

# A pajzsmirigyöbök genetikai vizsgálata újgenerációs szekvenáláson alapuló platformon kifejlesztett génpanel segítségével

Kocsis-Deák Barbara<sup>1</sup> ■ Balla Bernadett dr.<sup>1,2</sup> ■ Árvai Kristóf<sup>2</sup>  
Tobiás Bálint dr.<sup>1,2</sup> ■ Győri Gabriella dr.<sup>3</sup> ■ Járay Balázs dr.<sup>4</sup>  
Székely Eszter dr.<sup>4</sup> ■ Podani János<sup>5</sup> ■ Kósa János dr.<sup>1,2</sup> ■ Lakatos Péter dr.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. Belgyógyászati Klinika, Budapest

<sup>2</sup>PentaCore Laboratórium, Budapest

<sup>3</sup>Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Radiológiai Klinika, Budapest

<sup>4</sup>Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, II. Patológiai Intézet, Budapest

<sup>5</sup>Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológiai Intézet, Budapest

**Bevezetés:** Vékonytű-biopsziás pajzsmirigyöbminták 25%-ánál bizonytalan citológiai eredményt kapunk. A göbök genetikai vizsgálata hozzájárulhat a pontos diagnózishoz.

**Célkitűzés:** Európában az első és a legtöbb, 23 releváns pajzsmirigyongogént (568 mutációval) tartalmazó génpanel kialakítása.

**Módszer:** A biopsziás mintákból izolált DNS vizsgálata Ion Torrent újgenerációs szekvenálással történt.

**Eredmények:** Módszerünk validációját tumorszövetmintákon végeztük, ennek során 127, a pajzsmirigydagasztokban eddig nem ismert eltéréseket azonosítottunk. Az *AXINI* a legpolimorfabb génnek, míg a *BRAF* c.1799T>A (V600E) a leggyakrabban azonosított mutációnak bizonyult. A vékonytű-biopsziás mintáinkban 36-féle, klinikailag releváns variánst detektáltunk, melyek 75%-a az irodalomban még nincs leírva. A citológiai malignus nyolc mintánk közül hatban, a bizonytalan citológiájú tizennégy mintánk közül nyolcban, míg a citológiai benignus huszonnyolc mintánk közül húszban azonosítottunk patogén variánst valamely driver génben (*BRAF* c.1799T>A, *NRAS* c.181C>A).

**Következtetés:** Olyan validált, megbízhatóan működő újgenerációs szekvenáláson alapú módszert fejlesztettünk ki, amely nagy pozitív prediktív értékkel (89%) és szenzitivitással (79%) képes a pajzsmirigy rosszindulatú elváltozásainak korai felismerésére.

Orv Hetil. 2019; 160(36): 1417–1425.

**Kulcsszavak:** pajzsmirigydagasztok, pajzsmirigyöbök genetikai vizsgálata, újgenerációs szekvenálás, génpanel

## Genetic testing of thyroid nodules using a gene panel developed on a new generation sequencing platform

**Introduction:** Twenty-five percent of fine-needle aspiration biopsy samples of thyroid nodules produce indeterminate cytological results. Genetic testing of nodules can contribute to accurate diagnosis.

**Aim:** Developing the first gene panel in Europe utilizing the 23 most relevant thyroid oncogenes with 568 mutations.

**Method:** Examination of the isolated DNA from biopsy samples by Ion Torrent new generation sequencing.

**Results:** The validation of our method was performed on tumor tissue samples, in which 127 genetic variations were identified, yet unknown in thyroid tumors. *AXINI* was the most polymorphic gene, while *BRAF* c.1799T>A (V600E) was the most frequently identified mutation. We detected 36 clinically relevant variants, 75% of which have not been described in the literature. Six of our 8 cytologically malignant and 8 of our 14 indeterminate as well as 20 of our 28 cytologically benign samples were identified as containing pathologic variants in a driver gene (*BRAF* c.1799T>A, *NRAS* c.181C>A).

**Conclusion:** We have developed a validated, reliable new generation sequencing-based method with high positive predictive value (89%) and sensitivity (79%), suitable for the early detection of malignant lesions in the thyroid.

