

분화성 갑상선암과 관련된 유전자의 메틸화

서울대학교 의과대학 외과학교실, 서울대학교암병원 갑상선센터 외과, 서울대학교 의과대학 암연구소¹, 국립중앙의료원 외과²
태순영¹, 지현근¹, 김수진¹, 이규언¹, 윤여규^{1,2}

Gene Methylation Associated with Differentiated Thyroid Cancer

Soon Young Tae¹, Hyun-Keun Chi¹, Su-jin Kim¹, Kyu Eun Lee¹ and Yeo-Kyu Youn^{1,2}

Department of Surgery, Seoul National University Hospital and College of Medicine, Division of Surgery, Thyroid Center, Seoul National University Cancer Center and Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine¹, Department of Surgery, National Medical Center², Seoul, Korea

Epigenetic alteration changes expression of many genes, such as tumor suppressor gene and molecular specific gene, without change in DNA sequence. Cancers, including thyroid cancer, often exhibit an aberrant methylation of gene promoter regions, which is associated with loss of gene function. Aberrant methylation plays a fundamental role in tumorigenesis. Methylation of some genes tends to occur in certain types of thyroid cancer. Methylation of TIMP3, SLC5A8, p16, RAR β 2, DAPK genes is associated with papillary thyroid cancer. Some studies show that aberrant methylation is related to the BRAF V600E mutation. Methylation of PTEN and RASSF1A genes occurs commonly in follicular thyroid cancer. Methylation of thyroid-specific genes, such as sodium/iodide symporter, thyroid-stimulating hormone receptor, and SLC26A4 which encodes pendrin, also has a relation to thyroid cancer. Methylation of these genes could be utilized as markers to detect early disease, to define prognosis and to predict therapeutic targets of thyroid cancer.

Key Words: Epigenetics, Methylation, Thyroid cancer, Genes, Tumor suppressor

서론

후성학적 변성(epigenetic alteration)은 유전자의 염기 서열(nucleotide sequence)은 바뀌지 않지만, 유전자 발현(gene expression)을 변경하는 유전자의 변화이다.^{1,2)} Epigenetics라는 용어는 1942년 Waddington³⁾이 “유전자와 그에 따른 산물 간의 우연한 상호작용이 생명체에 표현형의 결과를 나타낸다”는 개념으로 처음 사용하였다. 1983년 Feinberg와 Vogelstein⁴⁾이 정상 세포에 비해 종양세포의 게놈(genome)에서 메틸화 상태

가 유의하게 감소되어 있다는 사실을 발표한 이후로, epigenetics는 종양 분야에서 많은 연구자들에게 관심의 대상이 되었다. 1989년에는 Greger 등⁵⁾이 retinoblastoma 환자에서 retinoblastoma suppressor gene promoter의 과메틸화를 보고하여, DNA의 메틸화가 종양억제유전자의 발현을 억제할 수 있음을 보고하였다.

후성학적 변성은 인간 유전자 발현의 조절에서 기본적인 역할을 한다.⁶⁾ 대표적인 후성학적 변성에는 DNA 메틸화(methylation)와 히스톤 변성(histone modification)이 있다.^{7,8)} DNA 메틸화는 CpG dinucleotide 중 cytosine residue의 5' 탄소 부위에 메틸기(CH₃)가 결합하는 것

Received January 15, 2014 / Revised May 10, 2014 / Accepted May 20, 2014

Correspondence: Kyu Eun Lee, MD, PhD, Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, 101 Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea

Tel: 82-2-2072-2018, Fax: 82-2-766-3975, E-mail: kyulee@medimail.co.kr

This study was supported by the Seoul National University Hospital Research Fund (Grant Number 04-2013-0070).

Copyright © 2014, the Korean Thyroid Association. All rights reserved.

© This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

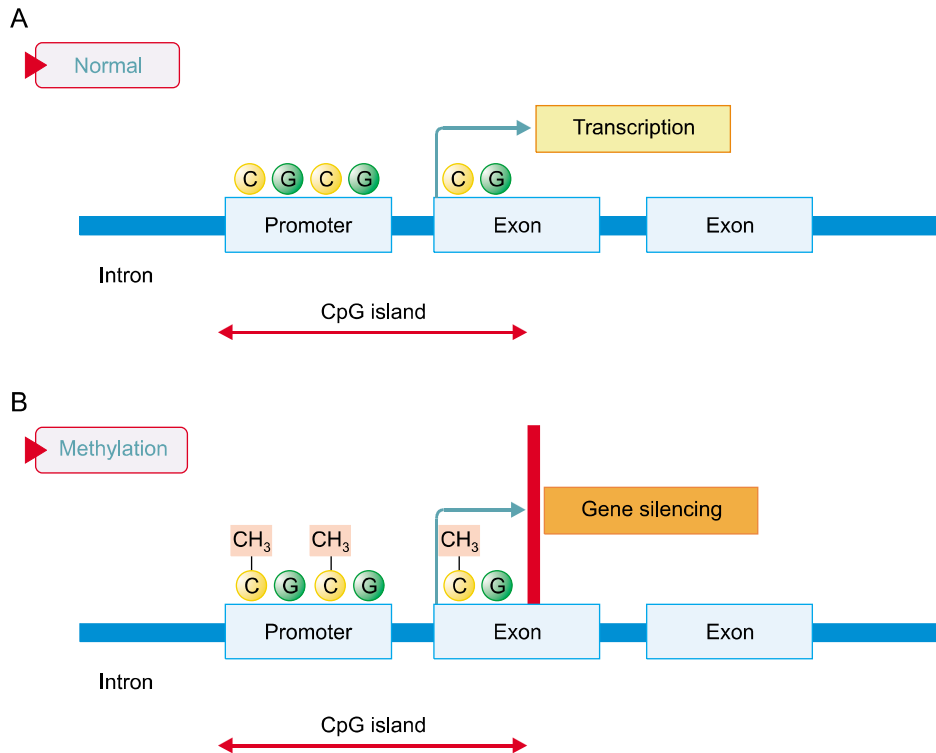


Fig. 1. CpG island methylation. (A) In a normal cell, CpG islands have no methylated cytosine residue and allow transcriptional activity. (B) DNA methylation at the 5 position of cytosine has the specific effect of reducing gene expression by gene silencing. Methylated CpG islands contribute to loss of gene function.

이다. CpG dinucleotide가 많이 모여 있는 부위를 CpG island라 명칭하고, 주로 promoter와 exon의 시작 부위에 위치한다(Fig. 1). 전사(transcription) 시작 부위 근처의 DNA 메틸화는 염색질(chromatin) 재구성(remodeling)과 연관이 있으며, 보통 유전자의 발현을 억제 한다.⁷⁾ DNA 메틸화가 유전자 발현을 억제하는 방법은 유전자와 유전자의 전사 기구(transcriptional machinery)의 결합을 막는 DNA methyl-binding transcription repressors를 구성하거나 DNA 메틸화가 직접적으로 transcription factor와 gene의 결합을 억제하는 것이다.⁹⁾

DNA 메틸화는 배아발생(embryogenesis) 동안 유전자 발현의 조절에 중요한 생리학적 메커니즘이고, 정상적으로는 비활성 X 염색체(inactive X chromosome)와 각인 유전자(imprinted gene)에 존재한다.^{10,11)} 반면 house-keeping gene과 같이 정상적으로 발현되는 유전자에서는 세포 내에서 메틸화를 막는다. Promoter에서 CpG island의 메틸화는 유전자 발현의 상실과 관련이 있기 때문에 정상 세포에서 메틸화로부터의 보호는 매우 중요하다.²⁾ 비정상적인 유전자 메틸화는 병적인 상태, 특히 암에서 흔히 발생하고, 이것은 유전자의 부적절한 비활성화(silencing)를 초래한다. 실제로 DNA 메틸화를 포함한 후성학적 변성은 유전적 변형(genetic alteration)과 함께 거의 모든 암에서 존재하며, 이것이 종양화를 유도하는 것으로 여겨지고 있다.¹²⁾

