



¹ Kür at O uz YAYKA LI

² Nesibe YAMAK

³ Murat OKTAY

² Emine YAYKA LI

⁴ Elif Önder

⁵ Nilay AYDIN OKTAY

⁴ Yusuf AYDIN

¹ Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Düzce.

² Düzce Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Düzce.

³ Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Düzce.

⁴ Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları AD, Düzce.

⁵ Düzce Atatürk Devlet Hastanesi Radyoloji Klini i, Düzce.

Submitted/Ba vuru tarihi:

02.01.2013

Accepted/Kabul tarihi:

15.10.2013

Registration/Kayıt no:

13.10.323

**Corresponding Address /
Yazı ma Adresi:**

Kür at O uz YAYKA LI, PhD.

Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı,
81620 Konuralp, Düzce, Türkiye.
E-mail:kursatay@yahoo.com

© 2013 Düzce Medical Journal
e-ISSN 1307- 671X
www.tipdergi.duzce.edu.tr
duzcetipdergisi@duzce.edu.tr

Papiller Tiroid Kanseri Brak T1799a Mutasyonunun Tümör Büyüklü üne Etkisi

The Effect of BRAF T1799A Mutation on Tumor Size of Papillary Thyroid Cancer

ÖZET

Amaç: Tiroid kanseri en yaygın endokrin malignitesidir ve tüm dünyada insidansı giderek artmaktadır. Tüm tiroid kanseri vakalarının yaklaşık % 80'ini teşkil eden papiller tiroid kanserinin etyolojisinde BRAF T1799A mutasyonu önemli bir rol oynamaktadır. Bu çalışmanın amacı BRAF T1799A mutasyonunun tiroid kanserindeki frekansı ve tümör büyüklü ü ile muhtemel ilişkisini ara tırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya tiroid kanseri tanısı konmuş 58 olgu ve kanserden başka sebeplerle opere edilmiş 52 olgu olmak üzere toplam 108 olgu dahil edilmiştir. Olguların parafine gömülü dokularından DNA izole edilerek genotipleme PCR-RFLP yöntemiyle analiz edilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS 17.0 programı kullanılarak yapılmıştır. P değeri 0,05'ten küçük değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Bulgular: Tiroid kanseri ile kontrol grupları arasında AA genotipi açısından istatistiksel bir anlam bulunamazken TA genotipi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edildi (p=0,0001, OR=7,089 (2,7-18,6)). Tümör boyutu 1 cm'den küçük ve büyük olan papiller tiroid kanseri grupları arasında hem TA genotipi (p=0,51, OR=0,641 (0,1-2,4)) hem de AA genotipi (p=0,67, OR=0,694 (0,1-3,8)) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı.

Sonuç: Tiroid kanseri diğer kanser türleri arasında en fazla artışına sahip olduğundan moleküler temelinin aydınlatılması önem kazanmıştır. Yapılan bu çalışmada en yaygın görülen BRAF T1799A mutasyonunun tümör büyüklü üne etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Fakat daha net sonuçlar alabilmek için çalışmada daha büyük popülasyonlarda tekrarlanmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Papiller tiroid kanseri, BRAF, tümör boyutu.

SUMMARY

Objective: The incidence of thyroid cancer, the most common endocrine malignancy is increasing in all populations. Papillary thyroid cancer constitutes approximately 80 % of the thyroid cancers and several BRAF gene mutations especially T1799A are involved in the etiology of papillary thyroid cancer. The aim of this study was to investigate the frequency of BRAF T1799A mutation in thyroid cancer and the possible association between BRAF T1799A mutation and tumor size.

Methods: The study was conducted with 58 cases with thyroid cancer and 52 cases with no cancer in totally 108 cases. DNA isolated from paraffin-embedded tissues of cases, and the genotypes were analyzed by PCR-RFLP method. Statistical analyses were performed using SPSS 17.0 software. P values less than 0.05 were accepted as statistically significant.

Results: There was no statistically significant association between patient and control groups in term of the AA genotype. However TA genotype was significantly higher in patient group than control group (p=0.0001, OR=7.089 (2.7-18.6)). When comparing less and more than 1 cm tumor size groups in papillary thyroid cancer cases, there was no statistically significant association for TA genotype (p=0,51, OR=0,641 (0,1-2,4)) and AA genotype (p=0,67, OR=0,694 (0,1-3,8)).