**Keywords:** thyroid tumors, genetic testing of thyroid nodules, new generation sequencing, gene panel

Kocsis-Deák B, Balla B, Árvai K, Tobiás B, Győri G, Járay B, Székely E, Podani J, Kósa J, Lakatos P. [Genetic testing of thyroid nodules using a gene panel developed on a new generation sequencing platform]. *Orv Hetil.* 2019; 160(36): 1417–1425.

(Beérkezett: 2019. március 27.; elfogadva: 2019. április 25.)

### Rövidítések

ATC = (anaplastic thyroid cancer) anaplasticus pajzsmirigy-carcinoma; COSMIC = (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) A rákos szomatikus mutációk katalógusa; CT = (computed tomography) számítógépes tomográfia; DNS = dezoxiribonukleinsav; DTC = (differentiated thyroid cancer) differenciált pajzsmirigy-carcinoma; ETT-TUKEB = Egészségügyi Tudományos Tanács, Tudományos és Kutatásügyi Bizottság; FNAB = (fine-needle aspiration biopsy) vékonytű-aspirációs biopszia; FTC = (follicular thyroid carcinoma) follicularis pajzsmirigy-carcinoma; ISP = Ion Sphere Particle; MAPK = (mitogen-activated protein kinase) mitogén által aktivált proteinkináz; MEN2 = (multiple endocrine neoplasia type 2) multiplex endokrin neoplasia-2; miRNS = mikro-RNS; MNV = (multi-nucleotide variant) többszörös nukleotidvariáns; MR = (magnetic resonance) mágneses rezonancia; mRNS = (messenger RNA) hírvívő RNS; MTC = (medullary thyroid cancer) medullaris pajzsmirigy-rák; NGS = (next generation sequencing) újgenerációs szekvenálás; NPV = (negative predictive value) negatív prediktív érték; PBS = (phosphate-buffered saline) foszfátpufferes sóoldat; PCR = (polymerase chain reaction) polimeráz-láncreakció; PI3K/AKT = foszfatidil-inozitol-3-kináz/AKT; PPV = (positive predictive value) pozitív prediktív érték; PTC = (papillary thyroid carcinoma) papillaris pajzsmirigy-carcinoma; RNS = ribonukleinsav; SNV = (single-nucleotide variant) egyedi nukleotidvariáns; UH = ultrahang

Az elmúlt évtizedekben a pajzsmirigy-tumörök a leggyakoribb endokrin daganattá váltak, és világszerte folyamatosan emelkedő incidenciát mutatnak [1]. Tapintható göbök a pajzsmirigyek 4–7%-ában fordulnak elő a hazai populációban [2], míg a nem tapintható és ultrahanggal nem látható göbök jóval gyakoribbak. Ezeket az elváltozásokat sokszor egyéb indikációjú képalkotó vizsgálatok elvégzésekor azonosítják, mint például a nyaki erek Doppler-vizsgálata, illetve a nyaki CT/MR során. Így a hazai lakosság 20–50%-ában fedezhetnek fel göböket, vizsgálati módszertől függően [3], melyek kb. 2–10%-ában daganat alakul ki.

A rosszindulatú elváltozások többségét ún. hideg, azaz radioaktív jódot nem felhalmozó göbökben azonosítják. A ma alkalmazott pajzsmirigyvizsgálati módszerek közül rutinszerűen alkalmazzák az ultrahang (UH)-vizsgálatot. Ennek segítségével olyan jellegzetességek fedezhetők fel, amelyek segítenek következtetni a göb esetleges malignus

tulajdonságaira. Ennek tisztázása azonban további vizsgálatokat igényel. Vékonytű-aspirációs biopszia (fine-needle aspiration biopsy = FNAB) segítségével történhet mintavétel a malignitásra gyanús göbökből. A mintákat a citológiai kiértékelés folyamán hatféle kategóriába sorolják a Bethesda-rendszer alapján [4]: C1 – értékelhetetlen minta, C2 – benignus elváltozás, C3 – nem meghatározható, atípusos minta, C4 – follicularis neoplasia vagy annak gyanúja, C5 – malignitásra gyanús és C6 – egyértelműen rosszindulatú daganat. A kinyert sejtek vizsgálata az esetek kb. 25%-ában bizonytalan eredményt ad. A minták 3–20%-a a C3-as kategóriába sorolható, ahol a malignitási kockázat 5–15% körül mozog [5]; ilyen esetekben a ma alkalmazott megoldás a későbbi ismételt mintavétel, illetve ha szükséges, akkor műtéti beavatkozás.