히스톤 변성(histone modification)은 아세틸화(acetylation)와 메틸화(methylation)가 대표적이며 유전자 조절(gene regulation)에 또 하나의 중요한 후성학적 변성이다.¹³⁾ 진핵생물(eukaryote)에서 DNA는 염색질 안에 존재한다. 염색질의 기본 구조인 nucleosome은 DNA fragments로 구성되어 있고, 이 DNA fragments가 히스톤 8량체(octamer)를 감싸고 있는 모습이다.¹⁴⁾ 히스톤의 N-terminal tail의 아세틸화(acetylation)와 탈아세틸화(deacetylation)는 histone acetyltransferase와 histone deacetylase에 의해 조절되고, 히스톤의 아세틸화는 유전자의 발현(expression)을 억제한다. 이런 비정상적인 후성학적 변성은 중요한 유전자의 조절(regulation)을 방해하고, 갑상선암을 포함하여 여러 종류의 암형성(tumorigenesis)에 중요한 역할을 한다.⁶⁾

본 논문은 갑상선암과 관련된 후성학적 변성 중 유전자의 비정상적인 메틸화에 대한 연구들을 살펴보고자 한다. 임상 검체에서 염색질의 변화를 확인하기 어려운 반면 DNA 메틸화 관련 유전자들은 보존이 용이하여 암과 관련된 후성학적 연구는 주로 유전자의 메틸화에 대한 연구가 주를 이루고 있다.¹⁵⁾ DNA의 메틸화는 메틸기가 결합된 cytosine에 대한 methyl-binding protein 항체(antibody)를 이용하여 정제(purified)할 수 있다.¹⁶⁾ 대부분의 연구에서 유전자 DNA 메틸화의 검출법은 methylation specific polymerase chain reaction (MSP)

으로 특정화된 메틸화 또는 비메틸화 primer를 이용하여 메틸화 여부를 확인하는 방법과 정량적(quantitative) MSP를 이용하였다. miRNA를 조절하는 유전자 부위의 DNA 과메틸화는 miRNA의 발현을 억제하고, 그 결과 mRNA 분해(degradation)나 translation의 억제를 유발한다.¹⁷⁾ DNA 메틸화에 대해 많이 연구되고 있는 다른 암과 마찬가지로 갑상선암에서도 종양억제유전자의 비정상적인 메틸화는 흔하게 발생한다.^{1,2,6)} 종양억제유전자들은 다양한 메커니즘을 통해 종양을 억제하는 기능을 가지고 있다. 따라서 메틸화에 의해 이 유전자들이 비활성화(silencing)되는 것은 갑상선의 종양 형성에 매우 중요한 역할을 한다고 생각할 수 있다.⁶⁾

갑상선유두암에서 종양억제유전자의 비정상적인 메틸화

갑상선유두암은 갑상선 여포 상피 세포에서 유래되

는 갑상선암 중 80% 이상을 차지한다.¹⁸⁾ 갑상선유두암과 연관성이 있는 종양억제유전자의 메틸화는 TIMP3 (tissue inhibitor of metalloproteinase 3), SLC5A8 (solute carrier family 5, member 8), p16, RAR β 2 (retinoic acid receptor beta 2), DAPK (death-associated protein kinase), RUNX3 (runt-related transcription factor 3) 등의 유전자들이 많이 연구되고 있다(Table 1).¹⁹⁻²³⁾

TIMP3는 암의 성장(growth)과 혈관 생성(angiogenesis), 침범(invasion), 전이(metastasis)를 억제하는 metalloproteinase의 조직 억제자(inhibitor)로 알려져 있다.²⁴⁻²⁷⁾ 이 유전자는 갑상선암을 비롯한 여러 암에서 과메틸화가 발견되었다.^{24,28-30)} Hu 등¹⁹⁾은 갑상선유두암 조직에서 RNA를 분리하고 quantitative methylation specific polymerase chain reaction (QMSP)을 통해 TIMP3의 메틸화를 분석하였다. 갑상선유두암 조직 231개 중 122개(53%)에서 TIMP3 promoter의 과메틸화가 발견되었으며, TIMP3 메틸화가 확인된 군은 메틸화가 발견

Table 1. Methylation of tumor suppressor genes associate with papillary thyroid cancer

Gene	Methods	nMe/N (%)	Clinical signification	References
TIMP3	QMSP	122/231 (53%)	Extrathyroidal invasion Lymph node metastasis Multifocality	Hu et al, 2006
	QMSP	22/44 (51%)	Lack of tissue inhibitor of metalloproteinase and antagonist of angiogenesis	Brait et al, 2012
SLC5A8	MSP	9/10 (90%)	Thyroid tumorigenesis	Porra et al, 2005
	QMSP	76/231 (33%)	Extrathyroidal invasion Multifocality Advanced tumor stage	Hu et al, 2006
	QMSP	34/86 (40%)	Increase of the amount of circulating cf-DNA	Zane et al, 2013
P16	MSP	17/35 (48%)	No association with clinical characteristics	Kim et al, 2010
	MSP	18/44 (41%)	High AMES risk group Advanced tumor stage	Lam et al, 2007
	MSP	10/25 (40%)	No association with clinical characteristics	Mohammadi-asl et al, 2011
	MSP	3/12 (25%)	Advanced tumor stage	Schagdarsurengin et al, 2002
	MSP	20/74 (27%)	Metastasis High AMES risk group	Wang et al, 2013
RAR β 2	QMSP	50/231 (22%)	No association with clinical characteristics	Hu et al, 2006
	QMSP	23/138 (17%)	Association with smoking	Kiseljak-Vassiliades et al, 2011
DAPK	QMSP	78/231 (34%)	Multifocality	Hu et al, 2006
RUNX3	QMSP	10/12 (83%)	Diagnostic marker	Ko et al, 2012
Rap1GAP	MSP	58/75 (71%)	Silencing of gene	Zuo et al, 2010

AMES: age-metastasis-extent-size, cf-DNA: cell-free DNA, DAPK: death-associated protein kinase, MSP: methylation specific polymerase chain reaction, nMe/N: number of cases with methylation/total, QMSP: quantitative methylation specific polymerase chain reaction, Rap1GAP: Rap1 GTPase-activating protein, RAR β 2: retinoic acid receptor beta 2, RUNX3: Runt-related transcription factor 3, SLC5A8: solute carrier family 5 member 8, TIMP3: tissue inhibitor of metalloproteinase 3

되지 않은 군에 비해 갑상선의 침윤(extrathyroidal invasion), 림프절 전이(lymph node metastasis), 다원성(multifocality)이 유의하게 많다고 보고하였다. Brait 등³¹⁾은 15개의 정상 갑상선 조직, 44개의 양성 갑상선 병변 조직, 44개의 갑상선암 조직을 QMSP를 통해 분석하여 각각 4개(27%), 18개(42%), 22개(51%)의 조직에서 TIMP3의 메틸화가 발견되었음을 보고하였다. 즉, TIMP3의 메틸화가 metalloproteinase의 억제자와 신생혈관생성(angiogenesis)의 길항제(antagonist)의 기능을 상실하게 하는 것으로 여겨진다.²⁷⁾

