



# Mouse models of papillary thyroid carcinoma — short review

## Mysie modele raka brodawkowego tarczycy — krótki przegląd

Dagmara Rusinek<sup>1</sup>, Jolanta Krajewska<sup>1</sup>, Michał Jarzab<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch, Gliwice, Poland

<sup>2</sup>III Department of Radiotherapy and Chemotherapy, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch, Gliwice, Poland

### Abstract

Thyroid carcinoma (TC) is the most common endocrine malignancy, and its frequency is still rising. Papillary thyroid carcinoma (PTC) accounts for 80% of all TCs and usually is related to a very good prognosis. However, the standard therapeutic approaches are not always sufficient and disease progression is sometimes observed. These data highlight the limitation of our understanding of molecular mechanisms underlying tumorigenesis and how they vary between individual patients. Over the last 19 years mouse models of thyroid cancers have been developed in order to give answers to questions about their genetic background, relations of key molecular events with pathways fundamental for cancer, and many others. Among these models genetically engineered mice were of utmost importance regarding the input of knowledge about human tumorigenesis. In the present review the most significant mouse models of PTC are described with particular emphasis on *BRAFV600E*-induced ones, for the sake of its frequency in PTC, relation to factors of poor prognosis, and the fact that, since its identification, it became an attractive target in novel therapies. For the presented mouse models phenotype consequences of particular genetic alterations are described as well as the limitations of the used methods. (*Endokrynol Pol* 2016; 67 (2): 212–223)

**Key words:** mouse model; papillary thyroid carcinoma; *BRAFV600E*

### Streszczenie

Rak tarczycy (TC) stanowi większość nowotworów złośliwych układu endokrynnego. Obserwuje się stały przyrost zachorowalności na TC, szczególnie na raka brodawkowego tarczycy (PTC), który stanowi aż 80% wszystkich TC. Rak brodawkowy tarczycy wiąże się najczęściej z bardzo dobrym rokowaniem. Zdarzają się jednak chorzy, w przypadku których standardowe leczenie okazuje się niewystarczające i obserwuje się progresję choroby, co podkreśla ograniczenia naszego zrozumienia mechanizmów molekularnych leżących u podłoża raka, jak również indywidualnych różnic. Przez ostatnich 19 lat zostało opracowanych wiele mysich modeli raka tarczycy, w celu odpowiedzi na pytania dotyczące jego podłoża genetycznego, związku kluczowych zmian genetycznych z fundamentalnymi dla raka ścieżkami sygnałowymi oraz wiele innych aspektów. Ze względu na wkład w poznanie mechanizmów ludzkiej kancerogenezy największe znaczenie odegrały modele oparte o genetyczne modyfikacje. W poniższym przeglądzie przybliżone zostały najważniejsze mysie modele raka brodawkowego tarczycy. Najwięcej uwagi poświęcono modelom PTC indukowanym mutacją *BRAFV600E* w związku z największą częstością tej zmiany w PTC, jej związkiem z gorszym rokowaniem oraz faktem, że od momentu odkrycia stała się jednym z bardziej atrakcyjnych celów w nowych terapiach. Dla prezentowanych mysich modeli PTC podano konsekwencje fenotypowe poszczególnych zmian genetycznych, jak również ograniczenia wynikające z zastosowanej metody. (*Endokrynol Pol* 2016; 67 (2): 212–223)

**Słowa kluczowe:** mysy model; rak brodawkowy tarczycy; *BRAFV600E*

### Introduction

Thyroid carcinoma (TC) constitutes the vast majority of all endocrine malignancies and is one of the few neoplasias that are more common in females than in males, comprising 2.1% of cancers in women [1]. What is more, the estimated risk of thyroid cancers may be increased by the initial diagnosis of breast cancer in women, or prostate cancer in men, or in case of initial primary cancers of the oral cavity and pharynx, kidney and renal pelvis [2]. Since the 1980s an increase in thyroid carcinoma incidence has been observed

in developed countries, mostly due to more effective diagnostic tools headed by ultrasonography and fine needle aspiration biopsy, which enable detection of subclinical tumours. However, this rise in frequency seems to be greater than could be predicted only from improved diagnostics and heightened medical surveillance. The largest increase in incidence over time is seen in papillary thyroid carcinoma (PTC) [3], being the most frequent among all thyroid cancer types (80% of cases). PTC along with follicular thyroid carcinoma (FTC) constitutes well differentiated TC (DTC), which together with poorly differentiated (PDTC) and undifferentiated



Dagmara Rusinek M.D., Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Centre and Institute of Oncology, Gliwice Branch, Gliwice, Poland, e-mail: dagmara.rusinek@io.gliwice.pl

thyroid carcinomas (ATC) represents epithelial thyroid cancers, which arise from follicular cells (also named non-medullary thyroid cancers, NMTC).

The prognosis for patients with thyroid cancers is very good, with the overall free survival rate > 95% at five years. However, there is a subset of patients who develop metastases and do not respond to systemic therapy mainly due to resistance to radioiodine treatment. This strengthens the need for the development of new targeted therapies, adapted more individually to a patient. The study of molecular mechanisms underlying thyroid cancers has shed some light on their pathogenesis and possible targets that could be used in different schemes of treatment. It has been shown that the biological behaviour of cancers is determined by their genotype, which may also influence tumour response to specific therapies. Thus, molecular analyses of cancers enable improvement of diagnostics and prediction of prognosis, which in turn has an impact on decisions about supplementary therapy and follow-up. Of all thyroid cancer types papillary thyroid carcinoma is the one with the broadest genetic background knowledge.

There are many different approaches available to model thyroid cancer. However, each has its own limitations. Taking into consideration not only the tumour but also the patients heterogeneity, human thyroid cancer is challenging to study. Limited human material availability makes it impossible to compare genetic, epigenetic, and proteomic profiles with all potentially affecting factors being included. There are well-established human cell line models almost for each thyroid cancer type. These are useful in primary analyses concerning drug development, prediction of tumour response to pharmaceutical agents, and the study of signalling pathways. However, in monolayered cultures the three-dimensional thyroid follicle, being the basic thyroid unit, is lost. The two-dimensional cultures of thyrocytes in turn may lose normal functions as TSH responsiveness [4]. Toda et al. in 2002 established new organotypic culture with the use of 3D collagen gel culture of thyroid tissue fragments with improved oxygenation through air exposure [5]. These models, by recreating thyroid follicles in vitro, give the opportunity to study information about tumour-stromal interactions [6]. However, when working with cell lines their uniqueness or derivation from the original tumour should be verified. In 2008 Schweppe et al. demonstrated significant redundancy and cross-contamination among almost 50% of analysed thyroid cell lines, with only 23 out of 40 cell lines having unique genetic profiles [7]. It is believed that mice are the best model for cancer investigation that give comprehensive information about tumour behaviour, its molecular background, clinical consequences, as well as response to specific drugs. There are three ways of inducing

tumours in mice, involving carcinogenic compounds, xenograft models based on implantation of human tumour cells as a subcutaneous or orthotopic transplants into severe combined immunodeficient (SCID) mouse strains or genetically engineered models. The first approach mentioned takes into consideration not only some chemical agents but also physical agonists as well as radiation. It gives insight mainly into the influence of environmental factors on carcinogenesis. In the case of thyroid cancers these are mostly goitrogens that significantly decrease thyroid hormone levels, which in turn leads to TSH elevation, goitre development, and some follicular neoplasm induction [8]. It is also known that ionising radiation is a well-established risk factor in PTC. The consequences of X-irradiation were studied in xenograft models demonstrating induction of *RET/PTC1* and/or *RET/PTC3*, the second most frequent molecular events in PTC, of which induction of the first one was dose-dependent [9, 10]. An advantage of xenografting is that the studies employ real human cells or human cancers, which are implemented into the mouse. On the other hand, these models require changes in the host immune system, which in consequence do not mimic the situation in actual patients. What is more, the tumour implantation site affects the tumour behaviour, for instance orthotopic implantation facilitates growth and metastases [11]. The most comprehensive and reliable results are provided by models using genetically engineered mice. It is quite impressive how far we can go in the manipulation of the mouse genome in order to study human tumorigenesis. We can now easily generate mice in which the function of a particular gene is lost, mutated, up-regulated, or down-regulated, and the introduced changes in the genome may be limited to appropriate cell types.

