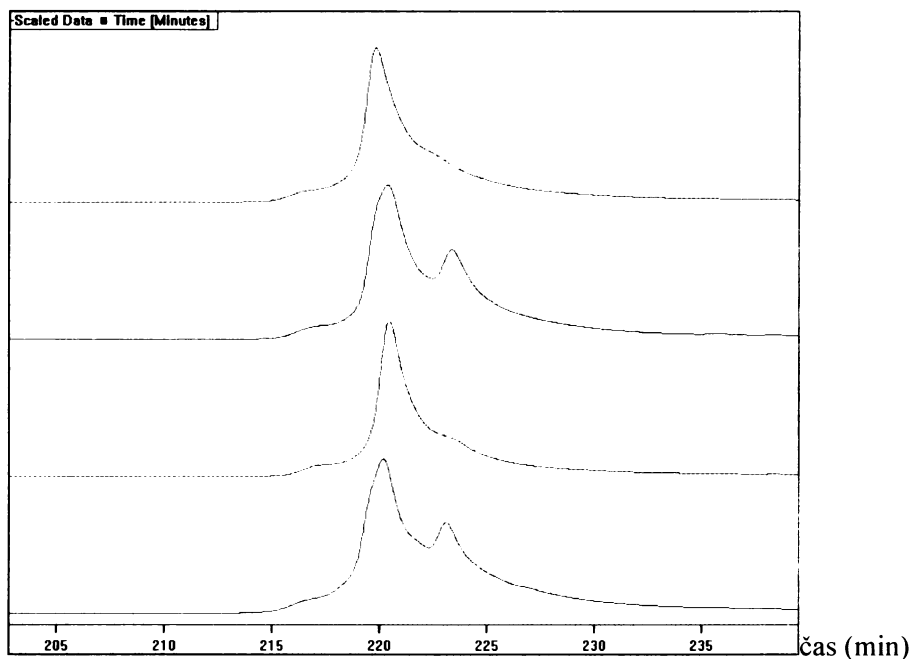
Obr. 17 Fotografie elektroforézy optimalizace PCR amplifikace pro 15. exon *BRAF* genu na 1,5% agarózovém gelu. Teploty annealingu zleva u každé koncentrace: 56 °C; 57,5 °C; 61,1 °C; 64,9 °C; 68,7 °C; 71,6 °C. M – hmotnostní marker. Černé šipky ukazují velikost PCR produktu a směr elektroforézy, bílá šipka označuje nalezené optimální podmínky reakce.

4.1.5 SSCP detekce

Optimální podmínky pro detekci *BRAF* mutace pomocí SSCP byly nalezeny při 7 °C na 10% nenedenuračním polyakrylamidovém gelu. Pro optimalizaci byly použity pozitivní vzorky s *BRAF* V600E mutací. Pozitivní a negativní vzorky se na SSCP analýze lišily tvarem křivek mezi 215. a 225. min. Zatímco pozitivní heterozygotní vzorky měly v tomto místě dva vrcholy, negativní vzorky měly pouze jeden (obr. 18, 19).



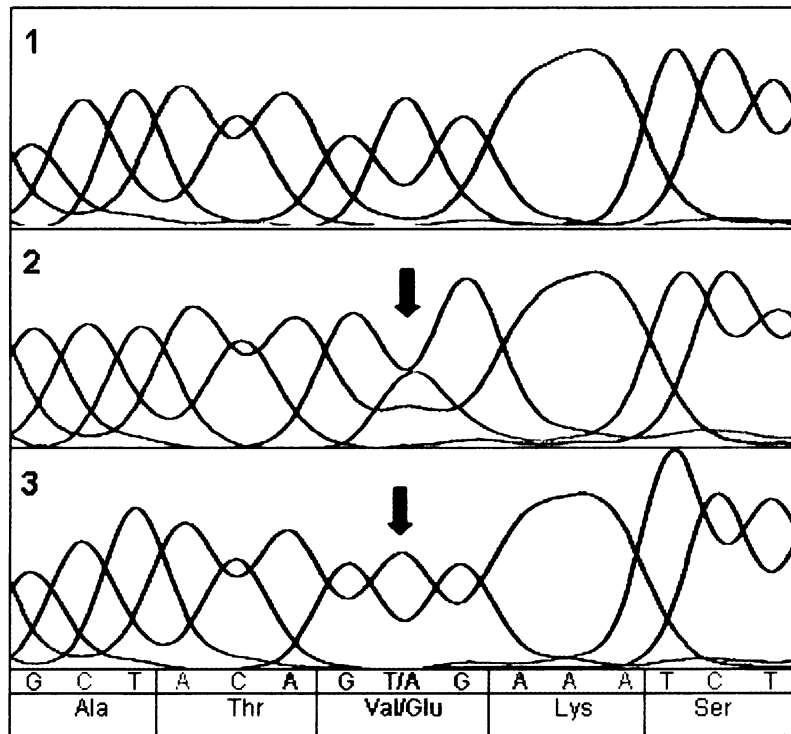
Obr. 18 SSCP analýza *BRAF* proto-onkogenu při 7 °C. Modře - *BRAF* negativní vzorek, červeně - *BRAF* pozitivní vzorek. 1 - zbylé primery, 2 - dsDNA, 3 - ssDNA.



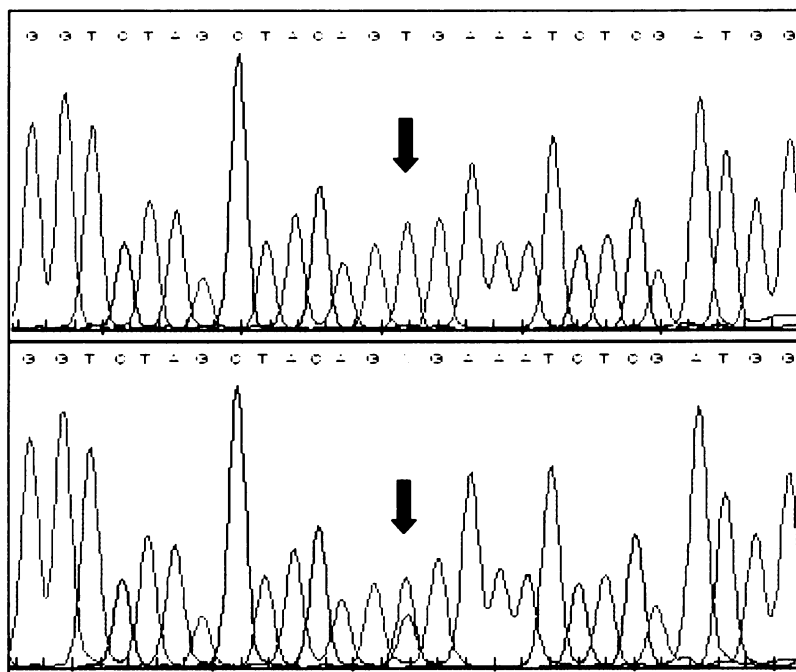
Obr. 19 SSCP analýza *BRAF* proto-onkogenu při 7 °C. Modře - *BRAF* negativní vzorek, červeně - *BRAF* pozitivní vzorek.

4.1.6 Přímá fluorescenční sekvenace

Vzorky, které pomocí SSCP byly vyhodnoceny jako pozitivní, byly osekvenovány přímou fluorescenční sekvenací. Nejdříve jsme sekvenovali gelovou sekvenací (obr. 20), později jsme zavedli rychlejší kapilární sekvenaci (obr. 21).



Obr. 20 Sekvenace *BRAF* genu pomocí gelové sekvenace. 1. Vzorek bez mutace V600E. 2. Heterozygotní vzorek s mutací V600E. 3. Homozygotní vzorek s mutací V600E.



Obr. 21 Sekvenace *BRAF* mutace V600E pomocí kapilární sekvenace. Nahore – vzorek bez mutace, dole – vzorek s mutací, heterozygot.

4.2 VYHODNOCENÍ

4.2.1 Kontrolní geny a *RET/PTC* přeskupení

Detekcí exprese *GAPDH* genu byla potvrzena přítomnost cDNA. Původ buněk byl ověřen expresí genu *PAX8*.

TK doména společně s EC doménou byla pozitivní u 8 vzorků PTC. U těchto vzorků byla provedena amplifikace kalcitoninu. Všechny vzorky byly negativní.

Pomocí gelové elektroforézy (viz. kap. 3.8.2) se nám podařilo detekovat 2 *RET/PTC1*, 1 *RET/PTC3* a 10 zatím neurčených fúzních forem *RET/PTCX* (pozitivní TK doména). Celkem se tedy podařilo detekovat *RET/PTC* přeskupení u 13 z 67 pacientů s PTC (19,4 %) (tab. 4). U ostatních PTC tkání (staré parafinové bločky) se ani po mnoha metodických pokusech (viz kap. 3.3.3) a konzultacích se zahraničními pracovišti nepodařilo vyizolovat dostatečně kvalitní genetický materiál, který by analýzu fúzních forem umožňoval. Charakteristika pacientů s *RET/PTC* přeskupením je uvedena v tabulce 4. V tabulce 5 je srovnání klinicko-patologických parametrů pacientů s *RET/PTC* přeskupením s pacienty, u nichž tyto genetické alterace nebyly nalezeny. Statisticky významně vyšel pouze rozdíl v zastoupení mužů a žen ve skupinách ($p=0,019$). Mezi pacienty s detekovaným *RET/PTC* přeskupením byl poměr ženy : muži roven 1,6 : 1, kdežto ve skupině pacientů s PTC bez *RET/PTC* přeskupení byl tento poměr 9,75 : 1.

U jedné pacientky, která byla primárně odoperována pro MTC, jsme překvapivě našli *RET/PTC1* přeskupení. V tomto případě se jedná o smíšený MTC-PTC. Pacientka (25 let) měla vysoký kalcitonin - 1088ng/l (normální hladina do 8,9 ng/l) a klasifikaci tumoru T3N1Mx. Byla u ní nalezena somatická mutace Met918Thr v *RET* genu typická pro MTC.

Tab. 4a Přehled pacientů s *RET/PTC* přeskupením

Vzorek	<i>RET/PTC</i>	<i>BRAF</i>	Pohlaví	Rok operace	Věk ^a	Varianta	Velikost (mm)	T
100	<i>RET/PTC1</i>	n	z	2006	33 (13)	FV	10	1
177	<i>RET/PTC1</i>	n	m	2007	19 (0)	DS	20	2
94	<i>RET/PTC3</i>	n	z	2006	12 (0)	FV		
4	<i>RET/PTCX</i>	n	m					
14	<i>RET/PTCX</i>	n	z	2003	13 (0)	FV	17	2
39	<i>RET/PTCX</i>	n	z	2005	67 (48)			1
44	<i>RET/PTCX</i>	n	m	2005	47 (29)	O		
50	<i>RET/PTCX</i>	V600E	z	2005	72 (53)			1
61	<i>RET/PTCX</i>	n	z	2005	29 (10)	O	18	2
87	<i>RET/PTCX</i>	V600E	m	2005	59 (40)	FV	22	2
144	<i>RET/PTCX</i>	n	z	2006	14 (0)		17	2
159	<i>RET/PTCX</i>	V600E	z	2006	34 (14)	K	25	2
181	<i>RET/PTCX</i>	V600E	m	2007	26 (5)	K	9	1

^a V závorce je uveden věk v období černobylské havárie.

RET/PTCX – blíže neurčené *RET/PTC* přeskupení (pozitivní TK doména *RET* genu)

n – bez *BRAF* V600E mutace (negativní)

FV – folikulární varianta, DS – difúzní sklerotizující varianta, O – onkocytární PTC,

K – klasický PTC

T – hodnocení primárního tumoru

Tab. 4b Přehled pacientů s *RET/PTC* přeskupením - pokračování

Vzorek	<i>RET/PTC</i>	<i>BRAF</i>	N	Fokalita	Pouzdro	Invaze	Angioinvaze
100	<i>RET/PTC1</i>	n	N1	U	ano	ano	
177	<i>RET/PTC1</i>	n					
94	<i>RET/PTC3</i>	n	N1		ne		
4	<i>RET/PTCX</i>	n					
14	<i>RET/PTCX</i>	n	N1			ano	
39	<i>RET/PTCX</i>	n	N0	U	ano	ne	
44	<i>RET/PTCX</i>	n		M			
50	<i>RET/PTCX</i>	V600E		M		ne	ne
61	<i>RET/PTCX</i>	n				ne	ne
87	<i>RET/PTCX</i>	V600E			ano	ne	
144	<i>RET/PTCX</i>	n		M	ne		ne
159	<i>RET/PTCX</i>	V600E		M	ano	ano	
181	<i>RET/PTCX</i>	V600E	N0	U			

RET/PTCX – blíže neurčené *RET/PTC* přeskupení (pozitivní TK doména *RET* genu)

n – bez *BRAF* V600E mutace (negativní)

N – hodnocení přítomnosti metastáz v lymfatických uzlinách, N0 – bez metastázy, N1 – s metastázou

U – unifokální, M – multifokální

Pozn.: Lékařská dokumentace mnohdy postrádala zpětně již nezjistitelné údaje, proto klinicko-patologické parametry nebyly určeny u všech pacientů.

Tab. 5 Souhrn klinicko-patologických parametrů u pacientů s PTC a jejich závislosti na přítomnosti *RET/PTC* přeskupení (*RET/PTC1*, *RET/PTC3* a *RET/PTCX*).

	Celkem (%)	<i>RET/PTC</i>		Bez přeskupení		statistika*
		počet	%	počet	%	
Pacienti	67					
muži	10 (14,9)	5	38,5	5	9,3	p=0,019; $\chi^2=7,037$
ženy	57 (85,1)	8	61,5	49	90,7	
Věk						
< 30 let	19 (29,7)	6	50,0	13	25,0	p=0,186; $\chi^2=3,503$
30 - 60 let	36 (56,3)	4	33,3	32	61,5	
> 60 let	9 (14,0)	2	16,7	7	13,5	
Velikost nádoru						
< 15 mm	28 (50,0)	4	40,0	24	52,2	p=0,660; $\chi^2=1,161$
16 - 40 mm	26 (46,4)	6	60,0	20	43,5	
> 41 mm	2 (3,6)	0	0,0	2	4,3	
Variety PTC						
klasická	7 (15,9)	2	22,2	5	14,3	p=0,490; $\chi^2=1,371$
folikulární	27 (61,4)	4	44,4	23	65,7	
ostatní	10 (22,8)	3	33,4	7	20,0	
Invaze						
ano	20 (52,6)	3	42,9	17	54,8	p=0,687; $\chi^2=0,329$
ne	18 (47,4)	4	57,1	14	45,2	
N						
N0	9 (28,1)	2	40,0	7	25,9	p=0,604; $\chi^2=0,413$
N1	23 (71,9)	3	60,0	20	74,1	
Multifokalita						
M	11 (50,0)	4	57,1	7	46,7	p=1,000; $\chi^2=0,21$
U	11 (50,0)	3	42,9	8	53,3	
Opouzdění						
ano	26 (83,9)	4	66,7	22	88,0	p=0,241; $\chi^2=1,628$
ne	5 (16,1)	2	33,3	3	12,0	
Angioinvaze						
ano	5 (53,3)	0	0,0	5	41,7	p=0,505; $\chi^2=1,875$
ne	10 (66,7)	3	100,0	7	58,3	

* Fisherův exaktní test (p= pravděpodobnost na hladině významnosti $\alpha=0.05$;
 χ^2 = Pearsonův Chí-kvadrát se dvěma stupni volnosti)

N – hodnocení metastáz v lymfatických uzlinách, N0 – bez metastáz, N1 – s metastázami
M – multifokální, U - unifokální

Pozn.: Vzhledem k tomu, že řada vzorků byla vyhledána retrospektivně, lékařská dokumentace mnohdy postrádala zpětně již nezjistitelné údaje.

Porovnali jsme také výskyt *RET/PTC* přeskupení u jednotlivých histologických variant v závislosti na pohlaví (tab.6) a věkové rozložení pacientů s mutací *RET/PTC1*, *RET/PTC3* a *RET/PTCX* (tab.7).

Tab. 6 Výskyt *RET/PTC* přeskupení u jednotlivých histologických typů PTC.

Varianty PTC	Celkem ^a	<i>RET/PTC</i>		Bez přeskupení		statistika ^c
		počet	%	počet	%	
Klasická	7	2	28,6	5	71,4	p=1,000 $\chi^2=0,630$
muži	2	1	50,0	1	20,0	
ženy	5	1	50,0	4	80,0	
Folikulární	27	4	14,8	23	85,2	p=0,394 $\chi^2=0,917$
muži	3	1	25,0	2	8,7	
ženy	24	3	75,0	21	91,3	
Ostatní^b	10	3	30,0	7	70,0	p=0,183 $\chi^2=2,744$
muži	3	2	66,7	1	14,3	
ženy	7	1	33,3	6	85,7	

* Fisherův exaktní test (p= pravděpodobnost na hladině významnosti $\alpha=0.05$; χ^2 = Pearsonův Chí-kvadrát se jedním stupněm volnosti)

^a U 23 pacientů s PTC nebyl určen histologický typ nádoru.

^b Ostatní varianty PTC: 6 onkocytární, 1 varianta z vysokých buněk, 1 světlobuněčná, 1 kribiformní, 1 difúzní sklerotizující.

Tab. 7 Věkové rozložení pacientů s *RET/PTC* přeskupením a bez něj.

	Počet	Průměr ± SD	Medián (rozmezí)
<i>RET/PTC1</i>	2	19,0; 33,0	
<i>RET/PTC3</i>	1	12,0	
<i>RET/PTCX</i> ^a	9	40,1 ± 22,14	34,0 (13 - 72)
Bez přeskupení	52	42,1 ± 17,64	42,5 (11 - 81)
Celkem^b	65	40,9 ± 18,23	40,0 (11 - 81)

^a *RET/PTCX* - neurčené *RET/PTC* přeskupení (pozitivní pro TK doménu *RET* genu).

^b Věk nebyl určen u 2 pacientů s PTC.

4.2.2 BRAF V600E mutace

Celkem z 202 vzorků čerstvých tkání (n = 61), biopsií tenkou jehlou (n = 8) a parafinových bločků (n = 133) jsme izolovali DNA a studovali přítomnost somatické mutace *BRAF* genu pomocí metody SSCP. Pozitivní vzorky jsme ověřili přímou fluorescenční sekvenací (viz kap. 3.9). Tabulka 8 udává porovnání klinicko-patologických parametrů u pacientů s detekovanou mutací *BRAF* V600E a pacientů, u nichž není tato mutace přítomna.

Tab. 8 Souhrn klinicko-patologických parametrů a jejich závislost na výskytu *BRAF* mutace.

	Celkem	<i>BRAF</i> ^{V600E}		<i>BRAF</i> ^{WT}		statistika *
		počet	%	počet	%	
Pacienti	202					
muži	39	18	23,4	21	16,8	p=0,274
ženy	163	59	76,6	104	83,2	$\chi^2=1,323$
Věk						
< 30 let	37	13	16,9	24	19,7	p=0,129 $\chi^2=4,216$
30 - 60 let	106	36	46,8	70	57,4	
> 60 let	56	28	36,3	28	22,9	
Velikost nádoru						
< 15 mm	89	32	50,8	57	54,8	p=0,596 $\chi^2=1,16$
16 - 40 mm	64	27	42,9	37	35,6	
> 41 mm	14	4	6,3	10	9,6	
Variety PTC						
klasická	14	7	26,9	7	10,9	p=0,111 $\chi^2=4,297$
folikulární	54	12	46,2	42	65,6	
ostatní	22	7	26,9	15	23,5	
Invaze						
ano	34	14	56,0	20	55,6	p=1,000 $\chi^2=0,001$
ne	27	11	44,0	16	44,4	
N						
N0	19	8	36,4	11	36,7	p=1,000 $\chi^2=0,001$
N1	33	14	63,6	19	63,3	
Multifokalita						
M	18	5	20,0	13	37,1	p=0,253 $\chi^2=2,041$
U	42	20	80,0	22	65,9	
Opouzdření						
ano	40	15	83,3	25	86,2	p=1,000 $\chi^2=0,072$
ne	7	3	16,7	4	13,8	
Angioinvaze						
ano	15	7	77,8	8	50,0	p=0,229 $\chi^2=1,852$
ne	10	2	22,2	8	50,0	

* Fisherův exaktní test (p= pravděpodobnost na hladině významnosti $\alpha=0.05$; χ^2 = Pearsonův Chí-kvadrát s jedním nebo dvěma stupni volnosti). N – hodnocení metastáz v lymfatických uzlinách, N0 – bez metastáz, N1 – s metastázami, M – multifokální, U - unifokální

Pozn.: Vzhledem k tomu, že řada vzorků byla vyhledána retrospektivně, lékařská dokumentace často postrádala zpětně již nezjistitelné údaje.

Z důvodu zjištění vlivu černobylské havárie na výskyt *BRAF* mutace jsme soubor rozdělili do pěti období - jedno období před rokem 1986 a čtyři pětiletá období po černobylské havárii. Věkové složení souboru a pohlaví pacientů udává tabulka (tab. 9).

Tab. 9 Věkové rozložení pacientů s PTC v jednotlivých obdobích v závislosti na pohlaví.

Období	Počet	Věk při operaci (roky)	
		Průměr ± SD	Medián (rozmezí)
Před 1986	10	38,0 ± 16,69	34,5 (10 - 65)
muži	2	30; 31	
ženy	8	39,9 ± 18,38	38,0 (10 - 65)
1986 - 1990	11	56,1 ± 24,00	65,0 (16 - 84)
muži	3	37; 65; 84	
ženy	8	53,9 ± 25,32	64,0 (16 - 81)
1991 - 1995	17	53,5 ± 16,50	57,0 (17 - 73)
muži	2	39; 48	
ženy	15	54,9 ± 17,09	58,0 (17 - 73)
1996 - 2000	34	52,3 ± 15,84	52,0 (15 - 83)
muži	10	55,6 ± 10,62	52,0 (44 - 78)
ženy	24	50,9 ± 17,58	53,0 (15 - 83)
2001 - 2007	127	46,3 ± 18,39	47,0 (11 - 81)
muži	21	49,3 ± 20,80	46,0 (17 - 80)
ženy	106	45,7 ± 17,92	47,0 (11 - 81)
Celkem	199	48,1 ± 18,36	49,0 (10 - 84)
muži	38	50,7 ± 18,31	48,5 (17 - 84)
ženy	161	47,5 ± 18,37	49,0 (10 - 83)

^a Věk byl určen u 199 pacientů z 202. U 3 pacientů nebylo zjištěno přesné datum operace.

Celkem jsme somatickou *BRAF* mutaci detekovali u 77 pacientů s PTC (38,1%). Jeden pacient byl homozygotem, ostatní heterozygoty. Prevalenci mutace v jednotlivých obdobích, věkové rozložení a zastoupení pohlaví v závislosti na mutaci udávají tabulky 10, 11 a 12.

Tab. 10 Výskyt *BRAF* mutace v jednotlivých obdobích.

Období	Celkem	<i>BRAF</i> ^{V600E}		<i>BRAF</i> ^{WT}		statistika [*]
		počet	%	počet	%	
Před 1986	10	0	0,0	10	100,0	p=0,017 χ ² =11,005
1986 - 1990	11	6	54,6	5	45,4	
1991 - 1995	17	10	58,8	7	41,2	
1996 - 2000	34	11	32,4	23	67,6	
2001 - 2007	131	50	38,2	81	61,8	

* Fisherův exaktní test (p= pravděpodobnost na hladině významnosti α=0.05; χ²= Pearsonův Chi-kvadrát se čtyřmi stupni volnosti)

Tab. 11 Věkové rozložení pacientů s PTC v jednotlivých obdobích v závislosti na výskytu *BRAF* mutace.

Období	Počet	Věk (roky)		statistika [*]
		Průměr ± SD	Medián (rozmezí)	
Před 1986	10			
n	10	38 ± 16,69	34,5 (10 - 65)	
p	0	0	0	
1986 - 1990	11			
n	5	51,2 ± 26,87	37,0 (23 - 81)	p=0,784
p	6	60,2 ± 23,00	65,5 (16 - 84)	
1991 - 1995	17			
n	7	53,7 ± 22,85	58,0 (17 - 73)	p=0,591
p	10	53,4 ± 11,65	50,0 (38 - 72)	
1996 - 2000	34			
n	23	50,1 ± 17,53	49,0 (15 - 83)	p=0,294
p	11	56,8 ± 10,89	57,0 (39 - 78)	
2001 - 2007	127			
n	77	46,1 ± 17,83	48,0 (11 - 80)	p=0,884
p	50	46,7 ± 19,40	46,0 (18 - 81)	
Celkem	199			
n	122	46,8 ± 18,40	48,0 (10 - 83)	p=0,214
p	77	50,1 ± 18,24	52,0 (16 - 84)	

* Mann-Whitneyův test (p= pravděpodobnost na hladině významnosti $\alpha=0,05$)

^a Věk byl určen u 199 pacientů z 202. U 3 pacientů nebylo známo přesné datum operace.

n – negativní (bez mutace), p – pozitivní (mutace V600E)

Tab. 12 Výskyt *BRAF* mutace v jednotlivých obdobích v závislosti na pohlaví.

Období	Celkem	<i>BRAF</i> ^{V600E}		<i>BRAF</i> ^{WT}		statistika [*]
		počet	%	počet	%	
Před 1986	10					
muži	2	0	0,0	2	20,0	
ženy	8	0	0,0	8	80,0	
1986 - 1990	11					
muži	3	2	33,3	1	20,0	p=1,000 $\chi^2=0,244$
ženy	8	4	66,7	4	80,0	
1991 - 1995	17					
muži	2	2	20,0	0	0,0	p=0,485 $\chi^2=1,587$
ženy	15	8	80,0	7	100,0	
1996 - 2000	34					
muži	10	4	36,4	6	26,1	p=0,692 $\chi^2=0,379$
ženy	24	7	63,6	17	73,9	
2001 - 2007	130					
muži	22	10	20,0	12	15,0	p=0,479 $\chi^2=0,547$
ženy	108	40	80,0	68	85,0	

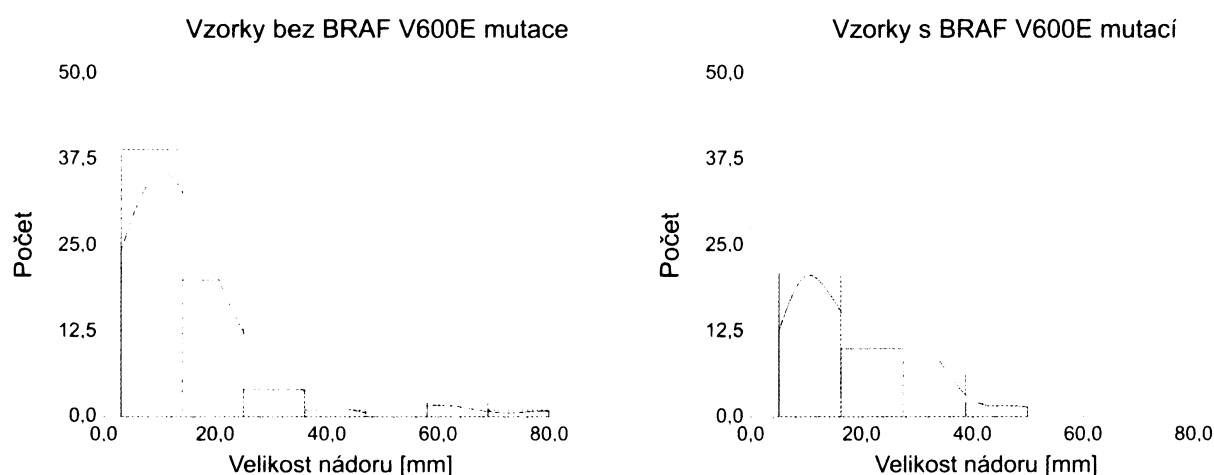
Hodnotili jsme závislost velikosti nádoru na přítomnosti *BRAF* mutace a zjistili jsme signifikantně větší velikost nádoru u nositelů mutace V600E v letech 2001-2007, tento trend však nebyl ve všech obdobích stejný (tab. 13, obr. 22 –24).

Tab. 13 Velikost primárního nádoru v jednotlivých obdobích v závislosti na výskytu *BRAF* mutace.