Conclusion: Thyroid cancer has the most increasing rate among all cancers types in the world. So, the elucidation of the molecular basis in detail has gained the great importance. In this study, it was concluded that BRAF T1799A mutation has no effect on tumor size. However, this study should be repeated with larger population to get more confident results.

Key Words: Papillary thyroid cancer, BRAF, tumor size.

G R

Ça ımızın vebası olarak da tanımlanan kanser hastalı ı dünyadaki ölümler arasında ba lıca ölüm sebeplerinden biridir ve ya am kalitesini dü rtmektedir. 2008 yılı verilerine göre dünyada 12,7 milyon yeni kanser vakası ve 7,6 milyon kanser nedeni ölüm gerçekleş mi tir (1, 2). En yaygın endokrin malignitesi olan tiroid kanserinin insidansı dünyada ve ülkemizde giderek artmaktadır. Bu artı , Amerika Birle ik Devletleri'nde 2009 yılı için 37.200 vakayla di er kanser türleri arasında en hızlısıdır. Klasik sınıflandırmaya göre tiroid kanseri papiller, foliküler, medüller ve anaplastik olmak üzere dört ana sınıfa ayrılmaktadır. Tüm tiroid kanseri vakaları arasında papiller tiroid kanseri yakla ık % 80 insidansıyla en fazla görülen tiroid kanseri tipidir (3-5). Tiroid kanserinin moleküler temelinde genellikle BRAF ve RAS genlerindeki mutasyonlar ile RET (rearranged during transfection) proto-onkogenindeki yeniden düzenlenmelerin (rearrangements) etkili oldu u son yıllarda yapılan ara tırmalarda detaylı bir eklede ortaya konmu tur (6, 7). B-Raf proteinin kodlayan BRAF proto-onkogenindeki mutasyonlar tüm kanserlerde oldu u gibi papiller tiroid kanserinde de vakalarının yakla ık % 40-45'inde görülmektedir. BRAF gen ifadesini arttıran mutasyonlar tiroid hücreleri için tümörjenik olan MAPK sinyal yola mı aktifle tirmek suretiyle papiller tiroid kanserinin moleküler temelinde rol alır (8-10). Papiller tiroid kanserinde görülen BRAF gen mutasyonları arasında en fazla BRAF T1799A mutasyonu görülmektedir. Papiller tiroid kanserlerinin yakla ık olarak yarısında görülen bu mutasyonda timin bazının adenin bazıyla yer de i tirmesiyle valin aminoasidi yerine glutamat aminoasidi (V600E) olu ur (11-13).

Dünya Sa lık Örgütü tarafınca çapı 1 cm'den küçük olan tümörlere papiller tiroid mikro kanser olarak tanımlanmaktadır (14). Küçük boyutlarından dolayı önceleri fazla tanımlanamayan mikro kanser, son zamanlarda geli mi görüntüleme sistemlerinin geli tirilmesiyle daha fazla tanımlanabilmektedir (15). Yapılan analizlerde BRAF T1799A mutasyonu papiller tiroid mikro kanser vakalarının % 30-50'sinde görüldü ü bilinmektedir (16). Fakat tümör büyüklü ü 1 cm'den küçük ve büyük papiller tiroid kanserleri arasında BRAF T1799A mutasyonu açısından anlamlı bir ili kinin olup olmadı ı yeteri kadar ara tırılmamı tir. Bu çalı manın amacı BRAF T1799A mutasyonun tiroid kanserindeki frekansı ve tümör büyüklü ü ile muhtemel ili kisini ara tırmaktır.

MATERYAL VE METOD

Çalı maya, Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı tarafından tiroid kanseri tanısı konmu 58 hasta ve kanserden ba ka sebeplerle opere edilmi 52 olgu dahil edilmi tir. Olguların parafine gömülü dokularından kesitler alınarak 2x5µm boyutlarında kesitler alındı. Ayrıca olguların ya , cinsiyet ve tümör derecesi gibi demografik bilgileri kayıt edilmi tir.