SLC5A8은 짧은 사슬지방산(short-chain fatty acid)의 Na^+ -coupled transporter로써 갑상선 조직을 포함한 인간의 여러 조직에서 발현된다.^{22,32)} Histone deacetylase를 억제하는 butyrate, propionate, pyruvate의 섭취(uptake)를 조절함으로써 종양 억제의 기능을 하는 것으로 알려진 이 유전자는 여러 암에서 메틸화가 발견되었다.³³⁻³⁶⁾ Porra 등²²⁾은 MSP를 통해 10개의 갑상선유두암 조직 중 9개에서, 6개의 여포 변종 갑상선유두암(follicular variant of papillary thyroid carcinoma) 조직 중 2개에서 SLC5A8 유전자의 메틸화를 확인하였고, 4개의 갑상선 선종 조직에서는 SLC5A8 유전자의 메틸화를 확인하지 못하였음을 보고하였다. 이는 SLC5A8 유전자의 메틸화가 갑상선유두암과 밀접한 연관성이 있음을 시사한다. Hu 등¹⁹⁾은 QMSP를 이용하여 SLC5A8 유전자의 메틸화를 조사하여, SLC5A8 유전자의 메틸화가 있는 갑상선유두암 조직 76개와 SLC5A8 유전자의 메틸화가 없는 갑상선유두암 조직 155개를 비교하였다. 이 유전자의 메틸화는 갑상선유두암의 갑상선 외 침윤, 다원성, 진행된 종양 단계(advanced tumor stage)와 연관이 있음을 보고하였다. Zane 등³⁷⁾은 QMSP를 통해 갑상선유두암 조직 86개 중 34개(40%)에서 SLC5A8 유전자의 과메틸화를 확인하였다. 또한, 과메틸화가 발생한 군은 그렇지 않은 군에 비해 혈장(plasma) 내에 circulating cell-free DNA(cf-DNA)의 양이 증가함을 관찰하였다. 이는 비침습적인 방법을 통해 갑상선유두암을 조기 진단할 수 있는 가능성을 제시한 것이다.

p16 종양억제유전자는 갑상선암을 포함한 인간에서 발생하는 종양과 관련하여 가장 많이 연구된 유전자 중 하나이다.³⁸⁾ 이 유전자는 cyclin-dependent kinase(CDK)를 억제하는 단백질로서 CDK4에 특징적으로 결합하여, 세포 주기(cell cycle)의 G1기를 조절하는 CDK-cyclin D complex의 기능을 억제한다.³⁹⁾ Kim 등⁴⁰⁾은 35개의 갑상선유두암 조직을 MSP를 이용하여 조사하였고, 17개(48.6%)의 조직에서 p16 유전자의 메틸화

를 발견하였다. 이 중 16개의 조직에서 p16 단백질 소실이 발생함을 확인하였다. 하지만 p16 단백질이 소실된 군과 소실되지 않은 군에서 임상병리학적 차이는 없었다. Lam 등³⁸⁾은 MSP를 이용하여 44개의 갑상선유두암 조직을 조사하였다. 이 중 18개(41%)의 조직에서 p16 유전자의 메틸화를 발견하였고, 이 유전자의 메틸화가 발견된 군은 메틸화가 발견되지 않은 군에 비해 AMES (age-metastasis-extent-size)의 높은 위험도를 보이며, 진행된 종양 단계를 보인다고 보고하였다. Mohammadi-asl 등²¹⁾은 양성 갑상선 종양과 갑상선유두암 조직을 각각 25개씩 MSP를 통해 조사하였고, 7개(28%)와 10개(40%)의 조직에서 메틸화를 보여, 갑상선유두암에서 유의하게 많은 p16 유전자의 메틸화가 발생함을 보고하였다. 하지만 유전자의 과메틸화 유무에 따른 임상적 차이는 보이지 않는다고 하였다. Schagdarsurengin 등⁴¹⁾은 MSP를 통해 갑상선유두암 조직을 조사하였고, 12개의 조직 중에 3개(25%)의 조직에서 메틸화가 발견되었음을 보고하였다. p16 유전자의 과메틸화는 진행된 종양 단계와 연관이 있음을 보고하였다. Wang 등²³⁾은 74개의 갑상선유두암 조직과 21개의 정상 갑상선 조직의 MSP를 이용한 조사 결과, 갑상선유두암 조직의 27% (20개)에서 p16 유전자의 메틸화가 발견되었고, 정상 갑상선 조직에서는 메틸화가 발견되지 않음을 보고하였다. 또한, 메틸화가 발견된 갑상선유두암 군이 그렇지 않은 군보다 전이가 유의하게 많았으며, AMES의 고위험군 환자가 많았다고 보고하였다.

RAR β 2 유전자는 nuclear transcriptional regulators의 thyroid-steroid hormone receptor family 중 하나로서, retinoic acid receptor beta를 표현(encoding)한다. 이 유전자는 retinoic acid에 결합하여 배아기 형태발생(embryonic morphogenesis), 세포 성장(cell growth) 과분화(differentiation) 시기에 세포 신호(cellular signaling)를 조절함으로써 종양 억제유전자의 역할을 한다.⁴²⁾ Hoque 등⁴³⁾이 QMSP를 통해 양성 갑상선질환 군과 갑상선유두암 군을 비교하였고, 갑상선유두암 군에서 RAR β 2 유전자의 메틸화가 의미 있게 많음을 보고하였다. 반면, Mohammadi-asl 등²¹⁾은 QMSP를 통해 갑상선의 양성 종양 조직 25개와 갑상선유두암 조직 25개를 분석하였으나, RAR β 2 유전자의 메틸화 정도의 정량적 차이가 없음을 보고하였다. Hu 등¹⁹⁾은 QMSP를 통해 231개의 갑상선유두암 조직 중에 50개(22%)의 조직에서 메틸화를 발견하였으나, 갑상선유두암의 임상병리학적 특징과의 연관성은 없다고 보고하였다. RAR β 2 유전자의 메틸화와 갑상선유두암에 대한 연구 중 흡연과 관련된 보고도 있었

다. Kiseljak-Vassiliades와 Xing⁴⁴⁾은 QMSP를 이용하여 138개의 갑상선유두암 조직을 조사하였고, 흡연력이 있는 환자의 조직 42개와 흡연력이 없는 환자의 조직 96개 중 각각 13개(31.0%), 10개(10.4%)의 조직에서 RAR β 2 유전자의 메틸화를 발견하였다. 이에 흡연이 RAR β 2 유전자의 메틸화와 연관이 있을 것이라고 제안하였다.

DAPK는 최근 새롭게 밝혀진 종양억제유전자로 calcium/calmodulin-dependent serine/threonine kinase이며, 다양한 proapoptosis 기능을 통해 종양 억제 기능을 한다.⁴⁵⁾ 이 유전자 역시 여러 암에서 비정상적인 과메틸화가 발생하여 비활성화된다.⁴⁵⁻⁴⁸⁾ Hu 등¹⁹⁾은 QMSP를 이용하여 231개의 갑상선유두암 조직을 조사하였고, 이중 DAPK 유전자의 과메틸화가 없는 군에 비해 과메틸화가 있는 78개(34%)의 조직군에서 다원성이 의미 있게 많음을 보고하였다.

RUNX3는 epithelial proliferation과 apoptosis의 조절에 관여하는 강력한 종양억제유전자이다.^{49,50)} Ko 등²⁰⁾은 12개의 갑상선유두암 조직과 5개의 정상 갑상선 조직을 QMSP를 통해 RUNX3 유전자의 메틸화를 조사하였다. 갑상선유두암 조직 중 10개(83%)에서 이 유전자의 메틸화가 발견되었고, 반면 정상 갑상선 조직에서는 메틸화가 확인되지 않았다. 따라서 RUNX3 유전자의 메틸화가 갑상선유두암의 진단적 표지자로서 유용할 수 있음을 제시하였다.

