

세포 흡인 검사에서 Peptide Nucleic Acid-Mediated PCR Clamping법을 이용한 BRAF^{V600E} 유전자 변이 검사

동아대학교 의과대학 ¹이비인후-두경부외과학교실, ²영상의학과학교실, ³내분비내과학교실, ⁴핵의학교실, ⁵외과학교실, ⁶병리학교실

홍종철¹ · 박헌수¹ · 강명구¹ · 이준형² · 김덕규³ · 박미경³ · 강도영⁴ · 김성흔⁵ · 홍숙희⁶ · 김대철⁶

Detection of BRAF^{V600E} Mutation using Peptide Nucleic Acid-Mediated PCR Clamping Method in Fine Needle Aspiration Cytology

Jong-Chul Hong, M.D.¹, Heon-Soo Park, M.D.¹, Myung-Koo Kang, M.D.¹, Joon-Hyung Lee, M.D.², Deok-Kyu Kim, M.D.³, Mi-Kyung Park, M.D.³, Do-Young Kang, M.D.⁴, Sung-Heun Kim, M.D.⁵, Sook-Hee Hong, M.D.⁶ and Dae-Cheol Kim, M.D.⁶

Purpose: The aim of this study was to evaluate the diagnostic value of a peptide nucleic acid (PNA)-mediated PCR clamping method for the detection of BRAF^{V600E} mutations in fine needle aspiration cytology (FNAC).

Methods: One hundred sixty four patients underwent FNAC to evaluate BRAF^{V600E} mutations between April 2011 and November 2011. Among them, forty-two patients were diagnosed with papillary thyroid carcinoma in a permanent pathologic specimen. A PNA-mediated PCR clamping method and a Dual-Priming Oligonucleotide (DPO)-based Real-time PCR method were used to detect the BRAF^{V600E} mutation. We compared the result of mutation between the two methods.

Results: A BRAF mutation was found in 31 samples created by the PNA-mediated PCR clamping method, and in 28 samples in the DPO-based Real-time PCR method. The rate of BRAF mutation was 73.8% in association with the PNA-mediated PCR clamping method, and 66.7% in association with the DPO-based Real-time PCR method. There was no statistical differences between the two methods ($P > 0.05$).

Conclusion: The PNA-mediated PCR clamping method may be an alternative to the DPO-based Real-Time PCR method

for detection of BRAF mutations in thyroid nodules. (Korean J Endocrine Surg 2012;12:87-91)

Key Words: Thyroid cancer, BRAF mutation

중심 단어: 갑상선암, BRAF 변이

Departments of ¹Otolaryngology-Head and Neck Surgery, ²Radiology, ³Endocrinology, ⁴Nuclear Medicine, ⁵Surgery, ⁶Pathology, Dong-A University College of Medicine, Busan, Korea

서론

갑상선 결절은 성인에서 촉진으로 4~8%, 초음파로는 10~41%까지 발견되고 있다. 그리고 부검 결과 50%의 환자에서 결절이 발견된다.(1) 최근에는 건강 검진 시 갑상선 초음파 검사의 대중화로 인해 갑상선 결절의 발견율이 점점 높아지고 있으며, 그 중 약 5%에서 갑상선암이 발견된다. 갑상선암은 국내에서 매년 증가하고 있으며, 2009년 한국 국가암등록사업 보고서에 따르면 전체 암중에서 위암 다음으로 가장 많은 수를 차지한다. 갑상선암 중 유두상암이 국내에서는 가장 흔한 조직형으로 전체 갑상선암 중 약 95%를 차지한다.(2)

최근 갑상선암의 발생원인과 관련하여 다양한 유전자 연구가 발표되고 있다. 갑상선 양성 및 악성 종양에서 ras 암 유전자 돌연변이가 약 30% 정도로 발견되고 있으며, 이는 갑상선 종양 발생의 초기 단계에 관여하는 것으로 보고되고 있다.(3) RET/PTC 돌연변이는 갑상선 유두암에서 약 11~40%에서 관찰되고 있다.(4) 그리고 p53 종양억제유전자 점돌연변이도 발견되는데, 이는 분화암보다는 미분화암에서 높은 빈도로 발견된다.(5) Raf kinase는 세포의 성장과 분화 그리고 악성화에 관여하는 Ras, mitogen-activated protein kinase kinase (MEK), mitogen activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-related kinase (ERK) 신호 경로의 중요한 자이다. Raf kinase 중 B type RAF (BRAF)는 이 신호경로의 가장 강력한 활성화체이며 이 유전자는 염색체 7번에 위치한다. BRAF^{V600E}은 전체 BRAF 돌연변이의 약 90% 정도를