Az utóbbi évtizedben további – az FNAB-alapú citológiát kiegészítő – diagnosztikus módszerek után kutattak, melyek csökkenthetnék ezen bizonytalan kategóriába kerülő minták számát. Több tanulmányban is felvetették a göbök genetikai vizsgálatának lehetőségét, melynek segítségével mélyebb betekintést kaphatunk ezen elváltozások molekuláris hátterébe, ami hozzájárulhat a pontos diagnózishoz. A pajzsmirigy-rákban megismert számos genetikai elváltozás hatékonyan alkalmazható a molekuláris diagnosztika területén. Világszerte a papillaris pajzsmirigy-carcinoma (PTC) előfordulása a leggyakoribb a pajzsmirigy-tumörök között, a magyar populációban is ez a típus fordul elő 60–85%-ban [6].

Egy malignitásra gyanús göb komplex genetikai háttérrel rendelkező megbetegedés, melynek vizsgálatára ma az újgenerációs szekvenáláson (NGS) alapuló platformok a legalkalmasabbak. Ezek közös tulajdonsága, hogy képesek párhuzamosan, egy időben több millió DNS-szál pontos leolvasására, tehát nagy az áteresztőképességük; sokkal gyorsabbak, rövidebb idő alatt képesek eredményt adni, és mindezt jóval kedvezőbb áron képesek elvégezni, mint a hagyományos Sanger-szekvenálás. Az NGS-platformok által hatalmas mennyiségű genetikai információhoz jutunk, melyeket bioinformatikai szoftverekkel és online adatbázisokkal tudunk elemezni. További előnye a Sanger-szekvenálással szemben, hogy nem csupán egy gén célzott hot spotjait képes azonosítani, hanem több tíz vagy száz gén teljes bázisrendjének leolvasására képes.

E jellemzők alapozták meg az általunk kifejlesztett génpanel bevezetését és klinikai validálását, mely egy időben vizsgálja számos, pajzsmirigyrákban ismert gén szomatikus eltérését, Ion Torrent platformon. Az általunk tervezett multiplex PCR-alapú AmpliSeq hot spot panel 23 rákgént (*AKT1*, *APC*, *AXINI*, *BRAF*, *C16orf3*, *CTNNA1*, *DICER1*, *EIF1AX*, *GNAS*, *HRAS*, *IDH1*, *KRAS*, *LPAR4*, *MET*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PTEN*, *RET*, *SMAD4*, *TERT*, *TP53*, *TSHR*, *VHL*) és azon belül 568 ismert onkogén mutációt tartalmaz. Módszerünk kidolgozása során alapvető célunk volt egy kiterjesztett panel létrehozása, mely nemcsak a leggyakrabban mutált géneket (például *BRAF*, *RAS*) tartalmazza, hanem több olyan gént is, amelynek mutációja ritkábban fordul elő bizonyos pajzsmirigy-tumorkban. Végső célunk egy olyan diszkriminatív géncsoport, illetve mutációs mintázat meghatározása, amely hozzájárulhat a pajzsmirigy-göbök malignizációjának előrejelzésére.

## Módszer

### Vizsgált minták

A vizsgálat beállítását és validálását kétféle mintacsoporton végeztük:

1. Igazoltan PTC-s páciensekből származó tumoros és ép/egészséges pajzsmirigyszövet-minták, melyeket operáció során gyűjtöttünk.
2. FNAB segítségével vett biopsziás minták.

