

## 한국인 갑상선 유두암에서 ras 변이

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 내분비-대사 내과, 삼성생명과학연구소<sup>1</sup>, 병리과<sup>2</sup>

정정화 · 김근숙<sup>1</sup> · 정태식 · 오영륜<sup>2</sup> · 장혜원 · 정혜승 · 민용기 · 이명식 · 이문규 · 김광원 · 정재훈

### ras Mutation in Korean Papillary Thyroid Carcinomas

Jung Hwa Jung, Keun-Sook Kim<sup>1</sup>, Tae Sik Jung, Young Lyun Oh<sup>2</sup>, Hye Won Jang, Hye Seung Jung, Yong-Ki Min, Myung-Shik Lee, Moon-Kyu Lee, Kwang-Won Kim, Jae Hoon Chung

*Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine, Samsung Biomedical Research Institute<sup>1</sup>, Department of Pathology<sup>2</sup>, Department of Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine*

### ABSTRACT

**Background:** RET/PTC rearrangement and mutations of BRAF and ras are well-known oncogenes involved in the pathogenesis of papillary thyroid carcinoma (PTC). The prevalence of RET/PTC rearrangement and BRAF mutations were 0~13% and 66~83% in Korean patients with PTC, respectively. We evaluated the prevalence of ras mutations in surgical specimens of PTC, and we compared them with the patients' clinical features.

**Subjects and Methods:** We included the surgical specimens of 49 PTCs and a few follicular thyroid carcinomas (FTCs) and follicular adenomas (FAs) as positive controls. Polymerase chain reaction, single strand conformation polymorphism and direct sequence analysis were consecutively performed to detect ras mutations.

**Results:** No mutations of the ras oncogenes were detected in 49 PTCs. However, heterozygous mutations of the ras oncogenes were found in a FTC and FA as positive controls, respectively.

**Conclusion:** These findings suggested that ras mutation is not or rarely related to the tumorigenesis of PTCs in Koreans. Therefore, BRAF mutations and RET/PTC rearrangement, rather than ras mutation, might contribute the development of PTC in Koreans. (J Kor Endocrine Soc 22:203~209, 2007)

**Key Words:** Papillary thyroid carcinoma, Ras oncogene

## 서 론

ras 유전자의 변이는 이 유전자의 최종산물인 p21 단백질의 기능적 변화를 초래하여, 세포핵으로 성장 신호를 필요 이상으로 전달함으로써 세포의 성장과 분열을 촉진하여 발암과정에 관여한다[1]. ras 변이는 종양의 종류에 따라 다르게 나타나는데, 갑상선암은 K-, N-, 그리고 H-ras 유전자 3개 모두에서 변이를 보이는 유일한 암이다[1]. 1994년 갑상선 유두암에서 N-ras 변이가 재발, 전이 및 사망 등과 같은 갑상

선 유두암의 공격성을 나타내는 독립적인 예후인자로 알려졌고[2,3], 최근에는 ras 변이가 생존율과의 연관성뿐만 아니라 미분화암과 저분화암에서 더 흔하게 관찰되어 종양의 진행에 관여할 가능성을 시사하고 있다[4].

갑상선 분화암의 발병기전에 있어 RET/PTC 재배열과 BRAF 및 ras 변이는 약 70%에서 발견되며[5], 이들은 상호 배타적이라 동일한 환자에서 중복되어 나타나지 않는다[6,7]. 국내 자료에 의하면 한국인의 갑상선 유두암에서 RET/PTC 재배열 발현빈도는 0~12.9%로 서구인에 비하여 비교적 낮았고[8,9], BRAF 변이는 66~83%로 상대적으로 높았다[10~13]. 매우 제한적인 대상 중에서 여포암과 여포선종에서 각각 1예씩의 N-ras 변이가 발견되었고, 갑상선 유두암에서는 ras 변이가 관찰되지 않았다[8].