Rap1은 small GTPase의 Ras family 중 하나로, 갑상선에서 mitogenic pathway와 oncogenic pathway의 조절에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.^{51,52)} GTPase 활성 단백질인 Rap1GAP은 GTP를 GDP로 hydrolysis 시켜 Rap1의 활성화를 억제함으로써 종양억제유전자의 역할을 한다.^{53,54)} Zuo 등⁵⁵⁾은 75개의 갑상선유두암 조직을 MSP를 이용하여 조사하였고, 58개(71%)의 조직에서 Rap1GAP 유전자의 메틸화가 확인되었다고 보고하였다. Rap1GAP 유전자의 메틸화는 이 유전자가 발현되지 않는 것과 유의한 상관관계가 있다고 보고하였다. 반면 5개의 정상 갑상선 조직에서는 Rap1GAP 유전자의 메틸화가 발견되지 않았다고 하였다.

BRAF mutation과 관련 있는 종양억제유전자의 비정상적인 메틸화

BRAF 유전자의 돌연변이는 갑상선유두암에서 발생하는 가장 흔한 유전적 변화이다.⁵⁶⁻⁵⁸⁾ 그중에서 V600E mutation (T1799A)은 갑상선유두암의 BRAF mutation

중 90% 이상에서 나타난다.⁵⁹⁾ 이 돌연변이는 V600E amino acid를 BRAF kinase로 변화시켜 kinase의 지속적인 활성화를 야기시킨다. 여러 임상 연구에서 갑상선유두암의 공격적인 임상적 특징과 재발이 BRAF mutation과 연관이 있음을 보여줌으로써 BRAF mutation이 갑상선유두암의 경과에 중요한 역할을 할 것으로 여겨진다.^{57,60-62)} 그 분자 메커니즘은 아직 명확하진 않지만, 몇몇 종양억제유전자의 비정상적인 메틸화가 BRAF mutation과 관련이 있다고 보고되고 있다.^{19,31,63)}

Hu 등¹⁹⁾은 TIMP3, SLC5A8, DAPK 유전자의 비정상적인 메틸화로 인한 비활성화가 BRAF V600E mutation에 의해 촉진되는 갑상선유두암 발생에 중요한 역할을 할 것이라고 제안하였다. Hoque 등⁴³⁾은 11개의 methylation marker (RAR β 2, RASSF1A, CDH1, TSHR, TIMP3, CALCA, TGF- β , S100A2, p16, GSTpi, DAPK)와 BRAF V600E mutation의 상관관계를 조사하여, RAR β 2와는 양의 상관관계를, RASSF1A과는 음의 상관관계를 보인다고 보고하였다. Brait 등³¹⁾은 BRAF V600E mutation이 TIMP3, RAR β 2 유전자의 메틸화와 양의 상관관계를 보이고, RASSF1A 유전자의 메틸화와는 음의 상관관계를 보인다고 보고하였다. RASSF1A 유전자에 대하여 Xing 등⁶⁴⁾은 BRAF V600E mutation이 RASSF1A 유전자의 과메틸화와 반비례관계(inverse relationship)라고 보고하였으나, Santoro 등⁶⁵⁾은 BRAF V600E mutation과 RASSF1A 유전자의 메틸화는 갑상선암 발생의 초기에 중요한 역할을 하며 갑상선유두암의 좋지 않은 임상적 경과와 관련이 있다고 주장하였다. Porra 등²²⁾은 갑상선유두암에서 SLC5A8 유전자의 메틸화에 의한 유전자 발현 저하는 MAPK pathway를 지속적으로 활성화하여 BRAF V600E mutation을 유발할 수 있다고 제안하였다.

Mismatch repair pathway의 결손에 의해 발생한 microsatellite instability (MSI)는 다양한 암과 관련이 있다. 대장암에서 mismatch repair gene인 human Mut-L homologue 1 (hMLH1) 유전자의 메틸화는 MSI와 연관이 있다는 보고가 있다.⁶⁵⁾ Guan 등⁶⁶⁾은 MSP를 이용하여 38개의 갑상선유두암 조직 중 8개(21%)에서 hMLH1 유전자의 메틸화를 확인하였다. hMLH1 유전자의 메틸화가 발견된 군은 그렇지 않은 군에 비해 림프절 전이와 BRAF V600E mutation이 유의하게 많았다고 보고하였다. Santos 등⁶⁷⁾은 MSP를 통해 갑상선유두암, 갑상선여포암, 양성 갑상선 종양의 조직에서 hMLH1 유전자의 메틸화를 조사하였고, 각각 44% (31/70), 33% (4/12), 64% (9/14)에서 메틸화가 발견되어 각 군의 유의한 차

이는 보이지 않았다. 하지만 hMLH1 유전자의 낮은 발현은 BRAF V600E mutation, RET/PTC rearrangement, 그리고 isocitrate dehydrogenase 1과 NRAS 유전자의 mutation과 연관이 있음을 보고하였다.

최근 BRAF V600E mutation이 vascular endothelial growth factor (VEGF)의 과발현(overexpression)과 연관성이 있다는 보고도 있다.⁶⁸⁾ TIMP3는 metalloproteinase inhibitor이면서 VEGF receptor antagonist이기도 하다.²⁷⁾ TIMP3 메틸화에 의한 비활성화와 VEGF의 과발현이 BRAF V600E mutation의 발생에 관여하여 BRAF mutation-promoted PTC의 예후와 공격적인 성향의 중요한 메커니즘으로 작용할 것으로 여겨진다.⁶⁾

갑상선여포암에서 종양억제유전자의 비정상적인 메틸화(Table 2)

PTEN (phosphatase and tensin homolog) 유전자는 phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate를 탈인화(dephosphorylation)시켜 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway의 신호(signaling)를 종료시키는 phosphatase를 표현(encoding)한다. PI3K/AKT pathway는 세포의 증식과 생존에 중요한 역할을 하며, 이것이 비정상적으로 활성화 되었을 경우 암을 유발한다.⁶⁹⁾ Alvarez-Núñez 등⁷⁰⁾은 46개의 갑상선유두암, 7개의 갑상선여포암, 6개의 여포상 선종, 그리고 39개의 정상 갑상선 조직을 MSP를 이용하여 조사하였다. 갑상선유두암 21개(45.7%), 갑상선여포암 6개(85.7%), 여포상 선종 5개(83.3%)의 조직에서 각각 PTEN 유전자의 과메틸화가 발견되었고, 정상 갑상선 조직에서는 비정상적인 메틸화가 발견되지 않았다. 이에 PTEN 유전자의 과메틸화가 갑상선암의 발생에 영향을 미치며, 특히 여포상 종양에서 중요한 역할을 할 것이라고 제안하였다. Hou

등⁷¹⁾은 QMSP를 통해 양성 갑상선 선종 조직 42개, 갑상선여포암 조직 65개, 그리고 갑상선미분화암 조직 36개의 PTEN 유전자의 과메틸화를 조사하였다. 그 결과 갑상선미분화암에서 25개(69%)로 과메틸화가 가장 많이 발견되었고, 갑상선여포암 33개(51%), 양성 갑상선 선종 5개(12%) 순으로 과메틸화가 발견되었으며, 그 차이가 통계학적으로 유의함을 보고하였다. 이에 PTEN 유전자의 메틸화 정도가 갑상선암의 진행(progression)에 기여할 것으로 여겨진다고 제안하였다.