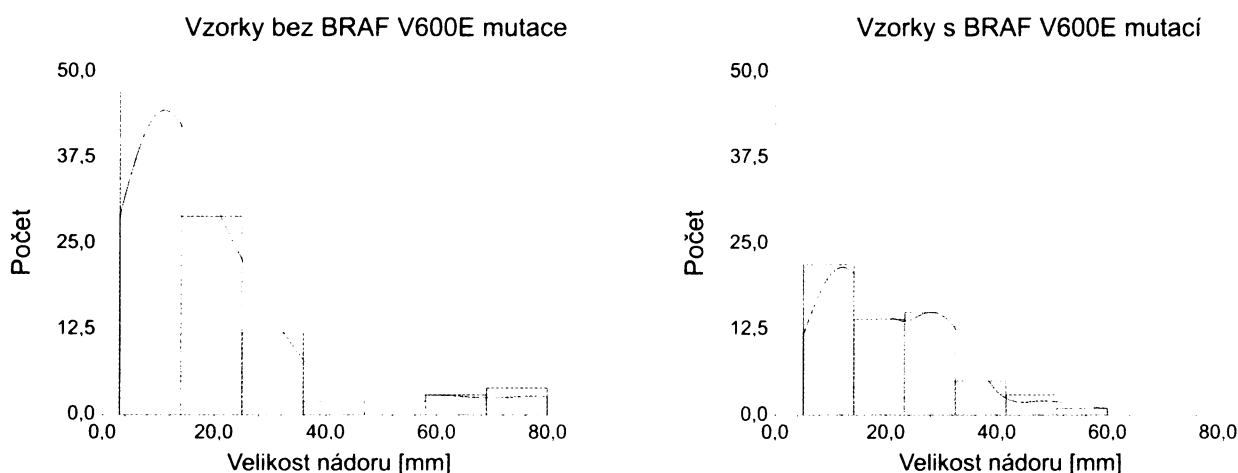
	Počet	Velikost primárního nádoru (mm)		p
		Průměr ± SD	Medián (rozmezí)	
Před 1986	3			
n	3	8; 25; 50		
p	0			
1986 - 1990	6			
n	2	80; 30		
p	4	32,5 ± 14,46	32,5 (15 - 50)	0,639
1991 - 1995	11			
n	6	13,2 ± 8,77	10,0 (6 - 30)	
p	5	28,0 ± 20,19	20,0 (10 - 60)	0,096
1996 - 2000	32			
n	22	29,7 ± 20,24	25,5 (5 - 80)	
p	10	20,1 ± 8,88	20,0 (6 - 30)	0,317
2001 - 2007	108			
n	67	15,6 ± 13,92	11,0 (3 - 80)	
p	41	19,1 ± 11,02	15,0 (5 - 50)	0,024
Celkem	160			
n	100	19,7 ± 17,46	15,0 (3 - 80)	
p	60	20,9 ± 12,18	18,5 (5 - 60)	0,069

* Mann-Whitneyův test (p= pravděpodobnost na hladině významnosti $\alpha=0.05$)

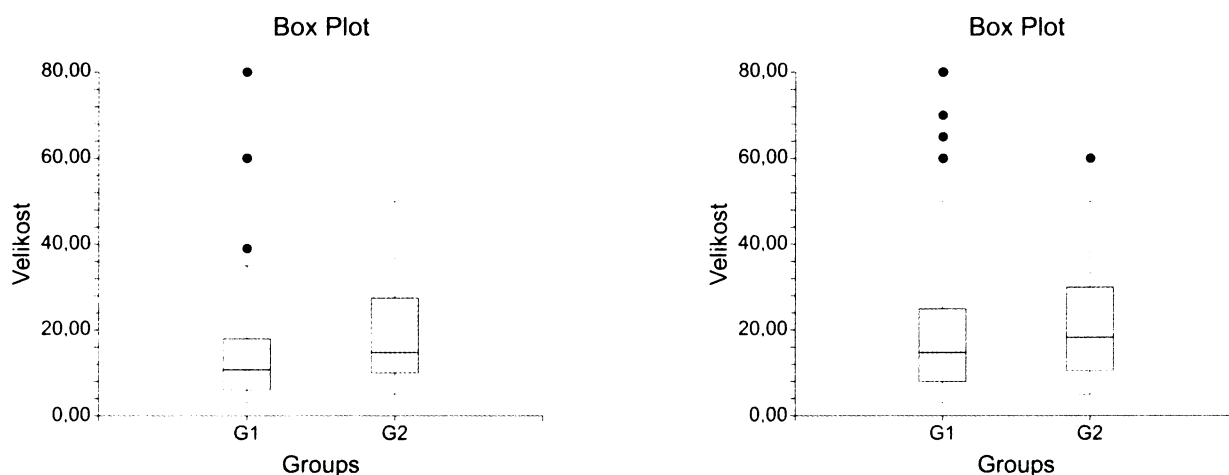
^a Přesná velikost primárního nádoru nebyla určena u 42 pacientů.
n – negativní (bez mutace), p – pozitivní (mutace V600E)



Obr. 22 Grafy závislosti velikosti primárního nádoru na výskytu *BRAF* mutace v období mezi roky 2001 - 2007.



Obr. 23 Grafy závislosti velikosti primárního nádoru na výskytu *BRAF* mutace ve všech obdobích.



Obr. 24 Grafy závislosti velikosti primárního nádoru na výskytu *BRAF* mutace. Levý graf - období mezi roky 2001 - 2007, pravý graf – všechna období. G1 – vzorky bez mutace, G2 – vzorky s mutací V600E.

V celém souboru jsme našli větší výskyt mutace V600E *BRAF* genu u klasické varianty PTC (50%) než u folikulární varianty PTC (22,2%). Prevalenci této mutace u jednotlivých variant v závislosti na pohlaví udává tabulka (tab. 14). Bohužel počty vzorků s histologicky prokázanou variantou jsou v jednotlivých skupinách nízké a nelze proto učinit průkazné závěry.

Tab. 14 Výskyt *BRAF* mutace u nejčastějších histologických variant PTC.

Varianty PTC	Celkem ^a	<i>BRAF</i> ^{V600E}		<i>BRAF</i> ^{WT}		statistika [*]
		počet	%	počet	%	
Klasická	14	7	50,0	7	50,0	
muži	4	2	28,6	2	28,6	p=1,000 $\chi^2=0$
ženy	10	5	71,4	5	71,4	
Folikulární	54	12	22,2	42	77,8	
muži	9	4	33,3	5	11,9	p=0,098 $\chi^2=3,086$
ženy	45	8	66,7	37	88,1	
Ostatní^b	22	7	31,8	15	68,2	
muži	6	2	28,6	4	26,7	p=1,000 $\chi^2=0,009$
ženy	16	5	71,4	11	73,3	

* Fisherův exaktní test (p= pravděpodobnost na hladině významnosti $\alpha=0.05$;

χ^2 = Pearsonův Chí-kvadrát s jedním stupněm volnosti)

^a U 112 pacientů s PTC nebyl určen histologický typ nádoru.

^b Ostatní varianty PTC: 1 makrofolikulární, 11 onkocytární, 3 varianty z vysokých buněk, 1 světlobuněčná, 1 kribriformní, 1 difúzní sklerotizující, 1 mikrofolikulární, 1 Warthin - like PTC s oxyfilními buňkami, 2 cystické varianty.

U jedné pacientky s diagnostikovaným MTC jsme našli *BRAF* V600E mutaci. Tato pacientka měla MTC, který byl součástí syndromu MEN2, dále u ní byla přítomna neurofibromatóza, urolithiasa, zvýšený PTH, vysoký kalcitonin a vzdálené metastázy. Somatická mutace v *RET* genu zatím nebyla nalezena.

5. DISKUZE

Tato diplomová práce se zabývala zavedením metodik izolace genetického materiálu z různě zpracovaných nádorových tkání štítné žlázy. Poté byly podle literatury vybrány dva nadějně molekulární markery pro studium genetických příčin PTC v české populaci.

První důležitou genetickou změnou je *RET/PTC* přeskupení (80). Z 11 známých forem *RET/PTC* přeskupení jsme se zaměřili na dvě nejčastější přeskupení *RET/PTC1* a *RET/PTC3*. Většina *RET/PTC* fúzních forem je spojována s radiačně indukovanými PTC. U sporadického PTC byly detekovány pouze *RET/PTC1*, *RET/PTC2*, *RET/PTC3* a *ELKS/RET*. *RET/PTC3* se vyskytuje krátkou dobu po ozáření, je spojen s větší agresivitou (větší růst, extrathyroidální šíření) a je často detekován u solidní varianty PTC. *RET/PTC1* je asociován s PTC po delší latentní době, nalézán u starších pacientů a nejčastěji u klasické formy PTC (3, 12, 50).

Dlouho se předpokládalo, že *RET/PTC* přeskupení je specifické pouze pro PTC. Nejnovější studie ovšem ukazují přítomnost *RET/PTC* fúzních genů také u Hashimotovy thyroditidy (81), benigních adenomů (13, 69, 82), hyperplastických nodulů (82), karcinomu z Hürthleho buněk (83) a hyalinních trabekulárních tumorů štítné žlázy (84). Tyto studie však byly vždy založeny na detekci *RET/PTC* přeskupení pouze z celkové RNA pomocí RT-PCR, proto původ buněk nemohl být přesně určen. Je možné, že tato onemocnění mohla obsahovat ve vzorku RNA klinicky i histologicky nezjištěný mikrokarcinom PTC.

V této diplomové práci byla studována *RET/PTC* přeskupení u 67 pacientů s PTC. Tato mutace byla detekována celkem u 13 pacientů (19,4%) - 2 *RET/PTC1* (3,0%), 1 *RET/PTC3* (1,5%) a 10 *RET/PTCX* (14,9%). Zjištěná prevalence této mutace spadá do širokého rozmezí, které je uváděno v publikacích - od 0% (85) až 87% (12). Rozdíly v detekčním záchyty mohou být způsobené použitím různě citlivých metodik (reverzní transkripce v reálném čase, Southern blotting, detekce na agarozovém gelu, imunohistochemie, hybridizace in situ, fluorescence in situ, sekvenace a další), etnicko-geografickou variabilitou a vlivem faktorů životního prostředí, jako je ionizační záření. Naše výsledky se podobají spíše výsledkům studií prováděných u neozářených pacientů s PTC (10, 13). Velké rozdíly jsou i mezi populacemi. Nejmenší výskyt mutace je v populaci Saudské Arábie (3%), Německa (8%) a Francie (11%) (86 - 88). Vyšší výskyt je v Itálii (33-35%) a Číně (55%) (88 - 90). Nejvíce byla tato mutace detekována u populace vystavené ionizačnímu záření (67 - 87%) (12, 91).

V našem souboru jsme detekovali TK i EC doménu *RET* genu u 8 vzorků. TK doména může být přítomna z několika důvodů: přítomnost blíže neurčeného *RET/PTC* přeskupení,

exprese celého *RET* genu či přítomnost smíšeného papilárního a medulárního karcinomu. Předpokládá se, že *RET* gen se ve folikulárních buňkách a u PTC za normálních okolností neexprimuje, proto přítomnost TK domény *RET* genu (92 - 95) naznačuje přítomnost některé z fúzních forem. Některé studie však uvádějí, že u PTC se může vyskytovat *RET/PTC* fúzní gen společně s nepřeskupeným *RET* genem (96, 97). *RET* gen je exprimován také makrofágy (98), které se vyskytují při poškození nebo tumorech štítné žlázy (99). Protože jsme chtěli vyloučit možnost medulárního karcinomu u těchto vzorků, provedli jsme amplifikaci genu pro kalcitonin. Všechny vzorky byly negativní. U těchto vzorků se tedy nejspíše exprimoval celý *RET* gen. Vzorky pozitivní pro TK doménu a negativní pro EC doménu jsme považovali za důkaz přítomnosti *RET/PTC* přeskupení.

V naší studii jsme nezjistili signifikantní rozdíl mezi věkem pacientů s *RET/PTC* přeskupením a bez něj. Některé světové studie ukazují vyšší výskyt *RET/PTC* přeskupení u mladších pacientů (100), ale jiné studie toto nepotvrzují (13, 92, 101). Některé dokonce zachytily vyšší výskyt u pacientů nad 40 let (95).

V naší studii jsme našli korelaci mezi *RET/PTC* přeskupením a pohlavím ($p = 0,019$). I když se u mužů vyskytuje PTC mnohem méně často než u žen (v našem souboru studovaných 67 tkání byl poměr ženy : muži roven 5,7 : 1), *RET/PTC* přeskupení bylo u mužů časté. Mezi pacienty s detekovaným *RET/PTC* přeskupením byl poměr ženy : muži roven 1,6 : 1, kdežto ve skupině pacientů s PTC bez *RET/PTC* přeskupení byl tento poměr 9,75 : 1. U mužů bývá popisován agresivnější fenotyp PTC než u žen, možná proto, že se u nich vyskytují agresivnější genetické alterace. Nenalezli jsme žádné korelace mezi *RET/PTC* přeskupením a velikostí nádoru, typu PTC, extrathyroidální invazí, metastázami v lymfatických uzlinách, multifokalitou nádoru, opouzďením tumoru a angioinvazí. Korelace *RET/PTC* přeskupení s klinicko-patologickými parametry zůstává i v literatuře stále kontroverzní. Některé studie udávají častější výskyt mutace u malých, dobře diferencovaných a klinicky indolentních tumoru (95), zatímco jiné udávají korelaci s častějším výskytem metastáz (102) nebo lokální invazí (103).

U jednoho vzorku jsme našli smíšený PTC-MTC karcinom, který byl potvrzen i geneticky – byla nalezena fúzní forma *RET/PTC1* a zároveň somatická mutace Met918Thr v 16. exonu *RET* proto-onkogenu.

Druhá důležitá genetická změna, která byla v této diplomové práci studována a je vhodným kandidátem na nádorový marker, je somatická mutace v *BRAF* genu. *BRAF* V600E (T1799A) mutace je nejčastější mutací u PTC (29 – 83%) (36-43). V naší studii jsme *BRAF* mutaci detekovali u 38,1% pacientů s PTC. Tato mutace byla dosud nalezena jen u PTC a anaplastického karcinomu, patrně odvozeného z PTC. Zatím nebyla nalezena u žádného FTC nebo MTC. Proto by *BRAF* mohl sloužit jako selektivní genetický marker pro PTC.

V této diplomové práci byla provedena retrospektivní studie pro zjištění vlivu černobylské jaderné havárie na výskyt *BRAF* mutace. V literatuře se udává malý výskyt *BRAF* mutace u pacientů, kteří žili v oblasti Černobyli (0 - 12%) (44, 45, 104). Naše vzorky jsme rozdělili do pěti období - jedno před a čtyři po černobylské havárii. Dospěli jsme k zajímavým výsledkům. Rozdíl ve výskytu mutace byl mezi jednotlivými obdobími signifikantní. Před černobylskou havárií jsme nedetekovali žádnou mutaci, zatímco po roce 1986 jsme mutaci našli u 77 pacientů (40,1%). Statisticky jsme hodnotili rozdíl mezi jednotlivými obdobími ($p = 0,017$) i mezi obdobími před černobylskou havárií a po černobylské havárii ($p = 0,015$). V letech 1986 – 1995 jsme pozorovali značný nárůst výskytu této mutace (55-60%), od roku 1996 pozorujeme pokles na 32,4% a v posledním období 2001-2007 je procentuální výskyt mutace 38,2%. Tento průběh prevalence záchytu mutace je velmi zajímavý a ukazuje na možnou souvislost výskytu mutace s černobylskou havárií. Výsledek však může být zkreslený, neboť jsme měli k dispozici pouze 10 vzorků tkání pacientů operovaných před rokem 1986 a vyhledávání takto starých vzorků je obtížné. O rozšiřování souboru se však neustále snažíme. Jistě bude také v budoucnu zajímavé detekovat u vzorků s *BRAF* mutací možné další genetické alterace, které by mohly modifikovat agresivitu nádoru.

V naší studii jsme nenalezli žádnou korelaci mezi mutací a histologickým typem PTC. *BRAF* mutaci jsme zachytili u poloviny nádorů s klasickým PTC, u 22,2% folikulární varianty PTC a u 31,8% ostatních histologických variant. Dle literárních dat je největší prevalence *BRAF* mutace u varianty z vysokých buněk (77%), dále u klasické varianty PTC (60%) a nejnižší u folikulární varianty (12%) (36, 41, 46, 49, 105). Vzhledem k výskytu mutace u jednotlivých variant a vzhledem k agresivitě těchto variant ve směru - varianta z vysokých buněk > klasická varianta > folikulární varianta - se předpokládá, že *BRAF* mutace je spojena s vyšší agresivitou nádoru. Jedna publikace udává výskyt mutace také u vzácných variant PTC (46). Mutaci autoři našli u 6 z 15 (40%) onkocytárních PTC a 6 z 8 (75%) Warthin-like PTC, ale žádnou mutaci nedetekovali u 2 difúzních sklerozujících variant, 1 varianty

z válcových buněk, 5 hyalinních trabekulárních PTC a 5 mukoepidermoidních tumorů (46). Pro svou vzácnost nebyly tyto varianty v jiných publikacích popsány.

V naší studii jsme zjišťovali korelaci mutace *BRAF* genu s klinicko-patologickými parametry. Při rozdělení souboru na jednotlivá období vyšla významná korelace mutace s velikostí nádoru v období 2001 – 2007. nádory s mutací byly větší ($p = 0,024$). Pokud jsme ale soubor hodnotili jako celek, rozdíl signifikantní nebyl ($p = 0,069$), v některých obdobích byl dokonce pozorován opačný trend. Ostatní klinicko-patologické charakteristiky nebyly signifikantně odlišné u pacientů s a bez mutace. Světová data naznačují, že *BRAF* mutace je nezávislý prognostický faktor predikující horší prognózu PTC. *BRAF* mutace dle literatury zvyšuje agresivitu nádoru spíše větší invazí, metastázami a častější recidivou, ale zatím nikdo nezjistil rozdíl ve velikosti primárního nádoru. Některé studie uvádějí také signifikantní vztah *BRAF* mutace s extrathyroidální invazí a pokročilým stádiem (41) a vzdálenými metastázami (36). Jedna studie odhalila dokonce závislost *BRAF* mutace na pohlaví (vyšší výskyt u mužů) (43). Na základě studia našeho již poměrně rozsáhlého souboru však asociaci mezi výskytem mutace V600E v *BRAF* genu a agresivitou nádoru nemůžeme potvrdit.

Jeden ze studovaných pacientů byl překvapivě homozygotem pro *BRAF* mutaci. Bohužel k tomuto pacientovi nejsou k dispozici téměř žádná klinicko-patologická data pro porovnání mutace s fenotypem. Homozygotní stav mohl také nastat pouze ztrátou heterozygoty, což námi nebylo ověřováno.

U čtyř pacientů jsme našli zároveň obě mutace - *BRAF* a *RET/PTC* přeskupení. Zatím pouze jediná publikace uvádí překryv *BRAF* a *RET/PTC* mutace (43). Většina studií neudává výskyt obou mutací u téhož pacienta (45, 44). U těchto čtyř pacientů jsme nenalezli žádné společné rysy ani zvýšenou agresivitu nádoru v porovnání s ostatními pacienty. I když je známo, že jak *BRAF*, tak *RET/PTC* přeskupení jsou schopny samy zapříčinit vznik nádoru, může kombinace těchto dvou změn také ovlivnit charakteristiky nádorů.

U jednoho vzorku biopsie jsme našli smíšený PTC-MTC karcinom, který byl potvrzen i geneticky *BRAF* mutací.

Zajímavý je rozdíl ve věkovém rozložení u pacientů s *RET/PTC* přeskupením a *BRAF* mutací. Zatímco polovina pacientů s *RET/PTC* mutací byla mladší 30 let, u více než 80% pacientů s *BRAF* mutací je věk vyšší (30-60 let). K podobným výsledkům došli i v některých studiích (44, 45). Zatímco *BRAF* mutace má tendenci vyskytovat se u dospělých pacientů s PTC, *RET/PTC* přeskupení se častěji vyskytuje u dětí po ozáření. Ovšem tato skutečnost může být způsobena tím, že PTC s přeskupením roste rychleji a je proto zachycen v nižším

věku ve srovnání s jinými mutacemi. Některé studie neuvádějí korelaci mezi *BRAF* mutací a věkem, na rozdíl od jiných (41). V naší studii jsme signifikantní korelaci mezi výskytem *BRAF* mutace a věkem v době diagnózy neprokázali.

Při hodnocení korelací genotyp – fenotyp je třeba si uvědomit, že současná kritéria pro zhodnocení PTC a prognózy onemocnění jsou založena na klinicko-patologických kritériích, která jsou často nekompletní, hlavně preoperačně, kdy není známa patologická charakteristika tumoru. Prognóza závisí na tom, kdy se nádor detekuje (někdy náhodně během jiného vyšetření), nebo kdy pacient skutečně dorazí k lékaři. Včasnost diagnózy ovlivňuje agresivitu nádoru - invazi nádoru, tvorbu metastáz atd.

Až u 20% normální populace se vyskytují okultní mikrokarcinomy štítné žlázy. Zatímco u některých lidí se vůbec neprojeví, u jiných se zvětšují a projevují se různou agresivitou. To může být způsobeno přítomností různých genetických změn. *BRAF* mutace tak reprezentuje první molekulární marker, který může být použit preoperačně z biopsie tenkou jehlou a může tak odhalit skrytou agresivitu mikrokarcinomu a vést k včasnému chirurgickému zákroku dříve než dojde k rozvoji nádoru.

Pro rozvoj včasné a přesné diagnostiky PTC je třeba hledat další kandidáty, kteří by spolu s *BRAF* mutací mohli být použiti jako spolehlivé genetické markery.

6. ZÁVĚR

V této diplomové práci byly splněny stanovené cíle a výsledky lze shrnout takto:

1. Zavedení metodiky pro izolaci RNA z čerstvých tkání a biopsií a izolaci DNA z čerstvých tkání, biopsií tenkou jehlou a parařinových bločků.
2. Zavedení detekce dvou nejčastějších genetických změn v PTC: somatické *BRAF* V600E mutace a *RET/PTC* přeskupení.
3. Zjištění prevalence obou mutací v české populaci:
 - a) *BRAF* mutace byla nalezena u 38,1% pacientů s PTC
 - b) *RET/PTC* přeskupení nalezeno u 19,4% pacientů
4. Porovnání genotypu s fenotypem a zjištění signifikantních rozdílů mezi pacienty s mutací a bez mutace:
 - a) signifikantně vyšší výskyt *RET/PTC* přeskupení u mužů
 - b) nižší věk pacientů s *RET/PTC* přeskupením než u pacientů s *BRAF* mutací
 - c) signifikantně větší velikost nádoru u *BRAF* pozitivních nádorů v období 2001-2007
5. Provedení retrospektivní studie a zjištění vlivu černobylské havárie na *BRAF* mutaci – před rokem 1986 nenalezena žádná mutace, po černobylské havárii mutace detekována u 40,1%.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. **Rejthar A, Vojtěšek B** 2002 Obecná patologie nádorového růstu. Grada
2. **Thomas GA, Bunnell H, Cook HA, et al.** 1999 High prevalence of *RET/PTC* rearrangements in Ukrainian and Belorussian post-Chernobyl thyroid papillary carcinomas: a strong correlation between *RET/PTC3* and the solid-follicular variant. *J Clin Endocrinol Metab.* 84:4232-4238
3. **Smida J, Salassidis K, Hieber L et al.** 1999 Distinct frequency of *RET* rearrangements in papillary thyroid carcinomas of children and adults from Belarus. *Int J Cancer* 80:32-38
4. **Kreze A, Langer P, Klimeš I, et al.** Všeobecná a klinická endokrinológia, Academic Electronic Press, s.r.o.. Bratislava 2004.
5. **Dvořák J** 1997 Rakovina štítné žlázy. Libri
6. **Lewinski A, Ferenc T, Sporny S, et al.** 2000 Thyroid carcinoma: diagnostic and therapeutic approach; genetic background. *Endocrine Regulations* 34:99-113
7. **Hansford JR, Mulligan LM** 2000 Multiple endocrine neoplasia type 2 and *RET*: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet* 37:817-827
8. **Durick K, Gill GN, Taylor SS** 1998 Shc and Enigma are both required for mitogenic signaling by *Ret/ptc2*. *Mol Cell Biol* 18:2298-2308
9. **Monaco C, Visconti R, Barone MV et al.** 2001 The RFG oligomerization domain mediates kinase activation and relocalization of the *RET/PTC3* oncoprotein to the plasma membrane. *Oncogene* 20:599-608
10. **Sugg SL, Zheng L, Rosen IB, et al.** 1996 *RET/PTC-1, -2, and -3* oncogene rearrangements in human thyroid carcinomas: implications for metastatic potential? *J Clin Endocrinol Metab* 81:3360-3365
11. **Jhiang SM** 2000 The *RET* proto-oncogene in human cancers. *Oncogene* 19:5590-5597
12. **Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, et al.** 1997 Distinct pattern of *RET* oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Research* 57:1690-1694
13. **Bounacer A, Wicker R, Caillou B et al.** 1997 High prevalence of activating *RET* proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumors from patients who had received external radiation. *Oncogene* 15:1263-1273

14. **Nikiforov YE, Koshoffer A, Nikiforova M, et al.** 1999 Chromosomal breakpoint positions suggest a direct role for radiation in inducing illegitimate recombination between the *ELE1* and *RET* genes in radiation-induced thyroid carcinomas. *Oncogene* 18:6330-6334
15. **Pierotti MA, Santoro M, Jenkins RB, et al.** 1992 Characterization of an inversion on the long arm of chromosome 10 juxtaposing D10S170 and *RET* and creating the oncogenic sequence *RET/PTC*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1616-1620
16. **Bongarzone I, Monzini N, Borrello MG et al.** 1993 Molecular characterization of a thyroid tumor specific transforming sequence formed by the fusion of *RET* tyrosine kinase and regulatory subunit RI alpha of cyclic AMP-dependent protein kinase A. *Mol. Cell. Biol.* 13:358-366
17. **Santoro M, Dathan NA, Berlingheri MT, et al.** 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
18. **Klugbauer S, Demidchik EP, Lengfelder E, et al.** 1998 Molecular analysis of new subtype of *ELE/RET* rearrangements, their reciprocal transcripts and breakpoints in papillary thyroid carcinomas of children after Chernobyl. *Oncogene* 16:671-675
19. **Yeh S, Chang C** 1996 Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5517-5521
20. **Klugbauer S, Lengfelder E, Demidchick EP, et al.** 1996 A new form of *RET* rearrangement in thyroid carcinomas of children after the Chernobyl accident. *Oncogene* 13:1099-1102
21. **Fugazzola L, Pierotti MA, Vigano E, et al.** 1996 Molecular and biochemical analysis of *RET/PTC4*, a novel oncogenic rearrangement between *RET* and *ELE1* genes in a post-Chernobyl papillary thyroid cancer. *Oncogene* 13:1093-1097
22. **Klugbauer S, Demidchick EP, Lengfelder E, et al.** 1998 Detection of novel type of *RET* rearrangement (*PTC5*) in thyroid carcinomas after Chernobyl and analysis of the involved *RET*-fused gene RFG5. *Cancer Res* 58:198-203
23. **Klugbauer S, Rabes HM** 1999 The transcription coactivator HTIF1 and a related protein are fused to the *RET* receptor tyrosine kinase in childhood papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 18:4388-4393

24. **Venturini L, You J, Stadler M, et al.** 1999 TIF1 γ , a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene* 18:1209-1217
25. **Salassidis K, Bruch J, Zitzelsberger H et al.** 2000 Translocation t(10;14)(q11.2;q22.1) fusing the kinetin to the *RET* gene creates a novel rearranged form (PTC8) of the *RET* proto-oncogene in radiation-induced childhood papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 60:2786-2789
26. **Klugbauer S, Jauch A, Lengfelder E, et al.** 2000 A novel type of *RET* rearrangement (PTC8) in childhood papillary thyroid carcinomas and characterization of the involved gene (RFG8). *Cancer Research* 60:7028-7032
27. **Nakata T, Litamura Y, Shimizu K et al.** 1999 Fusion of a novel gene, ELKS, to *RET* due to translocation t(10;12)(q11;p13) in papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 25:97-103
28. **Corvi R, Berger N, Balczon R et al.** 2000 *RET/PCM-1*: a novel fusion gene in papillary thyroid carcinoma. *Oncogene* 19:4236-4242
29. **Jindřichová Š, Vlček P, Bendlová B** 2004 Genetické příčiny vzniku karcinomů štítné žlázy. *Čas Lék čes* 143:664-668
30. **Pollock PM, Meltzer PS** 2002 A genome-based strategy uncovers frequent BRAF mutations in melanoma. *Cancer Cell* 2:5-7
31. **Davies H, Bignell GR, Cox C, et al.** 2002 Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949-954
32. **Peyssonaux C, Eychene A** 2001 The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell* 93:53-62
33. **Kolch W** 2000 Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351:289-305
34. **Mason CS, Springer C, Cooper RG, et al.** 1999 Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J* 18:2137-2148
35. **Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, et al.** 2004 Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116:855-867
36. **Kim KH, Kang DW, Kim SH, et al.** 2004 Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei Medical Journal* 45: 818-821
37. **Cohen Y, Xing M, Mambo E, et al.** 2003 BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 95:625-7

38. **Fukushima T, Suzuki S, Mashiko M, et al.** 2003 BRAF mutations in papillary carcinomas of the thyroid. *Oncogene* 22:6455-6457
39. **Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, et al.** 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
40. **Namba H, Nakashima M, Hayashi T, et al.** 2003 Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4393-4397
41. **Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, et al.** 2003 BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5399-5404
42. **Soares P, Trovisco V, Rocha AS, et al.** 2003 BRAF mutations and *RET/PTC* rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 22:4578-4580
43. **Xu X, Quiros RM, Gattuso P, et al.** 2003 High prevalence of Braf gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. *Cancer Res* 63:4561-4567
44. **Lima J, Trovisco V, Soares P, et al.** 2004 BRAF mutations are not a major event in post-Chernobyl childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4267-4271
45. **Kumagai A, Namba H, Saenko VA, et al.** 2004 Low frequency of BRAF T1796A mutations in childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4280-4284
46. **Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, et al.** 2004 BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *J Pathol.* 2004; 202(2):247-51.
47. **Trovisco V, Soares P, Soares R, et al.** 2005 A new BRAF gene mutation detected in a case of a solid variant of papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol.* 36(6):694-7.
48. **Carta C, Moretti S, Passeri L, et al.** 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(1):105-9.