In this review we will present the state-of-the-art in the development of genetically engineered mouse models of human papillary thyroid carcinoma. The vast majority of human thyroid cancer mouse models were based on the production of transgenic lines by pronuclear DNA microinjection into the fertilised egg cells and of knockout lines (conventional or conditional) by homologous recombination in mouse embryonic stem cells. However, new technologies have been introduced in order to control the time and location of onset of the studied alteration, including recombinase-mediated gene modification (*Cre/Lox*), inducible exogenous genes (tetracycline/doxycycline system), and drug-inducible Cre activity (usually the Cre-ERT2 transgene, activated by tamoxifen treatment). In the present review the major PTC mouse models will be presented with particular emphasis on models with PTC induced by the most frequent genetic event, *BRAFV600E* mutation. There is strong belief that mouse models may be of high impor-

tance as pre-clinical models for therapeutic evaluation and development of new therapies.

## Molecular biology of papillary thyroid carcinoma

There are four molecular alterations associated with PTC, some of which have diagnostic and/or prognostic value. These are somatic point mutations of the *BRAF* and *RAS* genes and rearrangements of *RET* and *NTRK1* genes. It is well known that ionising radiation is a risk factor in PTC development, especially in children. Key molecular alterations observed in radiation-induced PTCs are *RET* rearrangements. *RET* gene is normally not expressed in follicular thyroid cells. However, its rearrangements with constitutively expressed genes results in unregulated expression of chimeric oncoprotein with tyrosine kinase activity. These chromosomal aberrations take the form of intrachromosomal inversions and interchromosomal translocations. *RET/PTC1* and *RET/PTC3* account the vast majority of all *RET* rearrangements identified in PTC. The first is formed by fusion with the *H4* gene (*D10S170*) and the latter by fusion with the *NCOA4* gene (named also as *ELE1*, *RFG*, or *ARA70*). The prevalence of *RET/PTC* in papillary thyroid carcinoma varies in different studies from 0 to 87% [12, 13]. This high discrepancy is partly due to geographic variability, higher incidence of *RET* rearrangements in radiation-related PTCs, and the type of detection method used. Rearrangements of *NTRK1*, a receptor tyrosine kinase normally involved in nerve growth factor signalling, are less frequent than *RET/PTC* and account for less than 12% of PTCs [14]. The most frequent molecular event in papillary thyroid carcinoma, present in 45% of PTC cases [15], is *BRAFV600E* mutation, which involves a substitution of valine for glutamate at residue 600 due to a point mutation at nucleotide 1799 [16]. The presence of this *BRAF* mutation is believed to be associated with particular factors of poor prognosis, such as lymph node metastases, extrathyroidal invasion, advanced disease stage, lack of tumour capsule [17–19], and, according to the last multicentre study of Xing et al., increased cancer-related mortality among PTC patients [20]. However, there are studies contradicting these data [21–23]. The most recent data indicate mutations in the promoter of the *TERT* gene that, coexisting with *BRAFV600E*, may determine the aggressive course of PTC and play a key role in preoperative diagnostics [24, 25]. When it comes to *RAS* point mutations, these are present in up to 16% of PTCs, with *N-RAS* being most common [26], and are mostly detected in the follicular variant of PTC. *BRAF*, *RET*, and *RAS* encode proteins of the MAPK pathway, and their alterations are believed to be

alternative events in PTC, usually not coexisting within the same tumour [26, 27]. Mutations/rearrangements of these genes lead to two different signalling consequences. Tumours harbouring *BRAFV600E* mutation do not respond to negative feedback from ERK (since mutated *RAF* signals as a monomer), which results in constitutive high MAPK signalling [28]. PTCs driven by *RAS* and RTK (receptor tyrosine kinase) fusions in turn signal via *RAF* dimers that respond to ERK feedback, resulting in lower MAPK signalling. These differences are reflected in the cancer phenotype as, for instance, expression of genes responsible for iodine uptake, and metabolism is downregulated in *BRAFV600E* tumours on a larger scale compared to tumours harbouring *RET* rearrangements or *RAS* mutations [29]. MAPK pathway seems to be the key one in PTC progression. However, as presented in many studies, other pathways such as PI3K and/or AKT/mTOR are altered as well, depending on the type of molecular event [30, 31]. Accordingly, the TCGA study distinctly highlighted two types of PTC phenotype: *BRAF*-like and *RAS*-like [32].

## *BRAFV600E*-induced papillary thyroid carcinoma mouse models

Since *BRAFV600E* mutation is present in almost half of PTC cases, extensive studies were carried out on its molecular and clinical consequences and its impact on patient response to standard and novel therapies. This genetic event is capable of initiating oncogenesis and PTC development, which was demonstrated in cell line, xenograft tumour systems as well as transgenic mouse models [33–35]. However, *BRAFV600E* mutation may occur as a secondary event as well, as presented by Vasko et al. who detected *BRAF* alteration in lymph node metastases from primary PTC that did not harbour this nucleotide substitution [36].

There have been many genetically engineered *BRAF* mouse models developed, and these are very coherent in the obtained PTCs in terms of clinical features. The first transgenic model of *BRAFV600E*-induced PTC was published by Knauf et al. in 2005 [34]. The authors created *BRAFV600E* mice under control of the bovine Tg promoter. Two distinct lines were studied, which differed in the level of transgene expression. Higher *BRAF* expression was associated with higher incidence of PTC and more aggressive course, including local invasion. However, distant metastases were not observed. The presence of *BRAF* mutation led to dedifferentiation of thyroid cells and consequently to TSH elevation compared to wild-type mice. On the one hand dedifferentiated cells show decrease of thyroid specific genes and are tended to lose expression of the Tg-controlled transgene. However, due to the fact that

the Tg promoter is regulated by TSH, the higher TSH levels led to increased oncogene expression deviating from the human PTCs. To circumvent these problems, the authors engineered a tetracycline-inducible mouse model (Tg-rtTA/tetO-BRAFV600E) in which thyroid-targeted BRAFV600E expression was driven by the tetO transactivator, which in turn was under the control of Tg promoter [37]. After just one week of doxycycline (dox) administration an eight-fold increase in thyroid mass was observed, which decreased in 72 hours, reaching normal size by seven weeks when dox was withdrawn. The histopathological analysis revealed the presence of papillary thyroid cancers in mice exposed to dox, which exhibited features typical for human PTC. Also, dedifferentiation of PTC was observed in several cases with extrathyroidal extension of the tumour. However, no lymph node or distant metastases were detected. All these changes regressed upon withdrawal of dox with the presence of hyperplastic features after two weeks since transgene deinduction and completely normal thyroid histology after seven weeks. Moreover, restoration of RAI uptake was observed. The authors using this dox-inducible mouse model analysed not only consequences of direct "switching off" the oncogene but also the impact of pharmacological inhibition of this oncoprotein expression (inhibitor PLX4720) and MEK (PD0325901). However, the use of specific inhibitors did not give such spectacular effects of tumour regression and RAI uptake restoration as withdrawal of dox and de-induction of BRAFV600E. In another mouse model of BRAFV600E-induced PTC Tpo-driven cre was used in order to activate BRAF [35]. However, the mice did not survive long after the birth, suggesting that BRAFV600E expression may have caused deleterious developmental effects. In order to induce the oncogene expression in the adult thyroids, the authors developed Thyro::CreERT2 mice carrying Cre-activated BRAFV600E allele, in which expression of CreERT2 was controlled by the thyroglobulin promoter. Mice were treated with tamoxifen at one month of age and followed up for 12 months. The first indication of thyroid malignancy was detected six months after BRAFV600E expression, and by 12 months extensive PTC was observed. Comparable to other models, these mice also exhibited loss of thyroid-specific functions. The positive effects in anti-tumour activity obtained after administration of MEK inhibitor (PD0325901) suggest that BRAFV600E-induced PTC may critically rely on MEK1/2 signalling. Within the model with thyroid-specific knock-in of oncogenic BRAF (LSL-BrafV600E/TPO-Cre) developed by Franco et al. in turn, mice exhibited progression to invasive PTCs with a very short latency (PTCs with full penetrance were observed by three weeks of age) [38]. The authors studied whether

TSH signalling cooperates with oncogenic BRAF in PTC progression. They knocked out the TSH receptor, which resulted in attenuation of cancer phenotype. Similar effects were obtained when *Gsα* was knocked out in the thyroid, suggesting that the cooperation of TSHR and mutated BRAF is mediated partly by cAMP signalling. The authors indicate a key role of TSH signalling in BRAFV600E-induced PTC oncogenic transformation.