#### 1. Műtéti mintákon végzett validálási vizsgálat

Vizsgálatsorozatunk első felében PTC-s szövetből és ugyanazon beteg normál-pajzsmirigyszövetéből származó izolált DNS-t elemeztünk. Ezen mintákat 40 betegről gyűjtöttük be 2010 és 2016 között, a Semmelweis Egyetem Sebészeti Klinikáján. Összesen 67 darab pajzsmirigy-mintát vizsgáltunk meg: 39 PTC-s és 28, szövettanilag tumormentes pajzsmirigyszövetet. Ezek közül 27 minta volt párban (vagyis a PTC és az ép minta is ugyanabból a betegből származott), míg 12 csak PTC-s és 1 ép szövetből származott. A vizsgálatot a Nemzeti Kutatási Etikai Bizottság hagyta jóvá, és minden beteg írásban beleegyezett a vizsgálat elvégzésébe (ETT-TUKEB 1160-0/2010-1018EKU).

A begyűjtött szövetmintákat  $-80\text{ °C}$ -on tároltuk fel dolgozásig, majd PBS-ben homogenizáltuk Fisher Scientific PowerGen szövetdarálóval (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Németország), és genomiális DNS-t izoláltunk Roche High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Indianapolis, IN, Amerikai Egyesült Államok [USA]) segítségével, a gyártó előírása szerint. Az izolált DNS koncentrációját a Qubit dsDNA HS assay kit segítségével (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), míg a DNS minőségét NanoDrop spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Montchanin, DE, USA)  $260/280\text{ nm}$ -en határoztuk meg.

#### 2. Biopsziás mintákon végzett vizsgálat

Vizsgálatsorozatunk második felében pajzsmirigy-FNAB-mintákból izolált DNS-t elemeztünk. Összesen 77 páciens ultrahanggal gyanúsnak ítélt pajzsmirigy-göbőből történt mintavétel, melyeket speciális tartósítóoldatban,  $4\text{ °C}$ -on tároltunk. A mintavételek 2017 és 2018 között, a Semmelweis Egyetem Sebészeti Klinikáján, illetve az Istenhegyi Magánklinikán történtek. A vizsgálatot a Nemzeti Kutatási Etikai Bizottság hagyta jóvá, és minden beteg írásban beleegyezett a vizsgálat elvégzésébe (ETT-TUKEB 1160-0/2010-1018EKU).

A biopsziás mintákból a DNS-izolálás a QIAamp DNA Blood Mini Kittel történt, a gyártó előírása szerint, majd az izolált DNS koncentrációját Qubit dsDNA HS assay kit segítségével, míg a DNS minőségét NanoDrop spektrofotométerrel  $260/280\text{ nm}$ -en határoztuk meg.

### Szekvenálás és adatelemzés

A DNS-könyvtárakat az Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) alkalmazásával készítettük el: a multiplex primer poolokhoz  $10\text{ ng}$  genomiális DNS-t adtunk, majd PCR-rel felamplifikáltuk ( $2\text{ perc }99\text{ °C}$ -on,  $15\text{ másodperc }99\text{ °C}$ -on és  $4\text{ perc }60\text{ °C}$ -on [21 ciklus], végül  $10\text{ °C}$ -on tartva). A PCR után FuPa reagens segítségével a primereket részben visszaemésztettük, ezután szekvenálóadaptereket és egyedi bárkódokat ligáltunk az amplikonokhoz. A könyvtárakat kitisztítottuk Agencourt AMPure XP reagenssel (Beckman Coulter, Sacramento, CA, USA), majd a végleges könyvtárak koncentrációját Ion Library TaqMan Quantitation Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) segítségével határoztuk meg. A templát előkészítését Ion PGM™ Hi-Q View OT2 Kittel (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) végeztük egy félautomata Ion OneTouch 2 készüléken, emulziós PCR-módszerrel; ilyenkor a DNS-fragmentumokat mikrométer nagyságrendű szekvenálógyöngyök felületén amplifikáljuk, víz-olaj emulzióban. Ezután Ion OneTouch ES (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) segítségével a templátot nem tartalmazó gyöngyöket eltávolítottuk. Szekvenálóprimert és -polimerázt adtunk a templátot tartalmazó gyöngyökhöz, majd az így előkészített Ion Sphere Particle (ISP-) gyöngyöket egy Ion 314v2 BC szekvenálóchipbe töltöttük, és elindítottuk a szekvenálást Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) segítségével.