49. **Frattini M, Ferrario C, Bressan P, et al.** 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
50. **Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, et al.** 2000 Pattern of radiation-induced *RET* and NTRK1 rearrangements in 191 post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. *Clinical cancer Research* 6:1093-1103
51. **Pierotti MA, Bongarzone I, Borello MG, et al.** 1996 Cytogenetics and molecular genetics of carcinomas arising from thyroid epithelial follicular cells. *Genes Chrom Cancer* 16:1-14
52. **Greco A, Miranda C, Pagliardini S, et al.** 1997 Chromosome 1 rearrangements involving the genes TPR and NTRK1 produce structurally different thyroid-specific TRK oncogenes. *Genes Chrom Cancer* 19:112-123
53. **Greco A, Pierotti MA, Bongarzone I, et al.** 1992 Trk-T1 is a novel oncogene formed by fusion of *trp* and *trk* genes in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 7:237-242
54. **Greco A, Mariani C, Miranda C, et al.** 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
55. **Naldini L, Vigna E, Narsinham R, et al.** 1991 Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene *c-met*. *Oncogene* 6:501-504
56. **Gandino L, Munaron L, Naldini L, et al.** 1991 Intracellular calcium regulates the tyrosine kinase receptor encoded by the *met* oncogene. *J Biol Chem* 266:16098-16104
57. **Di Renzo MF, Narsimhan RP, Olivero M, et al.** 1991 Expression of the *met*/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues. *Oncogene* 6:1997-2003
58. **Di Renzo MF, Olivero M, Ferro S, et al.** 1992 Overexpression of the *c-Met*/HGF receptor gene in human thyroid carcinomas. *Oncogene* 7:2549-2553
59. **Ruco LP, Ranalli T, Marzullo A, et al.** 1996 Expression of Met protein in thyroid tumors. *J Pathol* 180:266-270

60. **Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, et al.** 2005 Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest* 115:94-101
61. **Dibb NJ, Dilworth SM, Mol CD** 2004 Switching on kinases: oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family. *Nat Rev Cancer* 4:718-727
62. **Gimm O, Perren A, Weng LP, et al.** 2000 Differential Nuclear and Cytoplasmic Expression of PTEN in Normal Thyroid Tissue, and Benign and Malignant Epithelial Thyroid Tumors. *Am J Pathol* 156:1693-1700
63. **Namba H, Gutman RA, Matsuo K, et al.** 1990 H-ras protooncogene mutations in human thyroid neoplasm. *J Clin Endocrinol Metab* 71:223
64. **Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, et al.** 2003 Molecular profile and clinical-pathological features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol* 120:71-77
65. **Hara H, Fulton N, Yashiro T, et al.** 1994 N-ras mutation: an independent prognostic factor for aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 116:1010
66. **Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, et al.** 1994 Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54:4855
67. **Zou M, Shi Y, Farid NR** 1993 p53 mutations in all stages of thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1054
68. **Rocha AS, Soares P, Seruca R, et al.** 2001 Abnormalities of the E-cadherin/catenin adhesion complex in classical papillary thyroid carcinoma and in its diffuse sclerosing variant. *J Pathol.* 194(3):358-66.
69. **Corvi R, Lesueur F, Martinez-Alfaro M, et al.** 2001 *RET* rearrangements in familial papillary thyroid carcinomas. *Cancer Letters* 170:191-198
70. **Carcangiu ML, Zampi G, Pupi A, et al.** 1985 Papillary carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 241 cases treated at the University of Florence, Italy. *Cancer.* 15:55(4):805-28.
71. **Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, et al.** 2006 PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 91(1):213-20.

72. **Wreesmann VB, Ghossein RA, Hezel M, et al.** 2004 Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: genome-wide appraisal of a controversial entity. *Genes Chromosomes Cancer.* 40(4):355-64.
73. **Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, et al.** 2006 PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 91(1):213-20.
74. **Castro P, Roque L, Magalhaes J, et al.** 2005 A subset of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma harbors the PAX8-PPARgamma translocation. *Int J Surg Pathol.* 13(3):235-8.
75. **Mansouri A, St-Onge L, Gruss, P** 1999 Role of Pax genes in endoderm-derived organs. *Trends Endocr. Metab.* 10: 164-167.
76. **Pasca di Magliano M, Di Lauro R, Zannini M** 2000 Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97: 13144-13149.
77. **Kroll T. G, Sarraf P, Pecciarini L, et al.** 2000 PAX8-PPAR-gamma-1 fusion in oncogene human thyroid carcinoma. *Science* 289: 1357-1360.
78. **Meloun M, Militký J** 1994 *Statistické zpracování experimentálních dat.* Plus; ISBN 80-85297-56-6
79. **Zvárová J** 1998 *Základy statistiky pro biomedicínské obory.* Karolinum; ISBN 80-7184-786-0
80. **Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, et al.** 1990 PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 60: 557-563.
81. **Wirtschafter A, Schmidt R, Rosen D, Kundu N. Santoro M, Fusco A, Mulhaupt H, Atkins JP, Rosen MR, Keane WM, Rothstein JL** 1997 Expression of the RET/PTC fusion gene as a marker for papillary carcinoma in Hashimoto's thyroiditis. *Laryngoscope:* 107(1):95-100.
82. **Elisei R, Romei C, Vorontsova T, Cosci B, Veremeychik V, Kuchinskaya E, Basolo F, Demidcik EP, Miccoli P, Pincera A** 2001 RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3211-3216.
83. **Belchetz G, Cheung CC, Freeman J, Rosen IB, Witterick IJ, Asa SL** 2002 Hurthle cell tumors: using molecular techniques to define a novel classification system. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 128: 237-240.

84. **Cheung CC, Boerner SL, Mac Millan CM, Ramayr L, Asa SL** 2000 Hyalinizing trabecular tumor of the thyroid: a variant of papillary carcinoma proved by molecular genetics. *Am J Surg Pathol* 24: 1622-1626.
85. **Iwamoto T, Takahashi M, Ito M et al.** 1990 Oncogenicity of the ret transforming gene in MMTV/ret transgenic mice. *Oncogene*. 5: 533-542.
86. **Zou M, Shi Y, Farid NR** 1994 Low rate of ret proto-oncogene activation (PTC/ret^{TPC}) in papillary thyroid carcinomas from Saudi Arabia. *Cancer* 73: 176-180.
87. **Mayr B, Potter E, Goretzki P et al.** 1998 Expression of ret/ptc1, -2, -3, -delta3 and -4 in German papillary thyroid carcinoma. *Br J Cancer* 77: 903-906.
88. **Santoro M, Carlomagno F, Hay ID et al.** 1992 RET oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. *J Clin Invest* 89: 1517-1522.
89. **Bongarzone I, Fugazzola L, Vigneri P et al.** 1996 Age-related activation of the tyrosine kinase receptor protooncogenes ret and ntrk1 in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2006-2009.
90. **Lee, CH, Hsu LS, Chi CW, Chen GD, Yang AH, Chen JY** 1998 High frequency of rearrangement of the ret protooncogene (ret/ptc) in Chinese papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1629-1632.
91. **Klugbauer S, Lengfelder E, Demidchik EP, Rabes HM** 1995 High prevalence of ret rearrangement in thyroid tumors of children from Belarus after the Chernobyl reactor accident. *Oncogene* 11: 2459-2467.
92. **Williams GH, Rooney S, Thomas GA, Cummins G, Williams ED** 1996 RET activation in adult and childhood papillary thyroid carcinoma using a reverse transcriptase-n-polymerase chain reaction approach on archival-nested material. *Br J Cancer*: 74(4):585-9.
93. **Ishizaka Y, Shima H, Sugimura T, Nagao M** 1992 Detection of phosphorylated retTPC oncogene product in cytoplasm. *Oncogene*: 7(7):1441-4.
94. **Viglietto G, Chiappetta G, Martinez-Tello FJ, Fukunaga FH, Tallini G, Rigopoulou D, Visconti R, Mastro A, Santoro M, Fusco A** 1995 RET/PTC oncogene activation is an early event in thyroid carcinogenesis. *Oncogene*: 11(6):1207-10.

95. **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(2):287-94.
96. **Bunone G, Uggeri M, Mondellini P, et al.** 2000 RET receptor expression in thyroid follicular epithelial cell-derived tumors. *Cancer Res* 60: 2845-2849.
97. **Fluge O, Haugen DRF, Akslen LA et al.** 2000 Expression and alternative splicing of c-RET RNA in papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 20: 885-892.
98. **Gattei V, Degan M, Rossi FM et al.** 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.
99. **Sugg, Ezzati S, Rosen IB et al** 1998 Distinct multiple RET/PTC gene rearrangements in multifocal papillary thyroid neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 4116-4122.
100. **Bongarzone I, Fugazzola L, Vigneri P et al.** 1996 Age-related of the tyrosine kinase receptor protooncogenes RET and NTRK1 in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2006-2009
101. **Williams GH, Rooney S, Thomas GA et al.** 1996 RET activation in adult and childhood papillary thyroid carcinoma using a reverse transcriptase-n-polymerase chain reaction approach on archival-nested material. *Br J Cancer* 74: 585-589.
102. **Jhiang SM, Caruso DR, Gilmore E, Ishizaka Y, Tahira T, Nagao M et al.** 1992 Detection of the PTC/retTPC oncogene in human thyroid cancers. *Oncogene* 7: 1331-1337.
103. **Miki H, Kitaichi M, Masuda E, Komaki K, Yamamoto Y, Monden Y** 1999 ret/PTC expression may be associated with local invasion of thyroid papillary carcinoma. *J Surg Oncol* 71: 76-81.
104. **Nikiforova MN, Ciampi R, Salvatore G, Santoro M, Gandhi M, Knauf JA, Thomas GA, Jeremiah S, Bogdanova TI, Tronko MD et al** 2004 Low prevalence of BRAF mutations in contrast to sporadic papillary carcinomas. *Cancer Letters* 209: 1-6.
105. **Salvatore G, Giannini R, Faviana P, Caleo A, Migliaccio I, Fagin JA, Nikiforov YE, Troncone G, Palombini L, Basolo F et al** 2004 Analysis of BRAF point

mutation and RET/PTC rearrangement refines the fine-needle aspiration diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 5175-5180.

8. PŘÍLOHY

SEZNAM PUBLIKACÍ:

1. Sýkorová V, 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.
2. Dvorakova S, Vaclavikova E, Sykorova V, 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.
3. Bendlová B, Dvořáková S, Václavíková E, Sýkorová V, Vlček P, Škába R 2006 Nádory štítné žlázy a Hirschsprungova choroba: desetileté zkušenosti s molekulárně genetickou diagnostikou *RET* proto-okogenu. Vnitř Lek 52: 926-934.

PREZENTACE V ČR S MEZINÁRODNÍ ÚČASTÍ:

1. Sýkorová V, Dvořáková Š., Astl J., Veselý D., Novák Z., Bendlová B.: Zavedení diagnostiky genetických změn u papilárního karcinomu štítné žlázy (přednáška) – XXVIII. Endokrinologické dny s mezinárodní účastí, 20.-22.10.2005, Olomouc, Sborník abstrakt str. 127
2. Sýkorová V, Dvořáková Š, Laco J, Ryška A, Kodetová D, Astl J, Veselý D, Bendlová B: Detekce mutace v BRAF genu u papilárního karcinomu štítné žlázy (poster) – XXX. Brněnské onkologické dny, 11.-13.května 2006. Brno, Edukační sborník str. 195. (Oceněn v soutěži o nejlepší poster).
3. Sýkorová V, Dvořáková Š, Laco J, Ryška A, Kodetová D, Astl J, Veselý D, Novák Z, Bendlová B: Diagnostika genetických změn u papilárního karcinomu štítné žlázy (přednáška) – Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, 7.-9.12.2006, Olomouc, Abstrakta str. 34-35

PREZENTACE V ZAHRANIČÍ:

1. Sykorova V, Dvorakova S, Laco J, Ryska A, Kodetova D, Astl J, Veselý D, Bendlová B: Analysis of BRAF Point Mutation in Papillary Thyroid Carcinoma (poster) - 9th European Congress of Endocrinology 28.4.-2.5.2007, Budapest, Endocrine Abstracts P121

ODBORNÉ STÁŽE:

1. Závěrečná zpráva (End Report) z odborné stáže na University of Wales a Singleton Hospital, Swansea, Velká Británie

GENETICKÉ PŘÍČINY VZNIKU PAPILÁRNÍHO KARCINOMU ŠTÍTNÉ ŽLÁZY

GENETIC CAUSES OF PAPILLARY THYROID CARCINOMA

VLASTA SÝKOROVÁ¹, ŠÁRKA DVOŘÁKOVÁ¹, DANIELA KODETOVÁ²,
JAROMÍR ASTL³, ALEŠ RYŠKA⁴, JAROSLAVA DUŠKOVÁ⁵, PETR VLČEK⁶,
ZDENĚK NOVÁK¹, BĚLA BENDLOVÁ¹

¹Endokrinologický ústav, Praha

²Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol, Praha

³Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN Motol, Praha

⁴Fingerlandův ústav patologie, Hradec Králové

⁵Ústav patologie 1. LF UK, Praha

⁶Klinika nukleární medicíny a endokrinologie 2. LF UK a FN Motol

SOUHRN

Papilární karcinom je nejčastějším karcinomem štítné žlázy (80–85 %). Pro jeho vznik je důležitá aktivace několika genů. K hlavním genetickým změnám patří přeskupení vzniklá fuzí genů kódujících tyrozin kinázy (*RET* proto-onkogen a *NTRK1* proto-onkogen) s jinými geny, somatická mutace v *BRAF* genu a zvýšená amplifikace met proto-onkogenu. V menší míře se účastní také další geny – *PTEN*, *RAS*, *TP53* a *AKAP9*. Identifikace těchto specifických genetických změn může přispět ke zpřesnění diagnózy z biopsie tenkou jehlou ještě před operací pacienta, k objasnění vzniku karcinomu a určení prognózy onemocnění.

Klíčová slova: papilární karcinom, štítná žláza, genetika, onkogen, fúzní gen, mutace, antionkogen

SUMMARY

Papillary thyroid carcinoma is the most common tumor of the thyroid gland. The activation of several genes is important for its development, mainly the formation of rearrangements of genes encoding tyrosine kinases (*RET* proto-oncogene and *NTRK1* proto-oncogene) with other genes, somatic mutation in *BRAF* gene and the increased amplification of met proto-oncogene are found. Minor genetic changes occur in other genes – *PTEN*, *RAS*, *TP53* and *AKAP9*. Identification of these specific genetic alterations can contribute to precisizing the diagnosis from fine-needle aspiration biopsy before surgery, explanation of the origin of carcinomas and establishment of prognosis of the disease.

Key words: papillary thyroid carcinoma, thyroid gland, genetics, oncogene, fused gene, mutation, tumor suppressor gene

Úvod

V posledních desetiletích incidence papilárního karcinomu štítné žlázy celosvětově vzrůstá. Příčiny tohoto vzrůstu nejsou příliš jasné. Mezi důležité faktory patří nedostatečný přísun jodu, geografické rozdíly a především ionizující záření (např. po černobylské havárii). Je to způsobeno zvýšenou radiosenzitivitou štítné žlázy, která se s rostoucím věkem snižuje, proto jsou ionizujícím zářením ohroženy především děti.

Papilární karcinom (PTC) je pomalu rostoucí nádor vycházející z folikulárního epitelu. Má papilární strukturu a obsahuje tzv. psammomatózní tělíčka, jejichž etiologie není zcela jasná. Vyskytuje se ve všech věkových skupinách, ale nejčastěji je v 3.–5. dekádě života. Vyznačuje se poměrně nízkou agresivitou, lokálním růstem nebo infiltrativním šířením do tkání a okolních orgánů. Časté jsou také metastázy v regionálních lymfatických uzlinách. Invaze do žil je naopak vzácná a je spojena s agresivnějším chováním PTC. Vzdálené meta-

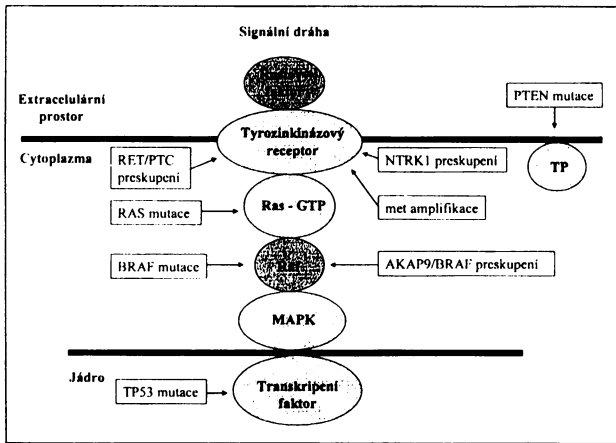
stázy se vyskytují především u dětí a mladistvých. Prognóza u PTC je příznivá, 80–95 % pacientů přežívá déle než 10 let.

PTC se dělí na několik histologických typů (Dvořák, 1997): folikulární varianta, varianta z vysokých buněk, z válcových buněk, difuzní varianta, solidní typ, karcinom z jasných buněk a oxyfilní varianta.

Genetická podstata PTC

Pro vývoj papilárního karcinomu štítné žlázy je důležitá změna dvou typů genů. Jedná se o **onkogeny** a **tumor-supresorové geny**.

1) **Onkogeny** jsou mutované formy normálních genů, proto-onkogenů, které kontrolují buněčnou proliferaci a diferenciaci. Většinou se jedná o komponenty signálních transdukčních drah (např. tyrozin kinázy nebo monomerní G-proteiny). V normálních buňkách se onkogeny nevyskytují. Z proto-onkogenů mohou vznikat bodovou mutací, chromozomovou přestavbou (translokace či inverze) nebo



Obr. 1 Genetické změny u papilárního karcinomu štítné žlázy a jejich umístění v signalizační dráze.

TP – tyrozin fosfatáza

amplifikací proto-onkogenu. K těmto mutacím dochází v somatických buňkách a mají dominantní účinek, to znamená, že k stimulaci maligní transformace stačí pouze jedna mutovaná alela.

2) **Tumor-supresorové geny** (antionkogeny) blokují abnormální růst a maligní transformaci. Alely se chovají recesivně, proto je k nádorovému bujení nutná inaktivace obou alel. K inaktivaci jedné alely může dojít už v zárodečné buňce (všechny buňky organismu nesou mutaci) nebo až v buňce somatické. K inaktivaci druhé alely bodovou mutací či delecí dochází vždy až na somatické úrovni a vede k poruše regulace buněčného růstu.

V patogenezi PTC se uplatňují genetické defekty zejména 4 proto-onkogenů kódujících kinázy: *RET* proto-onkogenu, *NTRK1* proto-onkogenu, *met* proto-onkogenu a *BRAF* genu (obr. 1).

1. *RET/PTC* přeskupování

RET proto-onkogen (*RET* – REarranged during Transfection) kóduje transmembránový tyrozin-kinázový receptor, který hraje důležitou roli v proliferaci, diferenciaci a přežívání buněk odvozených od neurální lišty. Ve folikulárních buňkách není za normálních okolností exprimován. Je lokalizován na 10. chromozomu (10q11.2) a obsahuje 21 exonů (Hansford et al., 2000), které kódují extracelulární, transmembránovou a tyrozinkinázoýý doménu *RET* proteinu.

Extracelulární doména zahrnuje kadherinu podobnou oblast vázající vápník a oblast bohatou na cystein. Transmembránová doména je kódována jediným 12. exonem. Intracelulární oblast katalyzuje autofosforylaci tyrozinových zbytků, které poté interagují s dalšími signálními molekulami. Za normálních podmínek je *RET* receptor aktivován pomocí multikomponentního komplexu, po jehož navázání dochází k dimerizaci a autofosforylaci (Hansford et al., 2000).

U PTC se vyskytuje *RET/PTC* přeskupení (rearrangements) (obr. 1), které vzniká fúzí 3' konce intracelulární tyrozinkinázoýý domény *RET* genu a 5' konce jiného konstitutivně exprimovaného genu poskytujícího promotor a dimerizační funkci. Tím vzniká stále aktivní chimérická forma receptoru, která je lokalizována v cytoplasmě, neboť postrádá transmembránovou doménu.

Výskyt *RET/PTC* přeskupení je velmi variabilní (5–70 % PTC). Byly pozorovány velké geografické rozdíly a také závislost na metodice stanovení (Jhiang, 2000). *RET/PTC* je spojován s agresivnější formou PTC a častou tvorbou vzdálených

metastáz (Sugg et al., 1996). K velkému nárůstu PTC došlo po černobylské havárii (26. duben 1986), kdy se do atmosféry uvolnilo ohromné množství radioaktivních izotopů (radioaktivní jod a cesium). Štítná žláza aktivně vycytává jod, proto jsou v postižené oblasti časté hlavně somaticky se vyskytující *RET/PTC* přeskupení ve folikulárních buňkách štítné žlázy (57–76 % PTC) (Thomas et al., 1999; Nikiforov et al., 1997; Bounacer et al., 1997; Nikiforov et al., 1999). Ionizující záření je účinnějším karcinogenem u dětí než u dospělých. Proto byly v době výbuchu ohroženy hlavně děti do 10 let (Thomas et al., 1999; Smida et al., 1999). U dětí do 4 let vzrostl počet PTC na Ukrajině a v Bělorusku po roce 1986 více než 80krát.

Přesný mechanismus, kterým ionizující záření indukuje onkogenní mutace, jako je přeskupování, není znám. V současné době se uvažuje o dvou mechanismech:

1) Radiace může přímo způsobit mutaci jako výsledek špatně opraveného DNA poškození. Při ionizujícím záření dochází k poškození chromatinové struktury projevující se jedno- nebo dvouřetězcovými zlomy v DNA nebo poškozením bází. Zlomy v DNA mohou být pro buňku letální nebo mohou být opraveny některým z enzymatických reparačních mechanismů, jako je ligace konců přerušovaných řetězců. Nesprávné spojení může vést k chromozomálním aberacím, jako je chromozomální translokace a inverze, kterými vznikají fuzní *RET/PTC* geny (Nikiforov et al., 1999). Uvedený mechanismus ovšem nevysvětluje dlouhé období mezi ozáření a vývojem PTC.

2) Proto se uvažuje o druhém způsobu, kdy radiace přímo nezpůsobí vznik fuzního genu, ale může zapříčinit trvalou genomickou instabilitu, která nakonec vytvořením mutací vede k tumorové progresi.

Není znám přesný důvod, proč k přeskupení způsobenému ozářením dochází tak často právě v buňkách štítné žlázy. Jedním z důvodů je prostorové umístění genů, které vytváří fuzní protein. Zatímco lineárně jsou od sebe geny často velmi vzdáleny, v interfázových jádrech je jejich vzájemná pozice díky umístění na určitých chromozomálních doménách jiná. Buněčná lokalizace jednotlivých chromozomálních oblastí se liší mezi různými fázemi buněčného cyklu a různými typy buněk. V thyroideálních buňkách se tak mohou fuzní geny vyskytovat vedle sebe a po radiaci se snadno rekombinují. Dalším důvodem může být zvýšená radiosenzitivita štítné žlázy oproti okolním tkáním.

V současné době je známo několik forem *RET/PTC* vznikajících inverzí nebo translokací (tab. 1), z nichž nejčastější jsou *RET/PTC1* a *RET/PTC3*.

RET/PTC1 označovaný také jako *RET/H4* vzniká fúzí *RET* proto-onkogenu s neznámým genem označeným H4 sondou na lokusu 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. Ale byl detekován i v oblasti Černobylu, 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).

RET/PTC3 vzniká fúzí *RET* proto-onkogenu s genem *ELE1* (10q11.2) označovaným také jako *RFG* (*RFG* – *RET* Fused Gene), který patří do rodiny „zink-finger“ (Santoro et al., 1994; Klugbauer et al., 1998). *RET/PTC3* je nejčastější u pacientů s PTC, kteří byli v době výbuchu v Černobylu mladší 10 let (až 70 %). Je detekován hlavně v nejhůře postižených oblastech Gomel, Brest a Minsk. Tento typ přeskupení je spojován s neagresivnější formou PTC, která se vyznačuje pře-

Tab. 1 Přehled RET/PTC přeskupení u PTC

Aktivující gen	Lokalizace	Funkce	Mutace	Fuzní forma
H4	10q21	neznámá	translokace	RET/PTC1
RI	17q23	regulační podjednotka (RI) cAMP-dependentní protein kinázy A	translokace	RET/PTC2
ELE1	10q11.2	transkripční koaktivátor androgenního receptoru	inverze	RET/PTC3
ELE1	10q11.2	transkripční koaktivátor androgenního receptoru	inverze	RET/PTC4
RFG-5	neznámá	integrální membránový protein Golgiho aparátu	inverze	RET/PTC5
HTIF 1	7q32	transkripční regulátor	translokace	RET/PTC6
HTIF1 γ	1p13	transkripční regulátor	translokace	RET/PTC7
KTN1	14q22.1	receptor v endoplazmatickém retikulu pro kinesin zajišťující transport vezikul a organel podél mikrotubulů	translokace	RET/PTC8
RFG9	18q21-22	neznámý cytoplazmatický protein účastnící se pravděpodobně intracelulárního transportu	translokace	RET/PTC9
ELKS	12p13	neznámá	translokace	ELKS/RET
PCM1	8q21-22	centrozomální protein	translokace	PCM-1/RET

devším rychlým růstem, větší velikostí, tvorbou vzdálených metastáz, nízkou diferenciací a velmi špatnou prognózou. Vyvíjí se po kratší latentní době (do deseti let po ozáření) a je většinou charakterizován jako solidní varianta PTC (Nikiforov et al., 1997; Smida et al., 1999).

2. BRAF mutace

V roce 2003 byla objevena bodová mutace v *BRAF* genu a byla identifikována jako nejčastější mutace u PTC (29–83 %) (podrobný přehled referencí uvádí Xing, 2005). *BRAF* somatické mutace byly poprvé nalezeny v maligním melanomu (Pollock et al., 2002) a v menší míře také u ovariálního karcinomu (Davies et al., 2002; Singer et al., 2003), karcinomu tlustého střeva (Rajagopalan et al., 2002; Wang et al., 2003) a plic (Davies et al., 2002).

Jedná se o aktivaci *BRAF* onkogenu, který patří mezi RAF proteiny. Tyto proteiny jsou velmi konzervované cytoplazmatické serin/threoninové proteinkinázy, které hrají důležitou roli v buněčné proliferaci, diferenciaci a apoptóze. Jsou součástí RTK-RAS-RAF-MEK-MAPK signální dráhy (obr. 1).

Při aktivaci RAF proteiny nejprve asociují s RAS vázající doménou, která je v N-terminální regulační oblasti RAS proteinu. Poté dochází k stimulaci jejich serin/threoninové kinázové aktivity a k následné fosforylaci a aktivaci MAPK (proteinkináza aktivovaná mitogeny) signální dráhy (Kolch, 2000).

Mezi RAF proteiny patří tři izoformy: A-Raf, B-Raf a C-Raf (neboli Raf1), lišící se různou expresí v tkáních. Ačkoli všechny izoformy jsou schopny aktivovat MEK fosforylaci, jsou odlišně aktivovány RAS proteinem. B-Raf je hlavní typ ve folikulárních buňkách štítné žlázy.

BRAF bodová mutace v PTC je výsledkem substituce T→A na pozici 1799 v 15. exonu. Tím dochází k substituci valinu za glutamát v kodonu 600 (V600E), dříve označované V599E. Tato mutace, která je v aktivační doméně, destabilizuje inaktivní formu zrušením hydrofobní interakce mezi aktivační smyčkou a ATP vazebným místem. Tím dojde ke zvýšení aktivity BRAF, která je nezávislá na RAS stimulaci (Wan et al., 2004).

Mutace V600E koreluje s vyšším stupněm TNM klasifikace, agresivnější formou nádoru a s horší prognózou onemocnění. Častěji se také vyskytují lokální metastázy. *BRAF* mutace je častěji detekována u spontánních PTC dospělých pacientů (29–83 %), zatímco u dětí je méně častá (12–16 %) (Lima et al., 2004; Kumagai et al., 2004).

U 10 % folikulární varianty PTC byla objevena další mutace v *BRAF* genu - K601E (Trovisco et al., 2004), u solidní varianty PTC byla detekována delece VK600-1E (Trovisco et al., 2005) a v roce 2006 byla nalezena inverze v kodonu 599 (V599Ins) (Carta et al., 2006).

Dalšími mutacemi jsou substituce G→A (G1365A) v 11. exonu a G→A v 11. intronu. Tyto dvě mutace jsou ale tichými mutacemi a nemají žádný vliv na aktivitu *BRAF* genu.

3. NTRK1 přeskupování

NTRK1 proto-onkogen (NTRK1 – neurotrophin tyrosine kinase receptor 1), neboli *TrkA*, kóduje receptor pro nervový růstový faktor a za normálních okolností je exprimován v periferních nervových gangliích. Je lokalizován na dvou úsecích 1. chromozomu (1q22-24, 1q32-41). Vyskytuje se asi u 10 % PTC. U pacientů z oblasti Černobylu se vyskytuje *NTRK1* přeskupení vzácně (3,3 % PTC) (Rabes et al., 2000).

TRK onkogeny vznikají intrachromozomální inverzí na 1. chromozómu. Dochází k fuzi 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. *NTRK1* přeskupení bylo detekováno u 5–25 % PTC, především u spontánních PTC.

Trk onkogen vzniká fuzí *NTRK1* genu s genem pro nesvalový tropomyosin *TPM3*, který je lokalizován v oblasti 1q31. *Trk* forma je nejčastější typ *NTRK1* přeskupení.

Dalšími formami jsou *Trk-T1* a *Trk-T2* onkogeny lišící se pouze svou velikostí. Vznikají fuzí *NTRK1* proto-onkogenu a *TPR* genu (*TRP* – Translocated Promotor Region) kódující protein, který je součástí cytoskeletu (Greco et al., 1997; Greco et al., 1992).

Další 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. chromozomu (Greco et al., 1995).