Our research group also developed a transgenic mouse model of BRAFV600E-induced PTC with use of the bovine Tg promoter, which provided the oncogene expression exclusively in thyroid cells. Papillary thyroid carcinoma was observed in 61% of all BRAF(+) mice. Contrary to all previous studies in our model, 15% of mice with PTC developed distant metastases to lungs. Local extrathyroidal invasion was observed as well. What is more, some of the BRAF(+) mice exhibited borderline thyroid lesions, which showed single features of neoplastic transformation, and some of the mice developed benign hyperplastic lesions. Using our mouse model and human microarray data we selected a list of 18 genes deregulated in a BRAFV600E-dependent manner, which might be involved in early stages of PTC development [39].

## PTC mouse models induced by *RET* rearrangements

### *RET/PTC1*

The first *RET/PTC1* mouse models were generated in 1996 independently by two research groups [40, 41]. Jhiang et al. developed a transgenic model in which targeted expression of *RET/PTC1* in thyroid was achieved by using the bovine Tg promoter [40]. They analysed two groups of *RET/PTC1* mice, with low and high copy numbers of the transgene, which displayed different tumour behaviour. All transgenic mice developed PTC; however, PTCs in low copy number mice were characterised by a longer latency (up to 21 days of age) contrary to the high copy number group, in which mice had bilateral thyroid tumours by four days of age [40, 42]. Congenital hypothyroidism was observed in the high copy line. The authors indicate the possible importance of TSH stimulation within this model. In 1996 the *RET-PTC1* transgenic mouse model was also generated by Santoro et al., who utilised the rat Tg promoter, obtaining PTC only in about 30% of mice by 16 months [41]. In none of these models were distant metastases observed. It was the additional mutation, like knock-out of the tumour suppressor *p53*, that caused invasiveness in *RET/PTC1* mice with the presence of distant metastases [43]. There was an attempt to generate doxycycline-inducible *RET/PTC1* model; however, the expression of the transgene was too low to initiate the neoplastic transformation [44].

### RET/PTC3

Transgenic model of *RET/PTC3*-induced thyroid cancer was generated by expression of *RET/PTC3* targeted to the thyroid cells with the bovine Tg promoter [45]. Most cases of transgenic mice developed follicular cell hyperplasia by the age of three months (9/13; 69%), whereas the solid variant of papillary thyroid carcinoma was observed in 42% of cases (10/24). There was no dedifferentiation of thyroid tumours, and lymph node metastases were detected only in two out of six mice studied in more advanced age. Only when crossing the Tg-*RET/PTC3* transgenic mice with mice null for the *p53* gene PTCs with poorly differentiated areas were obtained [46]. The tumours of *RET/PTC3<sup>p53-/-</sup>* mice were highly proliferative and, unlike the thyroid tumours derived from the parental *RET/PTC3* lines, grew in SCID mice but not in syngeneic immunocompetent mice. However, lymph node metastases were still rare (1/11 cases), and no distant metastases were detected. What is interesting is that the expression of *RET/PTC3* oncoprotein in older *RET/PTC3<sup>p53-/-</sup>* mice (> 6 months of age) was reduced to undetectable levels, which may suggest that this rearrangement is necessary only as a first hit in PTC initiation and that continued elevated expression may not be relevant for tumour progression.

### Models of NTRK1 activation

It was shown that *NTRK1* translocations promote *in vitro* transformation of NIH3T3 cells [47, 48] but not normal thyroid cells [49]. However, an *in vivo* study by Russell et al. demonstrated the initiating potential of TRK-T1 rearrangement in PTC formation [50]. All mice aged seven months or over developed thyroid abnormalities such as follicular hyperplasia and/or carcinoma but without local or distant metastases. However, TRK-T1 tumours failed to induce inflammation, which is characteristic for human PTCs. When crossed with knockout mice of the tumour suppressor gene *p27*, decreased latency and increased PTC frequency with higher proliferation index were observed, suggesting its role in PTC progression [51].

### RAS as PTC inducer?

The attempts to obtain mouse model of RAS induced PTC were not as spectacular in their results as was seen in the case of the above-mentioned other key molecular PTC drivers, since most engineered models did not exhibit papillary thyroid carcinoma. In a mouse model with *KRASG12V* expression under the control of rat Tg promoter thyroid abnormalities were observed; however, these were all benign with very low incidence and long latency [52, 53]. When mice were treated with goitrogens

the FTC development was observed in one mouse (out of 51), which suggests that RAS is a predisposing factor that requires additional multiple genetic alteration for thyroid carcinogenesis [52, 53]. A later model, this time with *HRASG12V* under the bovine Tg promoter, showed the presence of PTC in single cases [54]. However, the number of mice with PTC was limited and they could not pass this phenotype on to the next generation. Furthermore, concurrent lung carcinoma was observed with papillary architecture that represented primary rather than metastatic tumours. Also, the initial potential of *NRAS* was studied. Transgenic mice with human *NRAS* (Gln61Lys) were generated in which a progression from hyperplasia through adenoma to follicular thyroid carcinoma was observed [55]. No case of typical PTC was detected. Among FTCs 30% of cases were of mixed papillary and follicular features. Additionally, 25% displayed invasive carcinoma with poorly differentiated areas. Since aberrant activation of the PI3K/AKT pathway plays an undeniable role in thyroid carcinogenesis, double-mutant mice with knock-in *KRASG12D* gene and *PTEN<sup>(-/-)</sup>* deletion targeted to the thyroid were engineered [56]. In most mice the presence of aggressive, invasive, and metastatic FTC was detected with lung metastases observed in all mice above 12 weeks of age. These mouse models suggest that RAS mutations may lead to FTC development, but in the case of PTC these are rather a secondary event, not sufficient alone to induce carcinogenesis. Although in one transgenic model single cases of PTCs were obtained there are doubts about how much the overexpression of the transgene reflects the activity of endogenous mutated RAS expressed at a physiological level.

### Conclusions

Although papillary thyroid carcinoma has a very good prognosis, currently used therapeutic approaches and new molecular-based therapies highlight the limitation of our understanding of molecular mechanisms and how they vary between individual patients. Cancer is very complex and the heterogeneity of human population, considering genetic background, diet, and environmental exposures, does not help in its exploration. However, as presented over many years, mouse models seem to be the best approach to study human diseases. These systems enable us to study hypotheses generated from the analyses of human tumours as well as provide opportunities to discover novel mechanisms that can be further researched in humans. Mouse models are a powerful tool not only in studying the molecular background of cancers but also new therapy effects with the use of an individual patient's genetic pattern of key alterations.

## Acknowledgements

This work was supported by the Polish National Science Centre (project number N N401 612440) and the National Centre for Research and Development project under the program "Prevention practices and treatment of civilisation diseases" STRATEGMED (STRATEGMED2/267398 /4/NCBR/2015).