Az Ion Torrent szekvenátor futásából származó adatokat a platformspecifikus Torrent Suite v 5.0.4 szoftver (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) segítségével kiértékeljük. Az eredményes elemzéshez és a variánsok azonosításához megfelelő lefedettség szükséges. Az általunk vizsgált mutációknál minimum  $10\times$ -es volt a lefedettség, és akár  $5\%$ -os allélgyakoriságot is detektáltunk. Átlagos lefedettségünk minden esetben meghaladta a  $400\times$ -t. A népszerűségben  $1\%$ -nál nagyobb gyakorisággal előforduló változatokat a további elemzésből kiszűrtük. A szek-

venálás során kapott leolvasásokat a referenciagenomhoz (hg19) illesztettük a TMAP (<https://github.com/ion-torrent/TMAP>) algoritmus segítségével, majd a variáns hívót úgy állítottuk be, hogy a szomatikus variánsokat megtalálja az adott régiókban. Ion Reporter 5.0-t (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) használtunk a variánsok jelölésére.

## Eredmények

### 1. A műtéti mintákon végzett validálási vizsgálat eredményei

#### Páciens/minta adatok

Validálási vizsgálatunkba 31 női (átlagéletkor: 49,5 év) és 9 férfi (átlagéletkor: 55,1 év) páciensből származó pajzsmirigyszöveti minta került bevonásra. A vizsgált 39 PTC-minta 7 különböző variánsát azonosítottuk. A legtöbb esetben 24 klasszikus PTC, illetve 4 follicularis variáns, 3 enkapszulált, 3 Hürthle-sejtes, 1 oncocyter, 1 multifokális és 3 microcarcinoma fordult elő. A tumoros elváltozás három típusnál (klasszikus, enkapszulált, multifokális variáns) jelent meg mindkét lebenyben. Az átlagos tumorátmérőt megvizsgálva a legnagyobb daganatméretet a follicularis variánsok esetében tapasztaltuk (átlagos tumorátmérő: 18,8 mm). Mintáink ezen jellemzőit az 1. táblázatban foglaltuk össze.

Az operáció során a páciensek pajzsmirigyszövetéből vett mintákon szövettani vizsgálat történt, melynek eredménye alapján különítettük el a tumoros, illetve az ugyanazon páciensekből származó egészséges/tumormentes mintákat. Ezek alapján kerültek be a minták ge-

1. táblázat | A pácienseinkben azonosított 39 PTC-s minta altípusba sorolása és az ezen daganattípusokra jellemző tulajdonságok

PTC-minták (n = 39)	Nő/Férfi (n)	Lebenyek érintettsége egy/mindkettő (n)	Átlagos tumorátmérő (mm)
Klasszikus PTC (n = 24)	17/1	18/6	14,8
Follicularis variáns (n = 4)	3/1	4/0	18,8
Enkapszulált variáns (n = 3)	3/0	1/2	14,3
Hürthle-sejtes variáns (n = 3)	3/0	3/0	16,3
Oncocyter variáns (n = 1)	1/0	1/0	N/A
Multifokális variáns (n = 1)	1/0	0/1	N/A
Microcarcinoma (n = 3)	3/0	3/0	3,3

n = darabszám; N/A = nincs adat; PTC = papillaris pajzsmirigy-carcinoma

netikai vizsgálatunkba, így kialakítva a két vizsgálati csoportot: 1. PTC-s tumorminta és 2. tumormentes, egészséges minta.

#### A genetikai vizsgálat eredményei

A szekvenálás végén kapott adatok megbízhatóságát futásonként ellenőriznünk kellett, hiszen ezen paraméterek (például átlagos leolvasási szám, átlagos lefedettség) megfelelő értéke a variánsok megbízható azonosításához szükséges. A kapott NGS-eredményeknél mintánként 143 211 read volt az átlagos leolvasási szám. Az átlagos lefedettség 642×-esnek, míg az átlagos 1×-es célszekvenencia-lefedettség 98,2% körül adódott. Az általunk vizsgált pajzsmirigyminták minden esetben megfelelő értékekkel rendelkeztek, így a kapott eltéréseket megbízhatónak ítéltük.