RASSF1A 유전자는 Ras와 관련된 pathway에 작용하는 신호 단백질(signaling protein)을 표현(encoding)하는 유전자로서 많은 암과 더불어 갑상선암에서도 메틸화가 관찰된다.⁷²⁾ RASSF1A 유전자는 세포자연사(apoptosis)와 세포 주기 정지(cell cycle arrest)를 촉진하고, 세포주(cell line)에서 암세포 발생의 억제가 확인된 종양억제 유전자이다.⁷³⁾ Schagdarsurengin 등⁴¹⁾은 QMSP를 통해 RASSF1A 유전자의 메틸화 상태를 조사하여, 1개의 갑상선선분화(poorly differentiated)암 조직 중 1개(100%), 5개의 갑상선수질암 조직 중 4개(80%), 10개의 갑상선여포암 조직 중 7개(70%), 9개의 갑상선미분화(undifferentiated)암 조직 중 7개(78%), 13개의 갑상선유두암 조직 중 8개(62%)의 조직에서 확인하였다. 갑상선암세포주 9개에서는 모두 과메틸화를 확인하였으며, 4개의 정상 갑상선 조직에서는 1개(25%)에서만 과메틸화가 나타났다고 보고하였다. Xing 등⁶⁴⁾은 QMSP를 통해 9개의 양성 갑상선 선종 중 4개(44%), 12개의 갑상선여포암 중 9개(75%), 30개의 갑상선유두암 중 6개(20%) 조직에서 RASSF1A 유전자의 과메틸화를 확인하였다. 반면 14개의 정상 갑상선 조직에서는 RASSF1A 유전자의 과메틸화가 나타나지 않았다고 보고하였다. 이에 RASSF1A 유전자의 비정상적인 메틸화는 양성 갑상선 선종의 형성과 갑상선여포암과 갑상선유두암의 진행에 중요한 역

Table 2. Methylation of tumor suppressor genes associated with follicular thyroid carcinoma

Gene	Methods	Frequency (nMe/N [%])			References
		FA	FTC	PTC	
PTEN	MSP	5/6 (83%)	6/7 (86%)	21/46 (46%)	Alvarez-Núñez et al. 2006
	QMSP	5/43 (12%)	25/65 (51%)	No exam.	Hou et al. 2008
		PTC	FTC	Normal	
RASSF1A	QMSP	8/13 (62%)	7/10 (70%)	1/4 (25%)	Schagdarsurengin et al. 2002
	QMSP	6/30 (20%)	9/12 (75%)	0/14 (0%)	Xing et al. 2004

FA: follicular adenoma, FTC: follicular thyroid cancer, MSP: methylation specific polymerase chain reaction, nMe/N: number of cases with methylation/total, PTC: papillary thyroid cancer, PTEN: phosphatase and tensin homolog gene, QMSP: quantitative methylation specific polymerase chain reaction, RASSF1A: ras association domain family 1 isoform A

할을 할 것이라고 제안하였다.

갑상선암에서 갑상선 특이 유전자의 비정상적인 메틸화

갑상선은 우리 몸에 정상적인 대사에 관여하는 갑상선호르몬을 만들기 위해 요오드(iodide)를 섭취, 농축, 사용하는 기능이 있다. 이 과정은 갑상선의 여포 표피 세포(follicular epithelial cell)에서 특이하게 발현되는 몇 가지 중요한 단백질 분자와 관련이 있다.⁷⁴⁾ 요오드는 기저막(basolateral membrane)에서 sodium/iodide symporter (NIS)에 의해 세포 내로 이동하고, 첨단막(apical membrane)에서 pendrin을 통해 여포강(follicular lumen)으로 이동하게 된다. 요오드는 여포 세포 내에서 thyroid peroxidase (TPO)를 통해 산화되고, thyroglobulin (Tg)에 있는 tyrosine에 부착되어 MIT, DIT를 형성하고, 중합되어 T₃, T₄로 유기화된다(Fig. 2). 이 모든 과정은 갑상선자극호르몬의 조절에 의해 이루어지며, 갑상선자극호르몬은 thyroid stimulating hormone receptor (TSHR)에 결합함으로써 기능을 한다.⁷⁵⁾ 갑상선암에서 종종 이 thyroidal iodide-metabolizing molecules의 발현이 상실되며, 이로써 암세포의 방사성요오드 농축 능력이 상실된다. 결과적으로 이런 갑상선암 환자는 방사성요오드 치료가 실패하게 되어 갑상선암과 관련된 합병증 발생과 사망의 주된 원인이 된다.⁷⁶⁾

Smith 등⁷⁷⁾은 MSP를 이용하여 NIS 유전자의 메틸화를 조사하였고, 갑상선유두암 조직 32개 중 7개(22%)에서 메틸화를 발견하였고, 양성 갑상선 병변 조직 27개에서는 메틸화가 발견되지 않았다고 보고하였다. Galvão 등⁷⁸⁾은 QMSP를 통해 30개의 갑상선 종양 조직과 종양 주변 정상 조직의 NIS CpG island의 메틸화 정도를 조사하였다. 갑상선 종양 조직 중 10개는 양성 종양, 18개는 갑상선유두암, 2개는 갑상선여포암의 조직이었고, 양성 종양과 악성 종양뿐 아니라, 주변 정상 조직에서도 NIS 유전자의 메틸화가 발견되었다고 보고하였다. Stephen 등⁷⁹⁾은 methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA) assay와 MSP를 이용하여 24개의 종양억제유전자와 NIS 유전자의 메틸화를 조사하였다. 그 결과 13개의 갑상선암 조직에서 CASP8, RASSF1, NIS 유전자의 메틸화가 각각 9개, 10개, 7개에서 발견되었다. 또한, 정상 갑상선 조직에서도 각각 3개, 4개, 3개에서 CASP8, RASSF1, NIS 유전자의 메틸화가 발견되어, 이 유전자의 메틸화가 갑상선암 발생에 있어 초기의 변화일 것이라고 제

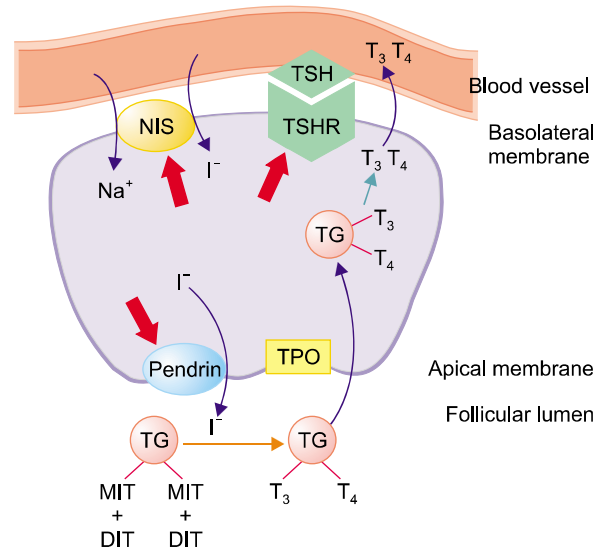


Fig. 2. Thyroidal iodide-metabolizing molecules. A unique physiological function of thyroid gland is ability to uptake, concentrate and use iodide to synthesize thyroid hormones. This process involves several key protein molecules that are specifically expressed in follicular epithelial cells of the thyroid gland. Thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) bound to TSH stimulates iodide transport into the thyroid gland by the sodium iodide symporter (NIS). The function of pendrin is to transport iodide into the follicular lumen from the thyroid cell. The genes of thyroid specific molecules (red arrow) are methylated in the promoter areas in thyroid tumors.