## References

- Parkin DM, Bray F, Ferlay J et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74–108. doi: 55/2/74 [pii].
- Hayat MJ, Howlander N, Reichman ME et al. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *Oncologist* 2007; 12: 20–37. doi: 12/1/20 [pii] 10.1634/theoncologist.12-1-20.
- Enewold L, Zhu K, Ron E et al. Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980–2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18: 784–791. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0960
- van Staveren WC, Solis DW, Delys L et al. Human thyroid tumor cell lines derived from different tumor types present a common dedifferentiated phenotype. *Cancer Res*. 2007; 67: 8113–8120. doi: 67/17/8113 [pii] 10.1158/0008-5472.CAN-06-4026.
- Toda S, Watanabe K, Yokoi F et al. A new organotypic culture of thyroid tissue maintains three-dimensional follicles with C cells for a long term. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 906–911. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00561-2.
- Toda S, Aoki S, Suzuki K et al. Thyrocytes, but not C cells, actively undergo growth and folliculogenesis at the periphery of thyroid tissue fragments in three-dimensional collagen gel culture. *Cell Tissue Res* 2003; 312: 281–289. doi: 10.1007/s00441-003-0718-0.
- Schweppel RE, Klopper JP, Korch C et al. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 4331–4341. doi: 10.1210/jc.2008-1102 [pii].
- Capen CC. Mechanistic data and risk assessment of selected toxic end points of the thyroid gland. *Toxicol Pathol* 1997; 25: 39–48.
- Mizuno T, Iwamoto KS, Kyoizumi S et al. Preferential induction of RET/PTC1 rearrangement by X-ray irradiation. *Oncogene* 2000; 19: 438–443. doi: 10.1038/sj.onc.1203343.
- Mizuno T, Kyoizumi S, Suzuki T et al. Continued expression of a tissue specific activated oncogene in the early steps of radiation-induced human thyroid carcinogenesis. *Oncogene* 1997; 15: 1455–1460. doi: 10.1038/sj.onc.1201313.
- Kim S, Park YW, Schiff BA et al. An orthotopic model of anaplastic thyroid carcinoma in athymic nude mice. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1713–1721. doi: 11/5/1713 [pii] 10.1158/1078-0432.CCR-04-1908.
- Tallini G, Asa SL. RET oncogene activation in papillary thyroid carcinoma. *Adv Anat Pathol* 2001; 8: 345–354.
- Nikiforov YE. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocr Pathol*. 2002; 13: 3–16. doi: EP: 13: 1: 03 [pii].
- Greco A, Miranda C, Pierotti MA. Rearrangements of NTRK1 gene in papillary thyroid carcinoma. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 321: 44–49. doi: 10.1016/j.mce.2009.10.009S0303-7207(09)00556-5 [pii].
- Xing M, Tufano RP, Tufano AP et al. Detection of BRAF mutation on fine needle aspiration biopsy specimens: a new diagnostic tool for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2867–2872. doi: 10.1210/jc.2003-032050 89/6/2867 [pii].
- Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2005; 12: 245–262. doi: 12/2/245 [pii] 10.1677/erc.1.0978.
- Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5399–53404. doi: 10.1210/jc.2003-030838.
- Lupi C, Giannini R, Ugolini C 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: 4085–4090. doi: jc.2007-1179 [pii].
- Wang Y, Ji M, Wang W et al. Association of the T1799A BRAF mutation with tumor extrathyroidal invasion, higher peripheral platelet counts, and over-expression of platelet-derived growth factor-B in papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2008; 15: 183–190. doi: 10.1677/ERC-07-0182 15/1/183 [pii].
- Xing M, Alzahrani AS, Carson KA et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *JAMA* 2013; 309: 1493–1501. doi: 10.1001/jama.2013.3190.
- Jo YS, Li S, Song JH 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: 3667–3670. Epub 2006/06/15. doi: jc.2005-2836 [pii]
- Kim TY, Kim WB, Rhee YS et al. The BRAF mutation is useful for prediction of clinical recurrence in low-risk patients with conventional papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 65: 364–368. doi: CEN2605 [pii]
- Fugazzola L, Mannavola D, Cirello V et al. BRAF mutations in an Italian cohort of thyroid cancers. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 61: 239–243. doi: 10.1111/j.1365-2265.2004.02089.x CEN2089 [pii].
- Ngeow J, Eng C. TERT and BRAF in thyroid cancer: teaming up for trouble. *J Clin Oncol* 2014; 32: 2683–2684. Epub 2014/07/16. doi: 10.1200/JCO.2014.56.5614
- Xing M, Liu R, Liu X et al. BRAF V600E and TERT promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with highest recurrence. *J Clin Oncol* 2014; 32: 2718–2726. Epub 2014/07/16. doi: 10.1200/JCO.2014.55.5094
- Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z et al. 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* 2003; 63: 1454–1457.
- Soares P, Trovisco V, Rocha AS et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 2003; 22: 4578–4580. doi: 10.1038/sj.onc.1206706.
- Pratilas CA, Taylor BS, Ye Q et al. (V600E)BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 4519–4524. doi: 10.1073/pnas.0900780106
- Durante C, Puxeddu E, Ferretti E et al. BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 2840–2843. doi: jc.2006-2707 [pii]10.1210/jc.2006-2707.
- Giordano TJ, Kuick R, Thomas DG et al. Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. *Oncogene* 2005; 24: 6646–6656. doi: 1208822 [pii] 10.1038/sj.onc.1208822.
- Faustino A, Couto JP, Populo H et al. mTOR pathway overactivation in BRAF mutated papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97: E1139-49. doi: 10.1210/jc.2011-2748
- Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* 2014; 159: 676–690. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.050
- Liu D, Liu Z, Condouris S et al. BRAF V600E maintains proliferation, transformation, and tumorigenicity of BRAF-mutant papillary thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 2264–2271. doi: jc.2006-1613 [pii] 10.1210/jc.2006-1613.
- Knauf JA, Ma X, Smith EP et al. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res* 2005; 65: 4238–4245. Epub 2005/05/19. doi: 65/10/4238 [pii] 10.1158/0008-5472.CAN-05-0047.
- Charles RP, Iezza G, Amendola E et al. Mutationally activated BRAF(V600E) elicits papillary thyroid cancer in the adult mouse. *Cancer Res* 2011; 71: 3863–3871. doi: 10.1158/0008-5472.
- Vasko V, Hu S, Wu G et al. High prevalence and possible de novo formation of BRAF mutation in metastasized papillary thyroid cancer in lymph nodes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5265-9. doi: 10.1210/jc.2004-2353.
- Chakravarty D, Santos E, Ryder M et al. Small-molecule MAPK inhibitors restore radioiodine incorporation in mouse thyroid cancers with conditional BRAF activation. *J Clin Invest*. 2011; 121: 4700–11. doi: 10.1172/JCI46382
- Franco AT, Malaguarnera R, Refetoff S et al. Thyrotrophin receptor signaling dependence of Braf-induced thyroid tumor initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 1615–1620. doi: 10.1073/pnas.1015557108.
- Rusinek D, Swierniak M, Chmielik E et al. BRAFV600E-associated gene expression profile: early changes in the transcriptome, based on a transgenic mouse model of papillary thyroid carcinoma. *PloS One* 2015; 10: e0143688. doi: 10.1371/journal.pone.0143688.
- Jhiang SM, Sagartz JE, Tong Q et al. Targeted expression of the ret/PTC1 oncogene induces papillary thyroid carcinomas. *Endocrinology* 1996; 137: 375–378. doi: 10.1210/endo.137.1.8536638.
- Santoro M, Chiappetta G, Cerrato A et al. Development of thyroid papillary carcinomas secondary to tissue-specific expression of the RET/PTC1 oncogene in transgenic mice. *Oncogene* 1996; 12: 1821–1826.
- Cho JY, Sagartz JE, Capen CC et al. Early cellular abnormalities induced by RET/PTC1 oncogene in thyroid-targeted transgenic mice. *Oncogene* 1999; 18: 3659–3665. doi: 10.1038/sj.onc.1202709.
- La Perle KM, Jhiang SM, Capen CC. Loss of p53 promotes anaplasia and local invasion in ret/PTC1-induced thyroid carcinomas. *Am J Pathol* 2000; 157: 671–677. doi: S0002-9440(10)64577-4 [pii].