Elde edilen bu dokulardan DNA izolasyonu analitikjena blackPREP FFPE DNA Kiti kullanılarak yapıldı (17). Kısaca, kesitlerin üzerine 400 µl lizis solüsyonu ve 25 µl Proteinaz K eklenip, sırasıyla 50 °C'ta 1 saat ve 90 °C'ta 2 saat inkübe edildi. nkübasyon bitiminde maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant filtrelili yeni bir tüpe alınıp üzerine 200 µl ba lanma solüsyonu eklendi. Santrifüj sonrası filtreye ba lanan DNA'lar iki defa yıkandıktan sonra üzerine elüsyon solüsyonu eklenip, santrifüj edilerek DNA elde edildi. BRAF genindeki T1799A mutasyonu, polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (polymerase chain reaction-restriction fragment lenght polymorphism=PCR-RFLP) yöntemiyle analiz edildi (18). T1799A mutasyonu içeren 224 bç (baz çifti) bölge forward; 5-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA ve reverse;5-GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA primerleri kullanılarak PCR yöntemiyle ço altıldı. PCR için 5 dakika 95 °C'de ilk denatürasyon yapıldıktan sonra 35 döngü (1 dakika 95 °C'de denatürasyon, 1 dakika 55 °C'de ba lanma ve 1 dakika 72 °C'de uzama) müteakip 72 °C'de 10 dk son uzama gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünü TspRI (NEB, UK) restriksiyon enzimi ile 16 saat inkübe edilip agaroz jelde yürütüldü. Jelde görülen bandların büyüklüklerine bakılarak analiz yapıldı. Mutasyonsuz normal gen diziliminde 2 adet TspRI enzim kesim bölgesi oldu undan 124, 87 ve 13 bç'lik DNA parçaları olu urken, mutasyonlu gen diziliminde TspRI kesim bölgelerinden biri kayboldu undan 211 ve 13 bç'lik DNA parçaları olu maktadır.

statistiksel de erlendirme için SPSS 17.0 paket programı kullanılmı tir. Gruplar arasında sayısal de i kenlerin kar ıla tırılmasında Student's t-testi, kategorik veriler için ise Ki-kare testi yapıldı. Tüm de i kenlerin birlikte ili kisi Lojistik regresyon analizi ile kontrol edildi. Betimleyici de er olarak ortalama ± standart sapma ve oranlar verildi. P de eri 0,05 düzeyi anlamlı seviye olarak kabul edildi.

SONUÇLAR

Hasta grubu 42'si bayan 16'sı erkek olmak üzere toplam 58 tiroid kanseri hastasından, kontrol grubu ise 34'ü bayan 16'sı erkek olmak üzere toplam 50 olgudan olu turuldu (p=0,616). Kontrol grubunun ya ortalaması 49,7±11,5 iken hasta grubunun ya ortalaması 45,5±13,3 olarak bulundu (p=0,09). Tiroid kanserli hastaların 7 (% 6,5)'si foliküler karsinom, 22 (% 37,9)'si papiller mikro karsinom ve 29 (% 50)'ü ise papiller makro karsinom olarak tespit edildi. Hasta grubu ile kontrol grubu arasında ya ve cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ili ki bulunamadı (Tablo 1).

Tiroid kanseri grubu olgularının 15 (% 25,9)'i TT genotipinde, 33 (% 56,9)'ü TA genotipinde ve 10 (% 17,2)'ü AA genotipinde oldu u bulunurken, kontrol grubu olguların 29 (% 58)'ü TT genotipinde, 9 (% 18)'ü TA genotipinde ve 12 (% 24)'si AA

Tablo 1. Çalı ma popülasyonun klinik ve demografik özellikleri.

De i kenler		Toplam (n=108)	Kontrol (n=50)	Tiroid CA (n=58)	p (2)
Ya		47,4±12,5	49,7±11,5	45,5±13,3	0,09
Cinsiyet	Bayan, n (%)	76 (70,4)	34 (68)	42 (72,4)	0,61
	Erkek, n (%)	32 (29,6)	16 (32)	16 (27,6)	
Tümör tipi	Foliküler, n (%)	7 (6,5)	-	7 (12,1)	-
	Papiller, (1 cm), n (%)	22 (20,4)	-	22 (37,9)	
	Papiller, (>1 cm), n (%)	29 (26,8)	-	29 (50)	

Tablo 2. Tiroid kanseri ve kontrol gruplarında genotiplerin dağılımı.