A 67 pajzsmirigyszövet-mintában összesen 177 aminosavcserevel járó variánst találtunk, ezek közül 143 single-nucleotide variánst (SNV; 142 misszenszt és 3 nonszenszt), 31 INDEL-t (27 insertiót, 3 deletiót és 1 frameshift deletiót) és 1 misszensz multiple nucleotide variánst (MNV) azonosítottunk. Ezek közül 127 olyan eltérést találtunk, melyet eddig még nem írtak le pajzsmirigydaganatokban, míg a maradék 50 mutációt korábban már azonosították (többségüket pajzsmirigyrákokkal, míg néhányat egyéb, nem pajzsmirigyrákos megbetegedésekkel [például mellrák, hasnyálmirigyrák, vastagbélrák] összefüggésben).

#### a) PTC-szövetben talált mutációk

A bizonyítottan PTC-s szövetmintákban a 23 vizsgált génből 20 esetén találtunk legalább egy eltérést, összesen 102 szomatikus mutációt detektáltunk bennük. Az *AXINI* mutatkozott a legheterozigotabb génnek, 16 variánsal. Ezt követte a *PIK3CA*-, az *APC*- és a *TSHR*-gén, melyeknek 15, 14, illetve 13 variánsát azonosítottuk. A leggyakrabban azonosított mutáció a jól ismert *BRAF* c.1799T>A (V600E) volt, mely 14 PTC-szöveti mintában fordult elő. Emellett további 2 mutáció fordult elő gyakran: 5 esetben *TSHR* c.1373T>C, míg 4 esetben *APC* c.636\_637insAA frameshift mutáció.

A PTC klasszikus altípusában a V600E mutáció mellett egyéb *BRAF*-mutációk is megtalálhatók, míg a PTC-variánsokban csak a V600E van jelen. A klasszikus típusban észleltünk egy nem bizonyítottan, de nagy valószínűséggel patogén 1795A>G (T599A) variánst. Kimutattuk, hogy a V600E-pozitivitás mellett egyéb géneket érintő mutációk kevésbé fordultak elő adott PTC-mintában, mint azon tumoros mintákban, ahol a V600E mutáció nem volt jelen.

Egy tumoros mintában átlagosan 5,74 mutációt találtunk; egy PTC-mintában a legtöbb mutációszám 19 volt, míg két esetben egyetlen szomatikus mutációt sem tudtunk azonosítani a vizsgált génekben.

Tumoros mintáinkban a 23 gén közül 3 génben egy mutációt sem találtunk; *TERT* promóter elváltozásokat



nem detektáltunk; illetve a *GNAS*- és a *KRAS*-génben sem találtunk eltérést.

#### b) Tumormentes, egészséges szövetben talált mutációk

A szövettanilag egészséges mintákban összesen 52 szomatikus eltérést találtunk, 15 génben. Itt is az *AXINI*-gén volt a legpolimorfabb, ennek mutációs mintázata azonban eltért a tumormintákban leírtaktól. Összesen 8 génben egyetlen mutációt sem azonosítottunk (*AKT1*, *BRAF*, *GNAS*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *TERT*, *VHL*).

## 2. A FNAB-mintákon végzett vizsgálat eredményei

### Páciens/minta adatok

FNAB segítségével összesen 77 páciens malignitásra gyanús pajzsmirigyöbéből történt mintavétel. A mintákból izolált DNS koncentrációja kritikus az NGS-vizsgálat sikerességét tekintve. A túl alacsony DNS-koncentrációjú mintákat sikertelennek ítéltük, és kizártuk a további vizsgálatból. Így összesen 51 sikeres mintánk volt, melyek 41 női (átlagéletkor: 53 év) és 10 férfi (átlagéletkor: 45 év) páciensből származtak.