44. Knostman KA, Venkateswaran A, Zimmerman B et al. Creation and characterization of a doxycycline-inducible mouse model of thyroid-targeted RET/PTC1 oncogene and luciferase reporter gene coexpression. *Thyroid* 2007; 17: 1181–1188. doi: 10.1089/thy.2007.0224.
45. Powell DJ, Jr, Russell J, Nibu K et al. The RET/PTC3 oncogene: metastatic solid-type papillary carcinomas in murine thyroids. *Cancer Res* 1998; 58: 5523–5528.
46. Powell DJ, Russell J, Li G et al. Altered gene expression in immunogenic poorly differentiated thyroid carcinomas from RET/PTC3p53<sup>-/-</sup> mice. *Oncogene* 2001; 20: 3235–3246. doi: 10.1038/sj.onc.1204425.
47. Greco A, Pierotti MA, Bongarzone I et al. TRK-T1 is a novel oncogene formed by the fusion of TPR and TRK genes in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 1992; 7: 237–242.
48. Greco A, Fusetti L, Miranda C et al. Role of the TFG N-terminus and coiled-coil domain in the transforming activity of the thyroid TRK-T3 oncogene. *Oncogene* 1998; 16: 809–816. doi: 10.1038/sj.onc.1201596.
49. Portella G, Vitagliano D, Borselli C et al. Human N-ras, TRK-T1, and RET/PTC3 oncogenes, driven by a thyroglobulin promoter, differently affect the expression of differentiation markers and the proliferation of thyroid epithelial cells. *Oncol Res* 1999; 11: 421–427.
50. Russell J, Powell DJ, Cunnane M et al. The TRK-T1 fusion protein induces neoplastic transformation of thyroid epithelium. *Oncogene* 2000; 19: 5729–5735. doi: 10.1038/sj.onc.1203922.
51. Fedele M, Palmieri D, Chiappetta G et al. Impairment of the p27kip1 function enhances thyroid carcinogenesis in TRK-T1 transgenic mice. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16: 483–490. doi: 10.1677/ERC-08-0272
52. Santelli G, de Franciscis V, Chiappetta G et al. Thyroid specific expression of the Ki-ras oncogene in transgenic mice. *Adv Exp Med Biol* 1993; 348: 59–62.
53. Santelli G, de Franciscis V, Portella G et al. Production of transgenic mice expressing the Ki-ras oncogene under the control of a thyroglobulin promoter. *Cancer Res* 1993; 53: 5523–5527.
54. Rochefort P, Caillou B, Michiels FM et al. Thyroid pathologies in transgenic mice expressing a human activated Ras gene driven by a thyroglobulin promoter. *Oncogene* 1996; 12: 111–118.
55. Vitagliano D, Portella G, Troncone G et al. Thyroid targeting of the N-ras(Gln61Lys) oncogene in transgenic mice results in follicular tumors that progress to poorly differentiated carcinomas. *Oncogene* 2006; 25: 5467–5474. doi: 10.1038/sj.onc.1209527 [pii] 10.1038/sj.onc.1209527.
56. Miller KA, Yeager N, Baker K et al. Oncogenic Kras requires simultaneous PI3K signaling to induce ERK activation and transform thyroid epithelial cells in vivo. *Cancer Res* 2009; 69: 3689–3694. doi: 10.1158/0008-5472.

## Polish version

### Wstęp

Rak tarczycy (TC, *thyroid carcinoma*) stanowi większość nowotworów złośliwych układu endokrynnego i jednocześnie 2,1% wszystkich raków u kobiet [1]. Co więcej, szacunkowe ryzyko TC może wzrastać w związku z wyjściową diagnozą raka piersi u kobiet lub raka prostaty u mężczyzn, raka jamy ustnej i gardła, czy też nerki i miedniczki nerkowej [2]. Począwszy od lat 80. XX wieku w krajach rozwiniętych obserwuje się wzrost zachorowalności na raka tarczycy, co tłumaczy się przede wszystkim skuteczniejszą diagnostyką, na czele z USG oraz aspiracyjną biopsją cienkoigłową, umożliwiającą wykrywanie guzów subklinicznych. Jednak wzrost częstości TC wydaje się być większy niż można by było szacować wyłącznie na podstawie ulepszonej diagnostyki i podwyższonej kontroli medycznej. Najwięcej nowych chorych odnotowuje się w przypadku najczęstszego spośród wszystkich raków tarczycy, raka brodawkowatego tarczycy ([PTC, *papillary thyroid carcinoma*]; 80% wszystkich TC) [3]. PTC oraz pęcherzykowy rak tarczycy (FTC, *follicular thyroid carcinoma*) stanowią zróżnicowane TC (DTC, *differentiated TC*), które łącznie ze słabo zróżnicowanym (PDTC, *poorly differentiated thyroid carcinomas*) oraz odróżnicowanym rakiem tarczycy (ATC, *undifferentiated thyroid carcinoma*) reprezentują raka nabłonkowego tarczycy, wywodzącego się z komórek pęcherzykowych. Rokowanie u chorych z PTC w większości przypadków jest bardzo dobre, a 5-letni czas przeżycia jest wyższy od 95%. U części pacjentów obserwuje się jednak rozwój przerzutów odległych oraz brak odpowiedzi na standardową terapię, będący w dużej mierze konsekwencją braku wrażliwości na działanie radiojodu. Te dane podkreślają potrzebę poszukiwań

nowych terapii celowanych, dobranych indywidualnie do pacjenta. Analiza molekularnych mechanizmów leżących u podłoża raka tarczycy przybliży pewne aspekty jego patogenezy oraz pozwala na wytypowanie potencjalnych markerów, które mogłyby zostać wykorzystane w nowych schematach postępowania terapeutycznego. Wiadomym jest, że biologia raka jest zdeterminowana przez jego genotyp, który może także warunkować odpowiedź na poszczególne terapie. Badania molekularne raka są więc istotnym elementem jego poznania, umożliwiającym opracowywanie efektywniejszych metod diagnostycznych, predykcję prognozy, a przez to, mającym wpływ na decyzje o terapiach uzupełniających czy też okresie obserwacji.

Spośród wszystkich TC rak brodawkowaty tarczycy jest jednym z lepiej poznanych pod kątem podłoża genetycznego. Opracowano wiele różnych metod modelowania raka tarczycy. Każda jednak ma swoje ograniczenia. Dodatkowo PTC wykazuje dużą heterogenność, co w połączeniu z różnorodnością cechującą materiał ludzki, nie ułatwia tego typu analiz. Jedną z metod wykorzystywanych do analiz szlaków sygnałowych w TC, podstawowych badań dotyczących rozwoju leków i przewidywania odpowiedzi na środki farmaceutyczne są badania *in vitro* prowadzone na zdefiniowanych liniach komórkowych. W jednowarstwowych kulturach komórek brak jest jednak podstawowej anatomicznej i czynnościowej jednostki gruczołu tarczowego, czyli trójwymiarowego pęcherzyka tarczycy, a w dwu-wymiarowych z kolei, tyreocyty mogą tracić typowe dla nich funkcje, w tym wrażliwość na TSH [4]. Dopiero, opracowanie w 2002 roku kultury organotypowej z użyciem trójwymiarowej macierzy kolagenowej o efektywniejszym natlenieniu poprzez ekspozycję na