책임저자 : 김대철, 부산시 서구 동대신동 3가-1
☎ 602-715, 동아대학교 의과대학 병리학교실
Tel: 051-240-2878, Fax: 051-243-7396
E-mail: freehand@dau.ac.kr

접수일 : 2012년 4월 3일, 수정일 : 2012년 5월 11일,
게재승인일 : 2012년 5월 14일

This study was supported by research funds from Dong-A University.

차지하는 가장 흔한 유형이다. 이 유형은 BRAF 유전자의 exon 15의 1799 nucleotide가 thymine에서 adenine으로 치환되는 것으로 알려졌다.(6) 국내 연구 결과 갑상선 유두암에서 BRAF 유전자의 돌연변이가 유병률은 80~90% 정도로 매우 흔히 발견되고, 특이도는 100%에 가까워 술 전 진단에 세침흡인검사와 함께 진단율을 높이기 위해 검사의 시행이 점점 늘어나고 있다.(7,8) BRAF 검사 방법도 여러 가지가 보고되고 있는데 그 중 Multiplex PCR법이 흔하게 사용되고 있다. 이에 저자들은 최근 국내에서 개발된 peptide nucleic acid (PNA)-mediated PCR clamping법을 이용한 BRAF 검사를 이용하여 Multiplex PCR법과의 결과 차이와 유용성에 대해서 알아보려고 하였다.

방 법

1) 대상

2011년 4월부터 2011년 11월까지 갑상선 결절을 주술로 본원 외래를 내원한 환자 중 수술 전 초음파 유도하 세침흡인검사와 BRAF 유전자 변이 검사를 했던 환자 164명 중 본원에서 수술 후 최종 병리 조직 검사상 유두상암으로 진단받았던 42명의 검체를 대상으로 하였다. BRAF 유전자 변이 검사 방법은 Dual-Priming Oligonucleotide (DPO) based Real-Time PCR법과 PNA-mediated real time PCR Clamping법을 사용하여 PNA-mediated real time PCR Clamping법의 결과와 차이가 있는지 알아보려고 하였다. 이 연구는 본원의 임상실험심사위원회의 심의를 통과하였으며, 모든 환자에게서 유전자 검사 동의를 받았다.

2) 조직 검체 수집

세침흡인방법을 통해 세포 검체를 얻은 후 DNA를 추출하였다.

3) DNA 추출 방법

BRAF 돌연변이 검출을 위한 DNA 추출은 High Pure PCR

Template Preparation Kit를 사용하였다. 추출된 DNA는 NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)을 사용하여 정량하였고, 실험 전까지 -20°C에 보관하였다.

4) BRAF 유전자 변이 검사 방법

(1) PNA-mediated real time PCR Clamping method: 갑상선 결절에서 채취한 세침흡인 검체로부터 DNA를 추출한다. Real-time PCR Mixture를 준비한다. PCR mixture 1, 2 각각을 고루 섞어 준비한다. 0.2 ml PCR 튜브에 검체의 이름을 적는다. 이 때 한 검체 당 2개의 튜브가 필요하다. 하나의 검체를 PCR mixture 1, 2에 각각 넣어 반응한다. 준비된 PCR mixture 1, 2를 각각의 튜브에 13 μ l씩 첨가한다. 준비된 검체를 10~25 ng으로 적정한 후 DNase/RNase Free Water로 final volume이 7 μ l가 되도록 준비한다. Mix된 용액을 부드럽게 섞어준 후 spin down하여 각각의 기기에 맞는 PCR tube 혹은 PCR plate로 옮긴다. 준비된 PCR tube 혹은 PCR plate를 Real-time PCR 기기에 넣어 증폭한다(Fig. 1). Non PNA mix #1 반응에서 검체의 Threshold Cycle (Ct) 값이 22~35 사이에서 확인되면 증폭 반응이 제대로 일어난 것으로 확인한다. 검체의 Ct값으로부터 다음과 같은 판정 기준 값을 계산한다. 1) Δ Ct-1 값: Standard Ct값(35, wild type 샘플에 대한 평균 Ct값) - PNA mix #2 반응에서 검체의 Ct값, 2) Δ Ct-2 값: PNA probe 유무에 따른 Ct값 차이(돌연 변이 샘플인 경우 PNA probe의 유무에 따른 증폭 효율의 차이가 없으므로 Ct값의 차이가 적음). 판정 기준값을 바탕으로 다음과 같은 돌연변이 판정 기준에 따라 돌연변이 유무를 확인한다. 1) Δ Ct-1 값 2.0 이상이면 돌연변이로 판정한다. 2) Δ Ct-1 값이 0~2 사이인 경우 Δ Ct-2 값이 3 이하이면 돌연변이로 판정한다(Fig. 2).