접수일자: 2007년 2월 12일

통과일자: 2007년 3월 23일

책임저자: 정재훈, 성균관대학교 의과대학 내분비-대사 내과

이에 본 연구에서는 한국인 갑상선 유두암에서 ras 변이의 빈도를 조사하여 ras 변이가 유두암 발생에 기여하는 정도를 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상 환자의 특징

1994년 12월부터 2004년 12월까지 삼성서울병원에서 갑상선절제술 후 갑상선 유두암으로 진단된 49명을 대상으로 하였다. 갑상선 유두암 중 전형적인 유두암만 포함하였고, 갑상선 유두암의 다른 아형들은 대상에서 제외하였다. 환자들의 나이는 평균  $43 \pm 16$ 세(16~79세)이었고, 남자가 7명, 여자가 42명이었다. 환자들의 임상정보는 후향적으로 병력 기록을 분석하였다. 경부 림프절의 병기나 TNM 병기는 AJCC (American Joint Committee on Cancer)의 2002년 권고안을 따라 분류하였다[14].

대상 환자의 평균 종양 크기는  $1.6 \pm 1.0$  cm (0.3~5.5 cm)이었다. 종양의 개수가 1개인 경우가 29명, 2개 이상인 경우가 20명이었다. 종양이 한 쪽 엽에만 있는 경우가 33명, 양 엽 모두에서 발생한 경우가 16명이었다. 병리조직검사에서 갑상선 외 조직 침범이 있는 경우가 31명이었고, 기관침범은 없었다. 경부 림프절 침범은 19명에서 관찰되었고, 경부 중심 림프절 전이(N1a)는 10명, 경부 측면 림프절 전이(N1b)는 9명에서 관찰되었다. 원격전이는 폐 전이가 1명에서 있었는데 방사성요오드 전신스캔으로 진단하였다. TNM 병기에 의하면 I기가 28명, II기는 0명, III기가 18명 그리고 IV기가 3명이었다. 추적관찰기간 동안 40명은 치유되었고, 6명은 잔여 조직이 남아 있었으며, 3명은 17~100개월째 재

발하였다.

### 2. ras 변이의 검색

#### 1) 종양조직에서 DNA 추출

갑상선 유두암으로 진단된 파라핀 블록에서 각각 20  $\mu$ m 두께의 연속절편 10매를 얻어 50 ml 용기에 넣은 다음 xylene을 처리하여 파라핀을 제거하였다. 회수된 조직에서 Tissue SV (plus) mini kit (General Biosystem, Korea)를 이용하여 제조회사의 권고 방법에 따라 게놈 DNA를 추출하였다.

ras 변이의 양성 대조군으로 갑상선 여포암과 양성 여포종양 조직을 사용하였다.

#### 2) 중합효소연쇄반응

H-ras, N-ras, K-ras 변이를 검색하기 위한 시발체는 엑손 1번의 코돈 12, 13과 엑손 2번의 코돈 61을 포함하도록 제작하였고, 각각의 유전자 서열과 중합효소연쇄반응 조건은 Table 1에 기술하였다. 중합효소연쇄반응은 먼저 94℃에서 10분간 초기 변성(denaturation)을 한 후, 94℃에서 30초 변성, 48~60℃에서 45초간 담금질(annealing), 73℃에서 45초 확장(extension)하는 과정을 35회 실시하고 73℃에서 10분간 최종 확장하였다. 음성 대조로는 주형(template) DNA를 가하지 않은 반응액을 사용하였다.

#### 3) Single strand conformation polymorphism (SSCP)

SSCP를 위하여 5  $\mu$ l의 중합효소연쇄반응 산물을 5  $\mu$ l의 중단용액(2  $\times$  Gel Loading Dye; 95% formamide, 10 mM NaOH, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol)에