powietrzu, pozwoliło na odtworzenie pęcherzyków tarczycowych, a tym samym analizę interakcji guz-podścielisko [5, 6]. Praca z 2008 roku autorów Scheppe i wsp. zademonstrowała jednak, jak dużą ostrożność należy zachować, pracując na liniach komórkowych, i jak istotna jest kwestia weryfikacji unikalności profilu linii oraz jej pochodzenia. Autorzy poddali analizie 40 linii komórkowych, z których aż 50% wykazała nadmiarowość oraz kontaminację krzyżowe [7]. Uważa się więc, że obecnie najlepszą metodą modelowania ludzkiego raka są mysie modele. Dają one największą kompleksowość informacji dotyczących biologii guza, jego podłoża genetycznego, klinicznych konsekwencji oraz odpowiedzi na specyficzne farmaceutyki. Dotychczas opracowano 3 główne drogi indukcji raka u myszy, obejmujące czynniki karcinogenne, modele ksenograficzne oparte na implantacji komórek ludzkiego guza podskórnie lub ortotopowo do myszy z niedoborem odporności (SCID) oraz modele myszy genetycznie modyfikowanych. W pierwszej ze wspomnianych dróg indukcji raka, dającej pogląd na wpływ czynników środowiskowych w procesie nowotworzenia, wykorzystuje się przede wszystkim związki chemiczne, ale także fizyczne agonisty, jak również promieniowanie. W przypadku modeli raka tarczycy stosowane są goitrogeny, które znamienne obniżają stężenie hormonów tarczycowych, co w konsekwencji prowadzi do wzrostu stężenia TSH w surowicy, rozwoju wola oraz indukcji nowotworów pęcherzykowych [8]. Wiadomo również, że promieniowanie jonizujące jest dobrze znanym czynnikiem ryzyka w PTC. Konsekwencje napromieniowania badano na modelach ksenograficznych, wykazując indukcję rearanżacji *RET/PTC1* i/lub *RET/PTC3* (drugiego co do częstości zdarzenia molekularnego w PTC), z których indukcja pierwszego była zależna od dawki promieniowania [9, 10]. Niepodważalną zaletą modelu ksenograficznego jest możliwość analizy ludzkich komórek, ludzkich raków implantowanych do myszy. Z drugiej jednak strony modele te wymagają zmian w układzie odpornościowym myszy, co w konsekwencji nie odzwierciedla rzeczywistej sytuacji obserwowanej u pacjenta. Ponadto miejsce implantacji guza ma duży wpływ na jego zachowanie. Przykładowo ortotopowa implantacja sprzyja tworzeniu przerzutów [11]. Najbardziej kompleksowe i wiarygodne wyniki uzyskuje się z wykorzystaniem modeli myszy genetycznie modyfikowanych. Obecnie manipulacje mysim genomem pozwalają na generowanie myszy z utratą funkcji konkretnego genu, z ekspresją genu zmutowanego, podwyższoną lub obniżoną ekspresją genu, a zakres wprowadzanych zmian może dotyczyć tylko określonego typu komórek.

W niniejszej pracy poglądowej przedstawiono obecny stan wiedzy dotyczący modeli raka brodawkowa-

tego tarczycy z wykorzystaniem myszy genetycznie modyfikowanych. Większość z tych modeli opierała się na modelach transgenicznym, powstałym poprzez mikroiniekcję DNA do przedjądrzy zapłodnionej mysiej komórki jajowej oraz na modelach typu *knock-out* (konwencjonalne lub warunkowe) związanych z modyfikacją pierwotnych komórek zarodkowych. W celu kontroli czasu oraz miejsca aktywacji wprowadzonych zmian, opracowano nowe technologie związane z wykorzystaniem modyfikacji genów w systemie Cre/Lox, indukowaną ekspresją genów w systemie tetracyklinowym oraz indukowaną przez farmaceutyki aktywnością rekombinazy cre (zwykle jest to transgen Cre-ERT2, aktywowany podawaniem tamoxifenu). W pracy przedstawiono także najważniejsze z opracowanych do tej pory mysich modeli PTC, ze szczególnym uwzględnieniem modeli PTC indukowanych mutacją *BRAFV600E*. Istnieje głębokie przekonanie, że mysie modele mogą w przyszłości odgrywać ważną rolę jako modele przed-kliniczne w rozwoju nowych terapii.

## Biologia molekularna raka brodawkowego tarczycy

Dotychczas opisano 4 główne wydarzenia molekularne związane z PTC, z których części przypisuje się znaczenie diagnostyczne i/lub prognostyczne. Są to mutacje punktowe genów *BRAF* i *RAS* oraz rearanżacje *RET* i *NTRK1*. Promieniowanie jonizujące jest znanym czynnikiem ryzyka w rozwoju PTC, szczególnie u dzieci, a rearanżacje genu *RET* są kluczowym zdarzeniem molekularnym obserwowanym w indukowanych promieniowaniem PTC. *RET* normalnie nie ulega ekspresji w komórkach pęcherzykowych. Jednak jego fuzje z konstytutywnie aktywnymi genami prowadzą w konsekwencji do niekontrolowanej ekspresji chimerycznej onkoproteiny z aktywnością kinazy tyrozynowej. Wspomniane aberracje chromosomowe mogą mieć postać wewnątrzchromosomowych inwersji lub międzychromosomowych translokacji. Najczęstszymi spośród rearanżacji *RET* są *RET/PTC1* oraz *RET/PTC3*, z których w pierwszej genem fuzyjnym jest gen *H4* (*D10S170*), a druga powstaje poprzez fuzję z *NCOA4* (zwanym także *ELE1*, *RFG* lub *ARA70*). Częstość rearanżacji *RET* w raku brodawkowym tarczycy jest bardzo różna i mieści się w zakresie 0–87% [12, 13]. Ta ogromna rozbieżność częściowo wynika z różnorodności populacyjnej w zależności od geograficznej lokalizacji, z wysokiej częstości *RET/PTC* w PTC indukowanych promieniowaniem, jak również z typu zastosowanej metody detekcji. Rearanżacje *NTRK1*, receptorowej aktywności kinazy tyrozynowej zaangażowanej w szlak czynnika wzrostu nerwów, są znacznie rzadsze i doty-



czą mniej niż 12% PTC [14]. Najczęstszą zmianą w PTC, obecną w 45% przypadków, jest mutacja *BRAFV600E*. Mutacja ta prowadzi do zamiany waliny na glutaminian w pozycji 600, będącej następstwem zmiany punktowej w nukleotydzie 1799 [15, 16]. Uważa się, że obecność mutacji *BRAF* w PTC wiąże się z czynnikami gorszego rokowania, takimi jak przerzuty do węzłów chłonnych, poza-tarczycowa inwazja, zaawansowane stadium choroby, brak torebki guza [17–19] oraz, według najnowszych danych opublikowanych przez Xinga i wsp. w ramach wielośrodkowego badania, podwyższoną śmiertelnością związaną z rakiem [20]. Są jednak prace, w których nie wykazano znamienności między występowaniem mutacji genu *BRAF* a powyższymi czynnikami [21–23]. Ostatnie doniesienia wskazują na mutacje w promotorze genu *TERT* jako zmiany genetyczne, które towarzysząc mutacji *BRAFV600E*, warunkują agresywny przebieg choroby i mogą odgrywać kluczową rolę w diagnostycznym postępowaniu przedoperacyjnym [24, 25]. Kolejnym wspomnianym wydarzeniem molekularnym w PTC są mutacje punktowe genów *RAS* z *NRAS* na czele, których ogólna częstość nie przekracza 16% [26]. Zarówno *BRAF*, *RET*, jak i *RAS* kodują białka biorące udział w szlaku MAPK, a ich zmiany uważane są za alternatywne wydarzenia w PTC, zwykle nie współwystępujące w obrębie tego samego guza [26, 27]. Konsekwencje mutacji/rearanzacji tych genów mogą mieć dwojaki charakter. Guzy z mutacją *BRAFV600E* nie odpowiadają bowiem na negatywne sprzężenie zwrotne ze strony ERK (w związku z funkcjonowaniem RAF jako monomeru), co w rezultacie prowadzi do konstytutywnej aktywności szlaku MAPK [28]. Natomiast w PTC indukowanych mutacją *RAS* czy rearanzacjami RTK (receptor o aktywności kinazy tyrozynowej) sygnał przenoszony jest przez dimer RAF, który odpowiada na zwrotną informację z ERK, przez co aktywność MAPK jest znacznie mniejsza. Mechanizmy te mają odzwierciedlenie w fenotypie raka, między innymi w ekspresji genów odpowiedzialnych za wychwyt i metabolizm jodu, znacząco niższej w *BRAF(+)* PTC w porównaniu z *RET(+)* i *RAS(+)* PTCs [29]. Szlak MAPK wydaje się być kluczowym w progresji PTC. Jednak, jak wykazano w wielu pracach, także inne szlaki, w tym PI3K oraz/lub AKT/mTOR, są zmienione w zależności od podtypu molekularnego PTC [30, 31]. Odpowiednio, w pracy projektu *The Cancer Genome Atlas*, na podstawie wielkoskalowych analiz transkryptomicznych, genomicznych oraz proteomicznych, wyróżniono dwa podtypy fenotypowe PTC: *BRAF*-podobne oraz *RAS*-podobne raki [32].