Genotipler	Toplam (n=108)	Kontrol (n=50)	Tiroid CA (n=58)	p (2)	Log Reg	
					OR (95% CI)	p
TT, n (%) (R)	44 (40,7)	29 (58)	15 (25,9)	0,0001	1	-
TA, n (%)	42 (38,9)	9 (18)	33 (56,9)		7,089 (2,7-18,6)	0,0001
AA, n (%)	22 (20,4)	12 (24)	10 (17,2)		1,611 (0,5-4,5)	0,37

Tablo 3. Tümör boyutlarına göre papiller tiroid kanseri gruplarında genotiplerin dağılımı.

Genotipler	Toplam (n=51)	Papiller (1 cm) (n=22)	Papiller (>1 cm) (n=29)	p (2)	Log Reg	
					OR (95% CI)	p
TT, n (%) (R)	14 (27,4)	5 (22,8)	9 (31)	0,87	1,0	-
TA, n (%)	28 (55)	13 (59)	15 (51,7)		0,641 (0,1-2,4)	0,51
AA, n (%)	9 (17,6)	4 (18,2)	5 (17,3)		0,694 (0,1-3,8)	0,67

genotipi olarak bulundu (Tablo 2). Yapılan istatistiksel analizlerde AA genotipi açısından istatistiksel bir anlam bulunamazken TA genotipi açısından hasta ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir (p=0,0001, OR=7,089 (2,7-18,6)).

Tümör boyutuna göre papiller tiroid kanseri grupları arasında genotip dağılımı analiz edildi (Tablo 3). Tümör boyutu 1 cm'den küçük olan olguların 5 (% 22,8)'i TT genotipinde, 13 (% 59)'u TA genotipinde ve 4 (% 18,2)'ü AA genotipindeyken, tümör boyutu 1 cm'den büyük olan olguların 9 (% 31)'u TT genotipinde, 15 (% 51,7)'i TA genotipinde ve 5 (% 17,3)'i AA genotipinde olduğu görüldü. Gerek TA genotipi (p=0,51, OR=0,641 (0,1-2,4)) gerekse AA genotipi (p=0,67, OR=0,694 (0,1-3,8)) açısından papiller tiroid kanseri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı.

TARTI MA

insidansının düşük olmasına karşın tiroid kanseri diğer tüm kanser türleri arasında en fazla artışına sahip kanser türüdür. BRAF gen mutasyonlarının tiroid kanserinin moleküler temelinde rol aldığı bilinmesine rağmen BRAF gen mutasyonlarının tümör boyutu ile ilişkiyi yeteri kadar araştırılmamıştır. Bu çalışmada, kanser vakalarında en yaygın bulunan BRAF T1799A mutasyonunun tiroid kanserinde görülme sıklığı ile bu mutasyonun tümör boyutuyla muhtemel ilişkiyi Türk popülasyonunda araştırıldı. Elde edilen deneysel verilere göre BRAF T1799A mutasyonu tiroid kanserinde anlamlı derecede fazla çıkarken, tümör büyüklüğü ile anlamlı bir ilişki edilememiştir.

BRAF geni mitojen tarafından aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yolu gibi birçok hayati fonksiyonu ifâ eden yollarda etkin rol almaktadır. Bundan dolayı herhangi bir sebeple mutasyona uğraması durumunda kanser oluşumunda etkili olabilmektedir. Yapılan araştırmalarda hemen hemen tüm kanser türlerinde BRAF geninin mutasyonlu olduğu ve mutasyon insidansının kanser türüne ve popülasyonlara göre değişimlikler arz ettiği belirtilmektedir (19, 20). Bugüne kadar yapılan araştırmalarda BRAF geninde V600K, T599I gibi çeşitli mutasyonlar rapor edilmesine karşın en yaygın gözlenen mutasyon T1799A (V600E) mutasyonudur ve bu mutasyonun birçok kanser

türünde etkili olduğu rapor edilmiştir (21, 22).