**Table 1.** Oligonucleotide primers and PCR conditions to amplify fragments of the ras oncogene

Ras gene	Codons	Primer sequence (sense/antisense)	Amplified size (base pairs)	PCR cycling conditions
K-ras exon-1	12/13	5'-GACATGTTCTAATATAGTCAC-3' 5'-CTGTATCAAAGAATGGTCCT-3'	220	35 cycles: 30" at 94℃, 45" at 50℃, 45 at 73℃
K-ras exon-2	61	5'-GACTGTGTTTCTCCCTTCT-3' 5'-ACTATAATTACTCCTAATGTC-3'	250	35 cycles: 30" at 94℃, 45" at 48℃, 45 at 73℃
N-ras exon-1	12/13	5'-ATGGAAGGTCACACTAGG-3' 5'-GGGCCTCACCTCTATGGTG-3'	239	35 cycles: 30" at 94℃, 45" at 58℃, 45 at 73℃
N-ras exon-2	61	5'-TTGCATTCCTGTGGTTTTT-3' 5'-TCCGCAAATGACTTGCTATT-3'	237	35 cycles: 30" at 94℃, 45" at 50℃, 45 at 73℃
H-ras exon-1	12/13	5'-TGGGCCTGGCTGAGCAGG-3' 5'-CAGCAGCTGCTGGCACCT-3'	235	35 cycles: 30" at 94℃, 45" at 60℃, 45 at 73℃
H-ras exon-2	61	5'-CCAGGGAGAGGCTGGCTG-3' 5'-GGTTCACCTGTACTGGTGGA-3'	261	35 cycles: 30" at 94℃, 45" at 60℃, 45 at 73℃

PCR; Polymerase chain reaction, " ; seconds.

혼합하여 95℃에서 5분간 고온 처리하여 변성시킨 후 바로 얼음 위에 보관하였다. 검체는 0.5 × MDE gel을 이용하여 4℃에서 3와트로 20시간 전기영동하였다.

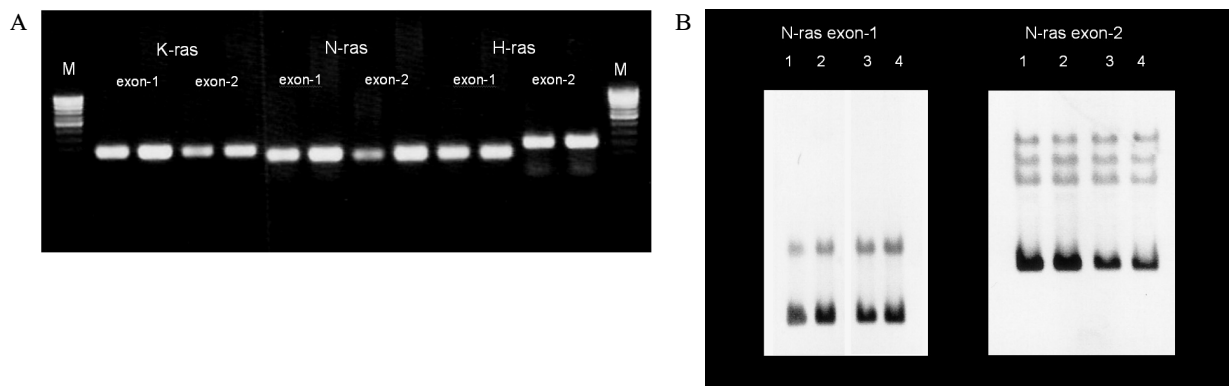
전기영동 후에 DNA 띠를 관찰하기 위하여 Gelstar 염색 (GelStar Nucleic Acid Gel Stain, CAMBREX, Korea)을 시행하였다. 영하 20℃에서 보관 중이던 Gelstar 염색용액을 차광하여 실온에서 15분 방치하였다. 이를 10,000 ×로 희석 시켜서 10 µl를 0.6 × TBE buffer 100 ml에 넣어 1 × GelStar 용액을 만들어 30분간 염색한 후 image capture를 이용하여 결과를 확인하였다(Fig. 1).

#### 4) 유전자 염기서열 분석(DNA sequence analysis)

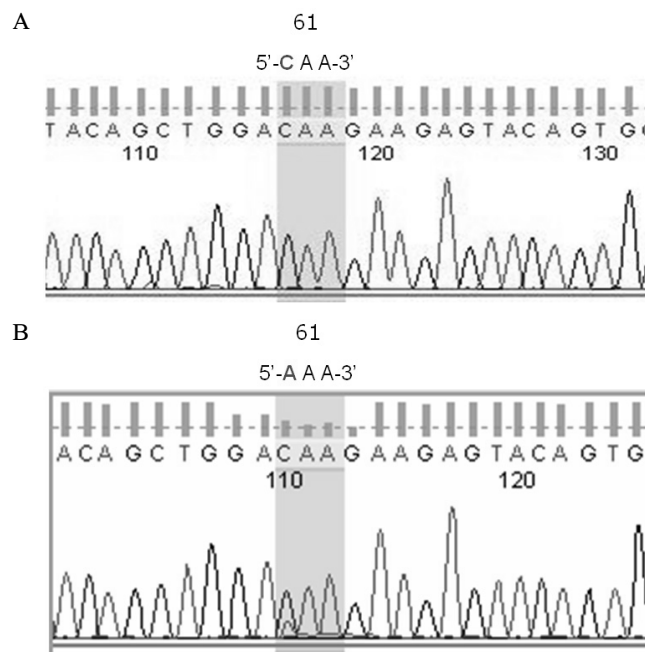
유전자 염기서열 분석은 ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) DNA 자동분석기를 사용하였다. 모든 검체에서 변이의 유무와 그 확인을 위하여 양쪽 가닥이 함께 검색되었으며, 정상 조직으로부터의 검체에서도 염기서열 분석을 시행하였다.

## 결 과

49예의 갑상선 유두암 조직에서 추출한 DNA를 이용하여 K-, N-, 그리고 H-ras의 엑손 1번과 엑손 2번을 각각 중



**Fig. 1.** A. Electrophoresis in 1.0% agarose gel using PCR products of K-, N- and H-ras from papillary thyroid carcinoma. M indicates molecular size marker. B. Representative results of SSCP for N-ras gene using 0.5 × MDE gel. There is no shift of band between 1 (normal control) and 2-4 (from papillary thyroid carcinomas).



**Fig. 2.** Representative direct sequences for exon-2 of N-ras gene using DNA from papillary thyroid carcinoma (A) and follicular carcinoma (B). B shows a mutation in heterozygosity at codon 61 (CAA --- AAA).

합효소연쇄반응으로 증폭하여 예상되는 크기(Table 1)의 DNA band를 얻었다(Fig. 1A). 갑상선 종양에서 얻은 DNA pair를 이용하여 시행한 SSCP에서는 한 예에서도 band의 위치이동은 관찰되지 않았다(Fig. 1B). SSCP의 낮은 민감도로 인하여 변이를 발견하지 못하였을 가능성을 배제할 수 없어 모든 예의 종양 DNA에서 엑손 1번과 2번을 증폭한 후 정제하여 직접 염기서열을 분석하였다.

유전자 염기서열 분석에서도 49예의 갑상선 유두암 조직 모두에서 K-, N-, 그리고 H-ras의 변이는 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 2A). 그러나 양성 대조군으로 사용한 갑상선 여포암과 양성 여포종양 조직에서는 이형접합체 변이를 관찰할 수 있었다(Fig. 2B).

## 고 찰

ras 암유전자 변이는 암으로의 형질전환과 암의 진행에서 중요한 역할을 한다. p21은 K-, N-, 그리고 H-ras 등의 유전자에 의해서 합성되며, GTPase 활성을 갖는 21 kD 크기의 monomeric GTP 결합단백으로 신호전달에 관여한다. ras 유전자 변이는 거의 대부분 코돈 12, 13, 61에서 하나의 염기가 교체되어 일어난다. Ras의 GTP 결합영역인 코돈 12와 13에 변이가 일어나면 GTP가 결합된 상태로 존재하는 반면, 코돈 61에 변이가 일어나면 내인성 GTPase 기능이 불활성화되어 p21 단백질이 계속 활성형으로 존재하게 된다[1]. 활성화된 ras는 일련의 신호전달과정을 통하여 핵 내의 유전자에 영향을 미친다. 현재까지 밝혀진 과정 중 대표적인 것이 RET/PTC → ras → raf → mitogen-activated protein (MAP) kinase/extracellular-signal-regulated kinase (ERK)를 통한 신호전달경로이다. 세포생식 신호를 핵으로 전달하는 키나아제들을 연속적으로 활성화시켜서 갑상선 세포의 증식을 자극시키는 대신 분화는 억제시킨다[6,7].

갑상선 유두암에서 RET/PTC 유전자 재배열은 서구지역의 성인에서 2.6~34%[15,16], ras 변이는 10-20%[17]로 보고되고 있고, 최근에 많이 연구되고 있는 BRAF 변이는 29~83%의 환자에서 발견되어 가장 흔한 발병기전으로 생각하고 있다[15,16]. 그러나 이러한 유전적 이상의 빈도는 종양의 아형과 지역에 따라 상당히 다양하게 보고된다.

갑상선 유두암의 RET/PTC 재배열에서 RET/PTC-1, -2, -3은 지역적인 분포와 검사방법의 민감도에 따라 2.5~34.5%까지 다양한 빈도로 보고되고 있다[18]. 환경적인 요인에 따라 요오드 결핍 지역에서는 RET/PTC-1, -2 재배열이, 방사선 조사에 의한 갑상선 유두암에서는 RET/PTC-3, -4 재배열이 많이 나타나[19,20] 요오드 섭취가 풍부한 지역에서의 빈도는 낮은 것으로 알려져 있다[21]. 한국인에서 RET/PTC 재배열은 박 등[8]과 정 등[9]이 각각 0% (0/24)와 12.9% (4/31)로 보고하여 서구에 비해 상대적으로 낮은 것을 알 수

있다.

2002년 갑상선암에서 발견된 이후 주요 관심의 대상이 되고 있는 BRAF 변이의 빈도는 최근까지 많은 연구들에서 갑상선 유두암의 29%[22]에서 83%[10]로 다양하게 보고되어 평균 44%로 추정된다. 그 아형에 따라 구분하여 빈도를 확인하였을 때 키 큰 세포 변이종에서 77~88%로 가장 높고, 다음으로 전형적인 유두암, 그리고 여포 변이종에서는 12~14%로 가장 낮게 나타난다[7]. 지역별로 비교하여 보았을 때 유럽을 포함한 외국의 자료에 비해 한국인에서 더 높은 빈도 (66~83%)로 보고되고 있다[10-13].

ras 유전자는 요오드 섭취가 충분한 지역에 비하여 요오드 결핍지역에서 더 높은 변이의 빈도를 나타낸다[23]. 갑상선 유두암에서 ras 변이 빈도는 0~56%로 매우 다양하게 보고되고 있으며[23~25], 전형적인 유두암보다는 유두암의 여포 변이종에서 더 높게 발견된다[24,26,27]. 여러 검사 방법들을 비교하였을 때 유전자 염기서열 분석으로 확인한 경우에 양성률이 가장 낮았고[28], 또한 한 센터에서 동일한 실험방법으로 검사를 시행하여 비교한 결과에서도 일본인과 대만인에서의 ras 변이가 각각 8.3%와 50%로 발견되어[29] 검사방법뿐만 아니라 지역적 특성에 따라서도 차이를 보인다.

따라서 지금까지 보고된 자료에 의하면 한국인의 갑상선 유두암에서 RET/PTC 재배열의 비율은 0~12.9%로 서구에 비해 비교적 낮으며[8,9], BRAF 변이는 약 66~83%로[10~13] 상대적으로 높다는 것을 알 수 있었다. 갑상선 유두암의 발병기전에 있어 RET/PTC 재배열, BRAF와 ras 변이의 유전자 이상이 전체의 2/3 정도를 차지하며, 이들이 상호배제적으로 발생한다[7]는 사실에 근거하여 추측하여 보았을 때, 우리나라 갑상선 유두암에서 ras 변이의 빈도는 당연히 낮을 것이라는 예측을 할 수 있다. 실제로 한국인 갑상선암에서의 ras 변이에 대한 빈도는 유일하게 하나의 논문에서만 보고되어 있는데, 여기서는 전체 61예의 갑상선 종양 중 2예(3%)에서 N-ras 변이가 발견되었고 세분하여 보았을 때 여포암과 여포선종에서 각각 1예씩 관찰되었으며, 유두암에서는 ras 변이는 발견되지 않았다[8]. 우리나라에서 그 이후에는 연구된 바가 없으나, 지역, 환경적으로 가까운 일본의 연구 결과에 비추어 보면[29] 일본과 유사하게 한국인에 발생하는 분화 갑상선 종양에서의 ras 변이 또한 요오드가 부족한 지역에 비해 드물게 나타날 것이라는 것을 예측해 볼 수 있다. 이번 연구에서도 예측한 바와 같이 49예의 갑상선 유두암 모든 예에서 ras 변이를 관찰할 수 없었다.

한국인을 대상으로 한 갑상선 이외의 종양에서의 ras 변이에 대한 빈도 분석에서도 다른 나라에 비해 변이의 비율은 낮게 보고되고 있다. 예를 들면, 비소세포성 폐암의 경우에 K-ras 변이가 외국에서 28~33%까지 보고되는데 비해 우리나라에서는 0% (0/25)로 관찰되었고[30], 췌장암의 경우

에도 K-ras 변이가 외국의 80~100%에 비하여 65% (31/48)로 낮게 보고되었다[31].

방법적인 측면에서 본 연구 대상에서 ras의 변이가 실제로 존재함에도 불구하고 연구자의 기술적인 문제로 인하여 발견하지 못하였을 가능성은 극히 적다. 전체 대상의 SSCP에서 정상 조직과 함께 비교하였을 때 band의 위치 이동은 관찰되지 않았고, SSCP의 민감도가 80% 정도로 알려져[32]있음을 고려하여 염기서열을 직접 분석하였음에도 갑상선 유두암에서는 코돈 12, 13, 그리고 61 어느 곳에서도 변이는 없었다. 따라서 최소한 본 연구의 주요 대상인 49예의 갑상선 유두암에서는 한 예에서도 K-, N-, H-ras의 변이는 없었고, 양성 대조군으로 함께 검사를 시행한 갑상선 여포암과 갑상선 여포선종에서는 각각 ras 변이를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 갑상선 종양 발생의 다단계과정에 대한 모델에서 ras 변이가 여포세포에서 여포선종으로의 진행과, 여포암 및 림프절 전이가 있는 유두암의 저분화암으로의 진행에만 관여하며, 여포세포의 유두암으로의 진행에는 관여하지 않을 것이라는 최근의 가설과 부합하는 소견이라 할 수 있다[6]. 그리고, 양성 대조군에서 발견된 ras 변이가 모두 이형접합체 변이었다는 점은 추후 ras 변이 검색 시에 염기서열분석 결과에서 이형접합체 변이의 가능성을 염두에 두고 이를 확인할 필요가 있다는 것을 시사한다.

결론적으로 갑상선 유두암 조직을 이용한 ras 유전자의 코돈 12, 13, 그리고 61의 변이 검색에서 한 예에서도 변이는 검출되지 않아서 적어도 한국인의 갑상선 유두암 발생에 ras 변이가 큰 역할을 하지는 않을 것이라고 추정할 수 있다. 그러나 본 연구의 대상이 적었고 특히 여포 변이종이 포함되지 않은 전형적인 유두암이었다는 것을 고려하였을 때 이를 포함하여 더 큰 집단을 대상으로 ras 변이의 존재 여부를 추가적으로 검색해 볼 필요성이 있다. 상기의 세가지 유전적 변이 이외에 다른 유전자가 관련되어 있을 가능성도 있으므로 다른 새로운 유전자에 대해서도 보다 많은 연구가 필요하다. 그리고, 앞서 언급한 바와 같이 지역적, 종족적으로 나타나는 특징일 가능성도 크게 고려되어야 하는데 이를 확인하기 위해서는 이민자들을 포함한 다종족으로 구성된 증례들에 대한 광범위한 조사가 도움이 될 것이다.

## 요 약

**연구배경:** RET/PTC 재배열 및 BRAF와 ras 변이는 갑상선 유두암의 발병기전에 잘 알려져 있는 암유전자이다. 한국인의 갑상선 유두암에서 RET/PTC 재배열과 BRAF 변이의 비율은 각각 0~12.9%와 66~83%를 차지한다. 본 연구에서는 한국인 갑상선 유두암에서 ras 변이의 빈도를 조사하여 ras 변이가 유두암 발생에 기여하는 정도를 알아보고자 하였다.

**방법:** 갑상선 유두암으로 진단된 49예의 조직을 대상으로 하였고 양성 대조군으로 갑상선 여포암과 양성 여포종양 조직을 사용하였다. ras 변이 검색을 위해 증합효소연쇄반응과 Single strand conformation polymorphism (SSCP), 유전자 염기서열 분석을 차례로 시행하였다.

**결과:** 49예의 갑상선 유두암 조직에서 K-, N-, 그리고 H-ras의 변이는 관찰되지 않았다. 그러나 양성 대조군으로 사용한 갑상선 여포암과 양성 여포종양 조직에서는 이형접합체 변이를 관찰할 수 있었다.

**결론:** 한국인의 갑상선 유두암 발생에 RET/PTC 재배열과 BRAF 변이는 기여하지만, ras 변이는 적어도 한국인의 갑상선 유두암 발생에는 큰 역할을 하지는 않을 것이라고 추정할 수 있다.

## 참 고 문 헌

1. Barbacid M: ras genes. *Ann Rev Biochem* 56:779-827, 1987
2. Manenti G, Pilotti S, Re FC, Della Porta G, Pierotti MA: Selective activation of ras oncogenes in follicular and undifferentiated thyroid carcinomas. *Eur J Cancer* 30A:987-993, 1994
3. 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* 116:1010-1016, 1994
4. Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, Pollan M, Herrero A, Pardo J, Wu R, Carcangiu ML, Costa J, Tallini G: ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol* 21:3226-3235, 2003
5. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA: 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, 2003
6. Kondo T, Ezzat S, Asa SL: Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 6:292-306, 2006
7. Xing M: BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer* 12:245-262, 2005
8. Park KY, Koh JM, Kim YI, Park HJ, Gong G, Hong SJ, Ahn IM: Prevalences of Gs alpha, ras, p53 mutations and ret/PTC rearrangement in differentiated thyroid tumours in a Korean population. *Clin*

- Endocrinol (Oxf) 49:317-323, 1998
9. Chung JH, Hahm JR, Min YK, Lee MS, Lee MK, Kim KW, Nam SJ, Yang JH, Ree HJ: Detection of RET/PTC oncogene rearrangements in Korean papillary thyroid carcinomas. *Thyroid* 9:1237-1243, 1999
10. Kim KH, Kang DW, Kim SH, Seong IO, Kang DY: Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei Med J* 45:818-821, 2004
11. Rha SY, Lee JC, Kwon KH, Lee HJ, Kim KS, Jo YS, Ku BJ, Shong M, Kim YK, Ro HK: The relationship between the BRAF mutations in thyroid papillary carcinomas and the prognostic factors. *J Korean Soc Endocrinol* 20:224-229, 2005
12. Kim TY, Kim WB, Rhee YS, Song JY, Kim JM, Gong G, Lee S, Kim SY, Kim SC, Hong SJ, Shong YK: The BRAF mutation is useful for prediction of clinical recurrence in low-risk patients with conventional papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 65:364-368, 2006
13. Park SY, Park YJ, Lee YJ, Lee HS, Choi SH, Choe G, Jang HC, Park SH, Park do J, Cho BY: Analysis of differential BRAF (V600E) mutational status in multifocal papillary thyroid carcinoma: evidence of independent clonal origin in distinct tumor foci. *Cancer* 107:1831-1838, 2006
14. Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG, Morrow M: *AJCC cancer staging manual*: 6th ed. pp77-79, New York, Springer-Verlag Press, 2002
15. Patel KN, Singh B: Genetic considerations in thyroid cancer. *Cancer Control* 13:111-118, 2006
16. Puxeddu E, Moretti S, Elisei R, Romei C, Pascucci R, Martinelli M, Marino C, Avenia N, Rossi ED, Fadda G, Cavaliere A, Ribacchi R, Falorni A, Pontecorvi A, Pacini F, Pinchera A, Santeusano F: BRAF (V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2414-2420, 2004
17. Namba H, Rubin SA, Fagin JA: Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 4:1474-1479, 1990
18. Sugg SL, Zheng L, Rosen IB, Freeman JL, Ezzat S, Asa S: Ret/PTC-1, -2, and -3 oncogene rearrangements in human thyroid carcinomas: implications for metastatic potential? *J Clin Endocrinol Metab* 81:3360-3365, 1996
19. Klugbauer S, Lengfelder E, Demidchik EP, Rabes HM: High prevalence of RET rearrangement in thyroid tumors of children from Belarus after the Chernobyl reactor accident. *Oncogene* 11:2459-2467, 1995
20. 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* 13:1093-1097, 1996
21. Wajjwalku W, Nakamura S, Hasegawa Y, Miyazaki K, Satoh Y, Funahashi H, Matsuyama M, Takahashi M: Low frequency of rearrangements of the ret and trk proto-oncogenes in Japanese thyroid papillary carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 83:671-675, 1992
22. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, Ohtsuru A, Saenko VA, Kanematsu T, Yamashita S: Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4393-4397, 2003
23. Said S, Schlumberger M, Suarez HG: Oncogenes and anti-oncogenes in human epithelial thyroid tumors. *J Endocrinol Invest* 17:371-379, 1994
24. Shi YF, Zou MJ, Schmidt H, Juhasz F, Stensky V, Robb D, Farid NR: High rates of ras codon 61 mutation in thyroid tumors in an iodide-deficient area. *Cancer Res* 51:2690-2693, 1991
25. Esapa CT, Johnson SJ, Kendall-Taylor P, Lennard TW, Harris PE: Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 50:529-535, 1999
26. Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE: Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol* 120:71-77, 2003
27. Liu RT, Hou CY, You HL, Huang CC, Hock-Liew, Chou FF, Wang PW, Cheng JT: Selective occurrence of ras mutations in benign and malignant thyroid follicular neoplasms in Taiwan. *Thyroid* 14:616-621, 2004
28. Vasko V, Ferrand M, Di Cristofaro J, Carayon P, Henry JF, de Micco C: Specific pattern of RAS

- oncogene mutations in follicular thyroid tumors. J Clin Endocrinol Metab 88:2745-2752, 2003
29. Naito H, Pairojkul C, Kitahori Y, Yane K, Miyahara H, Konishi N, Matsunaga T, Hiasa Y: Different ras gene mutational frequencies in thyroid papillary carcinomas in Japan and Thailand. Cancer Lett 131:171-175, 1998
30. Yoon HJ, Ju JY, Cho GJ, Kim EJ, Park KH, Kim KS, Ko YC, Lim SC, Kim YC, Park KO, Park JT: K-ras gene mutation in non-small cell lung cancer. J Lung Cancer 1:55-59, 2002
31. Kim YC, Choi KH, Kim HG, Lee ES, Son GS: Significance of K-ras mutation, K-ras expression and p53 expression in pancreatic cancer. Korean J Hepatobiliary Pancreat Surg 4:111-121, 2000
32. Orita M, Sekiya T, Hayashi K: DNA sequence polymorphisms in Alu repeats. Genomics 8:271-278, 1990