안하였다.

TSHR은 thyrocyte의 기능과 성장의 조절에 기본적인 역할을 한다.⁸⁰⁾ Thyrocyte에 의한 정상 요오드 섭취와 대사는 TSHR을 통한 갑상선자극호르몬의 조절에 의해 주로 이루어진다.⁷⁵⁾ Xing 등⁸¹⁾은 QMSP를 이용하여 39개의 갑상선유두암 조직, 15개의 갑상선여포암 조직, 그리고 8개의 양성 갑상선 선종 조직에서 TSHR 유전자의 메틸화를 조사하였다. 그 결과 갑상선유두암 조직 중 23개(59%), 갑상선여포암 조직 중 7개(47%)에서 과메틸화가 발견되었고, 양성 갑상선 선종 조직에서는 과메틸화가 나타나지 않음을 보고하였다. 이로써 TSHR 유전자의 메틸화를 분석하는 것이 갑상선 종양의 악성 여부를 진단하는 표지자로서 의미가 있을 것이라고 제안하였다. Smith 등⁷⁷⁾은 갑상선유두암 조직 32개를 MSP를 통해 조사하여 11개(34%)의 조직에서 TSHR 유전자의 메틸화를 발견하였다. 두 군의 환자를 비교하였을 때, 메틸화가 발견된 11명 중 1명에서 갑상선암의 재발이 있었고, 메틸화가 발견되지 않은 21명 중 11명에서 갑상선암의 재발이 있어, 이 유전자의 메틸화가 갑상선암의 재발과 역의 상관관계가 있다고 보

고하였다.

SLC26A4 유전자는 pendrin을 생산하는 단백질을 표현(encoding)한다.⁸²⁾ Xing 등⁸³⁾은 MSP를 통해 64개의 일차성 갑상선 종양 조직에서 SLC26A4 유전자의 메틸화를 조사하였다. 그 결과 양성 갑상선 선종 조직 9개 중 4개(44%), 갑상선여포암 조직 13개 중 6개(46%), 갑상선유두암 조직 35개 중 25개(71%), 갑상선미분화암 조직 7개 중 5개(71%)에서 SLC26A4 유전자의 메틸화가 발견되었음을 보고하였다. 따라서 SLC26A4 유전자의 메틸화가 갑상선암 발생에 초기의 변화일 것이라고 제안하였다.

그 밖에 갑상선암에서 발견되는 유전자의 비정상적인 메틸화

Galectin-3 (Gal-3)는 분화성 갑상선암의 진단에 가장 정확한 표지자로 여겨지고 있다. Gal-3는 갑상선암에서 많이 발현되고, 정상 갑상선 조직에서는 나타나지 않으며, 양성 갑상선 병변에서는 매우 드물게 발현된다.⁸⁴⁾ Keller 등⁸⁵⁾은 갑상선암에서 Gal-3의 메틸화 상태를 조사하였다. 이들은 mass spectrometry-based methylation analysis (MassARRAY)와 pyrosequencing technology를 이용하여 Gal-3 유전자의 메틸화를 조사하였고, 39개의 갑상선 유두암 조직, 3개의 갑상선미분화암 조직, 3개의 goiter 조직, 5개의 정상 갑상선 조직을 조사하였다. 그 결과 Gal-3 유전자의 메틸화 정도는 비종양 갑상선 조직에 비해 갑상선암 조직에서 유의하게 감소함을 보고하였다. 즉 Gal-3 유전자는 정상 조직에서 과메틸화에 의해 비활성화(silencing)되어 있고, 갑상선암의 상태에서 암에 특이적인 후성학적 변성에 의해 활성화 된다는 주장이다.

Sassa 등⁸⁶⁾은 정상 갑상선 조직에서는 CITED1 (Cbp/p300 Interacting Transactivators with glutamic acid [E] and aspartic acid [D]-rich C-terminal domain) 유전자의 promoter 부위에서 CpG의 메틸화가 다량 발견되지만, 갑상선유두암에서는 CITED1 유전자의 비정상적인 저 메틸화가 발생하여 CITED1 mRNA의 과발현이 발생함을 보고하였다.

결 론

인간에서 발생하는 다른 암처럼, 갑상선암에서 비정상적인 유전자의 메틸화는 암 발생에 중요한 역할을 한다. 종양억제유전자의 메틸화는 갑상선유두암에서는

BRAF/MEK/MAPK pathway와 같이 잘 알려진 signaling pathway의 변형과 연관이 있으며, 갑상선여포암에서는 PI3K/Akt pathway의 변형과 연관이 있다. 갑상선 특이 유전자의 비정상적인 메틸화와 이에 의한 비활성화가 갑상선암 발생에 주된 역할을 하는지는 명확하지 않지만, 방사성요오드 치료를 실패하게 하고, 이로 인해 갑상선암의 임상적 예후에 중요한 요인이 된다. 갑상선암에서 메틸화를 포함한 후성학적 변성에 대한 연구와 이에 대한 분자 메커니즘의 이해는 갑상선암의 조기 진단이나 종양 표지자로서의 가능성을 높일 것이다. 또한, 후성학적 변성을 이용한 갑상선암의 치료법 개발에도 실용적인 성과가 기대된다. 앞으로 갑상선암에 대한 후성학적 변성의 연구가 지속적으로 이루어질 필요가 있다.

중심 단어: 후성학, 메틸화, 갑상선암, 유전자, 종양 억제.

감사의 글

Figures 1, 2를 그려주신 이웅현님께 감사 드립니다.

References

- 1) Feinberg AP, Tycko B. *The history of cancer epigenetics. Nat Rev Cancer* 2004;4(2):143-53.
- 2) Herman JG, Baylin SB. *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. N Engl J Med* 2003;349(21):2042-54.
- 3) Waddington CH. *The epigenotype. 1942. Int J Epidemiol* 2012;41(1):10-3.
- 4) Feinberg AP, Vogelstein B. *Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. Nature* 1983;301(5895):89-92.
- 5) Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B. *Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. Hum Genet* 1989; 83(2):155-8.
- 6) Xing M. *Gene methylation in thyroid tumorigenesis. Endocrinology* 2007;148(3):948-53.
- 7) Bird A. *DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev* 2002;16(1):6-21.
- 8) Yoo CB, Jones PA. *Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. Nat Rev Drug Discov* 2006;5(1):37-50.
- 9) Yokomori N, Tawata M, Saito T, Shimura H, Onaya T. *Regulation of the rat thyrotropin receptor gene by the methylation-sensitive transcription factor GA-binding protein. Mol Endocrinol* 1998;12(8):1241-9.
- 10) Reik W, Lewis A. *Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. Nat Rev Genet* 2005;6(5):403-10.