(2) Dual-Priming Oligonucleotide (DPO) based Real-Time PCR method: 갑상선 결절에서 채취한 세침흡인 검체로부터 DNA를 추출한다. BRAF V600E 돌연변이를 검출하는 데 Anyplex™ BRAF V600E Real time detection system (Seegene Inc., Seoul, Korea)을 사용하였다. PCR 반응액은 다음과 같

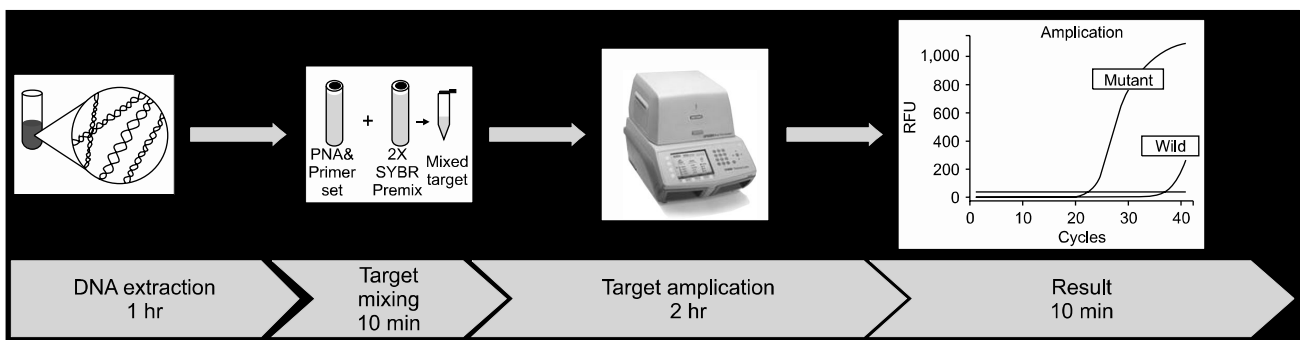


Fig. 1. Schematic representation of peptide nucleic acid (PNA)-mediated PCR clamping method.