4. Amplifikace met proto-onkogenu

Met proto-onkogen (7q21-q31) kóduje vysoce afinitní transmembránový tyrozinkinázový receptor pro hepatocytární růstový faktor HGF (HGF – hepatocyte growth factor), neboli rozptylovací faktor SF (SF – scatter factor), který patří mezi cytokiny (Naldini et al., 1991). Receptor se skládá ze dvou spojených disulfidovou vazbou. Je exprimován hlavně v epitelálních tkáních (Di Renzo et al., 1991), kde může být aktivován ligandem produkovaným sousední mezenchymatickou tkání pomocí parakrinní interakce.

Až u 70 % PTC byla detekována zvýšená amplifikace *met* onkogenu indukující proliferaci, buněčnou motilitu a invazi do dalších tkání. Zvýšená exprese tohoto genu souvisí s vysokou malignitou PTC a je považována za sekundární změnu ve vývoji nádoru až po přeskupení *RET* nebo *NTRK1* genů (Di Renzo et al., 1992; Ruco et al., 1996).

5. AKAP9-BRAF přeskupení

V roce 2005 se objevila zpráva o novém onkogenu hrajícím roli v patogenezi PTC. Tento onkogen vzniká paracentrickou inverzí 7. chromozomu a fúzí N-konce *AKAP9* genu (A-kinase anchor protein 9) s C-terminální katalytickou doménou serin/threoninové kinázy *BRAF* (Ciampi et al., 2005). *BRAF* protein tak ztrácí dvě regulační autinhibiční domény. Vzniká fuzní protein *AKAP9-BRAF*, který má kinázovou aktivitu nezávislou na *RAS* stimulaci a je schopen aktivovat *MAPK* signální dráhu.

Dříve byl výskyt mutace v *BRAF* genu spojován hlavně se spontánním PTC a přeskupení indukované ionizačním zářením bylo vyhrazeno *RET* genu. Nyní se ukazuje, že také *BRAF* gen je spojen s přeskupením stimulovaném radiací. Toto přeskupení bylo detekováno u dětí z oblasti Černobylu po krátké latentní době (Ciampi et al., 2005).

6. Další geny účastníci se tumorogeneze PTC

U 5–21 % PTC byla nalezena LOH (ztráta heterozygoty) na 10q23, kde je lokus *PTEN* genu, který kóduje protein tyrosin fosfatázu (Gimm et al., 2000). Byla detekována také jeho snížená exprese.

Dalším genem, jehož mutace byly detekovány u pacientů s PTC je *RAS* onkogen (5–20 % PTC). Kóduje malý GTP-vazebný protein. *RAS* onkogen je aktivován bodovými mutacemi v GTP vazebné doméně a v GTPázové doméně (Namba et al., 1990). Podílí se na časném vývoji tumoru a je často detekován v tumorech s metastázami. Je spojován s horší prognózou PTC (Hara et al., 1994).

Dalším genem uplatňujícím se v patogenezi PTC je tumor-supresorový *TP53* gen kódující P53 fosfoprotein. Tento gen je nejčastěji mutovaným genem v lidských tumorech. Má duální aktivitu: zajišťuje opravu poškozené DNA a podílí se na regulaci apoptózy buněk, které mají neopravitelné poškození, čímž brání přenosu poškození do další generace buněk. P53 protein aktivuje transkripci genů, které zastavují buněčné dělení a umožňují opravu poškozené DNA. Nejvíce mutací způsobujících tumorogenezi je v DNA vazebné doméně. Mutovaný P53 se vyskytuje u 0–75% PTC, podílí se zejména na dediferenčním procesu (Zou et al., 1993).

7. Familiární PTC

PTC je z převážné většiny sporadického původu (95 %), jen asi u 5 % PTC se vyskytuje familiárně (FPTC). Je charakterizovaný agresivnějším fenotypem než u sporadického PTC. Je obvykle multifokální a objevuje se v časnějším věku. Způsob dědičnosti, stejně jako genetická a molekulární podstata nejsou ještě přesně známy (Corvi et al., 2001).

PTC je také spojován s některými dědičnými nádorovými syndromy. Jedná se o Cowdenův syndrom a familiární adenomatózní polypózu (FAP), včetně jejího subtypu Gardnerova syndromu. Za tyto syndromy zodpovídají dva geny: *APC* gen (5q21) u FAP a *PTEN* gen (10q23.3) u Cowdenova syndromu. Karcinomy folikulárních buněk se vyskytují u 10% pacientů s těmito syndromy. Jsou častěji multifokální, ale do uzlin či vzdálených orgánů metastazují jen vzácně.

ZÁVĚR

V tomto článku jsme shrnuli poznatky o nejdůležitějších genetických změnách pozorovaných u papilárního karcinomu štítné žlázy. V naší laboratoři jsme zatím zavedli detekci dvou nejčastějších mutací – *RET/PTC* přeskupení (*RET/PTC1* a *RET/PTC3*) a *BRAF* somatickou mutaci V600E. V současné době shromažďujeme čerstvé tkáně odoperované štítné žlázy, biopsie tenkou jehlou a parafinové bločky, se kterými provádíme retrospektivní studii zaměřenou na zjištění vlivu černobylské havárie na vznik papilárního karcinomu štítné žlázy v České republice.

Vlastní výzkumná práce je podporována projektem IGA MZ ČR NR/7806-3, NR/9165-3.

LITERATURA

- Bongarzone I, Monzini N, Borrello MG, Carcano C, Ferraresi G, Arighi E, Mondellini P, Della Porta G, Pierotti MA. Molecular characterization of a thyroid tumor specific transforming sequence formed by the fusion of *RET* tyrosine kinase and regulatory subunit R1 alpha of cyclic AMP-dependent protein kinase A. *Mol. Cell Biol* 1993; 13:358-366.
- Bounacer A, Wicker R, Caillou B, Cailleux AF, Sarasin A, Schlumberger M, Suarez HG. High prevalence of activating *RET* proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumors from patients who had received external radiation. *Oncogene* 1997; 15:1263-1273.
- Carta C, Moretti S, Passeri L, Barbi F, Avania N, Cavaliere A, Monacelli M, Macchiarulo A, Santeusano F, Tartaglia M, Puxeddu E. Genotyping of an Italian papillary carcinoma cohort revealed high prevalence of *BRAF* mutations, absence of *RAS* mutation and allowed the detection of new mutation of *BRAF* oncoprotein (*BRAF*^{V599ins}). *Clinical Endocrinology* 2006; 64: 105-109.
- Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, Gandhi M, Zhu Z, Nikiforova MN, Rabes HM, Fagin JA, Nikiforov YE. Oncogenic *AKAP9-BRAF* fusion is a novel mechanism of *MAPK* pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest* 2005; 115:94-101.
- Corvi R, Berger N, Balczon R, Romeo G. *RET/PCM-1*: a novel fusion gene in papillary thyroid carcinoma. *Oncogene* 2000, 19: 4236-4242.
- Corvi R, Lesueur F, Martinez-Alfaro M, Zini M, Decaussin M, Murat A, Romeo. *RET* rearrangements in familial papillary thyroid carcinomas. *Cancer Letters* 2001; 170:191-198.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S,

- Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417:949-954.
8. Di Renzo MF, Narsimhan RP, Olivero M, Bretti S, Giordano S, Medico E, Gaglia P, Zara P, Comoglio PM. Expression of the met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues. *Oncogene* 1991; 6:1997-2003.
9. Di Renzo MF, Olivero M, Ferro S, Prat M, Bongarzone I, Pilotti S, Belfiore A, Costantino A, Vigneri R, Pierotti MA, et al. Overexpression of the c-Met/HGF receptor gene in human thyroid carcinomas. *Oncogene* 1992; 7:2549-2553.
10. Dvořák J. Rakovina štítné žlázy. 1997 Libri.
11. Fugazzola L, Pierotti MA, Vigano E, Pacini F, Vorontsova TV, Bongarzone I. Molecular and biochemical analysis of RET/PTC4, a novel oncogenic rearrangement between RET and ELE1 genes in a post-Chernobyl papillary thyroid cancer. *Oncogene* 1996; 13:1093-1097.
12. Gimn O, Perren A, Weng LP, Marsh DJ, Yeh JJ, Ziebold U, Gil E, Hinze R, Delbridge L, Lees JA, Mutter GL, Robinson BG, Kommitho P, Dralle H, Eng C. Differential Nuclear and Cytoplasmic Expression of PTEN in Normal Thyroid Tissue, and Benign and Malignant Epithelial Thyroid Tumors. *Am J Pathol* 2000; 156:1693-1700.
13. Greco A, Mariani C, Miranda C, Lupas A, Pagliardini S, Pomati M, Pierotti MA. 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* 1995; 15:6118-6127.
14. Greco A, Miranda C, Pagliardini S, Fusetti L, Bongarzone I, Pierotti MA. Chromosome 1 rearrangements involving the genes TPR and NTRK1 produce structurally different thyroid-specific TRK oncogenes. *Genes Chrom Cancer* 1997; 19:112-123.
15. Greco A, Pierotti MA, Bongarzone I, Pagliardini S, Lanzi C, Della Porta G. Trk-T1 is a novel oncogene formed by fusion of trp and trk genes in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 1992; 7:237-242.
16. Hansford JR, Mulligan LM. Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet* 2000; 37: 817-827.
17. Hara H, Fulton N, Yashiro T, Ito K, DeGroot LJ, Kaplan EL. N-ras mutation: an independent prognostic factor for aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 1994; 116:1010.
18. Jhiang SM. The RET proto-oncogene in human cancers. *Oncogene* 2000; 19:5590-5597.
19. Jindřichová Š, Vlček P, Bendlová B. Genetické příčiny vzniku karcinomů štítné žlázy. *Čas Lék čes* 2004; 143:664-668.
20. Klugbauer S, Demidchik EP, Lengfelder E, Rabes HM. Detection of novel type of Ret rearrangement (PTC5) in thyroid carcinomas after Chernobyl and analysis of the involved RET-fused gene RFG5. *Cancer Res* 1998; 58:198-203.
21. Klugbauer S, Demidchik EP, Lengfelder E, Rabes HM. Molecular analysis of new subtype of ELE/RET rearrangements, their reciprocal transcripts and breakpoints in papillary thyroid carcinomas of children after Chernobyl. *Oncogene* 1998; 16: 671-675.
22. Klugbauer S, Jauch A, Lengfelder E, Demidchik E, Rabes HM. A novel type of RET rearrangement (PTC8) in childhood papillary thyroid carcinomas and characterization of the involved gene (RFG8). *Cancer Research* 2000; 60:7028-7032.
23. Klugbauer S, Lengfelder E, Demidchik EP, Rabes HM. A new form of RET rearrangement in thyroid carcinomas of children after the Chernobyl accident. *Oncogene* 1996; 13:1099-1102.
24. Klugbauer S, Rabes HM. The transcription coactivator HTF1 and a related protein are fused to the RET receptor tyrosine kinase in childhood papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 1999; 18:4388-4393.
25. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000; 351:289-305.
26. 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. Low frequency of BRAF T1796A mutations in childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:4280-4284.
27. 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. BRAF mutations are not a major event in post-Chernobyl childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:4267-4271.
28. Nakata T, Kitamura Y, Shimizu K, Tanaka S, Fujimori M, Yokoyama S, Ito K, Emi M. Fusion of a novel gene, ELKS, to RET due to translocation t(10;12)(q11;p13) in papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 25:97-103.
29. Naldini L, Vigna E, Narsimhan R, Gaudino G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Comoglio PM. Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-met. *Oncogene* 1991; 6:501-504.
30. Namba H, Gutman RA, Matsuo K, Alvarez A, Fagin JA. H-ras protooncogene mutations in human thyroid neoplasm. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71:223.
31. Nikiforov YE, Koshoffer A, Nikiforova M, Stringer J, Fagin J. Chromosomal breakpoint positions suggest a direct role for radiation in inducing illegitimate recombination between the ELE1 and RET genes in radiation-induced thyroid carcinomas. *Oncogene* 1999; 18:6330-6334.
32. Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, Monforte-Munoz H, Fagin JA. Distinct pattern of RET oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Research* 1997; 57:1690-1694.
33. Pierotti MA, Santoro M, Jenkins RB, Sozzi G, Bongarzone I, Grieco M, Monzini N, Miozzo M, Herrmann MA, Fusco A, et al. Characterization of an inversion on the long arm of chromosome 10 juxtaposing D10S170 and RET and creating the oncogenic sequence RET/PTC. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:1616-1620.
34. Pollock PM, Meltzer PS. A genome-based strategy uncovers frequent BRAF mutations in melanoma. *Cancer Cell* 2002; 2:5-7.
35. Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, Lengfelder E, Beimfohr C, Hoelzel D, Klugbauer S. Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. *Clinical cancer Research* 2000; 6:1093-1103.
36. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch repair status. *Nature* 2002; 418:934.
37. Ruco LP, Ranalli T, Marzullo A, Bianco P, Prat M, Comoglio PM, Baroni CD. Expression of Met protein in thyroid tumors. *J Pathol* 1996; 180:266-270.
38. Salassidis K, Bruch J, Zitzelsberger H, Lengfelder E, Kellerer AM, Bauchinger M. Translocation t(10;14)(q11.2;q22.1) fusing the kinetin to the RET gene creates a novel rearranged form (PTC8) of the RET proto-oncogene in radiation-induced childhood papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2000; 60:2786-2789.

39. Santoro M, Dathan NA, Berlingheri MT, Bongarzone I, Paulin C, Grieco M, Pierotti MA, Vecchio G, Fusco A. Molecular characterization of RET/PTC3, a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. *Oncogene* 1994; 9:509-516.
40. Singer G, Oldt R 3rd, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, Shih IeM. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:484-486.
41. Smida J, Salassidis K, Hieber L, Zitzelsberger H, Kellerer AM, Demidchik EP, Negele T, Spelsberg F, Lengfelder E, Werner M, Bauchinger M. Distinct frequency of RET rearrangements in papillary thyroid carcinomas of children and adults from Belarus. *Int J Cancer* 1999; 80:32-38.
42. Sugg SL, Zheng L, Rosen IB, Freeman JL, Ezzat S, Asa SL. RET/PTC-1, -2, and -3 oncogene rearrangements in human thyroid carcinomas: implications for metastatic potential? *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3360-3365.
43. 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. High prevalence of RET/PTC rearrangements in Ukrainian and Belorussian post-Chernobyl thyroid papillary carcinomas: a strong correlation between RET/PTC3 and the solid-follicular variant. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4232-4238.
44. Trovisco V, Soares P, Soares R, Magalhaes J, Sa-Couto P, Sobrinho-Simoes M. A new BRAF gene mutation detected in a case of a solid variant of papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol* 2005; 36: 694-697.
45. Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, Maximo V, Silva P, Magalhaes J, Abrosimov A, Guiu XM, Sobrinho-Simoes M. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *Journal of Pathology* 2004; 2002: 247-251.
46. Venturini L, You J, Stadler M, Galien R, Lallemand V, Koken MH, Mattei MG, Ganser A, Chambon P, Losson R, de The H. TIF1 γ , a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene* 1999; 18:1209-1217.
47. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R; Cancer Genome Project. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004; 116:855-867.
48. Wang L, Cunningham JM, Winters JL, Guenther JC, French AJ, Boardman LA, Burgart LJ, McDonnell SK, Schaid DJ, Thibodeau SN. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res* 2003; 63:5209-5212.
49. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2005; 12: 245-262.
50. Zou M, Shi Y, Farid NR. p53 mutations in all stages of thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77:1054.

Adresa autora:
Vlasta Sýkorová
Endokrinologický ústav
Národní 8
116 94 Praha 1
e-mail: vlassyk@seznam.cz

Case History

New Multiple Somatic Mutations in the *RET* Proto-oncogene Associated with a Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma

Š. Dvořáková,¹ E. Václavíková,¹ V. Sýkorová,¹ J. Dušková,² P. Viček,³ A. Ryška,⁴
Z. Novák,¹ and B. Bendlová¹

Medullary thyroid carcinoma (MTC) occurs mostly as a sporadic tumor or in connection with inherited cancer syndromes—multiple endocrine neoplasia (MEN) types 2A and 2B and familial MTC. Germline mutations in the *RET* proto-oncogene are found in most of the familial cases. Somatic mutations in the *RET* proto-oncogene are detected in 23%–69% of patients with sporadic MTC. The most frequent somatic mutation is Met918Thr in exon 16 and only a small percentage of mutations in other *RET* exons have been observed. In a very few cases double mutations were found. Genetic screening for somatic mutations in *RET* exons 10, 11, 13, 14, 15, and 16 in Czech patients with sporadic MTC was carried out by DNA sequencing. This study presents a new triple-somatic mutation Gly911Asp, Met918Thr, and Glu921Lys in exon 16 of the *RET* proto-oncogene detected in an 18-year-old Czech male patient. In the second case, a new double-somatic mutation Val591Ile in exon 10 with a concomitant somatic mutation Met918Thr in exon 16 was found in a 77-year-old Czech female patient. These both newly described somatic multiple mutations were revealed in a hemizygous status, the loss of heterozygosity in tumor tissues in comparison with germline DNA was confirmed.

Introduction

THE *RET* PROTO-ONCOGENE is located on 10q11.2 and encodes a transmembrane tyrosine kinase receptor that plays a role in differentiation and development of neuroendocrine cells (1). Activating germline mutations affecting different domains of the *RET* proto-oncogene are associated with autosomal dominant familial cancer syndromes: multiple endocrine neoplasia types 2A and 2B (MEN 2A and 2B) and familial medullary thyroid carcinoma (FMTC) (2–4).

Activating somatic mutations in the *RET* proto-oncogene causing the sporadic medullary thyroid carcinoma (MTC) are detected in 23%–69% of patients' tumors. The most frequent somatic mutation is Met918Thr in exon 16 (5). This mutation is involved in the initial event of the development of MTC and has a poor prognosis (6,7). Some other somatic missense point mutations as well as small oligonucleotide deletions or insertions in exons 10, 11, 13, and 15 have been also reported in sporadic MTC tumors but with a considerably lower frequency (8–12).

In a very few cases double germline or somatic mutations were reported (Table 1). We identified a new coexistence of three somatic missense mutations affecting codons Gly911Asp, Met918Thr, and Glu921Lys in exon 16 and a new double-somatic mutation Val591Ile in exon 10 and Met918Thr in exon 16 of the *RET* proto-oncogene in one allele associated with sporadic MTCs. To the best of our knowledge, no combination of somatic mutations at three codons in exon 16 and no double-somatic mutation in exons 10 and 16 have been reported thus far.

Materials and Methods

Patients

The first patient, a Czech man, was diagnosed and operated on at age 18. The patient underwent preoperatively ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy (FNAB) of thyroid nodule and lymph nodes. Cytologic smears were air-dried and stained with May-Grunewald and Giemsa stains.

¹Department of Molecular Endocrinology, Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic.

²Institute of Pathology and Institute of Postgraduate Studies, 1st Medical Faculty, Charles University, Prague, Czech Republic.

³Clinic of Nuclear Medicine and Endocrinology, 2nd Medical Faculty, Charles University, Prague, Czech Republic.

⁴Department of Pathology, Charles University Medical Faculty and Faculty Hospital, Hradec Králové, Czech Republic.

TABLE 1. DOUBLE GERMLINE AND/OR SOMATIC MUTATIONS REPORTED IN PATIENTS WITH MEDULLARY THYROID CANCER

Family	Exon	Mutation	Somatic/germline	Phenotype	Reference
1	11	Cys634Arg	germline	MEN 2A	13
	11	Ala640Gly	germline		
2	11	Cys634Arg	germline	MEN 2A	14
	11	Ala641Ser	germline		
3	14	Val804Met	germline	MEN 2B	15
	14	Tyr806Cys	germline		
4	14	Val804Met	germline	FMTC	16
	14	Arg844Leu	germline		
5	16	Met918Thr	germline	MEN 2B	17
	16	Ser922Tyr	germline		
6	14	Val804Met	germline	MEN 2B	18
	15	Ser904Cys	germline		
7	10	Cys618Arg	germline	FMTC	9
	16	Met918Thr	somatic		
8	10	Cys618Arg	germline	FMTC	9
	16	Met918Thr	somatic		
9	11	Cys634Ser	germline	MEN 2A	9, 19
	16	Met918Thr	somatic		
10	11	Cys634Arg	germline	MEN 2A	9, 19
	16	Met918Thr	somatic		
11	13	Glu768Asp	germline	FMTC	20
	16	Ala919Val	somatic		
12	10	Val591Ile	somatic	MTC	Current study
	16	Met918Thr	somatic		
13	11	Ala639Gly	somatic	MTC	21
	11	Ala641Arg	somatic		
14	15	Glu884Lys	somatic	MTC	8
	15	Arg908Lys	somatic		
15	16	Met918Thr	somatic	MTC	22
	16	Ala919Val	somatic		
16	16	Gly911Asp	somatic	MTC	Current study
	16	Met918Thr	somatic		
	16	Glu921Lys	somatic		

MEN, multiple endocrine neoplasia.

The cells were nearly all dissociated, mainly oval, and multinuclear. The wash-out FNAB material from the needle showed an extremely high level of calcitonin that confirmed medullary thyroid carcinoma. The total thyroidectomy with a right side dissection of lymph nodes was performed. For the histologic examination fatty tissue 135 × 15 × 15 mm with several lymph nodes (the largest was 20 × 10 × 10 mm) and the thyroidectomy specimen were supplied. Histologically, the lymph nodes were partly substituted with metastases of medullary thyroid carcinoma. The preserved remainder exhibited features of antigenic stimulation. Two whitish tumor nodules were found in the thyroid, the larger one (26 mm in diameter) in the right lobe that measured 50 × 35 × 35 mm, the smaller nodule of the same homogeneous whitish appearance 10 mm in diameter in the isthmus (25 × 17 × 8 mm). After careful revision of histologic slides it was identified that the isthmus neoplastic tissue was a lymph node metastasis surrounded by the non-neoplastic isthmus thyroid tissue. The left lobe of thyroid (40 × 20 × 15 mm) was macroscopically and histologically without tumor. Both neoplastic nodules contained medullary thyroid carcinoma (large cell variant with the stromal presence of amyloid). Immunohistochemical investigation revealed positivity for calcitonin in the neoplastic cells and a few non-neoplastic

C-cells in the vicinity of the tumor. No apparent C-cell hyperplasia was observed in the non-neoplastic investigated thyroid tissue. At present, 8 years after surgery, the patient is alive and without evidence of the relapse of the disease.

The second patient, a 77-year-old woman, was examined by FNA cytology and consecutively operated on for medullary thyroid carcinoma; total thyroidectomy was performed. Grossly, the right thyroid lobe measured 40 × 30 × 25 mm and weighed 33 g. The cut section was of brownish color, with several white to gray tumor nodules up to 20 mm in diameter. Microscopically, the tumor foci were composed of plump polygonal to spindle cells, haphazardly arranged in solid nests, embedded in large amounts of amyloid. The mitotic activity was very low. Immunohistochemically, the tumor cells expressed calcitonin, chromogranin, and synaptophysin; they were thyroglobulin negative. No signs of C-cell hyperplasia were seen in the surrounding non-neoplastic thyroid tissue. The left thyroid lobe measured 30 × 20 × 15 mm and weighed 19 g. On the cut section, it was homogeneous with a solitary pale, sharply circumscribed nodule of spherical shape, 15 mm in diameter. Histologically, this nodule was a microfollicular adenoma, partly hyalinized, formed of follicular cells with predominantly vacuolated cytoplasm; the cells thus gained a signet-ring appearance. They

strongly expressed thyroglobulin. Four years after the surgery, the patient is alive and well, without evidence of recurrence of the disease.

In both patients, no clinical signs or symptoms of a pheochromocytoma were detectable at the time of operation and there was no family history of MTC, MEN 2 syndromes, and Hirschsprung's disease. Thus, they were classified as a sporadic MTC cases.

Genetic analysis

The mutation analysis was performed under informed consent. Genomic DNA was extracted from peripheral leucocytes and somatic DNA was isolated from retrospective material paraffin-embedded formalin-fixed tissue blocks by our modification of phenol-chloroform isolation protocol (23). Polymerase chain reaction (PCR) amplifications of exons 10, 11, 13, 14, 15, and 16 and after double-stranded fluorescent sequencing were performed according to our previously described procedure (24). To prove the positive results exons 10 and 16 were reamplified three times and were also amplified with two different pairs of primers ruling out the possibility of a preferential annealing of one pair of PCR primers for the mutated allele.

Results

In the first patient with sporadic MTC, the direct sequencing analysis of the *RET* proto-oncogene revealed a new triple somatic hemizygous mutation Gly911Asp (GGT/GAT), Met918Thr (ATG/ACG), and Glu921Lys (GAA/AAA) in exon 16 in the tumor tissue from the right thyroid lobe (Fig. 1). These mutations were not found in DNA isolated from patient's peripheral blood, which confirmed their somatic origin. This triple somatic mutation was not detected in two lymph node metastasis (one localized in the middle of the isthmus tissue) and no other mutations in tested *RET* exons in these tissues were detected. Because of the different genetic background between primary and the metastatic neoplastic nodules, the haematoxylin-eosin-stained histology slides were revised. No light microscopy recognisable changes were found in the phenotype of the cells. Loss of heterozygosity (LOH) analysis was used to distinguish between the homozygous status or hemizygosity with loss of the wild-type allele. The polymorphism in exon 15 at codon Ser904Ser (TCC/TCG), the intronic variant G/A at the position -24 bp from exon 15 and the intronic variant G/A at position +72 bp from exon 16 were found in heterozygous status in constitutive DNA on contrary to hemizygous status in

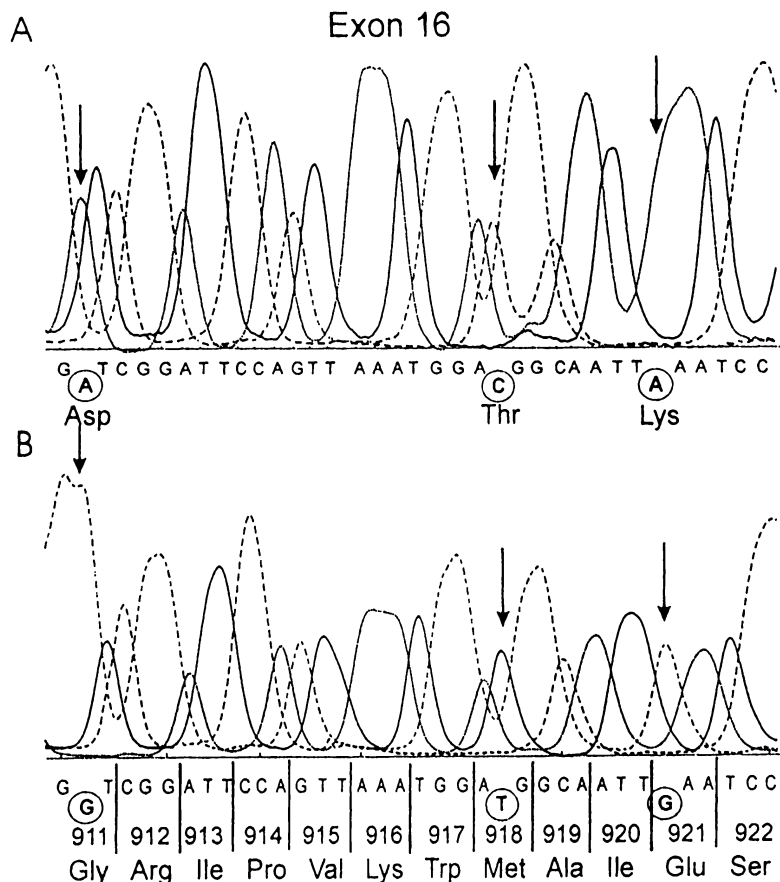


FIG. 1. Identification of the triple *RET* proto-oncogene mutation Gly911Asp (GGT/GAT), Met918Thr (ATG/ACG) and Glu921Lys (GAA/AAA) in exon 16 by direct sequencing. A: Partial sequence of the exon 16 from the first patient tumor tissue from right thyroid lobe (hemizygous mutation). B: Partial sequence of the exon 16 from the constitutive DNA isolated from blood of this patient, the same sequence was obtained from two lymph node metastasis.

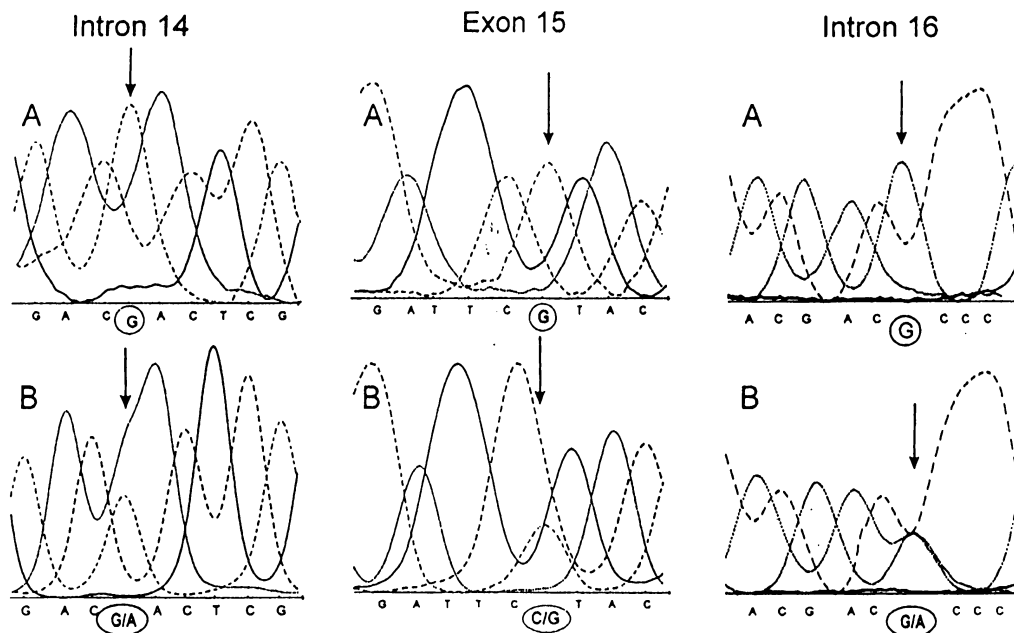


FIG. 2. Identification of the *RET* proto-oncogene polymorphisms at codon Ser904Ser (TCC/TCG) in exon 15, the intronic variant G/A at the position -24 bp from exon 15 and the intronic variant G/A at position +72 bp from exon 16 by direct sequencing. A: Partial sequence from the first patient tumor tissue from the right thyroid lobe, the same sequences were obtained from two lymph node metastasis (loss of heterozygosity). B: The same sequence from the constitutive DNA isolated from blood of this patient (heterozygous).

the primary tumor tissue (Fig. 2). These findings argue for the coexistence of all three mutations on the same *RET* allele and for the loss of one allele in the tumor tissue. Interestingly, we found the same pattern of polymorphisms as well as intronic variants in both studied lymph node metastasis. This could reflect that in the beginning of the oncogenic pro-

cess one allele was lost and then in the right thyroid lobe triple mutation occurred.