- 11) Feinberg AP, Cui H, Ohlsson R. *DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms*. *Semin Cancer Biol* 2002;12(5):389-98.
- 12) Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. *The epigenetic progenitor origin of human cancer*. *Nat Rev Genet* 2006;7(1):21-33.
- 13) Robertson KD. *DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web*. *Oncogene* 2002;21(35):5361-79.
- 14) Kornberg RD, Lorch Y. *Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome*. *Cell* 1999;98(3):285-94.
- 15) Park IS. *Epigenetics in head and neck cancer*. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg* 2009;52(12):943-8.
- 16) Piperi C, Papavassiliou AG. *Strategies for DNA methylation analysis in developmental studies*. *Dev Growth Differ* 2011; 53(3):287-99.
- 17) He L, Hannon GJ. *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. *Nat Rev Genet* 2004;5(7):522-31.
- 18) Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. *A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995 [see comments]*. *Cancer* 1998;83(12):2638-48.
- 19) Hu S, Liu D, Tufano RP, Carson KA, Rosenbaum E, Cohen Y, et al. *Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and BRAF mutation in papillary thyroid cancer*. *Int J Cancer* 2006;119(10):2322-9.
- 20) Ko HJ, Kim BY, Jung CH, Chun SW, Mok JO, Kim YJ, et al. *DNA methylation of RUNX3 in papillary thyroid cancer*. *Korean J Intern Med* 2012;27(4):407-10.
- 21) Mohammadi-asl J, Larijani B, Khorgami Z, Tavangar SM, Haghpahan V, Kheirollahi M, et al. *Qualitative and quantitative promoter hypermethylation patterns of the P16, TSHR, RASSF1A and RARBeta2 genes in papillary thyroid carcinoma*. *Med Oncol* 2011;28(4):1123-8.
- 22) Porra V, Ferraro-Peyret C, Durand C, Selmi-Ruby S, Giroud H, Berger-Dutrieux N, et al. *Silencing of the tumor suppressor gene SLC5A8 is associated with BRAF mutations in classical papillary thyroid carcinomas*. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(5):3028-35.
- 23) Wang P, Pei R, Lu Z, Rao X, Liu B. *Methylation of p16 CpG islands correlated with metastasis and aggressiveness in papillary thyroid carcinoma*. *J Chin Med Assoc* 2013;76(3):135-9.
- 24) Anania MC, Sensi M, Radaelli E, Miranda C, Vizioli MG, Pagliardini S, et al. *TIMP3 regulates migration, invasion and in vivo tumorigenicity of thyroid tumor cells*. *Oncogene* 2011;30(27):3011-23.
- 25) Anand-Apte B, Bao L, Smith R, Iwata K, Olsen BR, Zetter B, et al. *A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth*. *Biochem Cell Biol* 1996;74(6):853-62.
- 26) Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. *Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions*. *Eur J Cell Biol* 1997;74(2):111-22.
- 27) Qi JH, Ebrahim Q, Moore N, Murphy G, Claesson-Welsh L, Bond M, et al. *A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2*. *Nat Med* 2003;9(4):407-15.
- 28) Guan Z, Zhang J, Song S, Dai D. *Promoter methylation and expression of TIMP3 gene in gastric cancer*. *Diagn Pathol* 2013;8:110.
- 29) Catusus L, Pons C, Munoz J, Espinosa I, Prat J. *Promoter hypermethylation contributes to TIMP3 down-regulation in high stage endometrioid endometrial carcinomas*. *Histopathology* 2013;62(4):632-41.
- 30) Sun W, Zaboli D, Wang H, Liu Y, Arnaoutakis D, Khan T, et al. *Detection of TIMP3 promoter hypermethylation in salivary rinse as an independent predictor of local recurrence-free survival in head and neck cancer*. *Clin Cancer Res* 2012;18(4): 1082-91.
- 31) Brait M, Loyo M, Rosenbaum E, Ostrow KL, Markova A, Papagerakis S, et al. *Correlation between BRAF mutation and promoter methylation of TIMP3, RARBeta2 and RASSF1A in thyroid cancer*. *Epigenetics* 2012;7(7):710-9.
- 32) Miyauchi S, Gopal E, Fei YJ, Ganapathy V. *Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na(+)-coupled transporter for short-chain fatty acids*. *J Biol Chem* 2004;279(14):13293-6.
- 33) Li H, Myeroff L, Smiraglia D, Romero MF, Pretlow TP, Kasturi L, et al. *SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(14): 8412-7.
- 34) Elangovan S, Pathania R, Ramachandran S, Ananth S, Padia RN, Srinivas SR, et al. *Molecular mechanism of SLC5A8 inactivation in breast cancer*. *Mol Cell Biol* 2013;33(19):3920-35.
- 35) Park JY, Kim D, Yang M, Park HY, Lee SH, Rincon M, et al. *Gene silencing of SLC5A8 identified by genome-wide methylation profiling in lung cancer*. *Lung Cancer* 2013;79(3): 198-204.
- 36) Park JY, Helm JF, Zheng W, Ly QP, Hodul PJ, Centeno BA, et al. *Silencing of the candidate tumor suppressor gene solute carrier family 5 member 8 (SLC5A8) in human pancreatic cancer*. *Pancreas* 2008;36(4):e32-9.
- 37) Zane M, Agostini M, Enzo MV, Casal Ide E, Del Bianco P, Torresan F, et al. *Circulating cell-free DNA, SLC5A8 and SLC26A4 hypermethylation, BRAF(V600E): A non-invasive tool panel for early detection of thyroid cancer*. *Biomed Pharmacother* 2013;67(8):723-30.
- 38) Lam AK, Lo CY, Leung P, Lang BH, Chan WF, Luk JM. *Clinicopathological roles of alterations of tumor suppressor gene p16 in papillary thyroid carcinoma*. *Ann Surg Oncol* 2007;14(5):1772-9.
- 39) Serrano J, Goebel SU, Peghini PL, Lubensky IA, Gibril F, Jensen RT. *Alterations in the p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor gene in gastrinomas*. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(11):4146-56.
- 40) Kim YJ, Kim HS, Ha YJ, Lee HY, Park KG, Kim MK, et al. *p16(INK4A) promoter hypermethylation and expression of p16(INK4A), cyclin D1, and Rb in papillary thyroid carcinoma*. *Korean J Med* 2010;78(3):333-40.
- 41) Schagdarsurengin U, Gimm O, Hoang-Vu C, Dralle H, Pfeifer GP, Dammann R. *Frequent epigenetic silencing of the CpG island promoter of RASSF1A in thyroid carcinoma*. *Cancer Res* 2002;62(13):3698-701.