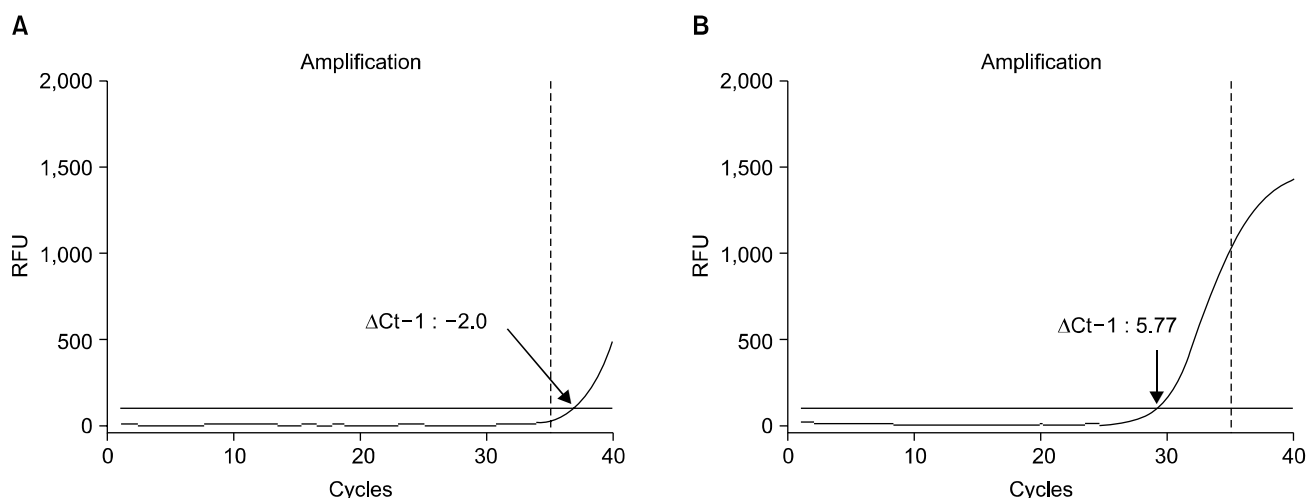


Fig. 2. (A) Wild type. $\Delta Ct-1$: -2.0. (B) Mutant type. $\Delta Ct-1$: 5.77.

이 준비한다. 한 반응당 Amplification과 detection 시약인 10× BRAF Oligo Mix (OM)은 2 μ l, 오염방지 시약인 8-methoxypsoralen (8-Mop)은 3 μ l, deoxynucleoside triphosphate (dNTPs)가 포함된 buffer와 DNA polymerase를 포함하고 있는 시약인 2× anyplex PCR Master Mix는 10 μ l씩 넣는다. PCR 반응액이 준비되면 5회 정도 고무 섞어준 후 0.2 ml PCR tube에 15 μ l씩 분주해준다. 샘플의 DNA 5 μ l를 각각의 반응액에 넣어 전체 부피가 20 μ l가 되도록 준비한다. Real time PCR은 CFX96™ Real-time PCR System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)장비를 사용하였으며 95°C에서 15분간 유지한 후에 95°C에서 15초, 60°C에서 30초를 15회 반복한 다음 다시 95°C에서 30초, 60°C에서 32초를 35회 반복하였다. Real time PCR에서 cycle threshold (Ct)란 형광증폭이 시작되는 지점을 뜻한다. 검체의 적합성을 판단하는 Ct값은 항상 40 이하이며, 검체의 Ct값이 40 이하일 때 양성으로 판정한다. 각각의 반응은 모두 양성 대조군과 음성 대조군을 포함하고 있다.

5) 통계학적 분석

SPSS 15.0 프로그램(Chicago, USA)의 student t-test를 이용하여 2가지 검사의 일치율을 비교하였으며, P값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

세침흡인세포 결과를 5개의 분류로 구분하였다. 5개의 분류법은 unsatisfactory, benign, atypia of undetermined significance (AUS), suspicious for malignancy (SFM), papillary carcinoma (PC)이다. 총 42 검체 중 unsatisfactory 검체는 1개였으며 이 중 1개의 검체에서 PNA-mediated real time PCR Clamping법과 Dual-Priming Oligonucleotide (DPO) based

Table 1. The results of BRAF^{V600E} mutation in PNA-mediated real time PCR clamping method and Multiplex PCR method according to fine needle aspiration cytology

FNAC (N)	PNA-mediated real time PCR clamping method		Multiplex PCR method	
	BRAF (+)	BRAF (-)	BRAF (+)	BRAF (-)
Unsatisfactory (1)	0	1	0	1
Benign (1)	0	1	0	1
AUS (4)	4	0	4	0
SFM (11)	6	5	4	7
PC (25)	21	4	20	5
Total (42)	31 (73.8%)	11 (26.2%)	28 (66.7%)	14 (33.3%)

FNAC = fine needle aspiration cytology; AUS = atypia of undetermined significance; SFM = suspicious for malignancy; PC = papillary carcinoma.

Real-Time PCR법에서 모두 BRAF 돌연변이 음성 소견이 있었다. Benign 검체는 모두 1개였으며 모든 검체에서 BRAF 돌연변이 음성 소견을 나타내었다. AUS 검체는 4였는데 모든 검체에서 PNA-mediated real time PCR Clamping법과 Dual-Priming Oligonucleotide (DPO) based Real-Time PCR법에서 양성 소견을 보였다. SFM 검체는 11개였다. 11개의 검체 중 BRAF 돌연변이 양성 소견을 보인 검체는 PNA-mediated real time PCR Clamping법에서 6개, Dual-Priming Oligonucleotide (DPO) based Real-Time PCR법에서 4개였다. Dual-Priming Oligonucleotide (DPO) based Real-Time PCR법에서 양성을 보인 4개의 검체에서 모두 PNA-mediated real time PCR Clamping법에서 양성을 나타내었지만, PNA-mediated real time PCR Clamping법에서 양성을 보인 나머지 2개의 검체에서는 Dual-Priming Oligonucleotide (DPO) based Real-Time PCR법에서 음성을 나타내었다. PC 검체는 25개