In the second patient with sporadic MTC, the direct sequencing analysis of the *RET* proto-oncogene revealed a new double-somatic hemizygous mutation Val591Ile (GTT/ATT) in exon 10 and a concomitant mutation Met918Thr in exon

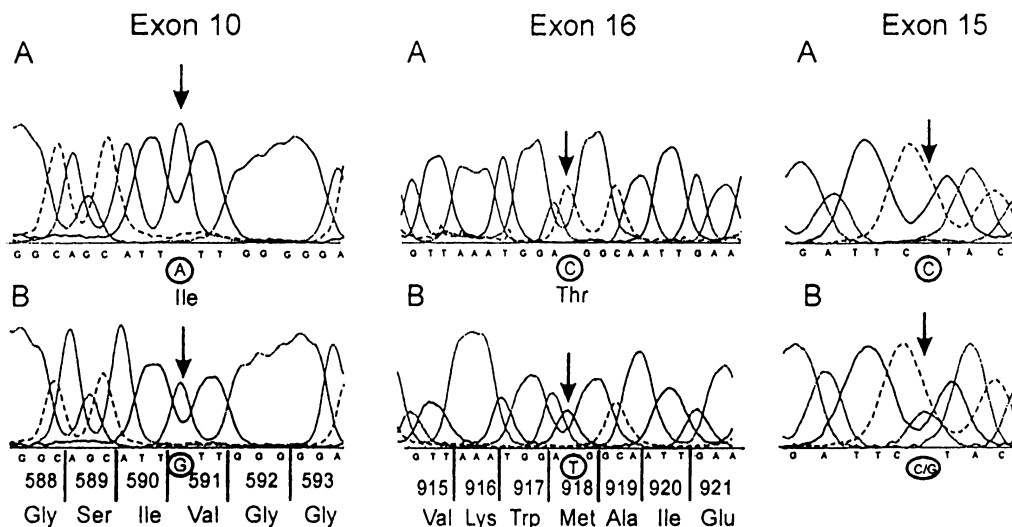


FIG. 3. Identification of the double *RET* proto-oncogene mutation Val591Ile (GTT/ATT) in exon 10 and Met918Thr (ATG/ACG) in exon 16 and polymorphism at codon Ser904Ser (TCC/TCG) in exon 15 by direct sequencing. A: Partial sequence of exons 10, 16, and 15 from the second patient tumor tissue (hemizygous mutation and loss of heterozygosity). B: The same sequence from the constitutive DNA isolated from blood of this patient.

16 (ATG/ACG) in the tumor tissue (Fig. 3). These mutations were not found in DNA isolated from patient's peripheral blood, which confirmed their somatic origin. The LOH was confirmed by using the exon flanking polymorphisms analysis. The polymorphism in exon 15 at codon Ser904Ser (TCC/TCG) was found in heterozygous status in constitutive DNA on contrary to hemizygous status in the tumor tissue (Fig. 3).

Discussion

The most common somatic *RET* proto-oncogene mutation detected in tumor tissue of patients with sporadic MTC is a missense mutation Met918Thr in exon 16, which converts *RET* into a dominant transforming gene (25). The mutation Met918Thr, presented also in our two patients, has been shown to alter the substrate specificity of RET, increases its enzymatic activity, and results in autophosphorylation of the tyrosine kinase domain of the RET receptor without requiring dimerization of the RET receptor (2,25,26). Mutation Met918Thr has been associated with more aggressive MTC and significantly less favorable clinical outcome (6), but we did not observe any progression of the disease in our patients thus far, perhaps because of successful radical total thyroidectomy and/or favorable mutation combination.

In our first patient, we provide the first evidence of an occurrence of a triple-somatic mutation in the *RET* proto-oncogene associated with sporadic MTC tumor. All three mutations (Gly911Asp, Met918Thr, and Glu921Lys) lie in exon 16. The newly described mutation Gly911Asp changes amino acid in nonconservative region of RET receptor. The replacement of glycine for aspartate could change acid base equilibrium and thus induce a conformational change in the RET protein, which might contribute to an impaired activity of the RET protein (2). Mutation Glu921Lys lies in region 4 (Ala-Ile-Glu) that indicates highly conserved sequence among protein kinases and is essential for enzymatic activity of the RET kinase (2). This mutation was not previously described in connection with MTC. Paradoxically, this mutation as a de-novo germline change was found in a patient with a sporadic long form of Hirschsprung's disease, where it was discussed as a main cause of inactivation or abolishment of the RET product (27,28). There was no evidence of symptoms of Hirschsprung's disease in our patient. But this likely inactivating mutation could contribute to the milder phenotype of MTC in our patient and no invasion of carcinoma to the other lobe of thyroid and could prevent from the development of distant metastasis. Interestingly, we found this triple mutation only in primary tumor compared to two lymph node metastasis. This observation could be explained that the triple mutation has arisen during tumor progression within a primary tumor suggesting a less rapid overgrowth of the clones bearing this change. An alternative, which is less likely in this sporadic case, is that MTC and MTC metastasis could have a polyclonal origin, where is possible that lymph node metastasis metastasized from the other MTC primary foci that does not bear this mutation. Therefore, it seems that *RET* triple mutation is not absolutely required for metastasis of MTC to lymph nodes.

In the second patient we found a new double-somatic mutation in two distinct regions of the *RET* proto-oncogene encoding extracellular domain (exon 10) and intracellular domain

(exon 16) of RET protein. The mutation Val591Ile in exon 10 was not previously described. Somatic mutations in the extracellular domain of the *RET* proto-oncogene are very rarely published. There were only found a 27-bp somatic heterozygous deletion (codons 611–619 or 612–620) in exon 10 associated with a sporadic MTC (11) and a 48-bp somatic heterozygous deletion (codons 592–607) in exon 10 (29). Although there are very poor data regarding function of somatic mutations in exon 10, it could be postulated to play a role in the kinetics of dissociation of the RET binding complex.

In addition to the effect of single-point mutations we could seek the effect of multiple mutations. Combinations of mutations in the *RET* proto-oncogene may modulate the transforming activity, catalytic activity, and substrate specificity of RET protein differently from those with only a single mutation (14–22). Although *RET* single mutation is sufficient to cause C-cell hyperplasia, tumor progression is thought to be due to the clonal expansion induced by accumulation of somatic events and/or epigenetic changes. The dominant effect of the mutant allele either by loss of the wild-type allele or by overrepresentation of the mutant allele was detected in MEN 2 related tumors (30–32). Furthermore, sporadic MTCs may derive from different cell subpopulations, some of which can carry different somatic mutations. MTC can be of polyclonal origin (19). In both our patients a novel somatic multiple mutations were found in a hemizygous status because of LOH in tumor tissue and multiple mutations lie on the same *RET* allele. This paper highlights the importance of performing a more extensive and more detailed genetic analysis of medullary thyroid carcinoma tissues.

Acknowledgements

This study was supported by the grant IGA MH CR NR/7806-3. We thank Mrs. Ivana Staňková for her excellent technical support and Ing. Petr Dvořák for his help with preparation of this manuscript.

References

1. Ishizaka Y, Itoh F, Tahira T, Ikeda I, Sugimura T, Tucker J, Fertitta A, Carrano AV, Nagao M 1989 Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. *Oncogene* 4:1519–1521.
2. Carlson KM, Dou S, Chi D, Scavarda N, Toshima K, Jackson CE, Wells SA Jr, Goodfellow PJ, Donis-Keller H 1994 Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the RET protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1579–1583.
3. Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, Howe JR, Moley JF, Goodfellow P, Wells SA Jr 1993 Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet* 2:851–856.
4. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Eldson MJ, Eng C, Gardner E, Love DR, Mole SE, Moore JK, Papi L 1993 Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 363:458–460.
5. Eng C, Mulligan LM, Smith DP, Healey CS, Frilling A, Raue F, Neumann HP, Pfragner R, Behmel A, Lorenzo MJ 1995 Mutation of the RET protooncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 12:209–212.
6. Zedenius J, Larsson C, Bergholm U, Bovee J, Svensson A, Hallengren B, Grimelius L, Backdahl M, Weber G, Wallin G

- 1995 Mutations of codon 918 in the RET proto-oncogene correlate to poor prognosis in sporadic medullary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3088–3090.
7. Romei C, Elisei R, Pinchera A, Ceccherini I, Molinaro E, Mancusi F, Martino E, Romeo G, Pacini F 1996 Somatic mutations of the ret protooncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma are not restricted to exon 16 and are associated with tumor recurrence. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1619–1622.
 8. Uchino S, Noguchi S, Yamashita H, Sato M, Adachi M, Yamashita H, Watanabe S, Ohshima A, Mitsuyama S, Iwashita T, Takahashi M 1999 Somatic mutations in RET exons 12 and 15 in sporadic medullary thyroid carcinomas: different spectrum of mutations in sporadic type from hereditary type. *Jpn J Cancer Res* 90:1231–1237.
 9. Marsh DJ, Scott DA, Eng C, Learoyd DL, Capes AG, Pojer R, Richardson AL, Houghton C, Mulligan LM, Ponder BAJ, Robinson BG 1996 Germline and somatic mutations in an oncogene: RET mutations in inherited medullary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 56:1241–1243.
 10. Bugalho MJ, Coelho I, Sobrinho LG 2000 Somatic trinucleotide change encompassing codons 882 and 883 of the RET proto-oncogene in a patient with sporadic medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 142:573–575.
 11. Kalinin V, Frilling A 1998 27-bp Deletion in the RET proto-oncogene as a somatic mutation associated with medullary thyroid carcinoma. *J Mol Med* 76:365–367.
 12. Alemi M, Lucas SD, Sallstrom JF, Bergholm U, Akerstrom G, Wilander E 1997 A complex nine base pair deletion in RET exon 11 common in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Oncogene* 14:2041–2045.
 13. Tessitore A, Sinisi AA, Pasquali D, Cardone M, Vitale D, Bellastella A, Colantuoni V 1999 A novel case of multiple endocrine neoplasia type 2A associated with two de novo mutations of the RET protooncogene. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3522–3527.
 14. Poturnajova M, Altanerova V, Kostalova L, Breza J, Altaner C 2005 Novel germline mutation in the transmembrane region of RET gene close to Cys634Ser mutation associated with MEN 2A syndrome. *J Mol Med* 83:287–295.
 15. Miyauchi A, Futami H, Hai N, Yokozawa T, Kuma K, Aoki N, Kosugi S, Sugano K, Yamaguchi K 1999 Two germline missense mutations at codons 804 and 806 of the RET proto-oncogene in the same allele in a patient with multiple endocrine neoplasia type 2B without codon 918 mutation. *Jpn J Cancer Res* 90:1–5.
 16. Bartsch DK, Hasse C, Schug C, Barth P, Rothmund M, Hoppner W 2000 A RET double mutation in the germline of a kindred with FMTC. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 108:128–132.
 17. Kitamura Y, Scavarda N, Wells Jr SA, Jackson CE, Goodfellow PJ 1995 Two maternally derived missense mutations in the tyrosine kinase domain of the RET protooncogene in a patient with de novo MEN 2B. *Hum Mol Genet* 5:1987–1988.
 18. Menko FH, van der Luijt RB, de Valk LA, Toorians AW, Sepers JM, van Diest PJ, Lips CJ 2002 Atypical MEN type 2B associated with two germline RET mutations on the same allele not involving codon 918. *J Clin Endocrinol Metab* 87:393–397.
 19. Eng C, Mulligan LM, Healey CS, Houghton C, Frilling A, Raue F, Thomas GA, Ponder BA 1996 Heterogeneous mutation of the RET proto-oncogene in subpopulations of medullary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 56:2167–2170.
 20. Miyauchi A, Egawa S, Futami H, Kuma K, Obara T, Yamaguchi K 1997 A novel somatic mutation in the RET proto-oncogene in familial medullary thyroid carcinoma with a germline codon 768 mutation. *Jpn J Cancer Res* 88:527–531.
 21. Kalinin VN, Amosenko FA, Shabanov MA, Lubchenko LN, Hosch SB, Garkavtseva RF, Izbicki JR 2001 Three novel mutations in the RET proto-oncogene. *J Mol Med* 79:609–612.
 22. Uchino S, Noguchi S, Adachi M, Sato M, Yamashita H, Watanabe S, Murakami T, Toda M, Murakami N, Yamashita H 1998 Novel point mutations and allele loss at the RET locus in sporadic medullary thyroid carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 89:411–418.
 23. Jindrichova S, Kodet R, Krskova L, Vlcek P, Bendlova B 2003 The newly detected mutations in the RET proto-oncogene in exon 16 as a cause of sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Mol Med* 81:819–823.
 24. Jindrichova S, Vcelak J, Vlcek P, Neradilova M, Nemecek J, Bendlova B 2004 Screening of six risk exons of the RET proto-oncogene in families with medullary thyroid carcinoma in the Czech Republic. *J Endocrinol* 183:257–265.
 25. Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, Grieco M, Fusco A, Vecchio G, Matoskova B, Kraus MH 1995 Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN 2A and MEN 2B. *Science* 267:381–383.
 26. Songyang Z, Carraway KL 3rd, Eck MJ, Harrison SC, Feldman RA, Mohammadi M, Schlessinger J, Hubbard SR, Smith DP, Eng C 1995 Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature* 373:536–539.
 27. Pelet A, Attie T, Goulet O, Eng C, Ponder BAJ, Munnich A, Lyonnet S 1994 De-novo mutations of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *The Lancet* 344:1769.
 28. Attie T, Pelet A, Edery P, Eng C, Mulligan LM, Amiel J, Boutrand L, Beldjord C, Nihoul-Fekete C, Munnich A, Ponder BAJ, Lyonnet S 1995 Diversity of RET proto-oncogene mutations in familial and sporadic Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 4:1381–1386.
 29. Ceccherini I, Pasini B, Pacini F, Gullo M, Bongarzone I, Romei C, Santamaria G, Matera I, Mondellini P, Scopsi L, Pinchera A, Pierotti MA, Romeo G 1997 Somatic in frame deletions not involving juxtamembranous cysteine residues strongly activate the RET proto-oncogene. *Oncogene* 14:2609–2612.
 30. Quadro L, Fattoruso O, Cosma MP, Verga U, Porcellini A, Libroia A, Colantuoni V 2001 Loss of heterozygosity at the RET protooncogene locus in a case of multiple endocrine neoplasia type 2A. *J Clin Endocrinol Metab* 86:239–244.
 31. Huang SC, Koch CA, Vortmeyer AO, Pack SD, Lichtenauer UD, Mannan P, Lubensky IA, Chrousos GP, Gagel RF, Pacak K, Zhuang Z 2000 Duplication of the mutant RET allele in trisomy 10 or loss of the wild-type allele in multiple endocrine neoplasia type 2-associated pheochromocytomas. *Cancer Res* 60:6223–6226.
 32. Huang SC, Torres-Cruz J, Pack SD, Koch CA, Vortmeyer AO, Mannan P, Lubensky IA, Gagel RF, Zhuang Z 2003 Amplification and overexpression of mutant RET in multiple endocrine neoplasia type 2-associated medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88:459–463.

Address reprint requests to:
 Dr. Šárka Dvořáková, PhD
 Department of Molecular Endocrinology
 Institute of Endocrinology
 Národní 8
 Prague 1, 11694
 Czech Republic

E-mail: sarka@obloha.cz

Nádory štítné žlázy a Hirschsprungova choroba: desetileté zkušenosti s molekulárně genetickou diagnostikou *RET* proto-onkogenu

Š. Bendlová¹, Š. Dvořáková¹, E. Václavíková¹, V. Sýkorová¹, P. Vlček², R. Škába³

¹Endokrinologický ústav, Praha, ředitel doc. MUDr. Vojtěch Hainer, CSc.

²Klinika nukleární medicíny a endokrinologie 2. lékařské fakulty UK a FN Motol, Praha, přednosta doc. MUDr. Petr Vlček, CSc.

³Klinika dětské chirurgie 2. lékařské fakulty UK a FN Motol, Praha, přednosta prof. MUDr. Jiří Šnajdauf, DrSc.

Souhrn: Výzkumy posledních 10 let prokázaly patogenetickou roli *RET* proto-onkogenu u nádorových onemocnění štítné žlázy - medulárního karcinomu štítné žlázy (MTC), papilárního karcinomu štítné žlázy (PTC), u syndromů MEN 2 a u Hirschsprungovy choroby, která může být spojena s MTC či MEN 2. Molekulárně genetická diagnostika umožňuje nalézt mutace genu, na základě nichž lze předvídat průběh onemocnění, ale zejména je přínosná u rizikových osob, v jejichž případech je možno při pozitivním nálezu mutace terapeuticky zasáhnout již v presymptomatickém stadiu onemocnění. Nositelům zárodečné mutace je doporučena profylaktická totální tyreoidektomie. Nyní se intenzivně zkoumá fyziologická role *RET* proto-onkogenu v normální proliferaci, diferenciaci a přežívání buněk. Díky novým poznatkům se rýsuje i možnost terapeutického využití genové terapie na úrovni *RET* signalizační kaskády.

Klíčová slova: medulární karcinom štítné žlázy - papilární karcinom štítné žlázy - Hirschsprungova choroba - molekulárně genetická diagnostika - *RET* proto-onkogen - genová terapie

Thyroid carcinomas and Hirschsprung's disease - 10-year experience with molecular genetic testing of the *RET* proto-oncogene

Summary: In the last ten years, research has confirmed the role of the *RET* proto-oncogene in the pathogenesis of thyroid cancer such as medullary thyroid carcinoma (MTC) and papillary thyroid carcinoma (PTC), multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN 2) and Hirschsprung's disease that can be associated with MTC or MEN 2. Through the use of molecular genetic testing, we are able to detect gene mutations and the course the disease might take can be predicted, thus enabling us to cure mutation carriers among the high-risk patients can at a very early, clinically asymptomatic stage of the disease; prophylactic total thyroidectomy in said patients is recommended. At this juncture, there is extensive on-going research on the physiological role played by the *RET* proto-oncogene on the normal proliferation, differentiation and survival of the cell. Thanks to the new findings there are now possibilities of the therapeutic use of gene therapy on an *RET* signaling cascade level in near future.

Key words: medullary thyroid carcinoma - papillary thyroid carcinoma - Hirschsprung's disease - molecular genetic testing - *RET* proto-oncogene - gene therapy

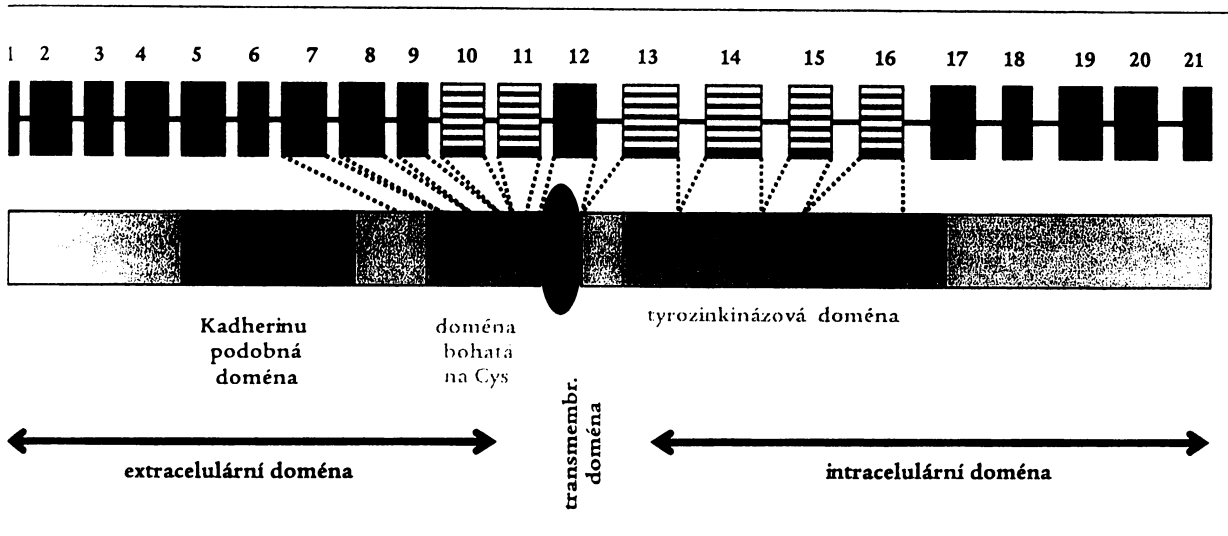
Úvod

Již téměř 10 let studujeme molekulárně genetické příčiny medulárního karcinomu štítné žlázy, nověji i papilárního karcinomu štítné žlázy a Hirschsprungovy choroby. Tato klinicky zdánlivě vzdálená onemocnění mají společnou patogenetickou příčinu - mutace v *RET* proto-onkogenu. Studium *RET* proto-onkogenu má význam nejen vědecký, ale detekce ge-

netických alterací tohoto genu slouží dnes již k rutinní molekulárně genetické diagnostice, která významně přispívá k predikci onemocnění a umožňuje včasný profylaktický zá- krok snižující morbiditu a mortalitu spojenou s těmito onemocněními.

***RET* proto-onkogen – normální funkce**
Proteinkinázy jsou zapojeny do většiny signálních cest. Velkou skupinu

(90 z 518 známých proteinkináz) představují receptorové či nereceptorové tyrozinkinázy, v jejichž aktivaci hrají roli specifické tyrozinové zbytky [39]. Defekty tyrozinkinázových receptorů jsou příčinou řady onemocnění a tyrozinkinázové receptory jsou tak slibnými terapeutickými cíli [24]. Jsou to transmembránové receptory s vnitřní kinázovou aktivitou, která je stimulována ligandy.



Obr. 1. *RET* proto-onkogen s vyznačenými typickými funkčními doménami.

Gen je tvořen 21 exony, což představuje 55 kb genetického materiálu. Rizikové exony 10, 11, 13, 14, 15 a 16 pro vznik MTC jsou vyznačeny šrafování.

Navázání extracelulárního ligandu vede k dimerizaci receptoru, kdy dojde ke spojení dvou katalytických domén, což umožní transfosforylaci tyrozinových zbytků. Fosfotyroziny šíří dále signál prostřednictvím intracelulárních proteinů, které nesou SH2 (src-homology 2) a fosfotyrozinové vazebné domény. Aktivace tyrozinkináz tak iniciuje intracelulární signální kaskádu, která nakonec vede k modulaci genové exprese a biologické odpovědi [50].

RET proto-onkogen je transmembránovou receptorovou tyrozinkinázou s typickými strukturálními a funkčními oblastmi (obr. 1) [34]. Jeho extracelulární část obsahuje 4 kadherinu podobné domény, doménu vazající vápník a oblast bohatou na cysteiny. Tato oblast obsahuje 28 cysteinových zbytků, z nichž 27 je konzervováno a vyskytuje se u mnoha živočišných druhů. Mezi cysteiny se tvoří disulfidické vazby, které jsou rozhodující při formování terciární struktury *RET* proteinu. Intracelulární část obsahuje typickou tyrozinkinázovou doménu. V důsledku alternativního sestřihu vznikají izoformy *RET*u. *RET*9 a *RET*51 jsou dvě hlavní pro-

teinové izoformy o 1072 a 1114 aminokyselinách [15].

Aktivace *RET*u je velmi přísně regulovaný, tkáňově specifický proces. Za normálních okolností je *RET* protein exprimován v raných vývojových fázích v buňkách odvozených od neuroektodermu, tedy z neurální lišty. *RET* protein je při aktivaci součástí multikomponentního komplexu, který váže růstové faktory z rodiny GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor). Byly izolovány 4 ligandy aktivující *RET*, jejichž specifita se vzájemně částečně překrývá. Jsou to GDNF, neurturin, artemin a persefin. Ligandy se nejprve musí navázat na své specifické koreceptory (GFR α 1-4), které jsou ukotveny v membráně prostřednictvím glykosylfosfatidylinositolu. Ligandy se poté spolu se svými koreceptory vážou na dvě molekuly *RET*u, dojde k dimerizaci receptoru, která spustí autofosforylaci klíčových tyrozinových zbytků a následnou intracelulární signalizaci (obr. 2) [1,38,49]. Vazbou GDNF na koreceptor se zároveň mění lipidové okolí *RET*u v plazmatické membráně. Intracelulární doména *RET*u obsahuje nejméně 12 autofosforylačních míst. Tyro-

zinové zbytky (Tyr) Tyr1090 a Tyr1096 jsou přítomny pouze u izoformy *RET*51. Fosforylované tyroziny *RET*u slouží jako místa vazebné interakce s intracelulárními signálními proteiny. Tyr905 je vazebným místem pro adaptory Grb7/10, Tyr1015 pro fosfolipázu C γ , Tyr981 pro c-Src a Tyr1096, specifický jen pro *RET*51, pro Grb2. Tyr1062 je vazebným místem pro takové proteiny jako jsou Shc, ShcC, IRS1/2, FRS2, DOK1/4/5 a Enigma. Tvorba těchto proteino-ových komplexů s Tyr1062 vede ke stimulaci Ras/ERK a fosfatidylinositol-3-kináza/AKT kaskády. Dle výsledků studií prováděných na buněčných kulturách a transgenních zvířecích modelech je přítomnost tyrozinu v pozici 1062 nezbytnou podmínkou pro transformační schopnost *RET* proto-onkogenu [14,26,33,36,46]. Ligandy ovlivňují aktivaci *RET* proteinu nejspíše autokrinním, možná i parakrinním mechanismem. *RET* je nepostradatelný pro vývoj sympatického, parasympatického a enterického nervového systému a ledvin [43,51].

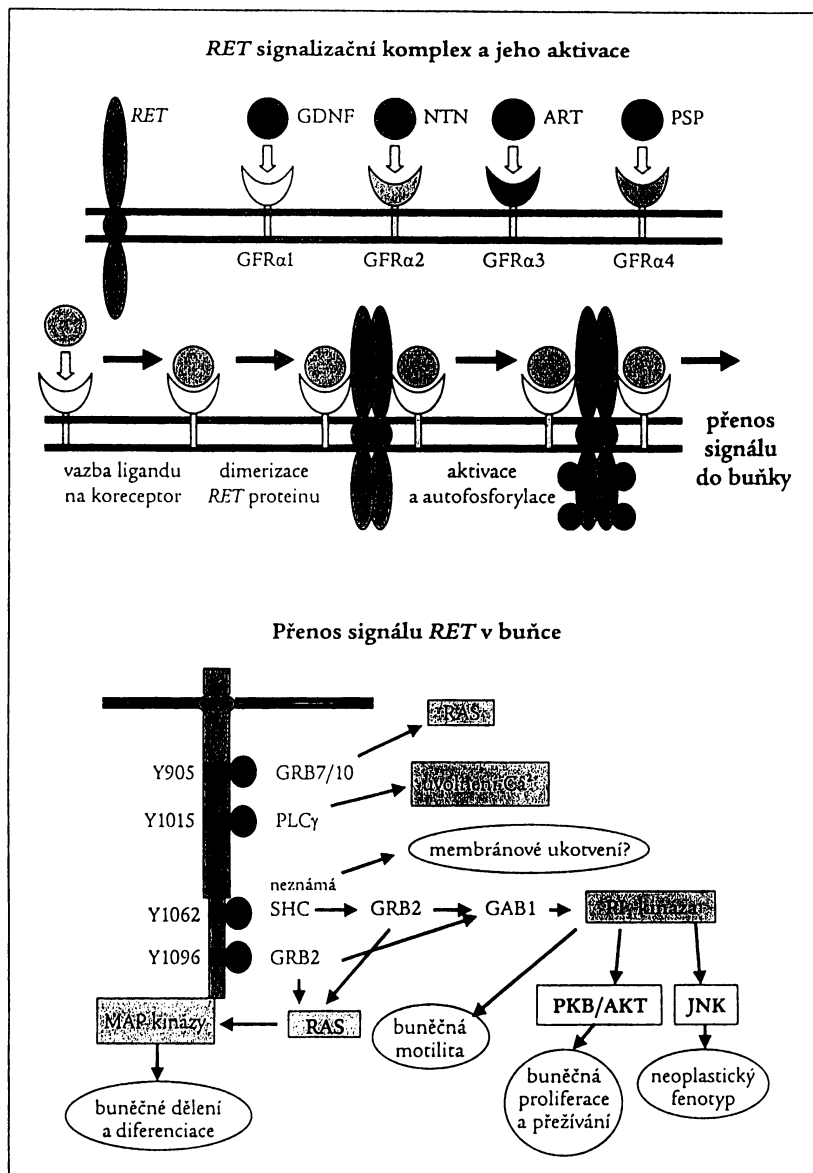
Poruchy *RET* signalizace

Za normálních okolností je aktivita receptorových tyrozinkináz přísně

regulována. Pokud dojde k poruše této regulace, stávají se účinnými onkogeny [23,49]. K onkogenní konverzi tyrozinkinázových receptorů dochází v důsledku různých mechanismů, zejména retrovirovou transdukcí, v důsledku genomového přeskupení, bodovými mutacemi, případně zvýšenou expresí [6]. *RET* je jediným příkladem tyrozinkinázového receptorového genu, jehož alterace způsobují různé typy lidských nádorů. Dysfunkce *RET* signalizační kaskády je příčinou nádorových onemocnění štítné žlázy – medulárního karcinomu a papilárního karcinomu, kdy dochází k nepatřičné aktivaci této kaskády. U Hirschsprungovy choroby je naopak *RET* signalizace inhibována [22].