- 42) Soprano DR, Qin P, Soprano KJ. *Retinoic acid receptors and cancers. Annu Rev Nutr* 2004;24:201-21.
- 43) Hoque MO, Rosenbaum E, Westra WH, Xing M, Ladenson P, Zeiger MA, *et al.* Quantitative assessment of promoter methylation profiles in thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(7):4011-8.
- 44) Kiseljak-Vassiliades K, Xing M. Association of cigarette smoking with aberrant methylation of the tumor suppressor gene *RARB* in papillary thyroid cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2011;2:99.
- 45) Schneider-Stock R, Roessner A, Ullrich O. *DAP-kinase--protector or enemy in apoptotic cell death. Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(9):1763-7.
- 46) Nomura T, Tahara T, Shiroeda H, Minato T, Matsue Y, Hayashi R, *et al.* Influence of *HRH2* promoter polymorphism on aberrant DNA methylation of *DAPK* and *CDH1* in the gastric epithelium. *BMC Gastroenterol* 2013;13:1.
- 47) Eisenberg-Lerner A, Kimchi A. *DAPK* silencing by DNA methylation conveys resistance to anti *EGFR* drugs in lung cancer cells. *Cell Cycle* 2012;11(11):2051.
- 48) Xiaofang L, Kun T, Shaoping Y, Zaiqiu W, Hailong S. Correlation between promoter methylation of *p14(ARF)*, *TMS1/ASC*, and *DAPK*, and *p53* mutation with prognosis in cholangiocarcinoma. *World J Surg Oncol* 2012;10:5.
- 49) Coffman JA. *Runx* transcription factors and the developmental balance between cell proliferation and differentiation. *Cell Biol Int* 2003;27(4):315-24.
- 50) Blyth K, Cameron ER, Neil JC. The *RUNX* genes: gain or loss of function in cancer. *Nat Rev Cancer* 2005;5(5):376-87.
- 51) De Falco V, Castellone MD, De Vita G, Cirafici AM, Hershman JM, Guerrero C, *et al.* *RET*/papillary thyroid carcinoma oncogenic signaling through the *Rap1* small GTPase. *Cancer Res* 2007;67(1):381-90.
- 52) Wang Z, Dillon TJ, Pokala V, Mishra S, Labudda K, Hunter B, *et al.* *Rap1*-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases by cyclic AMP is dependent on the mode of *Rap1* activation. *Mol Cell Biol* 2006;26(6):2130-45.
- 53) Zhang L, Chenwei L, Mahmood R, van Golen K, Greenson J, Li G, *et al.* Identification of a putative tumor suppressor gene *Rap1GAP* in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2006;66(2):898-906.
- 54) Tsygankova OM, Prendergast GV, Puttaswamy K, Wang Y, Feldman MD, Wang H, *et al.* Downregulation of *Rap1GAP* contributes to *Ras* transformation. *Mol Cell Biol* 2007;27(19):6647-58.
- 55) Zuo H, Gandhi M, Edreira MM, Hochbaum D, Nimgaonkar VL, Zhang P, *et al.* Downregulation of *Rap1GAP* through epigenetic silencing and loss of heterozygosity promotes invasion and progression of thyroid tumors. *Cancer Res* 2010;70(4):1389-97.
- 56) Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2006;6(4):292-306.
- 57) Xing M. *BRAF* mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005;12(2):245-62.
- 58) Groussin L, Fagin JA. Significance of *BRAF* mutations in papillary thyroid carcinoma: prognostic and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006;2(4):180-1.
- 59) Lupi C, Giannini R, Ugolini C, Proietti A, Berti P, Minuto M, *et al.* Association of *BRAF V600E* mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(11):4085-90.
- 60) Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, *et al.* *BRAF* mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(12):6373-9.
- 61) Li X, Abdel-Mageed AB, Kandil E. *BRAF* mutation in papillary thyroid carcinoma. *Int J Clin Exp Med* 2012;5(4):310-5.
- 62) Kim TH, Park YJ, Lim JA, Ahn HY, Lee EK, Lee YJ, *et al.* The association of the *BRAF(V600E)* mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *Cancer* 2012;118(7):1764-73.
- 63) Santoro A, Pannone G, Carosi MA, Francesconi A, Pescarmona E, Russo GM, *et al.* *BRAF* mutation and *RASSF1A* expression in thyroid carcinoma of southern Italy. *J Cell Biochem* 2013;114(5):1174-82.
- 64) Xing M, Cohen Y, Mambo E, Tallini G, Udelsman R, Ladenson PW, *et al.* Early occurrence of *RASSF1A* hypermethylation and its mutual exclusion with *BRAF* mutation in thyroid tumorigenesis. *Cancer Res* 2004;64(5):1664-8.
- 65) de Vogel S, Weijenberg MP, Herman JG, Wouters KA, de Goeij AF, van den Brandt PA, *et al.* *MGMT* and *MLH1* promoter methylation versus *APC*, *KRAS* and *BRAF* gene mutations in colorectal cancer: indications for distinct pathways and sequence of events. *Ann Oncol* 2009;20(7):1216-22.
- 66) Guan H, Ji M, Hou P, Liu Z, Wang C, Shan Z, *et al.* Hypermethylation of the DNA mismatch repair gene *hMLH1* and its association with lymph node metastasis and T1799A *BRAF* mutation in patients with papillary thyroid cancer. *Cancer* 2008;113(2):247-55.
- 67) Santos JC, Bastos AU, Cerutti JM, Ribeiro ML. Correlation of *MLH1* and *MGMT* expression and promoter methylation with genomic instability in patients with thyroid carcinoma. *BMC Cancer* 2013;13:79.
- 68) Jo YS, Li S, Song JH, Kwon KH, Lee JC, Rha SY, *et al.* Influence of the *BRAF V600E* mutation on expression of vascular endothelial growth factor in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(9):3667-70.
- 69) Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M. *PI3K/Akt* signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 2004;30(2):193-204.
- 70) Alvarez-Nunez F, Bussaglia E, Mauricio D, Ybarra J, Vilar M, Lerma E, *et al.* *PTEN* promoter methylation in sporadic thyroid carcinomas. *Thyroid* 2006;16(1):17-23.
- 71) Hou P, Ji M, Xing M. Association of *PTEN* gene methylation with genetic alterations in the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in thyroid tumors. *Cancer* 2008;113(9):2440-7.
- 72) Donninger H, Vos MD, Clark GJ. The *RASSF1A* tumor suppressor. *J Cell Sci* 2007;120(Pt 18):3163-72.
- 73) Agathangelou A, Cooper WN, Latif F. Role of the *Ras*-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res* 2005;65(9):3497-508.
- 74) Nilsson M. Iodide handling by the thyroid epithelial cell. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109(1):13-7.
- 75) Caillou B, Troalen F, Baudin E, Talbot M, Filetti S, Schlumberger M, *et al.* *Na⁺/I⁻* symporter distribution in human thyroid tissues: an immunohistochemical study. *J Clin*

- Endocrinol Metab* 1998;83(11):4102-6.
- 76) Sherman SI. *Thyroid carcinoma. Lancet* 2003;361(9356):501-11.
 - 77) Smith JA, Fan CY, Zou C, Bodenner D, Kokoska MS. *Methylation status of genes in papillary thyroid carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;133(10):1006-11.
 - 78) Galrao AL, Sodre AK, Camargo RY, Friguglietti CU, Kulcsar MA, Lima EU, et al. *Methylation levels of sodium-iodide symporter (NIS) promoter in benign and malignant thyroid tumors with reduced NIS expression. Endocrine* 2013;43(1):225-9.
 - 79) Stephen JK, Chitale D, Narra V, Chen KM, Sawhney R, Worsham MJ. *DNA methylation in thyroid tumorigenesis. Cancers (Basel)* 2011;3(2):1732-43.
 - 80) Kopp P. *The TSH receptor and its role in thyroid disease. Cell Mol Life Sci* 2001;58(9):1301-22.
 - 81) Xing M, Usadel H, Cohen Y, Tokumaru Y, Guo Z, Westra WB, et al. *Methylation of the thyroid-stimulating hormone receptor gene in epithelial thyroid tumors: a marker of malignancy and a cause of gene silencing. Cancer Res* 2003;63(9):2316-21.
 - 82) Everett LA, Glaser B, Beck JC, Idol JR, Buchs A, Heyman M, et al. *Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). Nat Genet* 1997;17(4):411-22.
 - 83) Xing M, Tokumaru Y, Wu G, Westra WB, Ladenson PW, Sidransky D. *Hypermethylation of the Pendred syndrome gene SLC26A4 is an early event in thyroid tumorigenesis. Cancer Res* 2003;63(9):2312-5.
 - 84) Xu XC, el-Naggar AK, Lotan R. *Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. Am J Pathol* 1995;147(3):815-22.
 - 85) Keller S, Angrisano T, Florio E, Pero R, Decaussin-Petrucci M, Troncone G, et al. *DNA methylation state of the galectin-3 gene represents a potential new marker of thyroid malignancy. Oncol Lett* 2013;6(1):86-90.
 - 86) Sassa M, Hayashi Y, Watanabe R, Kikumori T, Imai T, Kurebayashi J, et al. *Aberrant promoter methylation in overexpression of CITED1 in papillary thyroid cancer. Thyroid* 2011;21(5):511-7.