## Mysie modele raka brodawkowego tarczycy indukowanego mutacją *BRAFV600E*

W związku z faktem, że mutacja *BRAFV600E* jest obecna w prawie połowie przypadków PTC, od kilkunastu lat prowadzone są intensywne badania nad jej molekularnymi oraz klinicznymi konsekwencjami, jak również wpływem na odpowiedź pacjentów na standardowe i nowe terapie. Zmiana ta jest zdolna do indukcji PTC, co zademonstrowano zarówno na liniach komórkowych, w modelach ksenograficznych, jak i transgenicznych [33–35]. Z drugiej jednak strony mutacja *BRAFV600E* może pojawić się jako wtórne wydarzenie molekularne, co wykazali Vasko i wsp. [36]. Autorzy zaobserwowali obecność *BRAFV600E* w przerzutach w węzłach chłonnych przy jednoczesnym jej braku w pierwotnym PTC. Opracowane dotychczas modele genetycznie modyfikowanej myszy *BRAF(+)* są bardzo zbliżone w kwestii klinicznych konsekwencji. Pierwszym modelem transgenicznej myszy z PTC indukowanym mutacją *BRAFV600E* był model stworzony przez grupę Knaufa i wsp. w 2005 roku [34]. Autorzy opracowali *BRAF(+)* mysz pod kontrolą bydłęcego promotora Tg, uzyskując dwie linie różniące się poziomem ekspresji transgeny. Wyższa ekspresja zmutowanej kinazy *BRAF* wiązała się z większą częstością PTC oraz jego bardziej agresywnym przebiegiem, włączając poza-tarczycową inwazję. Nie zaobserwowano jednak przerzutów odległych. Obecność mutacji *BRAF* wiązała się natomiast z lokalnym odróżnicowaniem komórek tarczycowych i w konsekwencji podwyższeniem stężenia TSH w surowicy w porównaniu ze stężeniem TSH obserwowanym u myszy kontrolnych. Z jednej strony odróżnicowane tyreocyty wykazują obniżony poziom genów tarczycowo-specyficznych i tendencję do utraty ekspresji transgeny pozostającego pod kontrolą Tg. Z drugiej jednak strony, w związku z faktem, że promotor Tg jest regulowany przez TSH, wyższe stężenie TSH prowadzi do wzrostu ekspresji onkogenu, odbiegającej od obserwowanej u chorych z PTC. Celem przezwyciężenia tych sprzeczności autorzy zaprojektowali model myszy indukowanej tetracykliną (Tg-rtTA/tetO-*BRAFV600E*), w którym ekspresja *BRAFV600E* była indukowana przez transaktywator tetO, który z kolei pozostawał pod kontrolą promotora Tg [37]. Zaledwie po pierwszym tygodniu podawania doksycykliny (dox) wykazano 8-krotny wzrost masy tarczycy. Po jej wycofaniu natomiast zaobserwowano spadek masy gruczołu tarczowego po 72 godzinach, a powrót do normalnych rozmiarów po 7 tygodniach.

Analiza histopatologiczna wykazała obecność raka brodawkowatego tarczycy, o cechach typowych dla ludzkiego PTC, u myszy poddanych działaniu dox. Odnotowano także odróżnicowywanie się PTC w kilku przypadkach z poza-tarczycową inwazją guza, przy jednoczesnym braku przerzutów do węzłów chłonnych czy też przerzutów odległych. Wszystkie te zmiany ustępowały po wycofaniu dox, poprzez obecność cech rozrostowych po 2 tygodniach od inaktywacji transgeny, aż po normalną histologicznie tarczycę po 7 tygodniach łącznie z przywróceniem wychwyty radiojodu (RAI). Autorzy, wykorzystując powyższy model, sprawdzili również wpływ farmakologicznej inhibicji ekspresji kinazy BRAFV600E (inhibitor PLX4720) oraz MEK (PD0325901). Inhibitory te nie dały jednak tak spektakularnych efektów w regresji guza i odzyskaniu wrażliwości na RAI, jaki zaobserwowano przy bezpośredniej inaktywacji BRAFV600E poprzez wycofanie dox. W innym modelu PTC indukowanym mutacją BRAF zastosowano system rekombinazy cre pod kontrolą Tpo [35]. Myszy umierały jednak krótko po urodzeniu, co może sugerować szkodliwy wpływ BRAFV600E już w okresie rozwoju zarodkowego. Dlatego też autorzy opracowali myszy Thyro:Cre-ERT2 z allelem BRAFV600E indukowanym przez Cre, w których ekspresja CreERT2 pozostawała pod kontrolą promotora Tg. Myszy traktowano tamoksyfenem w pierwszym miesiącu życia i obserwowano przez okres do 12 miesięcy. Porównywalnie z innymi modelami, myszy wykazywały utratę specyficznych dla gruczołu tarczowego funkcji. Pozytywna anty-nowotworowa odpowiedź uzyskana dla inhibitora MEK (PD0325901) sugeruje, że PTC indukowane mutacją BRAFV600E mogą w sposób krytyczny polegać na sygnalizacji MEK1/2. Z kolei w ramach modelu typu *knock-in* grupy badawczej Franco i wsp. z włączaną ekspresją BRAF w tarczycy (LSL-BrafV600E/TPO-Cre) otrzymano PTC cechujące się krótkim okresem latencji (PTC o pełnej penetracji obserwowane były już w 3. tygodniu życia myszy) [38]. Autorzy wykorzystali uzyskany model do analizy sygnalizacji TSH pod kątem jej potencjalnej współpracy z BRAFV600E w progresji PTC. Zaobserwowano osłabienie fenotypu raka przy „wyłączeniu” receptora TSH. Podobne efekty otrzymano po usunięciu w komórkach tarczycy *Gsα*, co sugeruje, że we współpracy TSHR ze zmutowaną kinazą BRAF, przynajmniej częściowo, pośredniczy sygnalizacja cAMP. Autorzy wskazują na kluczową rolę TSH w nowotworowej transformacji PTC indukowanego mutacją BRAFV600E.

Grupa badawcza poniższej pracy poglądowej również opracowała transgeniczny model PTC z mutacją BRAFV600E, w którym tarczycowo-specyficzna ekspresja zmutowanej kinazy BRAF została osiągnięta dzięki promotorowi bydłowej Tg. Obecność PTC wykazano

w 61% przypadków myszy BRAF(+). W przeciwieństwie do wszystkich wcześniejszych modeli u 15% myszy z PTC autorzy zaobserwowali przerzuty odległe do płuc. Również poza-tarczycowa inwazja była obecna w niewielkim procencie myszy. W uzyskanym modelu u części myszy BRAF(+) rozwinęły się rozrosty graniczne, które reprezentowały pojedyncze cechy transformacji nowotworowej, jak również rozrosty łagodne. Wykorzystując uzyskany model oraz ludzkie dane mikromacierzowe, wyselekcjonowano listę 18 genów deregulowanych w BRAFV600E-specyficzny sposób, które mogą być zaangażowane w początkowe etapy rozwoju PTC [39].