였으며, 이 중 BRAF 돌연변이 양성 소견을 보인 검체는 PNA-mediated real time PCR Clamping법에서 21개, Dual-Priming Oligonucleotide (DPO) based Real-Time PCR법에서 20개였다. Dual-Priming Oligonucleotide (DPO) based Real-Time PCR법에서 양성을 보인 20개의 검체 모두에서 PNA-mediated real time PCR Clamping법에서도 양성 소견을 보였지만, 1개의 검체 결과가 일치하지 않았다. 이 실험 결과 PNA-mediated real time PCR Clamping법에 의한 유두상암의 BRAF 유전자 변이율은 73.8%, Dual-Priming Oligonucleotide (DPO) based Real-Time PCR법에 의한 BRAF 유전자 변이율은 66.7%를 나타내었으며, 검사법 사이의 변이율 차이나 검사법 사이의 일치율은 대상 환자 수가 적어 통계학적으로는 유의하지 않았다(Table 1) ($P > 0.05$).

고 찰

갑상선 결절은 성인 인구에서 초음파 검사로 약 40% 정도에서 발견되는 흔한 질환이며, 연령이 증가할수록 발견율이 증가한다. 결절이 발견되면 세포 흡인 검사를 통해 양성과 악성을 구분하는 것이 중요하며, 악성인 경우에는 수술로 갑상선 절제술을 해야 하지만, 양성으로 판정될 경우에는 치료가 불필요한 경우가 많다. 최근 초음파 기술의 발달과 함께 세포 흡인 검사는 외래에서 간편하게 시행할 수 있는 검사이기 때문에 많이 활용되고 있다. 하지만 초음파 소견에서 악성이 의심되더라도 세포 흡인 검사에서 unsatisfactory 또는 benign 또는 atypia of undetermined significance로 나오는 경우 임상 의사에게는 쉽게 수술 결정을 못하고 망설일 때가 많다. 우리나라의 경우 갑상선암이 가장 흔한 내분비계 암이며 이 중 95% 이상이 유두상암이기 때문에 (2) 최근에는 갑상선암의 진단율을 높이기 위해 수술 전에 BRAF 유전자 돌연변이를 검사하는 경우가 증가하고 있다.

BRAF 유전자 돌연변이 검사법은 여러 방법이 보고되고 있다. Direct DNA sequencing, PCR-RFLP, Dual-Priming Oligonucleotide (DPO) based Real-Time PCR, PCR-single strand conformation polymorphism 그리고 pyrosequencing법 등이 보고되고 있다.(9) 전통적인 검사법은 direct DNA sequencing법이다. 하지만 이 방법은 비용도 비싸고 결과가 나오는데 약 10시간 정도 걸린다는 단점이 있다. Kwak 등(9)은 BRAF 유전자 변이 검사에 direct DNA sequencing법을 이용하여 결과 차이를 비교하였는데, Dual-Priming Oligonucleotide (DPO) based Real-Time PCR 검사법은 간단하고 결과가 볼 수 있는데 5시간도 걸리지 않을 뿐 아니라 민감도와 정확도에서는 더 좋은 결과를 보여 주었다. 이에 저자들은 최근 국내에서 개발된 PNA-mediated real time PCR Clamping법을 세포 흡인 검체를 통해 multiplex PCR법과의 차이를 알아보 고자 하였다. 모든 검체가 수술 후 유두상암으로 확진된 환자였기 때문에 두 가지 방법의 specificity는 100%가 될 수밖에

에 없었다. 하지만 총 42개의 검체 중 PNA-mediated real time PCR Clamping법에서 31개의 검체가 BRAF 유전자 변이를 보였고, Dual-Priming Oligonucleotide (DPO) based Real-Time PCR법에서는 28개의 검체만 변이를 보였다. 3개의 검체에서 결과 차이를 보였는데 이는 검사법 간의 민감도 차이보다는 DNA 추출하는 과정에서 종양세포 보다는 조직구나 염증세포 같은 정상세포가 더 많이 포함되어 BRAF 유전자 변이 결과에 영향을 주었을 경우로 생각된다. 이 3개의 검체를 다시 검사하지는 않았지만 종양세포가 많이 포함된 검체에서 다시 DNA를 추출하여 검사한다면 다른 결과를 보일 수도 있을 것이다.