Tiroid kanserinin mortalitesi düşüktür ve uygulanan radyoaktif iyot tedavisi genellikle başarılı olmaktadır. Fakat kanserin nüksetme riski ve tedavisi ya am standardını düşürmektedir. Tiroid kanserinin tanısı genellikle ince iğne aspirasyon yöntemiyle konmaktadır fakat bu yöntemin çeşitli zorlukları olduğu ve bazı durumlarda kesin sonuç alınamamaktadır. Bundan dolayı tiroid kanserinin etyolojisinde rol alan genlerin tanımlanması tiroid kanserine yakalanma riskinin hesaplanması açısından önemlidir. Kanser tanısının konulduğu hastanın ileri yaşlarda olması, metastaz, invazyon, cinsiyet ve tümör büyüklüğü gibi faktörler tiroid kanseri hastaları için bilinen risk faktörleridir (23, 24). Tiroid papiller tiroid kanserinde tümör büyüklüğü tedavi yöntemini etkilediğinden tümör büyüklüğü için önceden analiz edilebilen risk faktörlerinin tanımlanması uygulanacak tedavi açısından faydalı olacaktır. BRAF T1799A mutasyonu ile tümör büyüklüğü arasındaki muhtemel ilişkiyi araştıran çalışmalar literatürde mevcuttur. Bu araştırmalarda BRAF T1799A mutasyonunun küçük boyutlardaki tümör vakalarında daha fazla olduğu (25, 26) gibi büyük boyutlardaki tümör vakalarında daha fazla olduğu rapor edilmiştir (27, 28). Bizim yaptığımız çalışmada ise BRAF T1799A mutasyonu tiroid kanseri olgularında anlamlı derecede yüksek çıkmasına karşın tümör boyutu ile anlamlı bir ilişki tespit edilemedi. Bu yönüyle bizim çalışmamız Kim ve ark.'nın yaptıkları çalışması ile uyumluluk göstermektedir. 89 olgu üzerinde yapılan bu çalışmada BRAF V600E mutasyonunun tümör büyüklüğü ile ilişkisi olmadığı rapor edilmiştir (29). Literatürdeki bu veriler arasındaki farklılıkların temel sebebi analiz edilen popülasyonların farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak, BRAF T1799A mutasyonunun papiller tiroid kanserinde tümör büyüklüğüne etkisi olmadığı bulunmasına karşın, daha güvenilir veriler elde edebilmek için bu çalışmada daha büyük popülasyonlar kullanılarak tekrarlanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Karabulutlu EY, Bilici M, Cayir K, Tekin SB, Kantarci R. Coping, Anxiety and Depression in Turkish Patients with cancer. Eur J of Gen Med 2010; 7: 296-302.