## Mysie modele PTC indukowanego rearanżacjami genu *RET*

### *RET/PTC1*

Pierwsze mysie modele *RET/PTC1* zostały opracowane w 1996 roku niezależnie przez dwie różne grupy badawcze [40, 41]. Jhiang i wsp. uzyskali ekspresję *RET/PTC1* w tarczycy mysiej z wykorzystaniem promotora bydłowej Tg [40]. Autorzy analizowali dwie linie myszy *RET/PTC1*, różniące się liczbą kopii transgeny oraz wykazujące odmienne zachowanie guza. Wszystkie myszy transgeniczne rozwinęły PTC, jednak PTC w grupie z niską liczbą kopii charakteryzowały się dłuższym okresem latencji (do 21 dni życia) w przeciwieństwie do grupy z dużą liczbą kopii, w której myszy rozwijały bilateralne guzy tarczycy do 4. dnia życia [40, 42]. Również w tej ostatniej grupie obserwowano wrodzoną niedoczynność tarczycy. Autorzy wskazują na potencjalne znaczenie stymulacji TSH w badanym modelu. W 1996 roku model myszy transgenicznej *RET/PTC1* został opracowany także przez Santoro i wsp. W modelu tym zastosowano promotor szczurzej Tg, a PTC było obecne zaledwie w 30% myszy w wieku do 16 miesięcy [41]. W żadnym z powyższych modeli nie wykazano obecności przerzutów odległych. Dopiero usunięcie genu supresorowego *p53* prowadziło do inwazji u myszy *RET/PTC1* i wykształcenia przerzutów odległych [43]. Podejmowane były próby opracowania modelu *RET/PTC1* indukowanego doksycykliną, jednak ekspresja transgeny była zbyt niska, żeby wyindukować raka [44].

### *RET/PTC3*

Transgeniczny model raka tarczycy indukowanego *RET/PTC3* opracowano z wykorzystaniem promotora bydłowej Tg [45]. Większość myszy transgenicznych rozwinęła pęcherzykowy rozrost tarczycy w wieku do 3 miesięcy (9/13; 69%), podczas gdy u 42% wykazano obecność wariantu litego PTC (10/24). Nie zaobserwowano odróżnicowywania się komórek, a przerzuty do węzłów chłonnych obecne były u 2/6 myszy,

poddanych analizie w bardziej zaawansowanym wieku. Dopiero skrzyżowanie transgenicznych myszy Tg-RET/PTC3 z myszami pozbawionymi genu *p53* pozwoliło na uzyskanie PTC z obszarami słabo zróżnicowanymi [46]. Guzy myszy RET/PTC3<sup>p53-/-</sup> cechował wysoki stopień proliferacji i, w odróżnieniu od linii rodzicielskiej RET/PTC3, wykazywały one wzrost w myszach SCID, ale nie w immunokompetentnych syngenicznych. Jednak i w tym przypadku przerzuty do węzłów chłonnych były rzadkie (1/11). Nie wykazano obecności przerzutów odległych. Co więcej, ekspresja białka RET/PTC3 u myszy RET/PTC3<sup>p53-/-</sup> powyżej 6. miesiąca życia ulegała redukcji do praktycznie niewykrywalnych wartości. Dane te mogą sugerować, że rearanżacja *RET/PTC3* ma znaczenie jedynie w pierwszym etapie indukcji PTC, a jej późniejsza podwyższona ekspresja może już nie być istotna dla progresji choroby nowotworowej.

### Modele aktywacji karcinogenezy poprzez *NTRK1*

Wykazano, że translokacje *NTRK1 in vitro* prowadzą do transformacji komórek NIH3T3 [47, 48], ale nie zdrowych komórek tarczycowych [49]. Badania *in vivo* przemawiają jednak za inicjującym potencjałem rearanżacji TRK-T1 w rozwoju PTC [50]. W badaniu grupy Russella i wsp. wszystkie myszy transgeniczne w wieku  $\geq 7$  miesięcy rozwinęły rozrosty pęcherzykowe tarczycy i/lub raka, bez widocznych przerzutów lokalnych, czy też odległych. Co istotne, guzy TRK-T1 nie indukowały stanów zapalnych, które są jedną z cech charakterystycznych dla większości ludzkich PTC. Po skrzyżowaniu myszy TRK-T1 z linią pozbawioną genu supresorowego *p27*, zaobserwowano skrócenie okresu latencji oraz wzrost częstości PTC z większym indeksem proliferacyjnym, sugerując jego rolę w progresji PTC [51].

### Mutacje *RAS* jako czynnik indukujący PTC?

Próby opracowania mysiego modelu PTC indukowanego mutacjami *RAS* nie były tak spektakularne w swych wynikach jak opisane powyżej modele pozostałych kluczowych zmian w PTC. Większość bowiem myszy modyfikowanych pod kątem genu *RAS* nie wykazywało rozwoju PTC. Przykładowo w modelu z ekspresją KRASG12V pod kontrolą promotora szczurzej Tg obserwowano zmiany w tarczycy, jednak wszystkie o charakterze łagodnym z długim okresem latencji [52, 53]. Po podaniu goitrogenów wykazano obecność FTC tylko u 1/51 myszy, co sugeruje, że *RAS* jest raczej czynnikiem predysponującym w raku tarczycy, wymagającym pojawienia się dodatkowych wydarzeń molekularnych [52, 53]. Późniejszy model, z 1996 roku, tym razem z ekspresją HRASG12V pod kontrolą promo-

tora bydłowej Tg, wykazał rozwój PTC w pojedynczych przypadkach myszy transgenicznych [54]. Jednak liczba myszy z PTC była bardzo ograniczona i nie zdołały one przekazać tej cechy potomstwu. Ponadto w modelu tym pojawił się rak płuc o architekturze brodawkowatej, który reprezentował raczej guza pierwotnego, a nie guza przerzutowego. Analizie poddano także potencjał inicjujący *NRAS* w raku tarczycy. Opracowano model myszy transgenicznej z ludzkim *NRAS* (Gln61Lys), w którym zaobserwowano progresję od zmian rozrostowych łagodnych, przez gruczolaka, do raka pęcherzykowego tarczycy [55]. Nie odnotowano żadnego przypadku typowego PTC. Natomiast 30% FTC charakteryzowało się mieszaniną cech charakterystycznych dla FTC, jak również PTC. W 25% przypadków myszy FTC wykazywały cechy inwazyjności z obecnością obszarów odróżnicowania. W związku z faktem, że aktywacja szlaku PI3K/AKT odgrywa niezaprzeczalną rolę w raku tarczycy, opracowano model myszy podwójnie zmutowanej z ekspresją KRASG12D oraz brakiem genu *PTEN*(-/-) w obrębie tarczycy [56]. Większość myszy transgenicznych w wieku powyżej 12. tygodnia życia rozwinęła agresywną, inwazyjną i przerzutową postać FTC z przerzutami do płuc.

Opisane powyżej modele pozwalają wysnuć hipotezę, że mutacje *RAS* mogą prowadzić do indukcji FTC, jednak w przypadku PTC stanowią wydarzenie wtórne, niewystarczające do samodzielnej indukcji transformacji nowotworowej. Mimo że w jednym modelu myszy transgenicznej uzyskano pojedyncze przypadki PTC, pojawiają się wątpliwości co do tego, na ile podwyższona ekspresja transgeny odzwierciedla aktywność endogenego zmutowanego *RAS* w warunkach fizjologicznych.

### Podsumowanie

Mimo że rak brodawkowaty tarczycy wiąże się z bardzo dobrym rokowaniem, obecnie stosowane postępowanie lecznicze oraz terapie celowane podkreślają nasze ograniczenia w zrozumieniu molekularnych mechanizmów leżących u jego podłoża, jak również różnorodności PTCs między poszczególnymi pacjentami. Rak jest bardzo złożonym schorzeniem, a heterogenność w obrębie populacji, wynikająca z różnic w genotypie, diety, czynników środowiskowych i innych, nie ułatwia jego badania. Na przestrzeni lat wykazano, że najlepszą metodą analizy ludzkich chorób, w tym raka, są mysie modele. Umożliwiają one weryfikację hipotez wysuniętych na podstawie analiz ludzkich guzów, jak również odkrywanie nowych mechanizmów, które następnie są poszukiwane u ludzi. Mysie modele są potężnym narzędziem nie tylko w kwestii badań nad molekularnym podłożem raka, ale również w kwestii analizy efektów nowych personalizowanych terapii leczniczych.

## Podziękowania

Praca powstała dzięki grantowi Narodowego Centrum Nauki (numer projektu N N401 612440) oraz

na podstawie projektu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu „Profilaktyka i leczenie chorób cywilizacyjnych” STRATEGMED (STRATEGMED2/267398/4/NCBR/2015).