1. Medulární karcinom štítné žlázy, syndromy MEN 2

Zárodečné bodové mutace v *RET*u jsou příčinou 3 nádorových syndromů s autozomálně dominantním typem dědičnosti: mnohočetné endokrinní neoplazie typu 2A (MEN 2A), typu 2B (MEN 2B) a familiárního medulárního karcinomu štítné žlázy (FMTC) (Multiple Endocrine Neoplasia Type 2: www.genetests.org) [41]. Pro tyto hereditární nádorové syndromy je příznačný familiární výskyt medulárního karcinomu štítné žlázy (MTC), což je maligní tumor vycházející z parafolikulárních buněk (C-buněk) štítné žlázy secernujících kalcitonin. Feochromocytom je přítomen u přibližně 50 % postižených v rodinách s MEN 2A, hyperparatyreóza pak asi u 15–30 % pacientů. Pacienti se syndromem MEN 2B mívají typický astenický marfanoidní habitus, u více než poloviny pacientů je přítomen feochromocytom, častá je ganglioneuromatóza gastrointestinálního traktu, mukózní neurinomy na rtech a jazyku, případně další léze. V rodinách s FMTC se vyskytuje pouze MTC bez dalších lézí. U pacientů s MEN 2B se MTC manifestuje již v raném dětství, u pacientů s MEN 2A obvykle v rané dospělosti a u FMTC



Obr. 2. Signalizace *RET*.

A) Tvorba multikomponentního komplexu – po navázání ligandu z rodiny GDNF (GDNF – glial cell line-derived neurotrophic factor, NTN – neurturin, ART – artemin, PSP – persephin) na svůj koreceptor (GFR α 1-4) ukotvený v buněčné membráně dojde k interakci s extracelulární částí *RET* receptoru, k dimerizaci komplexu, poté dojde k aktivaci tyrozinkinázové domény. Autofosforylací tyrozinových zbytků je iniciován přenos signálu.

B) Schématický náčrt signalizace *RET* s vyznačením klíčových tyrozinů (Y) v katalytické doméně a interagujících proteinů – přenašečů signálu

ve středním věku. Přes 95 % pacientů se syndromy MEN 2 a až 88 % pacientů s FMTC nese zárodečné mutace v *RET* proto-onkogenu. Tento nález vedl k zavedení genetického

screeningu, který umožňuje včasnou diagnózu hereditárního MTC u příbuzných v riziku onemocnění, u pacientů pak predikci vývoje onemocnění. Většina mutací nalezených

Tab. 1. Typy fúzních genů *RET* v patogenezi papilárního karcinomu štítné žlázy [49]. Majoritní formou je *RET/PTC1*, druhou nejčastější *RET/PTC3*, ostatní fúzní formy jsou vzácné.

Typ přeskupení	Fúzní partner <i>RETu</i>
<i>RET/PTC1</i>	<i>H4/D10S170</i>
<i>RET/PTC2</i>	<i>PKA, R1a</i>
<i>RET/PTC3</i>	<i>RFG/ElcI</i>
<i>RET/PTC4</i>	<i>RFG/ElcI</i>
<i>RET/PTC5</i>	<i>RFG5/golgin-84</i>
<i>RET/PTC6</i>	<i>HTIF1</i>
<i>RET/PTC7</i>	<i>RFG7/HTIFγ</i>
<i>RET/PTC8</i>	<i>KTN1/kinectin</i>
<i>RET/PTC9</i>	<i>RFG9</i>
<i>ELKS-RET</i>	<i>ELKS</i>
<i>PCM1-RET</i>	<i>PCM1</i>
<i>RFP-RET</i>	<i>RFP</i>

u pacientů s MEN 2A a s FMTC postihuje extracelulární oblast *RETu* bohatou na cysteiny. MEN 2A fenotyp je spojován nejčastěji s mutacemi v kodonu 634 (85 %), hlavně Cys634Arg, zatímco mutace spojené s FMTC fenotypem postihují rovnoměrně různé cysteiny extracelulární domény. FMTC může být také spojen s bodovými mutacemi v kinázové doméně *RETu* (Glu768Asp, Leu790Phe, Tyr791Phe, Val804Leu, Val804Met, Ser891Ala). Většina pacientů s MEN 2B nese mutaci Met918Thr v tyrozin kinázové doméně, jen u malé frakce těchto pacientů byla nalezena mutace Ala883Phe. Většina MTC (75 % případů) však vzniká sporadicky. Zhruba u poloviny nádorových tkání jsou pak detekovány somatické mutace pouze v nádorové tkáni, nejčastěji Met918Thr. Vzhledem k tomu, že až u 5–20 % prvotních záchytů MTC je detekována zárodečná, tedy na potomstvo přenosná mutace, doporučuje se geneticky testovat i tyto rodiny [8,9,21,31,37]. Mutace v *RET* proto-onkogenu jsou vzácně detekovány i u sporadických feochromocytomů [5]. Mechanismus vedoucí k onkogenní konverzi *RET* proteinu závisí na typu a místě aminokyselinové záměny. *RET* s mutací v extracelulární doméně v kodonu pro některý z klíčových cysteinů tvoří kovalentní

dimery, které vykazují konstitutivní kinázovou aktivitu nezávislou na ligandu. Záměna cysteinu za jinou aminokyselinu totiž zabrání tvorbě intramolekulárních disulfidických vazeb a umožní tvorbu intermolekulárních disulfidických vazeb mezi nepárovými cysteiny [48]. Mutace spojené s FMTC mívají nižší transformační aktivitu než mutace asociované s MEN 2A [55]. Mutace Met918Thr, typická pro syndrom MEN 2B, je spojena se změnou substrátové specifity. Dochází k aktivaci *RET* signalizační kaskády nezávisle jak na ligandu, tak na dimerizaci. V tomto ohledu jsou mutace spojené s MEN 2B rozdílné od mutací spojených s MEN 2A, liší se ve stechiometrii fosforylace tyrozinů *RET* proteinu a dalších intracelulárních proteinů. Navíc nádory typu MEN 2B mají odlišný genový expresní profil oproti nádorům typu MEN 2A [27]. Všechny mutace *RET* proto-onkogenu asociované se syndromy MEN 2 či s FMTC zvyšují aktivaci kinázy a onkogenní konverzi (gain-of-function). Nádorový fenotyp může ještě zhoršovat nerovnováha mezi mutantní a zdravou alelou, např. náleží zárodečných mutací na jedné alele a somatických mutací na druhé, či ztráta heterozygoty a/nebo amplifikace mutantního *RET* proteinu [25].

2. Papilární karcinom štítné žlázy

Papilární karcinom štítné žlázy (PTC) představuje 80–90 % všech karcinomů štítné žlázy [53]. Častou genetickou příčinou PTC jsou somatické chromozomální inverze nebo translokace, které způsobují rekombinaci intracelulární kinázové domény *RET* proto-onkogenu s heterologními geny za vzniku chimérických onkogenu *RET/PTC* (tab. 1) [28]. Dnes již není pochyb o tom, že nejčastější příčinou vzniku *RET/PTC* přeskupení je radioaktivní ozáření. Různé typy *RET/PTC* přeskupení byly nalezeny u více než 60 % „postčernobylských“ nádorových tkání PTC [57]. Indukce tvorby *RET/PTC* onkogenů vlivem radiace byla potvrzena i experimentálně, jak in vivo, tak in vitro [40]. Jak ionizující záření může indukovat vznik *RET/PTC* přeskupení vysvětluje zajímavý model, který dokládá, že ač jsou fúzní geny, např. v případě *RET/PTC1* geny *RET* a *H4*, od sebe daleko vzdálené na lineární mapě 10. chromozomu, v jádrech buněk štítné žlázy jsou vlivem terciární a kvartérní struktury často blízko sebe, což umožňuje jejich rekombinaci [42]. Vlivem fúze *RET/PTC* dojde k zahájení exprese *RET* fúzního proteinu, který ovšem může být exprimován pouze v cytoplazmě, transmembránová a extracelulární část proteinu totiž chybí. Část partnerského genu umožní dimerizaci tyrozin kinázových domén a aktivaci *RETu*.

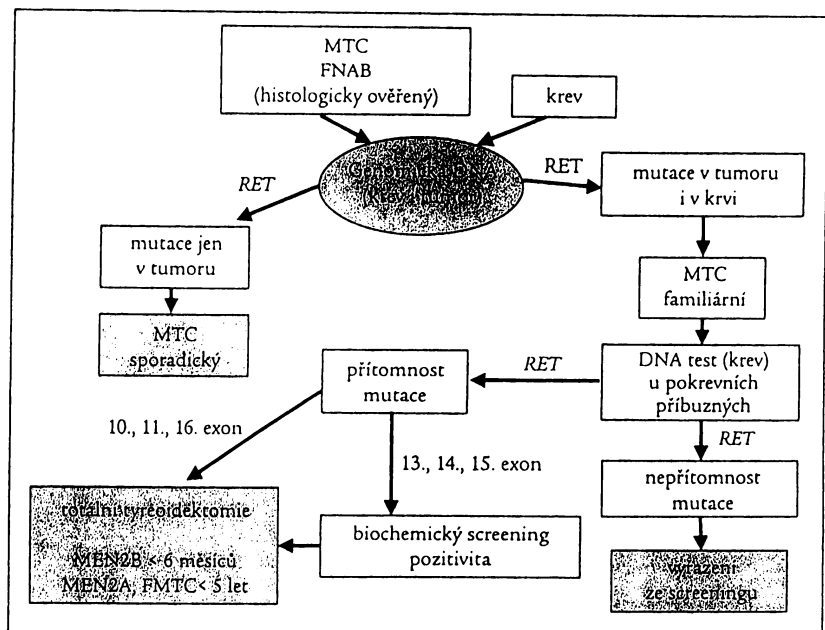
3. Hirschsprungova choroba

Hirschsprungova choroba (HSCR) je vrozené onemocnění enterického nervového systému, při kterém chybí gangliové buňky v myenterickém a submukózním plexu. Nad aganglionárním střevním úsekem, který je v 75–80 % případů HSCR lokalizován v rektu a colon sigmoideum, vzniká typické megakolon. Aganglionární úsek může ve 3–12 % postihovat celé tlusté střevo a přecházet na ileum. Vzácně se může vyskytnout i excesivní střevní aganglionóza po-

Tab. 2. Geny asociované s nesyndromickými formami Hirschsprungovy choroby (HSCR) (Hirschsprung Disease Overview: www.genetests.org)

Gen	Protein	Chromozomální lokus	Typ dědičnosti	Frekvence	Typ HSCR
<i>RET</i>	<i>RET</i> proto-onkogen	10q11.2	AD	17-38 % 70-80 % 50 % 3-10 %	Krátká forma Dlouhá forma Familiální Sporadický
<i>GDNF</i>	Glial cell line-derived neurotrophic factor	5p13.1-p12	AD	< 1 %	Variabilní
<i>NRTN</i>	Neurturin	19p13.3	AD	< 1 %	Variabilní
<i>EDNRB</i>	Endothelin B receptor	13q22	AD/AR	3 - 7 %	Variabilní
<i>EDN3</i>	Endothelin-3	20q13.2-q13.3	AD/AR	5 %	Variabilní
<i>ECE1</i>	Endothelin- converting enzyme	1p36.1	AD	< 1 %	Variabilní

stihující nejen tlusté, ale i téměř celé tenké střevo. HSCR se zřídka vyskytuje jako jeden ze symptomů chromozomálních abnormalit či některých monogenních syndromů, častěji pak samostatně bez jiných anomálií. Fenotyp HSCR je tedy poměrně rozmanitý. Familiární i sporadické formy jsou asociovány s mutacemi nejméně 6 genů (tab. 2), jejichž penetrace a exprese je velmi variabilní (Hirschsprung Disease Overview: www.genetests.org) [44]. Nejčastěji jsou nalézány zárodečně inaktivující mutace *RET* proto-onkogenu, jejichž dědičnost je autozomálně dominantní [2]. Fenotypická variabilita zde může být ovlivněna i některými polymorfizmy či haplotypy *RET* proto-onkogenu [7]. Vztah genotypu a fenotypu je stále předmětem výzkumu. Kromě řady inaktivujících mutací *RET* proto-onkogenu, které jsou typické pouze pro HSCR, byly nalezeny i mutace aktivující (v 10. exonu - v kodonech 609, 611, 618 a 620), které jsou typické pro MTC - v těchto případech se HSCR sdružuje s nádorovým postižením štítné žlázy, případně s feochromocytomem [16, 45]. Jedním z možných vysvětlení koexistence MEN 2 a HSCR fenotypů může být nastartování apoptózy v buňkách embryonálního enterického ganglia jako odpovědi na ne-



Obr. 3. Optimální schéma molekulárně genetické diagnostiky *RET* proto-onkogenu u medulárního karcinomu štítné žlázy (MTC) a syndromů MEN2 (FNAB - biopsie tenkou jehlou)

patřičný mitogenní signál způsobený mutovanou alelou *RET* proto-onkogenu. Jiným vysvětlením může být hypotéza, že proteinové izoformy obsahující tyto specifické mutace pronikají na buněčný povrch s velmi malou účinností - HSCR vzniká v důsledku nedostatku *RET* proteinu ve vyvíjející se střevní inervaci, zatímco zároveň dochází k aktivaci signalizační kaskády *RET*u ve štítné žláze a v nadledvině, která postačuje ke

vzniku hyperplazie a k tvorbě nádoru. Při léčbě pacientů s HSCR je důležité si uvědomit, že nejméně u 5 % pacientů s mutacemi *RET* proto-onkogenu je riziko vzniku MTC, proto je doporučován screening mutací *RET* proto-onkogenu, zejména 10. exonu, i u pacientů s HSCR.

Naše zkušenosti

Na našem pracovišti provádíme rutinně u pacientů s MTC a nověji

u pacientů s HSCR molekulárně genetický screening 6 rizikových exonů (exon 10, 11, 13, 14, 15 a 16) *RET* proto-onkogenu pomocí sekvenace. Při pozitivním záchytu mutace vyřetujeme cíleně i příbuzné v riziku. Tab. 3a a 3b udávají typy zachycených mutací a záchyt mutací u jednotlivých fenotypů. Na základě molekulárně genetického stanovení byla retrospektivně u řady pacientů potvrzena diagnóza a dle typu mutace predikován další průběh onemocnění, u mnoha prediktivních jedinců byla na základě detekované mutace doporučena profylaktická totální tyreoidektomie, řada příbuzných moh-

la být na základě negativního výsledku genetického screeningu vyřazena z pravidelného biochemického testování [29,30]. Díky výzkumným projektům můžeme pátrat i po výskytu minoritních mutací a polymorfizmů ve zbývajících 15 exonech a v přilehlých intronických oblastech. U jedné rodiny s FMTC jsme našli dosud nepopsanou mutaci v 5. exonu, která je zřejmě zodpovědná za onemocnění [18]. Objevili jsme také zajímavé kazuistiky, podle kterých jsou pacienti nositeli dvojitých či trojitých mutací, kdy se zdá, že výsledný fenotyp determinuje vždy ta nejagresivnější z mutací [19,20]. Snažíme se

prosádit optimální protokol genetického testování *RET* proto-onkogenu u pacientů s MTC (obr. 3). Abychom mohli jednoznačně vyloučit familiaritu klinicky sporadického MTC (prvotní záchyt v rodině), je třeba mít k dispozici i odoperovanou nádorovou tkáň.

U 5 rodin s HSCR (celkem testováno zatím 57 rodin) jsme zachytili mutace v 10. exonu spojené s MTC, nebo atypické mutace v rizikovém 13. exonu (tab. 4) [17]. Tři z nich dosud nebyly popsány, bez provedení funkční studie lze jen těžko spekulovat, jaký dopad budou mít na fenotyp. Problémem je i neúplná penetrace v rodině. To dokládá, že ani molekulárně genetická diagnostika neposkytne vždy jednoznačné doporučení. Největší přínos genetického testování vidíme tedy v možnosti včasné predikce, kdy lze dosud klinicky asymptomatickým nositelům mutace nabídnout profylaktickou totální tyreoidektomii (TTE), případně s disekcí krčních lymfatických uzlin, kam nádor často již ve velmi raných fázích karcinogeneze metastazuje [12]. Otázkou je, jak tento chirurgický výkon načasovat. O časnosti a radikálnosti zákroku rozhoduje typ nalezené zárodečné mutace. Doporučení se s přibývajícím počtem diagnostikovaných rodin, kdy se pečlivě vyhodnocuje korelace mezi genotypem a fenotypem, mění a obecně zpřísňují [32,35,37,54,58]. Dle kon-

Tab. 3a. Typy detekovaných zárodečných mutací *RET* proto-onkogenu v našem souboru pacientů s FMTC, MEN 2A, MEN 2B a klinicky sporadickou formou MTC.

Mutace <i>RET</i> proto-onkogenu	Spor. MTC	Rodiny		
		FMTC	MEN 2A	MEN 2B
Exon 5 Arg321Gly		1		
Exon 10 Cys609Tyr	1			
	1			
Exon 11 Cys620Phe			1	
Cys634Arg			7	
Cys634Tyr			1	
Cys634Ser	1		2	
Cys634Trp		1		
Exon 13 Glu768Asp		1		
Tyr791Phe	2	1	1	1
Exon 14 Val804Met	3	1		
Exon 16 Met918Thr				5
Celk. počet pozitivních rodin	8	5	11	5
Celk. počet testovaných rodin	147	10	12	5
Záchyt mutací v procentech	5,4 %	50 %	92 %	100 %

Tab. 3b. Procentuální záchyt zárodečných mutací *RET* proto-onkogenu v našem souboru pacientů s FMTC, MEN 2A, MEN 2B a klinicky sporadickou formou MTC.

	Spor. MTC	FMTC	Fenotyp MEN 2A	MEN 2B	Celkem
Počet testovaných rodin	147	10	12	5	174
Záchyt mutace	8	5	11	5	29
Procentuální záchyt	5,4 %	50 %	92 %	100 %	16,6 %
Počet pacientů MTC	147	10	12	5	174
Záchyt mutace	8	5	11	5	29
Neinformativní výsledek	139	5	1	0	145
Počet rodinných příslušníků	172	54	48	9	283
Záchyt mutace	7	13	16	2	38
Vyloučení ze screeningu	9	19	31	7	66
Neinformativní výsledek	156	22	1	0	179

senzu [8] byly mutace podle agresivity rozděleny do 3 skupin, od toho se odvíjí i doporučení, v jakém věku provést TTE, abychom skutečně předešli rozvoji onemocnění:

Skupina 3 - nejagresivnější mutace v kodonech 883, 918, 922, bývají příčinou MEN 2B (až v 50 % případů vznikají de novo) - TTE provést během prvních 6 měsíců života, nejlépe do 1 měsíce po narození.

Skupina 2 - mutace v kodonech 609, 611, 618, 620, 630, 634, bývají příčinou MEN 2A, případně FMTC, první čtyři se vyskytují u pacientů s HSCR spojeným s MTC - TTE provést do 5 let věku.

Skupina 1 - nejméně agresivní mutace v kodonech 768, 790, 791, 804, 891 - TTE provést mezi 5. a 10. rokem života.

Pacienti by i po provedené TTE měli být nadále sledováni pro možnost rozvoje reziduálního či metastatického MTC, feochromocytomu a sledována by měla být i případná hypoparatyreóza u odoperovaných pacientů. Pacienti odoperovaní pro mutaci v kodonu 634 by měli být sledováni pro možnost případného rozvoje adenomu či hyperplazie příštítných tělísek. V některých zahraničních laboratořích se provádí i prenatální diagnostika, u nás jsme zatím toto vyšetření prenatálně neprováděli.

Studujeme i genetické alterace u papilárních karcinomů štítné žlázy. Zavedena byla detekce *RET/PTC* forem ze zamražených nádorových tkání i z biopsií, problematictější je zatím stanovení těchto forem u nádorových buněk izolovaných ze starších parafinových bločků, kde je genetický materiál značně narušen. Přesto věříme, že se nám podaří zhodnotit vliv černobylské havárie na patogenezi *PTC* v České republice.

Moderní strategie léčby karcinomů štítné žlázy založená na inhibici *RET* kinázové aktivity.

Tyrozinkinázové geny jsou velmi slibnými terapeutickými cíli [13].

Tab. 4. Typy detekovaných zárodečných mutací *RET* proto-onkogenu u pacientů s Hirschsprungovou chorobou (HSCR).

Mutace <i>RET</i> proto-onkogenu	Rodiny s HSCR
Exon 10	
Cys609Tyr	1
Cys620Arg	1
del603(A)	1
Exon 13	
Tyr791Phe	1
Tyr798Ser	1
Celk. počet pozitivních rodin	5
Celk. počet testovaných rodin	57
Záchyt mutací v procentech	8,8 %

Pro blokaci tyrozinkinázové funkce *RET*u je k dispozici několik strategií, zahrnujících RNA interferenci k zastavení exprese *RET*u, genovou terapii s dominantně negativní mutantou nebo využití malých molekul, které slouží jako inhibitory tyrozinkinázy [24]. Genová terapie je pro léčbu nádorů štítné žlázy zvláště atraktivní, protože je zde možnost selektivního zacílení terapeutických genů do nádorových buněk aplikací tkáňově specifických promotorů, jako je např. kalcitoninový promotor u MTC, čímž dochází ke snížení mimonádorové toxicity. Možnosti terapie karcinomů štítné žlázy, které jsou testovány zatím zejména in vitro na tkáňových kulturách nebo na zvířecích modelech, jsou následující [3,4,52]:

1. Korektivní genová terapie: cílem je obnovení normální funkce mutovaného genu nebo alespoň zamezení jeho účinku, což představuje inhibici onkogenní *RET* signalizace expresí dominantně-negativní *RET* mutanty. Gen nesoucí její sekvenci je zabudován do adenovirového vektoru a exprimován pod kontrolou promotoru pro kalcitonin nebo tyreoglobulin. Dominantně-negativní mutanty dimerizují s onkogenním *RET* proteinem v endoplazmatickém retikulu, a tak brání expresi jak dominantně negativního, tak onkogenního *RET* proteinu na buněčném povrchu. Výsledkem je silná inhibice přežívání buněk způsobená indukci apoptózy.

2. Cytoreduktivní genová terapie: principem je vpravení exogenního „sebevražedného“ genu, který způsobuje zastavení syntézy DNA a buněčnou smrt nebo umožňuje aplikaci cytotoxické látky do nádorové tkáně. V praxi došlo u laboratorních zvířat k destrukci nebo stabilizaci jen malých tumorů, zatím bez terapeutického efektu na větší nádory.

3. Imunomodulační genová terapie: smyslem této metody je indukce genové exprese, která zvyšuje imunitní odpověď proti nádorové tkáni. Mnoho tumorů exprimuje nádorově asociované antigeny, které mohou být rozeznatelné imunitním systémem. Tyto antigeny jsou uvolňovány z nádorových buněk fyziologicky nebo po cytotoxické léčbě. Antigeny jsou pak vychytávány fagocytózou pomocí antigen prezentujících buněk. Nádory často vyvolávají slabou T-buněčnou odpověď, a tak unikají imunitnímu systému. Lokální expresí určitých cytokinů je tak možno vyvolat reakci imunitního systému proti nádoru. Cytokiny s protinádorovou aktivitou zahrnují interferon γ , tumor nekrotický faktor α (*TNF- α*), interleukiny 2 a 12 (*IL-2*, *IL-12*). Výsledkem pokusů prováděných na zvířatech byla regrese malých nádorů a stabilizace velkých nádorů, což ukazuje na vývoj dlouhotrvající protinádorové imunity.

4. Monoklonální protilátky: příprava několika lidských monoklo-

nálních protilátek proti RETu byla již publikována, ale zatím nebyly použity v léčbě [47].

5. Inhibitory tyrozinkinázy: další skupinou nadějných protinádorových léčiv jsou malé molekuly tyrozinkinázových inhibitorů, které kompetují s adenosin trifosfátem (ATP), a tím brání autofosforylaci, blokují kinázovou aktivitu a signální transdukcii [10,24]. Inhibice RETu může být efektivní strategií pro léčbu MTC, ovšem selektivní tyrozinkinázový inhibitor využitelný pro léčbu MTC nebyl zatím nalezen. Nejslibnějším kandidátem z testovaných potenciálních léčiv se zatím jeví anilinquinazolin ZD6474, protože efektivně blokuje fosforylaci a signalizaci RETu in vivo, inhibuje nádorový růst a působí zároveň jako antiangiogenní agens, přitom má nízkou toxicitu pro okolní tkáň [11]. Vzhledem k tomu, že se počet objevených malých organických sloučenin, které blokují RET tyrozinovou fosforylaci, stále zvyšuje, doufáme, že se už brzy použijí pro léčbu RET-pozitivních nádorů a možná se zapojí do preventivní strategie léčby pacientů se zárodečnými mutacemi *RET* proto-onkogenu.

Závěr

Nádory štítné žlázy představují nejpočetnější skupinu onkologických onemocnění v endokrinologii. Jejich incidence, zejména incidence papilárních karcinomů, bohužel rok od roku stoupá. V patogenezi medulárního a papilárního karcinomu, ale i zdánlivě klinicky vzdálené Hirschsprungovy choroby hrají roli genetické aberace *RET* proto-onkogenu. Identifikace jednotlivých genetických změn v *RET* proto-onkogenu může u pacientů pomoci odhadnout prognózu onemocnění, popř. zpřesnit diagnózu, ale hlavně indikuje včasný terapeutický zásah u rizikových osob

ještě v presymptomatickém stadiu onemocnění.

Tímto článkem jsme chtěli upozornit naši lékařskou veřejnost a pacienty na dostupnost tohoto stanovení v České republice.

Podpořeno granty IGA MZ ČR NR/7806-3 a GAČR 301/06/P425.

Literatura

1. Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 383-394.
2. Attie T, Pelet A, Edery P et al. Diversity of RET proto-oncogene mutations in familial and sporadic Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1381-1386.
3. Barzon L, Bonaguro R, Palu G et al. New perspectives for gene therapy in endocrinology. *Eur J Endocrinol* 2000; 143: 447-466.
4. Barzon L, Boscaro M, Palu G. Endocrine aspects of cancer gene therapy. *Endocr Rev* 2004; 25: 1-44.
5. Bender BU, Gutsche M, Glasker S et al. Differential genetic alterations in von Hippel-Lindau syndrome-associated and sporadic pheochromocytomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4568-4574.
6. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001; 411: 355-365.
7. Borrego S, Ruiz A, Saez ME et al. RET genotypes comprising specific haplotypes of polymorphic variants predispose to isolated Hirschsprung disease. *J Med Genet* 2000; 37: 572-578.
8. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5658-5671.
9. Bugalho MJ, Domingues R, Sobrinho L. Molecular diagnosis of multiple endocrine neoplasia Type 2. *Expert Rev Mol Diagn* 2003; 3: 769-779.
10. Carlomagno F, Santoro M. Identification of RET kinase inhibitors as potential new treatment for sporadic and inherited thyroid cancer. *J Chemother* 2004; 16(Suppl 4): 49-51.
11. Ciardiello F, Caputo R, Damiano V et al. Antitumor effects of ZD6474, a small molecule vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with additional activity against epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1546-1556.
12. Cohen MS, Moley JF. Surgical treatment of medullary thyroid carcinoma. *J Intern Med* 2003; 253: 616-626.
13. Core GJ, Gagel RF. Lessons learned from the management of a rare genetic cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 1566-1568.
14. Couplier M, Anders J, Ibanez CF. Coordinated activation of autophosphorylation sites in the RET receptor tyrosine kinase: importance of tyrosine 1062 for GDNF mediated neuronal differentiation and survival. *J Biol Chem* 2002; 277: 1991-1999.
15. de Graaff E, Srinivas S, Kilkenny C et al. Differential activities of the RET tyrosine kinase receptor isoforms during mammalian embryogenesis. *Genes Dev* 2001; 15: 2433-2444.
16. Decker RA, Peacock ML, Watson P. Hirschsprung disease in MEN 2A: increased spectrum of RET exon 10 genotypes and strong genotype-phenotype correlation. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 129-134.
17. Dvorakova S, Dvorakova K, Malikova M et al. A novel Czech kindred with familial medullary thyroid carcinoma and Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 2005; 40(Suppl e): e1-e6.
18. Dvorakova S, Vaclavikova E, Duskova J et al. Exon 5 of the RET proto-oncogene: a newly detected risk exon for familial medullary thyroid carcinoma, a novel germ-line mutation Gly321Arg. *J Endocrinol Invest* 2005; 28: 905-909.
19. Dvorakova S, Vaclavikova E, Ryska A et al. Double Germline Mutations in the RET Proto-oncogene in MEN 2A and MEN 2B Kindreds. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006; 114: 192-196.
20. Dvorakova S, Vaclavikova E, Sykora V et al. New multiple somatic mutations in the RET proto-oncogene associated with a sporadic medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2006; 16: 311-316.
21. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *JAMA* 1996; 276: 1575-1579.
22. Eng C, Mulligan LM. Mutations of the RET proto-oncogene in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes, related sporadic tumours, and Hirschsprung disease. *Hum Mutat* 1997; 9: 97-109.
23. Futreal PA, Coin L, Marshall M et al. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 177-183.

24. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 361-370.
25. Huang SC, Torres-Cruz J, Pack SD et al. Amplification and overexpression of mutant RET in multiple endocrine neoplasia type 2-associated medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 459-463.
26. Ichihara M, Murakumo Y, Takahashi M. RET and neuroendocrine tumors. *Cancer Lett* 2004; 204: 197-211.
27. Jain S, Watson MA, DeBenedetti MK et al. Expression profiles provide insights into early malignant potential and skeletal abnormalities in multiple endocrine neoplasia type 2B syndrome tumors. *Cancer Res* 2004; 64: 3907-3913.
28. Jhiang SM. The RET proto-oncogene in human cancers. *Oncogene* 2000; 19: 5590-5597.
29. Jindrichova S, Kodet R, Krskova L et al. The newly detected mutations in the RET proto-oncogene in exon 16 as a cause of sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Mol Med* 2003; 81: 819-823.
30. Jindrichova S, Vcelak J, Vlcek P et al. Screening of six risk exons of the RET proto-oncogene in families with medullary thyroid carcinoma in the Czech Republic. *J Endocrinol* 2004; 183: 257-265.
31. Jindrichova S, Vlcek P, Bendlova B. Genetic causes of the thyroid carcinomas. *Cas Lek Cesk* 2004; 143: 664-668.
32. Kahraman T, de Groot JW, Rouwe C et al. Acceptable age for prophylactic surgery in children with multiple endocrine neoplasia type 2a. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 331-335.
33. Kawamoto Y, Takeda K, Okuno Y et al. Identification of RET autophosphorylation sites by mass spectrometry. *J Biol Chem* 2004; 279: 14213-14224.
34. Kwok JB, Gardner E, Warner JP et al. Structural analysis of the human ret proto-oncogene using exon trapping. *Oncogene* 1993; 8: 2575-2582.
35. Lips CJ, Hoppener JW, Van Nesselrooij BP et al. Counselling in multiple endocrine neoplasia syndromes: from individual experience to general guidelines. *J Intern Med* 2005; 257: 69-77.
36. Liu X, Vega QC, Decker RA et al. Oncogenic RET receptors display different autophosphorylation sites and substrate binding specificities. *J Biol Chem* 1996; 271: 5309-5312.
37. Machens A, Ukkat J, Brauckhoff M et al. Advances in the management of hereditary medullary thyroid cancer. *J Intern Med* 2005; 257: 50-59.
38. Manie S, Santoro M, Fusco A et al. The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation. *Trends Genet* 2001; 17: 580-589.
39. Manning G, Whyte DB, Martinez R et al. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002; 298: 1912-1934.
40. Mizuno T, Iwamoto KS, Kyoizumi S et al. Preferential induction of RET/PTC1 rearrangement by X-ray irradiation. *Oncogene* 2000; 19: 438-443.
41. Mulligan LM, Eng C, Healey CS et al. Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC. *Nat Genet* 1994; 6: 70-74.
42. Nikiforova MN, Stringer JR, Blough R et al. Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. *Science* 2000; 290: 138-141.
43. Pachnis V, Mankoo B, Costantini F. Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development* 1993; 119: 1005-1017.
44. Parisi MA, Kapur RP. Genetics of Hirschsprung disease. *Curr Opin Pediatr* 2000; 12: 610-617.
45. Romeo G, Ceccherini I, Celli J et al. Association of multiple endocrine neoplasia type 2 and Hirschsprung disease. *J Intern Med* 1998; 243: 515-520.
46. Salvatore D, Barone MV, Salvatore G et al. Tyrosines 1015 and 1062 are in vivo autophosphorylation sites in ret and ret-derived oncoproteins. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3898-3907.
47. Salvatore G, Nagata S, Billaud M et al. Generation and characterization of novel monoclonal antibodies to the Ret receptor tyrosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 813-817.
48. Santoro M, Carlomagno F, Romano A et al. Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science* 1995; 267: 381-383.
49. Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F et al. Minireview: RET: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004; 145: 5448-5451.
50. Schlessinger J, Lemmon MA. SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci STKE* 2003; 2003: RE12.
51. Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L et al. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 1994; 367: 380-383.
52. Shelling A, Schweder, PM, During, MJ. Principles of gene therapy. In: Baxter JD (ed). *Genetics in endocrinology*. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins 2002: 491-520.
53. Sherman SI. Thyroid carcinoma. *Lancet* 2003; 361: 501-511.
54. Szinnai G, Meier C, Komminoth P et al. Review of multiple endocrine neoplasia type 2A in children: therapeutic results of early thyroidectomy and prognostic value of codon analysis. *Pediatrics* 2003; 111(Suppl E): E132-E139.
55. Takahashi M, Iwashita T, Santoro M et al. Co-segregation of MEN2 and Hirschsprung's disease: the same mutation of RET with both gain and loss-of-function? *Hum Mutat* 1999; 13: 331-336.
56. Vitagliano D, Carlomagno F, Motti ML et al. Regulation of p27Kip1 protein levels contributes to mitogenic effects of the RET/PTC kinase in thyroid carcinoma cells. *Cancer Res* 2004; 64: 3823-3829.
57. Williams D. Cancer after nuclear fallout: lessons from the Chernobyl accident. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 543-549.
58. Yip L, Cote GJ, Shapiro SE et al. Multiple endocrine neoplasia type 2: evaluation of the genotype-phenotype relationship. *Arch Surg* 2003; 138: 409-416.

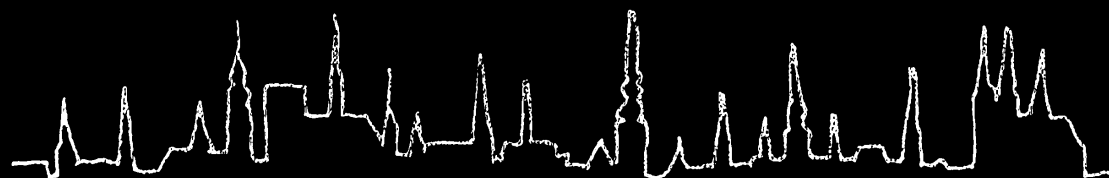
RNDr. Běla Bendlová, CSc.
www.endo.cz
e-mail: bbendlova@endo.cz

Doručeno do redakce: 20. 6. 2006

XXVIII.

**ENDOKRINOLOGICKÉ DNY
S MEZINÁRODNÍ ÚČASTÍ**

**20. - 22. 10. 2005
REGIONÁLNÍ CENTRUM OLOMOUC**



Program a abstrakta

ZAVEDENÍ DIAGNOSTIKY GENETICKÝCH ZMĚN U PAPILÁRNÍHO KARCINOMU ŠTÍTNÉ ŽLÁZY

V. Sýkorová¹, Š. Dvořáková¹, J. Astl², D. Veselý², Z. Novák¹, B. Bendlová¹

¹Endokrinologický ústav, Praha, ²ORL klinika FN Motol, Praha

Papilární karcinom (PTC), který vzniká z folikulárních buněk, je nejběžnější malignitou štítné žlázy (80-85%). Nejčastějšími genetickými změnami jsou somatické mutace v BRAF proto-onkogenu a RET/PTC přeskupení, které vzniká fúzí RET proto-onkogenu a jiného konstitutivně exprimovaného genu. Výskyt těchto genetických změn je ve světě velmi variabilní (5–70% PTC). Mezi nejčastější RET/PTC přeskupení patří RET/PTC1 a RET/PTC3. BRAF bodová mutace u PTC je výsledkem substituce T→A na pozici 1796 v 15. exonu (Val600Glu). Naším cílem bylo zavedení diagnostiky BRAF mutace a RET/PTC přeskupení a zjištění jejich výskytu v souboru 11 odo-perovaných tkání pacientů s PTC a jedné biopsie tenkou jehlou z PTC tkáně. DNA a RNA z nádorových tkání jsme získali Trizolovou izolací. BRAF mutaci jsme z nádorové DNA detekovali přímou fluorescenční sekvenací u 3 pacientů s PTC (25%). Expresi RET/PTC přeskupení jsme detekovali v cDNA, která byla převedena z RNA pomocí reverzní transkripce. Kvalita a přítomnost cDNA byla ověřena expresí ubiquitárního genu GAPDH a specifického genu pro štítnou žlázu PAX8. Expresi RET/PTC1 jsme našli u 1 pacienta (8%) a RET/PTCx (neurčený fúzní gen) u 2 pacientů s PTC (16%). Závěrem můžeme říci, že jsme úspěšně zavedli diagnostiku hlavních genetických změn u PTC a určili jsme genetickou příčinu PTC u 50% vzorků. V současné době shromažďujeme další tkáně, abychom mohli porovnat genotyp s fenotypem a věříme, že zavedená diagnostika pomůže k přesnějšímu určení diagnózy a prognózy onemocnění.

Tato práce je podpořena grantem IGA MZ ČR NR/7806-3.



195 Detekce mutace v BRAF genu u papilárního karcinomu štítné žlázy.Sýkorová V.¹, Dvořáková Š.¹, Laco, J.², Ryška A.², Kodetová D.³, Astl J.⁴, Veselý D.⁴, Bendlová B.¹

1) Endokrinologický ústav Praha

2) Fingerlandův ústav patologie Hradec Králové

3) Ústav patologie a molekulární medicíny FN Motol

4) ORL klinika FN Motol

Úvod

V roce 2003 byl v souvislosti s papilárním karcinomem štítné žlázy (PTC) objeven onkogen *BRAF*, který vzniká v důležitých aktivačních mutacích *b-raf* proto-onkogenu. B-raf je cytoplasmatická serin/threoninová proteinkináza, patří mezi RAF proteinové skupiny a následnou fosforylací aktivuje MAPK (proteinkináza aktivovaná mitogeny) signální dráhu, která hraje důležitou roli v buněčné proliferaci, diferenciaci a apoptóze. Somatická mutace v *BRAF* genu je výsledkem substituce v pozici 1796 (Val600Glu) v 15. exonu kinázové domény. Tím dojde ke zvýšení aktivity BRAF, která je nezávislá na stimulaci. Tato mutace byla detekována u 29 – 69% PTC. Koreluje s vyšším stupněm TNM klasifikace, agresivnější formou nádoru a horší prognózou onemocnění. Zdá se, že je specifická pro PTC a mikrokarinom PTC. U 10% folikulární varianty PTC byla nalezena jiná mutace v *BRAF* genu – Lys601Glu.

Cíl

Detekovat mutaci *BRAF* genu u PTC tkání v České republice.

Materiál a metody

Soubor 73 parafinových bločků a 11 odoperovaných čerstvých PTC tkání. Pro zjištění vlivu černobylské havárie na výskyt této mutace v České republice jsme vzorky rozdělili do pěti období – jedno období před černobylskou havárií v roce 1986 a čtyři pětiletá období od roku 1986 do současnosti. DNA jsme ze zamražených tkání získali Trizolovou izolací a z parafinových bločků pomocí QIAamp DNA Blood Mini Kitu. Mutaci jsme detekovali screeningovou metodou SSCP (single strand conformation polymorphism) a pozitivní vzorky ověřili přímou fluorescenční sekvenací.

Výsledky

Celkem jsme somatickou mutaci v *BRAF* genu detekovali u 32 pacientů s PTC (38,1%). Jeden pacient byl homozygotní, ostatní heterozygotní. V období před rokem 1986, které tvořilo 10 pacientů, jsme nedetekovali žádnou *BRAF* mutaci, v následujících obdobích jsme mutaci detekovali u 32 pacientů (43,2%). Zdá se, že mutace v *BRAF* genu nekoreluje s věkem diagnózy. Soubor tvořilo 25% mužů a 75% žen, z toho 47,6% mužů a 34,9% žen mělo *BRAF* mutaci. Medián věku v době diagnózy a podíl mutace u obou pohlaví udává tabulka:

Období	Počet (muži/ženy)	Věk s <i>BRAF</i> /bez <i>BRAF</i>	Muži s mutací (%)	Ženy s mutací (%)
před 1986	10 (2/8)	0 / 34,5	0 (0)	0 (0)
1986 – 1990	11 (3/8)	65,5 / 37	2 (66,7)	4 (50,0)
1991 – 1995	17 (2/15)	50 / 58	2 (100,0)	8 (53,3)
1996 – 2000	16 (6/10)	55,5 / 47	2 (33,3)	2 (20,0)
2001 – 2005	30 (8/22)	61,5 / 59	4 (50,0)	8 (36,4)
Celkem	84 (21/63)	59,5 / 54	10 (47,6)	22 (34,9)

Závěr

Somatickou *BRAF* mutaci jsme zachytili u 38,1% pacientů. Výskyt mutace je výrazně vyšší u mužů. Téměř polovina mužů měla tuto genetickou změnu, zatímco u žen pouze třetina. Zdá se, že se jedná o majoritní genetickou změnu, která hraje důležitou roli v patogenezi PTC. Toho by se mohlo využít v klinické praxi pro potvrzení diagnózy případně pro určení diagnózy z tenkou jehlou ještě před operací pacienta.

Tato práce je podpořena grantem IGA MZ ČR NR/7806-3.

DETEKCE MUTACE V BRAF GENU U PAPILÁRNÍHO KARCINOMU ŠTÍTNÉ ŽLÁZY



V. Sýkorová¹, Š. Dvořáková¹, J. Laco², A. Ryška², D. Kodetová³, J. Astl⁴, D. Veselý⁴, B. Bendlová¹

¹Endokrinologický ústav Praha, ²Fingerlandův ústav patologie Hradec Králové, ³Ústav patologie a molekulární medicíny FN Motol, ⁴ORL klinika FN Motol

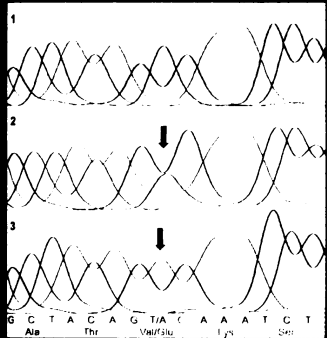
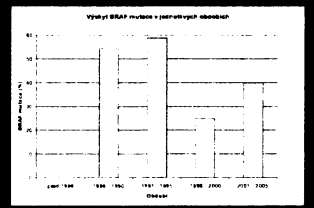
Úvod:
V roce 2000 byl v souvislosti s papilárním karcinomem štítné žlázy (PTC) objeven onkogen BRAF, který vzniká v důsledku vzácné G→A mutace b-raf proto-onkogenu. BRAF je cytoplasmatická serin/threoninová proteinkináza, patří mezi RAF proteiny. Aktivní protein a následnou fosforylaci aktivuje MEK (proto-kináza a aktivovaná mitogeny) signální dráhu, která hraje klíčovou roli v buněčné proliferaci, diferenciaci a apoptóze. Neaktivní mutace v BRAF genu je výsledkem substituce T>A na pozici 600 (V600E) v 15. exonu kinázového domény. Tato mutace zvyšuje aktivitu BRAF, která je nezávislá na stimulaci ras. Mutace byla detekována u 20-30% PTC karcinomů. Mírně vyššími TNM klasifikace, agresivnější formou nádoru a s horší prognózou onemocnění. Zdá se, že papilární karcinom PTC má jako charakteristickým PTC a jako variantou PTC byla objevena i v rakovině štítné žlázy (1).

Cíle:
- Zjistit mutaci BRAF genu u PTC karcinů v České republice.
Metody:
- 73 papilárních bloků z histologicky zamražených PTC karcinů
- rozděleno do 5 období před a po černobylské haváři
Rezultáty:
- Tazlová izolace (zamražení kůže)
- QIAamp DNA Blood (lyly) (papilární bloky)
- PCR mutace
- PCR (single strand conformation polymorphism), 7°C,
- sekvenování (sequencing) (Alf-Express)

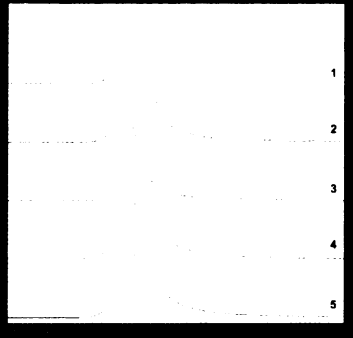


U 84 pacientů s karcinom štítné žlázy (PTC) BRAF genu byla detekována 22 pacientů (26,2%). Jeden pacient byl histologicky potvrzen v období před černobylskou havárií (1986-1989), které tvořilo 10 pacientů, tj. nebyly detekovány žádné BRAF mutace. V následujících obdobích jsme mutaci detekovali u 22 pacientů (26,2%). Zdá se, že mutace v BRAF genu nastorela ve většině případů. Soubor tvořilo 25% mužů a 75% žen, z toho 47,3% mužů a 34,9% žen mělo BRAF mutaci. Medián věku v době diagnózy, výskyt mutace v jednotlivých obdobích a výskyt u obou pohlaví je v tabulce a graf.

Období	Počet (muži/ženy)	Muži s mutací (%)	Ženy s mutací (%)	Věk s BRAF/bez BRAF
před 1986	10 (2/8)	0 (0)	0 (0)	0 / 34,5
1986 - 1990	11 (3/8)	2 (66,7)	4 (50)	65,5 / 57
1991 - 1995	17 (2/15)	2 (100)	8 (53,3)	50 / 58
1996 - 2000	16 (6/10)	2 (33,3)	2 (20)	55,5 / 47
2001 - 2005	30 (8/22)	4 (50)	8 (36,4)	61,5 / 59
Celkem	84 (21/63)	10 (47,6)	22 (34,9)	59,5 / 54



BRAF mutace byla detekována u 38,1% pacientů (22/58) v období po haváři. Téměř všechny mutace byly detekovány u žen. Nejvíce mutací bylo detekováno u žen v období 1991-1995, zatímco u žen v období 1996-2000 bylo detekováno jen 2 mutace. Toho by se mohlo očekávat při potvrzení diagnózy v období 1991-1995, kdy se tenkou jehlou ještě provádělo štítné žlázy. Před černobylskou havárií jsme detekovali žádné mutace v BRAF genu, což je v souladu s tím, že mutace v BRAF genu vzniká v důsledku ozáření. Náš cílem je rozšíření informací o tomto problému.
Podpořeno grantem IGA MZČR NR/7806-3.



**II. DNY DIAGNOSTICKÉ,
PREDIKTIVNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ
ONKOLOGIE**

7. – 9. prosince 2006

11. POKROKY V KLINICKÉ DIAGNOSTICE ZHOUBNÝCH NÁDORŮ II

Předsedající: KLEIBL J., BERKOVCOVÁ J., HAJDÚCH M.

Sobota / 9. 12. 2006 – 13:00–14:50

Alterace v genech s nízkou penetrancí u pacientek s karcinomem prsu

Kleibl Z.¹, Prokopcová J.¹, Havránek O.¹, Stříbrná J.¹, Novotný J.^{2,3}, Pohlreich P.¹

¹Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK v Praze; ²Onkologická klinika 1. LF UK v Praze a VFN; ³Nemocnice Příbram

Dědičné mutace v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2* se podílejí na vývoji přibližně 5% karcinomů prsu. Nádorové syndromy, které vznikají u nosiček mutací v těchto genech, jsou charakterizovány vysokým rizikem vzniku karcinomu prsu a/nebo ovaria. Přibližně 1% hereditárních karcinomů prsu způsobují mutace v dalších vysoce penetrantních genech (např. *p53*, *PTEN*), které jsou zodpovědné za hereditární syndromy zahrnující typicky i další malignity. Familiární výskyt lze prokázat u 10–15% mammárních karcinomů. V nepřítomnosti hereditární alterace v hlavních predispozičních genech lze v těchto případech uvažovat o mutacích v tzv. genech s nízkou penetrancí (např. *ATM*, *CHEK2*, *NBS1*). Tyto mutace se v populaci vyskytují s vyšší frekvencí, avšak u nosičů je nižší predispozice ke vzniku nádorového onemocnění, než je tomu u hlavních predispozičních genů (zvýšení RR ~1,5–3).

U pacientek s hereditárním nebo sporadickým karcinomem prsu jsme studovali význam mutací v genech s nízkou penetrancí se zvláštním zřetelem ke genům angažovaným v reparaci DNA. Studován byl gen *ATM* a výskyt známých patogenních alterací genu *CHEK2* a *NBS1*.

Mutační analýza genu *ATM*, provedená pomocí PTT a sekvenování v souboru 161 rizikových pacientek s karcinomem prsu, odhalila přítomnost tří zřejmě patogenních mutací (1,9%) vedoucích ke zkrácení proteinu. Naopak analýza v kohortě 183 kontrolních vzorků neprokázala výskyt žádné patogenní varianty ($p = 0,065$). Ve dvou případech pacientek s mutací se jednalo o osoby s bilaterálním výskytem karcinomu prsu, u další pacientky byl diagnostikován duktální karcinom prsu ve 37 letech.

Analýza mutace 1100delC genu *CHEK2* založená na DHPLC prokázala její výskyt u 1/358 (0,28%) vysoce rizikových osob s karcinomem prsu. Jednalo se o muže s karcinomem prsu a pozitivní rodinnou anamnézou (karcinomy GIT). Analýza 688 vzorků pacientek se sporadickým karcinomem prsu pak identifikovala mutaci 1100delC ve 3 případech (0,44%). U 2 pacientek se v rodině vyskytovali přími

příbuzní s nádorovým onemocněním (karcinom cervixu nebo plic). Karcinomy u všech identifikovaných nosičů mutací byly pozitivní na přítomnost estrogeních i progesteronových receptorů. Populační četnost mutace c. 1100delC genu *CHEK2* (0,27%) byla stanovena na kontrolním vzorku 730 osob (2/730). Pomocí DHPLC byla provedena i analýza exonu 2 a 3 genu *CHEK2* v populaci 323 pacientek se sporadickým výskytem karcinomu prsu, která prokázala přítomnost 10 mutací p.1157T (3,1%). Tato sekvenční varianta se vyskytla u 15/512 osob kontrolní populace (0,29%). Kromě této alterace byly identifikováni 4 nosiči dalších změn (p. T172A, p.R181C, IVS5+51A > T, IVS4 + 24T > C), nezachycených v kontrolní populaci.

Mutační analýza genu *NBS1* (nibrin) byla zaměřená na výskyt mutace c.675del5. Oproti očekávání v 472 vzorcích pacientek se sporadickým karcinomem prsu nebyla mutace nalezena.

Výsledky provedených analýz vypovídají o několika skutečnostech: frekvence alterací ve studovaných genech jsou v ČR nízké a o těch, které mají odlišnou četnost od simultánně studované kontrolní populace nejsou, s výjimkou *ATM*, dostupné zahraniční studie. Na tomto základě se domníváme, že frekvence a charakter alterací genů s nízkou penetrancí má vysoce regionální závislost a pro jejich identifikaci a praktické uplatnění se často nelze vyhnout analýzám celých genů v rozsáhlých souborech.

Práce byla podpořena Výzkumným záměrem MSM0021620808.

Diagnostika genetických změn u papilárního karcinomu štítné žlázy

Sýkorová V.¹, Dvořáková Š.¹, Laco J.², Ryška A.², Kodetová D.³, Astl J.⁴, Veselý D.⁴, Novák Z.¹, Bendlová B.¹

¹Oddělení molekulární endokrinologie, Endokrinologický ústav, Praha; ²Fingerlandův ústav patologie, Hradec Králové; ³Ústav patologie a molekulární medicíny FN Motol, Praha; ⁴ORL klinika FN Motol, Praha

Úvod: Papilární karcinom (PTC) je nejběžnější malignitou štítné žlázy (80–85%). Nejčastější příčinou je aktivace proto-onkogenů RET a BRAF. RET onkogen je aktivován RET/PTC přeskupením (rearrangements), které vzniká fúzí intracelulární tyrozin kinázové domény RET genu a jiného konstitutivně exprimovaného genu. Výskyt RET/PTC přeskupení je velmi variabilní (5–70%) v závislosti na geogra-

fických faktorech a použité metodice. K velkému nárůstu PTC došlo po černobylské havárii (26. duben 1986). RET/PTC je spojován s agresivnější formou PTC a častou tvorbou vzdálených metastáz. V současné době je známo několik fúzních forem, které vznikají inverzí nebo translokací. Nejčastější jsou RET/PTC1 a RET/PTC3 přeskupení. BRAF gen kóduje cytoplasmatickou serin/threoninovou proteinkinázu patřící mezi RAF proteiny. K aktivaci dochází substitucí T → A na pozici 1799 v 15. exonu způsobující substituci valinu za glutamát v kodonu 600 (V600E). Tato mutace je nejčastější genetickou změnou u PTC (29–69%) a koreluje s vyšším stupněm TNM klasifikace, agresivnější formou nádoru a s horší prognózou onemocnění.

Cíl: Detekce BRAF V600E mutace a RET/PTC přeskupení u PTC pacientů v české populaci.

Materiál a metody: Soubor tvořilo 44 odepřevzatých čerstvých tkání PTC pacientů, 9 biopsií tenkou jehlou z PTC tkání a 92 parafinových bločků. DNA a RNA z čerstvých tkání a biopsií jsme izolovali pomocí Trizolové metody. Expresi RET/PTC přeskupení jsme detekovali v cDNA čerstvých tkání, která byla převedena z RNA pomocí reverzní transkripce. Kvalita a přítomnost cDNA byla ověřena pomocí exprese ubikvitárního genu GAPDH a specifického genu pro štítnou žlázu PAX8. DNA z parafinových bločků jsme získali pomocí QIAamp DNA Blood Mini Kitu. Mutaci V600E jsme detekovali screeningovou metodou SSCP (single strand conformation polymorphism) a pozitivní vzorky ověřili přímou fluorescenční sekvenací. Pro zjištění vlivu černobylské havárie na výskyt této mutace v České republice jsme vzorky rozdělili do pěti období – jedno období před černobylskou havárií a čtyři období od roku 1986 do současnosti.

Výsledky: Expresi RET/PTC1 jsme našli u 2 pacientů (4,2%), RET/PTC3 u 1 pacienta (2,1%) a neurčené fúzní formy RET/PTCX u 2 pacientů s PTC (4,2%). Mutaci V600E v BRAF genu jsme detekovali u 56 pacientů s PTC (38,6%). Jeden pacient byl homozygotem, ostatní heterozygoty. V období před rokem 1986 (10 pacientů) jsme nedetekovali žádnou BRAF mutaci, v následujících obdobích jsme mutaci detekovali u 56 pacientů (41,2%). Zdá se, že tato mutace nekoreluje s věkem diagnózy. Soubor tvořilo 21,4% mužů a 78,6% žen, z toho 48,4% mužů a 36% žen mělo BRAF mutaci.

Závěr: RET/PTC přeskupení jsme detekovali u 5 ze 48 pacientů (10,4%), mutaci V600E jsme zachytili u 38,6% ze 145 pacientů. Výskyt mutace V600E je vyšší u mužů. Zdá se, že se jedná o ma-

přítní genetickou změnu, která hraje důležitou roli v patogenezi PTC. Toho by se mohlo využít v klinické praxi pro potvrzení diagnózy případně pro určení diagnózy z biopsie tenkou jehlou ještě před operací pacienta.

Tato práce je podpořena grantem IGA MZ ČR NR/7806-3.

Možnosti metod nukleární medicíny v onkologické diagnostice

Bakala J., Bernátek J., Gatěk J., Hrbáčková L.
Oddělení nukleární medicíny, Krajská nemocnice T. Bati a. s., Zlín; Chirurgické oddělení nemocnice ATLAS, Zlín

Metody nukleární medicíny, na rozdíl od jiných zobrazovacích metod, zobrazují hlavně funkční zobrazení metabolismu – buněčné aktivity

- funkce daného orgánu
- funkční zobrazení metabolismu
- buněčné aktivity
- genetické inform
- STÁLE SE VÍCE OBJEVUJE TERMÍN MOLECULAR IMAGING

Zobrazovací metody v computerové tomografii CT lze v obecné rovině rozdělit do dvou kategorií

- emisní
- transmisní

Emisní tomografie patří do nukleární medicíny – **SPECT** (Jednofotonová emisní computerová tomografie), kdy se detekuje gammazáření; nejčastějším zotopem je ^{99m}Tc , ^{123}I a ^{111}In , event. další

- Moderním způsobem je PET **pozitronová emisní tomografie**, kdy zdrojem záření jsou pozitrony, jimiž jsou značeny látky, jako např. glukóza, které se aktivně zapojují do metabolismu, tzn. že dokonale zobrazují metabolismus
- V poslední době se čím dále tím více ve světové literatuře i v praktickém použití objevuje řada článků, kdy se hovoří o hybridním zobrazení (emisní a transmisní), ujal se termín funkční anatomie čím dál častěji též termín MOLECULAR IMAGING, kde se, na základě fúze během jednoho vyšetření, zobrazuje vyšetření **PET/CT nebo SPECT/CT**

Zdá se, že tyto metody, zejména v onkologii, již mění přístup k onkologickým pacientům a mohou jednak sledovat pacienty, diagnostikovat onemocnění, staging etc. Dokonce se v poslední době v literatuře objevuje v onkologii název

- kompletní PET remise tumoru.