유전자 변이 검출율의 차이는 대상 검체 수가 적어 어떤 방법이 더 좋다고 결론을 내기 힘들지만, PNA-mediated real time PCR Clamping법으로 BRAF 유전자 변이를 검사하는 것도 좋은 방법이라고 생각한다. 이 방법은 야생형 염기서열과 상보적인 PNA probe를 이용한 Real time PCR 기반의 기술이다. PNA는 일종의 인공 DNA로 상보적인 핵산에 대한 강한 결합력, 높은 특이성을 가지고 있다. PNA-mediated PCR clamping법은 PNA의 이러한 장점과 DNA polymerase에 대한 primer로 사용될 수 없는 점을 이용하여 개발되었으며, 야생형 DNA는 PNA probe에 의해 PCR 증폭이 억제되고, 돌연변이 DNA만 선택적으로 증폭됨으로써 극소량의 돌연변이를 검출하는 기술이다. 또 다른 장점은 검사 후 결과를 보는데 3시간 30분 정도면 충분하다는 것이다.

수술 전 BRAF 유전자 돌연변이 검사의 장점은 앞서 언급이 되었지만, 수술 전 세포 흡인 검사의 결과가 애매한 경우 수술을 결정하는 데 도움을 줄 수 있을 뿐만 아니라 수술 중 동결절편검사의 횟수를 줄일 수 있어 수술 시간을 20~30분 정도 단축시킬 수 있을 뿐만 아니라 환자에게도 전신마취의 시간을 줄일 수 있어 유용하다. 그리고 고령이나 전신 질환으로 수술을 받을 수 없는 경우 표적 치료제의 연구 및 개발에 도움을 줄 수 있다.

최근 흑색종에서도 BRAF 유전자 변이와 연관한 다양한 표적 치료제들을 개발하고 있고 대표적인 약제군 중 하나가 BRAF 억제제(BRAF Inhibitors)이다. Sorafenib, RAF-625, XL-281 등이 이에 속하는데, 최근에는 선택적인 BRAF 억제제들이 개발되었고, 임상연구에서 가장 앞선 약제 중 하나가 PXL4032이다.(10,11) PLX4032를 이용한 Phase I 임상 시험에서 16명의 BRAF 유전자변이 흑색종 환자 중 14명의 환자에서 종양의 크기가 완전 관해를 보였고 56%의 환자에서는 부분 관해를 보였다고 한다.(12) 아직 이 연구는 진행 중이지만, 6개월 간의 결과만 보면 상당히 의미있는 결론을 얻을 것으로 평가할 수 있겠다. 최근에는 Vemurafenib (Zelboraf)라는 약제가 미국 FDA에서 BRAF 유전자 변이 전이성 악성 흑색종에서 치료제로 승인받아 본원에서 임상 시험이 진행 중이다. 치료시작 후 Fluorodeoxyglucose-positron emission tomography 검사에서도 상당히 긍정적인 결과를

었었다고 한다. 흑색종에도 이러한 연구가 진행되어 조금씩 좋은 결과를 보여주듯이 갑상선암이나 특히 유두상변이 역형성암에서도 BRAF 유전자 변이가 발견되기 때문에 환자의 무병생존율 향상에 도움을 줄 것으로 기대된다.

유두상암에서 BRAF 유전자 변이는 임상병리학적 특징이나 예후인자와의 관계에서 관계가 있다는 보고도 있고 그렇지 않다는 보고도 있다. Frasca 등(13)의 연구에서는 갑상선외 침윤, 크기 그리고 림프절 전이였고, Kebebew 등(14)의 연구에서 관련이 있는 인자는 나이, 병기, 림프절전이, 국소재발, 원격전이였다. Xing 등(15)과 Lee 등(16)은 변이가 있는 군에서 없는 군보다 수술 후 재발률이 유의하게 차이가 나는 것을 보고하였다. 그러나 Puxeddu 등(17)의 연구에서는 갑상선 유두암에서 나이, 성별, 암종의 크기, 갑상선외 침윤, 림프절 전이 그리고 병기와 유전자 변이 사이에는 관련이 없는 것으로 나타났다. 본 연구에서는 수술 후 임상병리학적 특징 및 예후 인자에 대해서는 조사하지 않아 BRAF 유전자 변이와의 상관 관계는 알 수 없었지만 대상 환자 수가 더 늘어나고 추적 관찰 기간이 길게 되면 예후와 유전자 변이와의 관계도 조사를 할 계획이다.