A FNAB-minták közül a citológiai kiértékelés 8 esetben adott malignus eredményt (2. táblázat). Negatív citológiai lelet keletkezett 28 páciensnél (ez eseteink 55%-a), tehát ezen mintákban malignitásra utaló elváltozás nem volt. Tizennégy esetben a minták a malignus gyanús kategóriák egyikébe estek. Míg egy esetben nincs információ a citológiai eredményről a kenet sejtmentessége miatt, azonban az NGS-vizsgálathoz elkülönített mintából elegendő volt a DNS-mennyiség, így genetikai eredmény készülhetett.

### A genetikai vizsgálat eredményei

A kapott NGS-eredményeknél mintánként 243 955 read volt az átlagos leolvasási szám. Az átlagos lefedettség 4312x-es, míg az átlagos 10x-es célszekvencia-lefedettség 87% volt. Az általunk vizsgált pajzsmirigy minták minden esetben megfelelő értékekkel rendelkeztek, így a kapott eltéréseket megbízhatónak ítéltük.

A vizsgált 51 mintából 35-ben találtunk klinikailag releváns genetikai eltérést. Összesen 36-féle aminosavcserével járó variánst azonosítottunk (24 SNV [24 misz-

szensz], 7 INDEL [1 insertio és 6 deletio], 2 splice site variáns, 1 intronikus régióba eső mutáció, 2 MNV) (3. táblázat). Ezek közül 27 olyan eltérést találtunk, amelyet eddig még nem írtak le pajzsmirigydaganatokban, míg 9-et már azonosítottak korábban. Ezek többségét pajzsmirigy-rákokban ismerték fel, míg néhányat nem pajzsmirigy-daganatos megbetegedésekkel (például hasnyálmirigy-rák, vastagbél-rák stb.) is összefüggésbe hozták.

A 8 pozitív citológiai/malignus megjelölésű FNAB-mintánk közül 6-ban különböző patogén eltéréseket azonosítottunk (*BRAF* c.1799T>A, *LPAR4* c.137A>G, *APC* c.1758A>C, *AXINI* c.120\_122delCAGinsAGC, *SMAD4* c.1569C>G, *TSHR* c.749\_753delAGGAA). A citológia alapján negatív besorolást kapó, a vizsgálat pillanatában malignitásra utaló jeleket nem mutató 28 mintánk közül 20 esetben találtunk genetikai elváltozást, mely kockázatot jelenthet pajzsmirigydaganat kialakulására; a már ismert eltérések közül egy-egy mintában megtaláltuk a *EIFLAX* c.338-1G>C, a *HRAS* c.181C>A, a *PTEN* c.634+2T>G, a *TSHR* c.1887G>T és c.1895C>T mutációkat. A legtöbbször (6 mintában) az *LPAR4* c.137A>G mutáció fordult elő, mely irodalmi adatok alapján a PTC malignus állapotával áll kapcsolatban [7]. További 8 esetben, ahol a citológiai eredmény nem mutatott ki malignus elváltozást, nem detektáltunk eltérést a vizsgált génekben. A 14 malignitásra gyanús (bizonytalan) citológiai eredményt mutató mintánál 6 esetben nem találtunk genetikai eltérést, míg 8-ban detektáltunk valamilyen patogén variánst. Ezek közül a jól ismert *BRAF* c.1799T>A és az *NRAS*-gén c.181C>A variánsát fedeztük fel egy-egy mintában, míg a többi páciensnél az *APC*, *AXINI*, *LPAR4*, *SMAD4*, *TERT* és *VHL* génekben azonosítottunk mutációkat. Annál az egy páciensnél, akinél a citológiai értékeléshez sejtmentes kenet készült, a genetikai vizsgálatra párhuzamosan félretett mintából sikerült kimutatnunk egy *LPAR4* c.137A>G génhibát. Az eredményeket a 4. táblázatban foglaltuk össze.