2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61): 69-90.
3. Pazaitou-Panayioutou K, Polyzos SA, Mantzoros CS. Obesity and thyroid cancer: epidemiologic associations and underlying mechanisms. *Obes Rev*. 2013 Aug 28. doi: 10.1111/obr.12070. [Epub ahead of print]
4. Xing M. Prognostic utility of BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 321(1): 86-93.
5. Li Y, Nakamura M, Kakudo K. Targeting of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma (review). *Oncol Rep* 2009; 22(4): 671-81.
6. Legakis I, Syrigos K. Recent advances in molecular diagnosis of thyroid cancer. *J Thyroid Res* 2011; 2011: 384213.
7. Witt RL, Ferris RL, Pribitkin EA, Sherman SI, Steward DL, Nikiforov YE. Diagnosis and management of differentiated thyroid cancer using molecular biology. *Laryngoscope* 2013; 123(4): 1059-64.
8. Davies H, Bignell GR, Cox C, et.al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002; 417(6892):949-54.
9. Pakneshan S, Salajegheh A, Smith RA, Lam AK. Clinicopathological relevance of BRAF mutations in human cancer. *Pathology* 2013; 45(4):346-56.
10. Espinosa AV, Porchia L, Ringel MD. Targeting BRAF in thyroid cancer. *Br J Cancer* 2007; 96(1):16-20.
11. Nikiforov YE. Molecular analysis of thyroid tumors. *Mod Pathol* 2011; 24 Suppl 2: S34-43.
12. Kumagai A, Namba H, Akanov Z, Saenko VA, Meirmanov S, Ohtsuru A, Yano H, Maeda S, Anami M, Hayashi T, Ito M, Sagandikova S, Eleubaeva Z, Mussinov D, Espenbetova M, Yamashita S. Clinical implications of pre-operative rapid BRAF analysis for papillary thyroid cancer. *Endocr J* 2007; 54(3): 399-405.
13. Nucera C, Lawler J, Hodin R, Parangi S. The BRAFV600E mutation: what is it really orchestrating in thyroid cancer? *Oncotarget* 2010; 1(8): 751-6.
14. Lloyd R, De Lellis R, Heitz P, Eng C. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of the endocrine organs. Lyon, France: IARC Press International Agency for Research on Cancer; 2004.
15. Renshaw AA. Papillary carcinoma of the thyroid <or=1.0 cm: rarely incidental or occult any more. *Cancer* 2005; 105(4):217-9.
16. Frasca F, Nucera C, Pellegriti G, Gangemi P, Attard M, Stella M, Loda M, Vella V, Giordano C, Trimarchi F, Mazzone E, Belfiore A, Vigneri R. BRAF(V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2008; 15(1): 191-205.
17. Yamak N, Yaykasli KO, So ukta H, Yayka lı E, Oktay M, Erdem H, Kaya E, Ekinci A, Kaya S, Kurman Y. Mide Kanseri Hastalarda Survivin Gen Polimorfizminin Ara tırılması. *Dicle Tıp Dergisi* 2012; 39(4):499-503.
18. Powell N, Jeremiah S, Morishita M, Dudley E, Bethel J, Bogdanova T, Tronko M, Thomas G. Frequency of BRAF T1796A mutation in papillary thyroid carcinoma relates to age of patient at diagnosis and not to radiation exposure. *J Pathol* 2005; 205(5):558-64.
19. Schulten HJ, Salama S, Al-Mansouri Z, Alotibi R, Al-Ghamdi K, Al-Hamour OA, Sayadi H, Al-Aradati H, Al-Johari A, Huwait E, Gari M, Al-Qahtani MH, Al-Maghrabi J. BRAF mutations in thyroid tumors from an ethnically diverse group. *Hered Cancer Clin Pract* 2012; 10(1): 10.
20. Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, Beller U, Westra WH, Ladenson PW, Sidransky D. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(8): 625-7.
21. Rubinstein JC, Sznol M, Pavlick AC, Ariyan S, Cheng E, Bacchicocchi A, Kluger HM, Narayan D, Halaban R. Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. *J Transl Med* 2010; 8: 67.
22. De Falco V, Giannini R, Tamburrino A, Ugolini C, Lupi C, Puxeddu E, Santoro M, Basolo F. Functional characterization of the novel T599I-VKSRdel BRAF mutation in a follicular variant papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(11): 4398-402.
23. Nam SY, Han BK, Ko EY, Kang SS, Hahn SY, Hwang JY, Nam MY, Kim JW, Chung JH, Oh YL, Shin JH. BRAF V600E mutation analysis of thyroid nodules needle aspirates in relation to their ultrasonographic classification: a potential guide for selection of samples for molecular analysis. *Thyroid* 2010; 20(3):273-9.
24. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 2007; 28(7): 742-62.
25. 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)*. 2006; 65(3): 364-8.
26. 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 V600E mutation on expression of vascular endothelial growth factor in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(9): 3667-70.
27. 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* 2005; 90(12): 6373-9.
28. Kurtulmus N, Duren M, Ince U, Cengiz Yalciner M, Peker O, Aydın O, Altıok E, Giray S, Azizlerli H. BRAF(V600E) mutation in Turkish patients with papillary thyroid cancer: strong correlation with indicators of tumor aggressiveness. *Endocrine* 2012; 42(2): 404-10.
29. Kim TY, Kim WB, Song JY, Rhee YS, Gong G, Cho YM, Kim SY, Kim SC, Hong SJ, Shong YK. The BRAF mutation is not associated with poor prognostic factors in Korean patients with conventional papillary thyroid microcarcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 63(5): 588-93.