결론

비록 제한된 환자수이지만 PNA-mediated real time PCR Clamping법은 Dual-Priming Oligonucleotide (DPO) based Real-Time PCR법과의 BRAF 유전자 변이 결과에서 그에 못지 않은 결과를 보여주었으며, 검사법도 간단하기 때문에 임상에서 그 사용이 증가될 것으로 생각된다. 특히 세포 흡인 검사 결과가 애매할 경우 수술 여부를 결정하는데 중요한 정보를 제공해 줄 수 있다. 하지만 유전자 변이와 예후 관계에 대해서는 더 많은 환자수를 대상으로 추적 관찰이 이루어져야 할 것이다.

REFERENCES

- 1) Weiss RE, Lado-Abeal J. Thyroid nodules: diagnosis and therapy. *Curr Opin Oncol* 2002;14:46-52.
- 2) Ministry for Health, Welfare and Family Affairs. Annual report of cancer incidence (2007), cancer prevalence (2007) and survival (1993-2007) in Korea. Seoul: Ministry for Health, Welfare and Family Affairs; 2009.
- 3) Hamacher C, Studer H, Zbaeren J, Schatz H, Derwahl M. Expression of functional stimulatory guanine nucleotide binding protein in nonfunctioning thyroid adenomas is not correlated to adenylate cyclase activity and growth of these tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1724-32.
- 4) Fusco A, Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Pilotti S, Pierotti MA, et al. A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. *Nature* 1987;328:170-2.
- 5) Feinstein E, Gale RP, Reed J, Canaani E. Expression of the normal p53 gene induces differentiation of K562 cells. *Oncogene* 1992;7:1853-7.
- 6) Frasca F, Nucera C, Pellegri G, Gangemi P, Attard M, Stella M, et al. BRAF(V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2008;15:191-205.
- 7) Kim SK, Kim DL, Han HS, Kim WS, Kim SJ, Moon WJ, et al. Pyrosequencing analysis for detection of a BRAFV600E mutation in an FNAB specimen of thyroid nodules. *Diagn Mol Pathol* 2008;17:118-25.
- 8) Lee HJ, Choi J, Hwang TS, Shong YK, Hong SJ, Gong G. Detection of BRAF mutations in thyroid nodules by allele-specific PCR using a dual priming oligonucleotide system. *Am J Clin Pathol* 2010;133:802-8.
- 9) Kwak JY, Kim EK, Kim JK, Han JH, Hong SW, Park TS, et al. Dual priming oligonucleotide-based multiplex PCR analysis for detection of BRAFV600E mutation in FNAB samples of thyroid nodules in BRAFV600E mutation-prevalent area. *Head Neck* 2010;32:490-8.
- 10) Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004;64:7099-109.
- 11) Sala E, Mologni L, Truffa S, Gaetano C, Bollag GE, Gambacorti-Passerini C. BRAF silencing by short hairpin RNA or chemical blockade by PLX4032 leads to different responses in melanoma and thyroid carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 2008;6:751-9.
- 12) Flaherty KT, Hodi FS, Bastian BC. Mutation-driven drug development in melanoma. *Curr Opin Oncol* 2010;22:178-83.
- 13) Frasca F, Nucera C, Pellegri G, Gangemi P, Attard M, Stella M, et al. BRAF(V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2008;15:191-205.
- 14) Kebebew E, Weng J, Bauer J, Ranvier G, Clark OH, Duh QY, et al. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Ann Surg* 2007;246:466-70.
- 15) 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;90:6373-9.
- 16) Lee X, Gao M, Ji Y, Yu Y, Feng Y, Li Y, et al. Analysis of differential BRAF(V600E) mutational status in high aggressive papillary thyroid microcarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2009;16:240-5.
- 17) Puxeddu E, Moretti S, Elisei R, Romei C, Pascucci R, Martinelli M, et al. BRAF(V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2414-20.