Metody nukleární medicíny, které se používají, můžeme rozdělit do čtyř skupin

1. primární diagnostika tumorózního ložiska přímé zobrazení hot spot
2. a nepřímé cold spot
3. sekundární postižení, ke zjištění metastáz
4. zjišťování funkce různých orgánů (ledviny a srdce) při chemoterapii, jak ke sledování možnosti

negativních účinků na ledviny a srdce, event. před chemoterapií

5. označení sentinelové při operační výkonech zejména Ca mam, maligního melanomu
6. v gynekologické operativně
7. v orofaciální operativně maligních tu.
8. i v jiných lokalitách Ca kolorectálního, Ca žaludku

Látky, které přímo zobrazují tumor, jsou takové, které se, po i. v. aplikaci, různým způsobem váží do buněk tumorózní tkáně. Nejčastěji používaný ^{99m}Tc Tetrofosmin a ^{99m}Tc MIBI se váže do mitochondrií, ^{18}F FDG Fluorodeoxy glukóza se zapojuje do metabolismu glukózy a značený somatostatin zobrazuje somatostatinové receptory na povrchu těla nádorové buňky. Nejrozšířenější je **scintigrafie skeletu**, která má zcela pevné, fixované místo v onkologické diagnostice. Slouží jednak ke zjištění primárního, nebo sekundárního postižení dálestagingu, ke sledování pacientů v dlouhodobém časovém období. Provádí se vždy metodou celotělové scintigrafie po i. v. aplikaci ^{99m}Tc MDP, který zobrazuje místa kostní přestavby, která koreluje s metastatickým postižením. Na našem oddělení pak většinou k doplnění provádíme planární scintigrafii nebo SPECT, které upřesňují ložisková postižení – např. páteře, obrátů, či v oblasti pánve. Velmi často se vyskytuje při mikrometastatickém postižení u karcinomu prsu tzv. superscan. Jedná se o mikrometastázy, které se znázorňují jako difuzní zvýšené vychytávání v celém skeletu.

Nejznámější metodou je scintigrafie skeletu WB nebo SPECT dále **mammoscintigrafie**, kterou na našem pracovišti provádíme již 8 let. Vyšetření je velmi jednoduché: po aplikaci Tetrofosminu se provádí snímání v levé a pravé poloze vleže a v AP projekci, event. doplňujeme SPECT. Dalšími přímo zobrazovacími metodami je zobrazení pomocí somatostatinových receptorů, kde se využívají dvě látky, z nichž jednou je ^{111}In Indium značený Octreotide anebo, zejména v onkologii používaný, ^{99m}Tc značený Depreotide. Oba dva se dají využít ke scintigrafii tumorózních ložisek prsu, i když jejich využití je spíše v jiné diagnostice. U Octreoscanu jsou to endokrinní tumory, u Depreotidu ložiskové léze plicní. Scintigrafii pomocí ^{99m}Tc Tetrofosminu a ^{99m}Tc MIBI se dá též využít ke sledování a vyjádření MDR (Multi Drug Resistance) genu, kdy koreluje eflux radiofarmaka s přítomností exprese tohoto genu. Dá se rovněž využít ke sledování úspěšnosti různých typů chemoterapie. Z metod, které slouží jako sekundární ke zjištění metastáz, je nejdůležitější **scintigrafie skeletu**, která má zcela pevné, fixované místo v onkologické a mammologické diagnostice. Slouží jednak ke stagingu, ke sledování pacientů v dlouhodobém časovém období. Provádí se vždy metodou celotělové scintigrafie po i. v. aplikaci ^{99m}Tc MDP, který zobrazuje místa kostní přestavby, která koreluje s metastatickým postižením. Na našem oddělení pak většinou k doplnění provádíme planární scintigrafii nebo SPECT, které upřesňují ložisková postižení – např. páteře, obrátů, či v oblasti

pánve. Velmi často se vyskytuje při mikrometastatickém postižení u karcinomu prsu tzv. superscan. Jedná se o mikrometastázy, které se znázorňují jako difuzní zvýšené vychytávání v celém skeletu. Zde se k diagnostice používá **scintigrafie kostní dřevě**, která se provádí dvojím způsobem:

- pomocí preparátů Nanocoll
- pomocí značených bílých krvinek preparátem Scintimun Granulocyte, jenž zobrazuje kostní dřevě, takže v místě metastatického postižení naopak dochází k negativním defektům

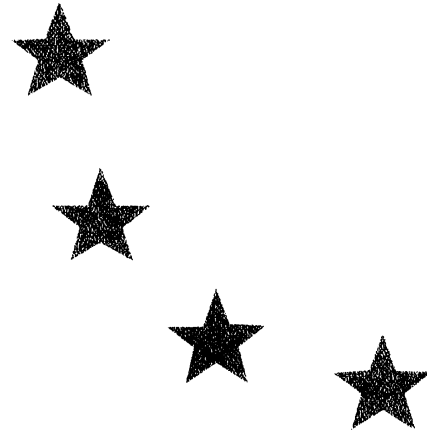
K dalším metodám, spíše pomocného charakteru, patří **SPECT jater** (k vyloučení ložiskových lézí), který umožňuje zejména 3D zobrazení. Docela efektivní metoda k diferenciální diagnostice mezi metastatickým postižením a haemangiomy je SPECT krevního poolu. Všechny tyto metody na našem oddělení běžně provádíme. Metodiky v onkologické diagnostice, které jsou zaměřeny na sledování funkce orgánů při chemoterapii:

- scintigrafie ledvin s výpočtem funkčních parametrů; chceme-li vyšetřit glomerulární filtraci, používáme radiofarmakon ^{99m}Tc DTPA, ke zjištění tubulární funkce používáme MAG3. Při tomto vyšetření vidíme jednak tvar, velikost ledvin, vychytávání a transport, jakož i funkční parametry – efektivní průtok plazmy ledvinami anebo glomerulární filtraci. Tyto údaje jsou velmi důležité k monitorování pacienta před či po chemoterapii nebo během ní.
- jedna z metod, která se zcela rutinně používá v mammologii je gatovaný SPECT, při kterém, kromě perfúze myokardu, sledujeme možnosti účinku kardiotoxických cytostatik na depresi systolické funkce, protože při gatovaném vyšetření vidíme jednak poruchy kinetiky, ejekční frakci a objemy systolické a diastolické a systolický volume.
- v poslední době pak zcela nezbytnou součástí nukleární medicíny v onkologii je zobrazení sentinelové uzliny, kdy se používá preparát nanocoll, velikosti částic 80 nanometrů, objem aktivity 2×50 MBq. Používáme dvoudenní protokol. Na našem oddělení aplikujeme peritumorálně a subcutánně na vyznačené místo nad tumorem, po masáži se provádí snímování na gammakameře v přední a zadní projekci. Snažíme se chirurgům označit počet a lokalizaci těchto sentinelových uzlin. Je zejména nutné zaměřit se na uzliny, které nejsou v typické axilární lokalizaci jako jsou parasternální nebo subclaviculární. Druhý den je pacient odvezen na sál, kde pomocí gammasondy operátor sleduje a detekuje sentinelovou uzlinu, která se po extirpaci vyšetří histologicky. Tato metoda je velkým přínosem v moderní léčbě. Zde si dovoluji jen malinkou zmínku o velmi diskutované otázce radiační zátěže na operačním sále. Dovolím si využít studie profesora W. Brennera a H. Ostertaga, která byla přednesena v Neapoli v srpnu 2001 a jmenuje se Radiation exposure to the personnel

Endocrine Abstracts

April 2007 Volume 14

ISSN 1470-3947 (print) ISSN 1479-6848 (online)



9th European Congress
of Endocrinology

28th April – 2 May 2007 Budapest, Hungary



Online version available at
www.endocrine-abstracts.org

Published by
BioScientifica 

malignancies). Tissue samples were obtained with the permission of the local Ethical Committee of Human Studies. Using quantitative real-time PCR we have analyzed: 33 samples of ccRCC with their controls (the contralateral pole of the same kidney not infiltrated by cancer, assigned C) as well as control samples from patients suffering from other, nonneoplastic kidney abnormalities (6 samples, assigned N). The expression of the whole pool of D1 transcript variants was dramatically lowered in ccRCC tissues. The separately performed expression analysis of alternatively spliced D1 transcript variants, which differ in the presence or absence of subexon 1b, also exhibited about 90% decrease of mRNA in both transcript variants of cancer tissues. Simultaneously, the comparison of these alternatively spliced mRNA groups revealed that ratio: (whole pool of D1 transcripts)/(transcripts containing the 1b exon) as well as relation: (whole pool of D1 transcripts)/(transcripts devoid of the 1b exon) were increased several times in the ccRCC in comparison with controls. This observation suggests the existence of at least one another alternatively spliced variant, which extends the whole pool of D1 transcripts and possibly is overexpressed in ccRCC. Our results indicated that the alternative splicing process of deiodinase type I can be disturbed in ccRCC.

P120

RET expression reduces estrogen-induced lactotrope hyperplasia

Carmen Cañibano, Noela Rodríguez, Sulay Tovar, María Jesús Vázquez, Montserrat Lavandeira, Carlos Díezguez & Clara Álvarez
Department of Physiology, School of Medicine, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

RET is a tyrosine kinase receptor activated by GDNF, NTN, ART and PSPN through GFR α 1,2, 3 and 4 respectively. Activation of the receptor elicits intracellular pathways such as Ras/MAPK and PI3K/AKT leading to differentiation and proliferation. Our group has previously shown that RET is expressed specifically in the somatotroph cell population within the pituitary gland, both in rats and in humans. We have also shown that, in absence of its ligand GDNF, RET induces activation of caspase 3 PKC δ /JNK/c/EBPa and CREB, causing apoptosis in cell cultures. Cell death is dependent on Pit-1 and p53 induction. This findings confirm previous hypothesis and strongly indicate that RET acts as a dependence receptor. Now we provide evidence that the same biological and biochemical mechanisms work *in vivo*.

For doing so, we have used a model of lactotroph hyperplasia induced by estrogen administration in rat. Hyperplastic pituitary glands were infected with purified high-titer retroviruses encoding RET or the corresponding empty virus as control. Viral delivery was achieved by estereotaxia, injecting the retrovirus directly into the pituitary of living anesthetized rats. Following treatment and infection rats were sacrificed and pituitary weights recorded. As expected, estrogen treatment induced a marked increase in pituitary size. Interestingly, viral-mediated RET expression caused a significant reduction compared to mock-infected pituitaries (26.6 \pm 1.8 mg vs 18.0 \pm 1.0 mg), restoring pituitary weight to values similar to pituitaries not treated with estrogens. We were able to detect RET expression in lactotrophs, suggesting that ectopic expression of the dependence receptor caused lactotroph cell death and hyperplasia reversal. Moreover, we show activation of the caspase 3-PKC δ -JNK-c/EBPa-CREB apoptotic pathway, indicating that the same molecular events are elicited by RET in cell culture models and *in vivo*.

P121

Analysis of BRAF point mutation in papillary thyroid carcinoma

Vlasta Sykorova¹, Sarka Dvorakova¹, Jan Laco², Ales Ryska², Daniela Kodetova³, Jaromir Astl⁴, David Vesely⁴ & Bela Bendlova¹
¹Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic, ²Fingerland's Institute of Pathology, Hradec Kralove, Czech Republic, ³Institute of Pathology and Institute for Pathological Anatomy and Molecular Medicine FN Motol, Prague, Czech Republic, ⁴Department of ENT and Head and Neck Surgery FN Motol, Prague, Czech Republic.

BRAF point mutations are found in 29-69% of papillary thyroid carcinoma (PTC). BRAF is a serine-threonine kinase involved in the phosphorylation of MAPK signaling pathway. The mutation is located in the exon 15 of BRAF, resulting in the substitution of valine to glutamate at codon 600 (V600E). Mutation generates unregulated B-Raf activity that leads to increased cellular proliferation. The aim of this study was to determine the frequency of BRAF mutation in the Czech population and its changes in 1960-2006. We examined 145 of PTC: 92 paraffin-embedded formalin-fixed tissue samples, 44 fresh frozen

tissues and 9 wash-out material from fine-needle aspiration biopsies (FNAB) after signing informed consent approved by ethical committee. For assessment of influence of Chernobyl nuclear accident we divided samples into 5 periods - one period before and four periods after the accident. DNAs from paraffin-embedded samples were extracted using the QIAamp DNA Blood Mini Kit and frozen samples using Trizol reagent. BRAF gene was screened using the single strand conformation polymorphism method (SSCP) and verified by direct sequencing. The V600E mutation was detected in 56 samples (38,6%). All BRAF mutations except one were heterozygous. Surprisingly, in the period before Chernobyl nuclear accident no BRAF mutation was found, in other periods 56 mutations were detected (41,2%). The female to male ratio was 3,7:1, mutation was found in 48,4% of male and in 36% of female patients. In our series difference between age at diagnosis in patients with and without mutation was not significant. Our study confirms a high rate of BRAF V600E mutation in Czech PTC patients. Results indicate that the mutation is the most frequent genetic alteration found in PTC and it could be used as a reliable genetic marker of PTC and applied for FNAB before surgery.

This study was supported by IGA MZ CR NR/7806-3.

P122

Effect of surgery on carotid vascular remodeling in patients with pheochromocytoma

Giampaolo Bernini, Fabio Galetta, Michele Bardini, Ferdinando Franzoni, Chiara Taurino, Angelica Moretti, Matteo Bernini & Antonio Salvetti
Department of Internal Medicine, University of Pisa, Pisa, Italy.

In vitro and *in vivo* studies suggest that catecholamines, in addition to their hemodynamic effect, exert a direct influence on the vascular wall, leading to eutrophic and hypertrophic remodeling. This finding is in agreement with that recently reported by our group on patients with pheochromocytoma (PHEO) who show carotid intima media thickness (IMT) and vascular fibrosis higher than essential hypertensives matched for classic cardiovascular risk factors, including blood pressure. To further confirm the direct vascular influence of catecholamines in humans, we compared carotid IMT, by ultrasound imaging, and vascular fibrosis, by imaging backscatter signal (IBS) analysis, in a group of patients with PHEO and high-normal blood pressure (n=10; mean \pm SD age 51 \pm 13.2 yr, range 28-70 yr) before and after surgical cure (mean \pm SD 20.5 \pm 5.98 months, range 12-29 months). After removal of the tumor, no significant variation in systolic (126.5 \pm 6.5 vs 138.3 \pm 5.6 mmHg, mean \pm SE) and diastolic (83.6 \pm 3.1 vs 87.0 \pm 4.1 mmHg) blood pressure and in total cholesterol (207.0 \pm 9.6 vs 198.8 \pm 12.6 mg/dl), HDL-cholesterol (62.8 \pm 4.5 vs 61.3 \pm 4 mg/dl), and LDL-cholesterol (118.3 \pm 8.5 vs 117.9 \pm 13.1 mg/dl) was observed, while a reduction in urinary metanephrines (normetanephrine: 480.0 \pm 51.2 vs 2264.8 \pm 681.4 μ g/24 h, $P < 0.003$; metanephrine: 178.7 \pm 23.5 vs 879.2 \pm 290.8 μ g/24 h, $P < 0.03$) and in catecholamines (plasma noradrenaline: 442.9 \pm 54.7 vs 623.9 \pm 115.0 pg/ml, N.S.; plasma adrenaline: 36.1 \pm 7.2 vs 183.8 \pm 99.3 pg/ml, $P < 0.02$; urinary noradrenaline: 49.4 \pm 8 vs 86 \pm 27.4 μ g/24 h, N.S.; urinary adrenaline: 8.6 \pm 0.7 vs 18.0 \pm 7.7 μ g/24 h, NS) was shown. After surgery, IBS values significantly decreased (-22.82 \pm 0.40 vs -21.17 \pm 0.61 dB, $P < 0.005$) and a similar pattern was observed for carotid IMT (0.86 \pm 0.06 vs 0.88 \pm 0.06 mm, $P < 0.06$), though at not significant extent. A direct and significant correlation was found between the absolute reduction in IBS values and the absolute decrement in urinary normetanephrines levels ($r = 0.54$, $P < 0.03$). In conclusion, our results confirm that high catecholamine levels directly affect the vascular wall structure, independently of the hemodynamic discharge.

P123

A case report of ectopic Cushing's disease presented with thrombocytopenia

Demet Ozgil Yetkin¹, Sayid S Zuhur¹, Ekrem Kara¹, Ayla Gurel Sayin², Buge Oz³ & Ertugrul Tasan¹

¹Istanbul University Cerrahpasa Medical faculty Endocrinology and Metabolism Department, Istanbul, Turkey, ²Istanbul University Cerrahpasa Medical faculty Cardiovascular Surgery Department, Istanbul, Turkey, ³Istanbul University Cerrahpasa Medical faculty Pathology Department, Istanbul, Turkey.

PURPOSE

To report a case of Cushing's syndrome caused by ectopic ACTH secretion related to a thymic carcinoid presented with thrombocytopenia.

ANALYSIS OF BRAF V600E MUTATION IN PATIENTS WITH PTC



Sykorova V¹, Dvorakova S¹, Laco J², Ryska A², Kodetova D³, Astl J⁴, Vesely D⁴, Bendlova B¹

¹Institute of Endocrinology Prague, ²Fingerland's Institute of Pathology Hradec Kralove, ³Institute of Molecular Pathology FN Motol, Prague, ⁴Department of ENT and Head and Neck Surgery FN Motol, Prague, Czech Republic

INTRODUCTION

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common type of thyroid cancer. BRAF gene are present in 40-60% of PTC. BRAF V600E mutation is one of the three isoforms of RAF, a serine-threonine kinase, which is involved in the activation by phosphorylation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. It mediates the cellular response to extracellular signals that regulate cell proliferation, differentiation, and apoptosis. The V600E mutation is located in the exon 15 (the substitution T>A at nucleotide 1799). Mutation generates an elevated cellular activity that increases cell proliferation. Regarding to the literature data this mutation correlates with a high level of TNM classification, higher aggressivity of the tumor and worse disease prognosis. In 10% of follicular variant of PTC was detected another mutation in BRAF gene (K601E).

AIMS

- 1. Detection of BRAF V600E mutation in Czech population
- 2. Correlation with clinicopathological characteristics
- 3. Evaluation of possible influence of Chernobyl accident on the occurrence of BRAF mutation

MATERIALS

122 paraffin-embedded tumor tissue blocks, 61 fresh frozen tissues and 8 fine-needle aspiration biopsies (FNAB) of PTC.

Samples were grouped to five periods - one period before the Chernobyl accident (1986) and four periods after the Chernobyl accident.

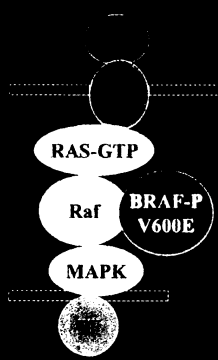
METHODS

Genomic DNA was extracted using the High Pure DNA Blood Mini Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Genotyping

Genotyping was performed using the Amplifluor DNA Blood Mini Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Genotyping was performed using the Amplifluor DNA Blood Mini Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).



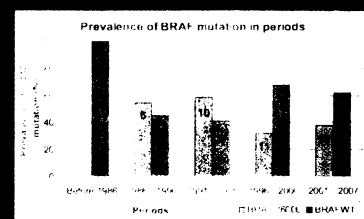
RESULTS

We retrospectively studied 202 patients for analysis of BRAF point mutation V600E. The prevalence of this mutation was 21%. The mutation was detected in 77 papillary (38%) PTC. All BRAF mutations were heterozygous except one homozygous sample in the period before Chernobyl nuclear accident. No BRAF mutation was found in the other periods. 77 mutations were detected (40.1%). Mutation was found in 46.2% of male and in 36.1% of female patients. Clinicopathological characteristics of the patients are summarized in Table 1. We found a significant difference between tumor size in the period 2001 - 2007 but not in the other periods. In our series no significant difference between age at diagnosis in patients with the V600E mutation and age in patients without the mutation was found. No correlations with other clinicopathological characteristics were detected. We found no mutation K601E in PTCs.



	Total	BRAF ^{V600E}	%	p [†]
PTC patients	202	42	21	
Male	95	44	46	0.24
Female	107	18	17	
Age at diagnosis				
< 30 yr	1	0	0	0.20
30 - 60 yr	117	22	19	
> 60 yr	84	20	24	
Tumor size				
< 15 mm	107	18	17	0.17
15 - 40 mm	73	14	19	
> 40 mm	22	10	45	
Histological variant of PTC				
Classic papillary	151	30	20	0.09
Follicular variant	49	12	24	
Other histology	2	0	0	
Extrathyroidal invasion				
No	121	22	18	0.09
Yes	81	20	25	
Nodal metastasis				
No	107	18	17	0.20
Yes	95	24	25	
Multifocality				
Multifocal	49	12	24	0.17
Unifocal	153	30	20	
Encapsulation				
No	107	18	17	0.01
Yes	95	24	25	
Angiolymphovascular invasion				
No	107	18	17	0.22
Yes	95	24	25	

BRAF mutation	Number	Mean tumor size (mm)	p [†]
Before 1986	1	27.2 (27.2)	
Yes	1	27.2 (27.2)	
No	0		
1987 - 1990	4	22.1 (22.1)	
Yes	4	22.1 (22.1)	0.635
No	0		
1991 - 1995	11	22.1 (22.1)	
Yes	11	22.1 (22.1)	0.016
No	0		
1996 - 2000	2	22.1 (22.1)	
Yes	2	22.1 (22.1)	0.17
No	0		
2001 - 2007	41	22.1 (22.1)	
Yes	41	22.1 (22.1)	0.024
No	0		
Total [‡]	189	22.1 (22.1)	
Yes	77	22.1 (22.1)	0.069
No	112	22.1 (22.1)	



CONCLUSION

Our study confirms a high rate of BRAF V600E mutation in PTC patients. PTC mutation found in PTC and it can be applied for FNAB before surgery. We found a correlation of BRAF mutation with tumor size in the follicular variant of papillary thyroid cancer from 2001-2007. But we couldn't confirm the influence of the mutation on higher aggressivity of the tumor. In the period before the Chernobyl accident we found no BRAF mutation, but it can be caused by the small number of samples from this period.

This study was supported by grants IGA MZD Praha NR/7866 Jan 11/IR/9158.



UICC INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER

11, rue de Frontene, CH-1211, Geneva, Switzerland
Tel: (4122) 809 18 40 Fax: (4122) 809 18 10 Email: info@uicc.org
global cancer control Knowledge Transfer direct: Tel: (4122) 809 18 40 Email: fellows@uicc.org

INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER

Fellowship Project Report

Name: Ms Vlasta Sykurova
Fellowship: ICRET, No: ICR/06/016, YEAR: 2005, DISCIPLINE: Oncology
Project Dates: 11.09.2006 - 07.10.2006
Home Institute: Dept. of Molecular Endocrinology
Institute of Endocrinology, - Pilsenske 94 Prague - The Czech Republic
Supervisor: Dr Bela Bendlova
Host Institute: Singleton Hospital
South West Wales Cancer Institute, Swansea SA2 8QA, The United Kingdom
Supervisor: Dr Gerwyn Thomas

PROJECT TITLE: Quantitative RT-PCR in papillary thyroid carcinoma

OBJECTIVES:

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common malignancy of the thyroid gland, accounting for 50-70% of all thyroid cancer. Rearrangements of the RET (REarranged during Transfection) proto-oncogene, mainly in the form of RET/PTC1 and RET/PTC3, are found in PTC and have been shown to play a role in early-stage papillary thyroid carcinogenesis. This event is mainly specific for PTC, but the reported frequencies varied widely from 2.0-50% of these tumors depending on different methodology, geographic factors, laboratory, age of patients, radiation exposure, metastasis and variants of PTC. The aim of the project was to learn a new methodology quantitative real-time PCR (qPCR) for genetic detection of RET/PTC rearrangements and to apply this new skills for thyroid tissues from Czech patients with PTC.

WORK CARRIED OUT:

For this project 50 tissues from Czech patients with PTC were used. The tissues had been immediately frozen in liquid nitrogen after surgical removal and stored at -80°C. Total RNA was extracted from about 100mg tissue using Trizol reagent. Total RNA was reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) using Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MuLV). 1ug RNA (after measuring of concentration and ratio 260/280nm and 260/230nm) was used for the production of cDNA in a mixture containing 25mM MgCl₂, 10mM dNTP, 0,1 ug random hexameres, 50 U reverse transcriptase and 10 U recombinant RNasin inhibitor in a final volume of 20 ul. The reaction was performed at 22°C for 10 min, 42°C for 15 min and 99°C for 5 min. 2ul of cDNA was used as template for the PCR reactions.

The integrity of the RNA and efficiency of the RT reaction was confirmed by the amplification of the housekeeping gene porphobilinogen deaminase (PBGD). PBGD1 forward primer (F): tgt ctg gta acg gca atg cgg reverse primer (R): cac tca gca tca tcc tca gg, length 547bp, PBGDII (F: tgc cag aga aga ggg tgg tg, R: cac tgg tgg ggg ggg tta gg, length 514bp). Rearrangements RET/PTC1 (F: caa agc cag cgt tac cat tgg, R: tcc cct cct aga gtt ttc, length 81bp) and RET/PTC3 (F: caa gct cct tac atc cc, R: t tct tca tca gtt ttt cc, length 134bp) were analyzed in 34 samples by PCR (polymerase-chain reaction). To identify types of RET rearrangements different from RET/PTC1 and RET/PTC3, samples were studied for the expression of the

tyrosine kinase - TK (F: cac cgc atg gag agg ccc cca aac tgc agc, R: aag ggc ctt ttg tcc ggc tc, length 97bp) and extracellular matrix (F: tgg cag gca cta tgt ccc aca tca g, R: ccc ggc cgc gct cac ct, length 105bp) domains of the RET. All samples were considered positive for rearrangement whenever they presented expression of RET TK domain and no expression of RET EC.

PCR protocol for PBGDI and PBGDII was: 2 ul of cDNA were added to a mixture containing 25mM MgCl₂, 2mM dNTP, 2uM of each primer and 1,25U AmpliTaq Gold Taq Polymerase in a final volume of 25ul. After initial denaturation at 95 C for 10 min, amplification was performed over 35 cycles consisting of 94 C for 30 sec, 55 C for 30 sec, 72 C for 90 sec, and a final extension at 72 C for 2 min on a MJ thermal cycler.

PCR protocol for TK and EC domains was: 2 ul of cDNA were added to a mixture containing 25mM MgCl₂, 2mM dNTP, 2uM of each primer and 1,25 Red Hot Taq Polymerase in a final volume of 25ul. Thirty cycles of denaturation (95 C for 30 sec), annealing (50 C for 30 sec), extension (60 C for 30 sec) and a final extension (72 C for 2 min) were performed. PCR protocol for RET/PTC1 and RET/PTC3 was: 2 ul of cDNA were added to a mixture containing 25mM MgCl₂, 2mM dNTP, 2uM of each primer and 1,25U AmpliTaq Gold Taq Polymerase in a final volume of 25ul. The amplification was performed over 30 cycles consisting of 94 C for 30 sec, 55 C for 30 sec, 72 C for 90 sec and a final extension at 72 C for 2 min. Every PCR reaction included positive and negative controls. 5 ul of PCR product were electrophoresed in a 2 % agarose gel and UV detected.

PCR protocol Real Time PCR was: 50ng of RNA were added to a mixture containing 3,25mM Mn(OAc)₂, 0,3uM of each primer and 1x conc. Light Cycler RNA Master SYBR Green in a final volume of 20ul. TK primers were: F (cgg tgg ccg tta aga tg) and P (tct gac agc agg tct cga a), length 64bp. Real Time PCR was performed on Light Cycler: reverse transcription (61 C for 20 min), denaturation (95 C for 30s), 45 cycles of amplification: denaturation (95 C for 1sec), annealing (60 C for 5 sec), extension (72 C for 1 sec) and a final extension (72 C for 1 sec), melting curve: denaturation (95 C for 5 sec), annealing (65 C for 1 sec) and melting on 95 C. We have always performed real time PCR with a negative control and each positive control in amount of 50ng, 1ng and 0,1ng of RNA. Each sample was amplified in two reaction mixtures for control of specificity and sensitivity of real time PCR.

RESULTS OBTAINED:

32 samples from the series of 34 samples were able to amplify control gene PBGDI. In 2 samples we performed control amplification for PBGDII, that had a lower PCR product than PBGDI. Both samples were positive. It was found RET/PTC1 in 1 cancer tissue, RET/PTC3 in none cancer tissue and RET/PTCX in 4 cancer tissues.

We optimised Real Time PCR for TK domain using two pairs of primers, two positive controls, different concentrations of Mn(OAc)₂ (2,5mM, 2,15mM a 4mM), different temperatures for annealing of primers (55 C and 60 C) and acquisition of amplification (57 C and 77 C). We analyzed 50 samples by using Real time PCR and we detected 7 samples (14%) positive for TK domain (RET/PTCX). The results are different from the results of a previous gel. It can be caused by using different method. Current studies demonstrated that the use of a single gene for normalization leads to relative large errors and that more than one reference gene should be used for accurate normalization of expression data.

The stay was very useful for me. I would like to have new knowledge for application of the Real time PCR in our laboratory. First of all I would like to use housekeeping genes such as PBGD and S14 (mitochondrial ribosomal protein) and normalize them for Real time PCR. I am going to collect other tissues and analyze them for RET/PTC using Real time PCR.

ARTICLES PUBLISHED/SUBMITTED:

(It is YOUR responsibility that any publication linked to the work carried out under this fellowship acknowledge the support of your specific UICG fellow.)

.....
.....
(Fellow's Signature)

.....
.....
Date: