

# BRAF<sup>V600E</sup>에 의한 갑상선 유두암의 암화과정

충남대학교 의과대학 내과학교실, 을지대학교 의과대학 내과학교실<sup>1</sup>

송민호 · 조영석<sup>1</sup> · 노흥규

## Pathogenetic Mechanisms and Therapeutic Implications of BRAF<sup>V600E</sup> in Papillary Thyroid Cancer

Minho Shong, Young Suk Jo<sup>1</sup>, Heung-kyu Ro

*Division of Endocrinology, Laboratory of Endocrine Cell Biology, Department of Internal Medicine, Chungnam National University School of Medicine; and Department of Internal Medicine<sup>1</sup>, Eulji University School of Medicine*

### 서 론

RAF kinases 연구는 oncogene 발굴이 한창이던 20년 전에 v-RAF의 발견과 함께 시작되었다. Rapp [1]와 Bister [2] 등이 1983년에 CRAF 유전자를 클로닝 하였으며 척추동물에서 두 개의 RAF 동형 유전자인 ARAF와 BRAF가 밝혀져 현재 3종류의 동형(isoforms)이 존재한다[3]. 최근에 인체 암에서 BRAF와 CRAF 유전자변이가 알려지고 이러한 유전자 변이가 kinase 활성증가를 통하여 암을 유발함이 확인 됨에 따라서 RAF 활성을 억제하는 소분자 화합물을 이용한 암 치료가 가능할 것으로 추정되기 때문에 과거 어느 때보다 더 관심의 대상이 되고 있다.

RAF kinases의 활성은 Ras의 결합 및 인산화에 의하여 조절된다[4]. 그동안 RAF kinase의 주요 신호전달 기능은 MAP kinases (ERK1/2)의 활성화를 통한 세포의 성장, 분화, 세포 골격근 재배열에 관련된 세포 기능 조절에 초점이 맞추어져 있었다[6~8]. 인체 암의 약 30% 정도에서는 MAP kinases의 활성이상이 관찰되기 때문에 RAF를 통한 MAP kinases의 조절이 중요할 것으로 추정되고 있다. 최근 들어 갑상선 유두암을 비롯하여 흑색종, 대장암, 난소암에서 BRAF 유전자의 somatic mutation이 발견되었고, 이러한 유전자 변이는 RAF kinase의 활성증가와 함께 종양유발인자로 생각된다[4,9]. 특히 갑상선 유두암에서는 BRAF<sup>V600E</sup> 변이만이 관찰되고 있으며 다른 어느 암에 비해서도 변이 빈도가 높기 때문에 BRAF<sup>V600E</sup> 연구모형으로서 유두암이 중요한 모델이다.

BRAF<sup>V600E</sup> 변이는 유두암을 유발하는 가장 중요한 유전자

변이로서 암 발생, 진행, 및 전이 모든 과정에 관여할 것으로 추정된다. 따라서 BRAF<sup>V600E</sup> 변이는 kinase 활성을 억제할 수 있는 소분자 화합물 개발에 있어 중요한 표적으로 연구되고 있다[10].

본 논문에서는 BRAF kinase에 과거의 발견을 요약하고, 현재 연구의 한계점을 지적하면서 저자 등이 생각하는 새로운 BRAF<sup>V600E</sup> 변이에 의한 갑상선 유두암의 발생과정을 고찰하고자 한다.

### BRAF 및 BRAF<sup>V600E</sup> kinases의 분자생물학

RAF 동형들은 유사한 염기서열을 지니고 있으며 세 부분의 conserved region (CR)이 있다. Ras 결합 부위를 포함한 CR1, CR2와 kinase domain을 갖는 C-terminus의 CR3이며[9], 이러한 CR을 중심으로 RAF의 활성을 조절하는 주요한 인산화 부위가 분포한다(Fig. 1). 세 개의 동형들 중 ARAF가 약 68 kDa으로 가장 작으며, CRAF가 72~74 kDa 정도의 크기이다. BRAF의 경우 alternative splicing에 의해 75에서 100 kDa의 다양한 크기로 존재하는데 exon 10a의 포함여부에 따라 MEK를 활성화시키는 능력의 차이를 유발한다[11]. RAF의 동형들 간에 존재하는 이러한 구조적인 차이는 BRAF<sup>V600E</sup> 돌연변이의 경우 kinase 활성이 12.5배나 상승하는 반면에 CRAF에 유사한 돌연변이를 유발할 경우 kinase 활성이 오히려 10배가 감소하는 상반된 결과를 야기하기도 한다[11]. RAF 동형들은 조직 특이적인 발현 차이도 보이고 세포 내의 위치(subcellular localization)에서도 차이를 보인다. 예를 들어, BRAF와 CRAF가 모두 신경조직(neuronal tissue)에 많이 분포하나 BRAF는 신경돌기(neurite process)에 분포하는 반면, CRAF는 핵주변

\* 본 연구는 한국과학재단에서 시행하는 신약타겟 발굴사업(과제번호: 2007-03846)에 의하여 지원되었음.

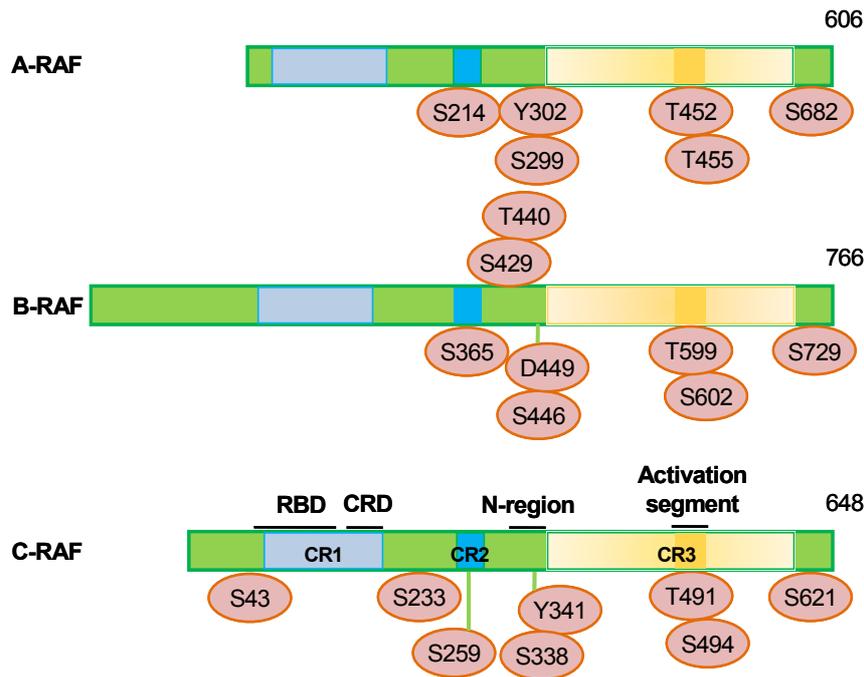


Fig. 1. RAF의 일차 구조비교.

(perinuclear)에 주로 존재한다[5]. 이는 RAF의 동형에 따라 특이적인 결합 지질 또는 단백질이 존재하고 이로 인해 특정 membrane raft로의 이동이 유도되는 서로 다른 조절기전이 존재함을 시사한다. 구조와 결합단백질의 차이는 BRAF가 Ras-Raf-Mek-Erk 경로 외에 NF- $\kappa$ B, MST-2 (mammalian sterile-20-like kinase), ASK1 (apoptosis signal regulating kinase 1), BAD (BCL-2-antagonist of cell death) 및 ROK- $\alpha$  등과 관련된 신호경로에 ARAF 및 CRAF와는 다른 영향을 미칠 수 있게 한다[10].

BRAF의 oncogenic activation도 N-terminus의 autoinhibitory region의 상실에 의한 v-Raf (retroviral oncogene derived from CRAF)의 활성화와는 다르다. BRAF 돌연변이는 활성분절(activation segment)이나 nucleotide binding loop (P loop)에서 집중적으로 발생하며 gain-of-function mutation으로 키나아제(kinase)의 활성화를 유발한다. 대부분의 키나아제와 마찬가지로 Raf kinase도 촉매 활성(catalytic activity)을 갖기 위해서는 활성부위의 인산화가 필요하며 활성분절에 존재하는 15~20개의 잔기(residue)가 인산화되면 catalysis에 적합한 구조로 활성분절이 안정화되게 된다. 야생형(wild type) BRAF의 경우 활성분절의 Val-600이 P-loop의 Phe-468과 소수성 결합(hydrophobic contact)을 하고 있어 DFG motif이 인산화 전이(phosphoryl transfer)에 적합한 배열을 이루지 못하게 하며 이를 통해 불활성화 상태를 유지한다. 그러나 발린(valine)이 글루탐산(glutamic acid)으로 치환될 경우 소수성 결합이 붕괴되고 이로 인해 활성화 상태가 지속되게 된다. 결국, 지금까지 알려진 45종류의 돌연변이 중

에 90%를 차지하고 있는 BRAF<sup>V600E</sup> 돌연변이는 활성분절에 존재하는 Thr599나 Ser602이 인산화된 야생형 BRAF와 유사한 구조를 가지게 되며[12], 이를 통해 Ras에 의한 활성화 없이도 Mek와 Erk의 순차적인 인산화를 지속적으로 유발하는 것이다.

Erk의 활성화는 mdm2의 발현을 조절함으로써 p53과 같은 종양 억제 유전자의 기능을 억제하며, 종양의 성장에 중요한 역할을 하는 VEGF (vascular endothelial growth factor)과 같은 혈관생성인자의 발현을 증가시킨다. 이와 더불어 세포의 증식을 유도하는 cyclin D1, 주변 조직으로의 침윤에 관여하는 integrin이나 성장 억제 신호에 저항을 띄게 하는 *c-myc*과 같은 유전자의 발현도 증가시키는 것으로 알려지고 있다. 또한, Erk는 BAD (BCL2-antagonist of cell death)나 CREB (cAMP responsive element binding protein)에 의해 유도되는 세포자연사(apoptosis)로부터 회피할 수 있도록 하며, myosin light chain kinase의 활성화를 통해 종양의 주변 조직으로의 침윤과 전이를 일으키기도 한다[11] (Fig. 2). 저자 등이 면역조직화학염색법을 통해 galectin-3, cyclooxygenase 2, cyclin D1, p53 및 VEGF의 발현을 확인한 결과에서도 BRAF<sup>V600E</sup> 돌연변이를 동반한 갑상선 암이 VEGF의 발현이 유의하게 증가되어 있음을 알 수 있었으며, 갑상선 암의 예후인자와 VEGF의 발현이 유의한 연관성을 가지고 있음을 알 수 있었다[13]. BRAF<sup>V600E</sup> 돌연변이에 의한 암화 과정은 NIH3T3 세포주나 BRAF<sup>V600E</sup> 형질전환 동물모델(transgenic animal model)을 이용한 실험에서 암세포로의 이행과 갑상선 유두암 및 미분화암의 발생

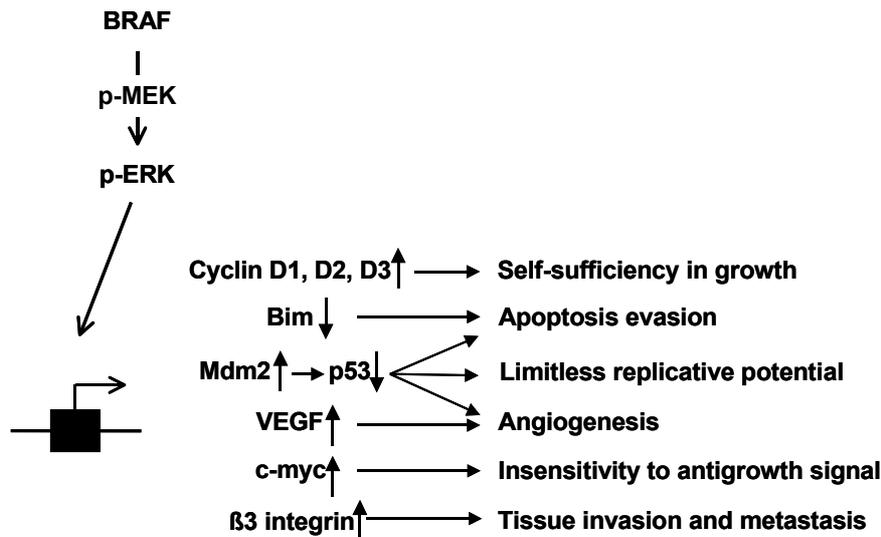


Fig. 2. BRAF<sup>V600E</sup> 돌연변이와 Erk의 활성화에 따른 종양 특이 단백질의 발현.

으로 이미 입증된 바도 있다[12,14]. 또한, 임상 연구를 통해서도 BRAF<sup>V600E</sup> 돌연변이가 갑상선암의 공격성에 기여할 것으로 추측할 수 있다. BRAF<sup>V600E</sup> 돌연변이는 갑상선암의 주변 조직으로의 침윤이나 암의 재발 및 요오드 섭취를 저하와 연관이 있다는 보고가 있으며[15] 또한 나쁜 임상경과를 취하는 갑상선 유두암의 이형인 tall cell variant에서 흔히 관찰된다[16]. 더불어 BRAF<sup>V600E</sup> 돌연변이가 갑상선암 중 가장 분화도가 나쁘며 예후가 불량한 anaplastic cancer에서도 발견된다[17].

### BRAF 및 BRAF<sup>V600E</sup> 네트워킹

RAF의 활성화는 Ras 이외에도 다양한 부위의 인산화에 의한 조절과정, oligomerization, 14-3-3과 같은 adaptor protein과의 결합 그리고 scaffold protein에 의한 조절이 관여한다. 특히 scaffold protein은 MAPK의 활성화를 조절하는 기작을 이해하는데 중요한 자료를 제공한다[6,18]. 다양한 외부신호에 반응하는 MAPK의 활성화가 특정신호를 인식하고 해당 신호에 적합한 단백질들만은 선택적으로 활성화시킬 수 있는 것은 scaffolding protein이 특정신호에 적합한 단백질들을 격리시켜 복합체를 만들기 때문이다. 즉, 진핵세포(eukaryotic cell)들은 염증신호(inflammatory signal), 환경 스트레스(environmental stress), 성장 신호 등과 같은 다양한 신호에 개별적으로 반응하기 위해서 관련 단백질의 복합체(signalosome)을 형성하는 것이다[19].

RAF 복합체는 Mlk3 (mixed lineage kinase3)-BRAF-CRAF 복합체와 CRAF-Mst2 복합체가 알려져 있다. Mlk3는 BRAF의 인산화에는 영향을 못 주지만, BRAF와 CRAF의 heterodimer 안정화에 기여한다. 이러한 결합은 BRAF의

활성화에 중요한 단계인 CRAF과의 상호작용에 필수적인 것으로 Mlk3를 억제(siRNA)할 경우 BRAF의 활성화가 Erk의 인산화를 유발하지 못 한다[20]. 현재 Mlk3 (mixed lineage kinase-3)-BRAF-CRAF 복합체의 정확한 구성은 알려지지 않았으나 CNK1 (connector enhancer of KSR1), Hsp90 (heat shock protein 90)과 Cdc37 등과 같은 샤프론(chaperone)과 scaffold protein이 포함되어 있다[21~23].

세포의 증식과 연관된 다양한 신호가 세포자연사를 촉발하는 것으로 알려져 있는데, 과도한 세포의 증식을 억제하려는 “failsafe mechanism”로 일컬어진다. 다시 말해 정상세포에서 이루어지는 프로그램에 의한 세포사(programmed cell death)는 증식의 억제와 세포자연사의 축진이 적절한 조화에 의해 이루어지는 것이다. 반대로, 암세포는 세포자연사를 억제하는 기전을 획득하여 통제되지 않는 세포의 증식을 유발하게 된다[19]. RAF 복합체와 연관된 failsafe mechanism으로는 Drosophila melanogaster에서 처음 확인된 Salvador-Wart-Hippo 경로(SWH pathway)가 있다[24]. Salvador (Sav)와 Hippo (Hpo)의 결합은 large tumor suppressor (Lats)의 인산화를 유발하고 활성화된 Lats는 Mps1-one binder-1 (dMob1)과 결합하여 Yorkie (Yki)의 인산화에 의한 불활성화를 유도한다. Yki가 불활성화된 세포는 cyclin E, Drosophilai inhibitor of apoptosis-1 (Diap1)의 발현을 유도하지 못하여 성장이 감소하고 사멸하게 된다[25]. SWH pathway는 포유류에서도 잘 보존되어 있는 것으로 판단되며 일례로 mammalian sterile 20-like kinase (MST)-1,2는 hWW45 (human orthologue of Sav)와 결합하여 인산화에 의한 LAT1, 2를 활성화 시킨다(Fig. 3). CRAF복합체는 안정상태에서 Mst2와 결합하여 억제하여 SWH pathway를 억제하지만, CRAF이 활성화되면 이러한 억제가 소실되고

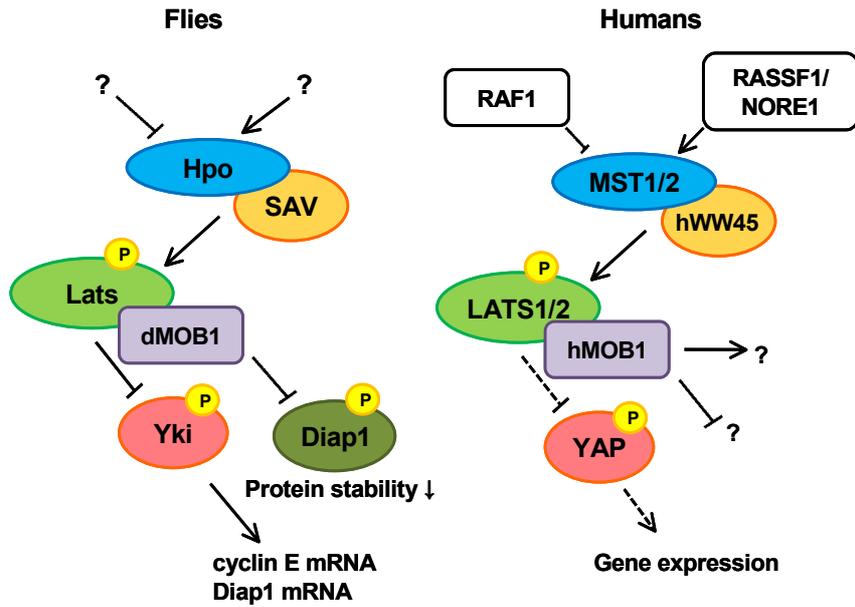


Fig. 3. Hpo-Lats 경로에 의한 세포의 성장과 사멸의 조절.

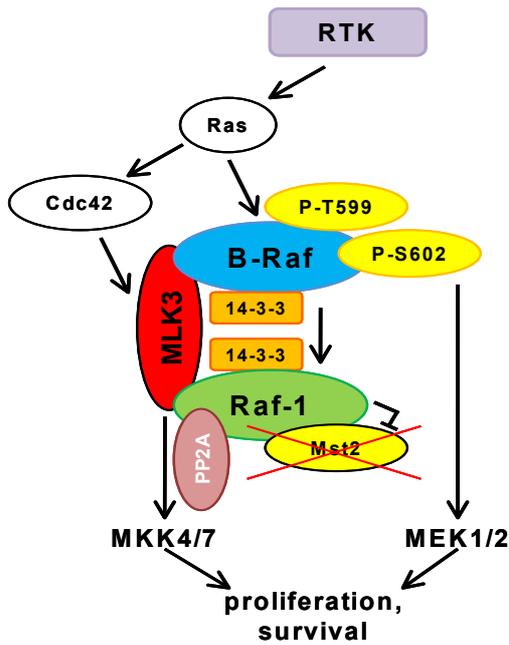


Fig. 4. Mik3-BRAF-CRAF 복합체와 CRAF-Mst2 복합체의 성장 신호 조절 모델.

Mst2에 의한 성장억제(growth arrest)와 세포자연사가 유발된다(Fig. 4).

현재까지 BRAF<sup>V600E</sup>에 의한 Mik3-BRAF-CRAF 복합체와 CRAF-Mst2 복합체의 변화 및 조절기전은 알려져 있지 않으나 BRAF<sup>V600E</sup>에 의한 SWH pathway의 변화를 몇 가지 추측할 수 있다. 첫째로, 야생형 BRAF은 MST1,2의 활성화를 유도하여 Lats1/2의 인산화를 유발하고 YAP (Yes-associated protein)의 인산화를 유도하지만, BRAF<sup>V600E</sup>의 경우 이러한

MST1,2의 활성화를 유도하지 못해 apoptosis를 회피할 수 있을 것으로 추측할 수 있다(가설 1). 저자 등이 실험한 바에 따르면 야생형 BRAF은 MST1,2의 인산화에 의해 FOXO1의 활성화를 증가시키지만 BRAF<sup>V600E</sup>의 경우는 MST1,2- FOXO1 경로에 영향을 주지 않았다. 둘째로 야생형 BRAF과 BRAF<sup>V600E</sup>에 CRAF 인산화가 차이가 있으므로 이로 인해 SWH경로에 미치는 영향이 다를 수 있다. BRAF은 endogenous CRAF의 활성을 유발하는 것으로 알려져 있는데 이는 ERK의 인산화에 대한 kinase 활성에도 영향을 주지만 CRAF의 MST1,2와의 결합에도 영향을 주게 된다. 즉, CRAF의 인산화는 CRAF-Mst2 복합체의 분리를 가져오며 이를 통해 유리된 MST2가 SWH 경로를 통하여 세포의 apoptosis를 유발하게 된다. *In vitro* kinase assay를 통하여 확인한 바에 따르면 BRAF<sup>V600E</sup>이 갖는 kinase activity가 ERK 인산화능은 뛰어난 반면 endogenous CRAF의 인산화에 대한 활성도는 낮은 것을 알 수 있다. 따라서 야생형 BRAF의 활성화는 CRAF의 인산화와 이로 인한 MST1/2의 활성화를 유도하여 세포자연사를 일으키는 반면에, BRAF<sup>V600E</sup>의 경우는 배타적인 ERK 인산화로 세포자연사를 회피할 가능성이 있다(가설 2).

#### BRAF<sup>V600E</sup> 소분자억제 화합물

BRAF<sup>V600E</sup> 돌연변이와 Erk의 활성화가 종양의 발생과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 규명됨에 따라 다양한 BRAF 소분자억제 화합물들이 개발되고 있다(Fig. 5). 이들 중 신세포암(advanced renal cell carcinoma)의 치료제로

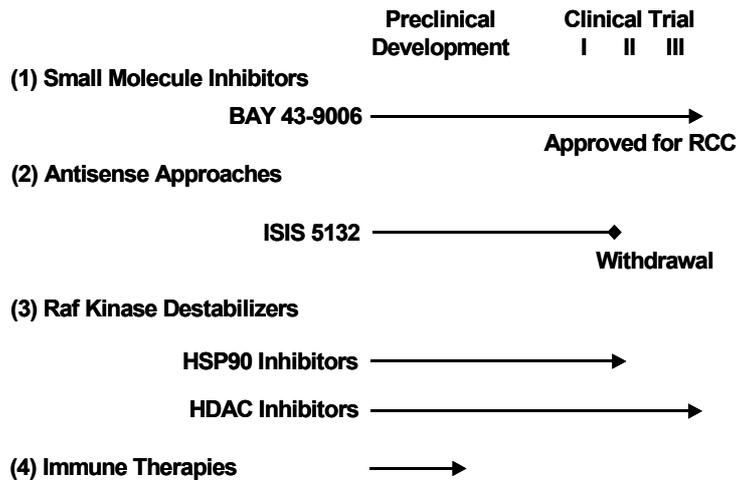


Fig. 5. 현재 연구 중인 RAF 단백질 표적 치료제(Schreck R et al.: Int J Cancer 2006).

2005년에 FDA의 공인을 받은 상태인 sorafenib (BAY 43-9006, Bayer, Onyx)이 대표적인 BRAF 억제제로 임상 연구 단계에 진입해 있다. Sorafenib은 CRAF를 표적으로 개발된 약물로 Raf kinase뿐만 아니라, VEGFR-2, VEGFR-3, FLT3 (FMS-like tyrosine kinase), PDGFR $\beta$  (platelet-derived growth factor receptor- $\beta$ ) 및 c-kit과 같은 tyrosine kinase도 억제하는 것으로 알려져 있다[10]. 따라서 sorafenib의 항암 작용은 Raf의 억제와 VEGFR이나 PDGFR에 의해 매개되는 종양의 혈관생성을 억제함으로써 나타날 것으로 추측할 수 있다. 그러나, sorafenib은 경구 복용이 가능하고 임상 연구 단계에 진입했다는 긍정적인 측면이 있는 반면에 inactive BRAF kinase에 결합해서 활성화를 억제하는 것으로 알려져 있다[4]. 따라서 sorafenib은 돌연변이 BRAF<sup>V600E</sup>보다 야생형 BRAF에 보다 효과적인 억제 능력을 갖는 단점이 있다. BRAF 억제제뿐만 아니라 BRAF<sup>V600E</sup> 돌연변이에 의한 Erk의 활성화의 차단을 위한 신약도 개발 중이다. 이들 중에는 non-ATP competitive Mek inhibitor인 CI-1040 (cyclopropylmethyl hydroxamate ester of an N-phenylanthranilic acid, Pfizer), PD0325901 (Pfizer) 및 ARRY-142886 (AstraZeneca) 등이 있다. Hsp90과의 결합을 억제함으로써 polyubiquitylation이나 프로테오솜 분해(proteosomal degradation)를 유도하는 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG)과 같은 Hsp90 억제제도 갑상선암의 치료제로서의 가능성이 연구되고 있다[26]. 그러나 이상과 같은 Ras-Raf- Mek-Erk 신호전달체계를 표적으로 하는 소분자억제 화합물들은 정상 세포의 성장과 분화를 억제하는데 따른 다양한 부작용을 극복해야 하는 과제를 가지고 있다. 참고로 sorafenib의 경우, 고혈압, 발진, desquamation, hand-foot reaction, 탈모, 홍조, 피로, 체중감소, 신경염 및 오심, 구토 등과 같은 소화기계 관련 부작용이 발생하였으며, 환자의 30%가 Grade 3 이상

의 부작용을 경험하였다.

## 결론 및 앞으로의 과제

갑상선암을 포함한 다양한 암에서 BRAF<sup>V600E</sup> 돌연변이가 발견된 이래로 BRAF<sup>V600E</sup> 돌연변이에 의한 단백질 구조의 변화가 밝혀졌으며 Ras와 무관하게 Erk의 인산화와 활성화를 지속적으로 유지할 수 있는 기전이 규명되고 있다. 또한, 이러한 지식을 바탕으로 Ras-Raf-Mek-Erk 경로를 표적으로 한 다양한 소분자억제 화합물들이 개발되어 임상시험 중에 있다. 그러나 임상시험에서 나타난 불충분한 효과와 정상 세포의 성장과 분화에 관여하는 신호전달체계를 억제하는데 따른 부작용을 극복해야 하는 과제도 남아 있다. 이와 더불어 BRAF를 포함하는 복합체와 다양한 단백질 간의 상호작용(protein-protein interaction)과 BRAF<sup>V600E</sup> 갑상선암에서 microRNA나 methylation과 같은 epigenetic alteration의 역할 등에 대한 연구를 바탕으로 한 신약의 개발도 필요할 것이다.

최근에 RAF 복합체의 형성과 성장신호의 전달 및 세포자연사 촉진 기전에 대한 세포생물학적 분석이 진행되고 있으며, 이러한 연구가 BRAF<sup>V600E</sup> 돌연변이에 의한 갑상선암이 세포자연사를 회피하는 기전을 제시하고 있다. 향후 Ras-Raf-Mek-Erk 경로의 억제와 세포자연사를 촉진하는 이원적인 작용점을 갖는 약물의 개발을 기대한다.

## 참 고 문 헌

1. Rapp UR, Goldsborough MD, Mark GE, Bonner TI, Groffen J, Reynolds FH Jr, Stephenson JR: Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene

- transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:4218-4222, 1983
2. Jansen HW, Ruckert B, Lurz R, Bister K: Two unrelated cell-derived sequences in the genome of avian leukemia and carcinoma inducing retrovirus MH2. *EMBO J* 2:1969-1975, 1983
  3. Marais R, Marshall CJ: Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer Surv* 27:101-125, 1996
  4. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R: Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116:855-867, 2004
  5. Chong H, Vikis HG, Guan KL: Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* 15:463-469, 2003
  6. Peyssonnaud C, Eychene A: The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell* 93:53-62, 2001
  7. Brtva TR, Drugan JK, Ghosh S, Terrell RS, Campbell-Burk S, Bell RM, Der CJ: Two distinct Raf domains mediate interaction with Ras. *J Biol Chem* 270:9809-9812, 1995
  8. Kao S, Jaiswal RK, Kolch W, Landreth GE: Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem* 276:18169-18177, 2001
  9. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R: The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:875-885, 2004
  10. Schreck R, Rapp UR: Raf kinases: oncogenesis and drug discovery. *Int J Cancer* 119:2261-2271, 2006
  11. Mercer KE, Pritchard CA: Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta* 1653:25-40, 2003
  12. 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* 417:949-954, 2002
  13. Jo YS, Li S, Song JH, Kwon KH, Lee JC, Rha SY, Lee HJ, Sul JY, Kweon GR, Ro HK, Kim JM, Shong M: Influence of the BRAF<sup>V600E</sup> mutation on expression of vascular endothelial growth factor in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3667-3670, 2006
  14. Knauf JA, Ma X, Smith EP, Zhang L, Mitsutake N, Liao XH, Refetoff S, Nikiforov YE, Fagin JA: Targeted expression of BRAF<sup>V600E</sup> in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res* 65:4238-4245, 2005
  15. Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, Carson KA, Vasko V, Larin A, Tallini G, Tolaney S, Holt EH, Hui P, Umbricht CB, Basaria S, Ewertz M, Tufano AP, Califano JA, Ringel MD, Zeiger MA, Sidransky D, Ladenson PW: BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6373-6379, 2005
  16. Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL, Fidler JP, Giordano TJ, Biddinger PW, Nikiforov YE: Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol* 30:216-222, 2006
  17. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Fagin JA, Nikiforov YE: 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, 2003
  18. Kolch W: Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351 Pt 2:289-305, 2000
  19. Kyriakis JM: The integration of signaling by multiprotein complexes containing Raf kinases. *Biochim Biophys Acta* 1773:1238-47, 2007
  20. Chadee DN, Kyriakis JM: MLK3 is required for

- mitogen activation of B-Raf, ERK and cell proliferation. *Nat Cell Biol* 6:770-776, 2004
21. Wartmann M, Davis RJ: The native structure of the activated Raf protein kinase is a membrane-bound multi-subunit complex. *J Biol Chem* 269:6695-6701, 1994
22. Zhang H, Wu W, Du Y, Santos SJ, Conrad SE, Watson JT, Grammatikakis N, Gallo KA: Hsp90/p50cdc37 is required for mixed-lineage kinase (MLK) 3 signaling. *J Biol Chem* 279:19457-19463, 2004
23. Jaffe AB, Hall A, Schmidt A: Association of CNK1 with Rho guanine nucleotide exchange factors controls signaling specificity downstream of Rho. *Curr Biol* 15:405-412, 2005
24. Harvey K, Tapon N: The Salvador-Warts-Hippo pathway - an emerging tumour-suppressor network. *Nat Rev Cancer* 7:182-191, 2007
25. Hergovich A, Stegert MR, Schmitz D, Hemmings BA: NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:253-264, 2006
26. da Rocha Dias S, Friedlos F, Light Y, Springer C, Workman P, Marais R: Activated B-RAF is an Hsp90 client protein that is targeted by the anticancer drug 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res* 65:10686-10691, 2005