A megvizsgált mintáinkban összesen 36-féle, klinikailag releváns mutációt azonosítottunk, 15 génben. A legpolimorfabb gén az *AXINI* volt, 6 különböző variánssal. A citológiai eredményekkel összevetve e 6 variáns közül egyet (c.120\_122delCAGinsAGC) pozitív, hármat (c.1326delC, c.2392A>G és c.476A>G) malignitásra gyanús göbökben fedeztünk fel, míg a c.1887\_1891delCCAGA és c.2155A>G variánsait negatív citológiai mintákban. Az *AXINI* után 5 variánssal a *TSHR*-gén (citológiai eredmények: 1 pozitív, 4 negatív) fordult elő a legtöbbször. A leggyakoribb mutációnk az *LPAR4* c.137A>G (p.Tyr46Cys) volt, amely egy aminosavcserével járó misszensz mutáció, melyet 11 mintánkban azonosítottunk. Az *LPAR4* c.137A>G eltérést hordozó minták többsége negatív citológiai eredményt mutató (11/6 eset), míg 2 esetben pozitív, másik 2 esetben malignitásra gyanús kategóriába sorolták ezeket,

2. táblázat | A citológiai vizsgálat eredményei az 51 FNAB-minta esetében

	Mintaszám (n)	Nő/Férfi (n)
Pozitív citológiai lelet	8	6/2
Negatív citológiai lelet	28	25/3
Gyanús citológiai lelet	14	9/5
N/A (Sejtmentes kenet)	1	1/0
Összesen	51	51

FNAB = vékonytű-aspirációs biopszia; n = darabszám; N/A = nincs adat

**3. táblázat** | A 36-féle mutáció, melyet FNAB-pajzsmirigy mintákban azonosítottunk. Feltüntetjük a mutációk típusát és COSMIC-azonosítójukat is, amennyiben az adott variánst már leírták a szakirodalomban, illetve az utolsó oszlopban leírtuk, hogy a citológiai kiértékelés során milyen besorolást kapott az adott minta, amelyben az adott variánst megtaláltuk

Gén	Mutáció	A mutáció típusa	COSMIC-azonosító	Milyen citológiai mintában találtuk?
<i>APC</i>	c.1758A>C	Misszensz	–	P
<i>APC</i>	c.2788A>C	Misszensz	–	GY
<i>APC</i>	c.4343C>G	Misszensz	–	2 N
<i>APC</i>	c.4679A>T	Misszensz	–	N
<i>AXINI</i>	c.120_122delCAGinsAGC	MNV	–	P
<i>AXINI</i>	c.1326delC	Deletio	–	GY
<i>AXINI</i>	c.1887_1891delCCAGA	Deletio	–	N
<i>AXINI</i>	c.2155A>G	Misszensz	–	N
<i>AXINI</i>	c.2392A>G	Misszensz	–	GY
<i>AXINI</i>	c.476A>G	Misszensz	–	GY
<i>BRAF</i>	c.1799T>A	Misszensz	COSM476	4 P, GY
<i>EIFLAX</i>	c.17G>T	Misszensz	–	N
<i>EIFLAX</i>	c.338-1G>C	Splice site	COSM3372212	N
<i>EIFLAX</i>	c.51_52insA	Insertio	–	2 N
<i>EIFLAX</i>	c.75delA	Deletio	–	N
<i>HRAS</i>	c.181C>A	Misszensz	COSM496	N
<i>IDH1</i>	c.142A>G	Misszensz	–	N
<i>LPAR4</i>	c.137A>G	Misszensz	–	2 P, 6 N, 2 GY, 1 N/A
<i>LPAR4</i>	c.824T>C	Misszensz	–	N
<i>MET</i>	c.4079C>T	Misszensz	–	N
<i>NRAS</i>	c.181C>A	Misszensz	COSM580	GY
<i>PIK3CA</i>	c.1034A>G	Misszensz	–	N
<i>PTEN</i>	c.398T>A	Misszensz	–	N
<i>PTEN</i>	c.409G>C	Misszensz	–	N
<i>PTEN</i>	c.411_413delATA	Deletio	–	N
<i>PTEN</i>	c.634+2T>G	Splice site	COSM1968251	N
<i>SMAD4</i>	c.1561A>G	Misszensz	–	GY
<i>SMAD4</i>	c.1569C>G	Misszensz	COSM14115	P
<i>SMAD4</i>	c.919G>A	Misszensz	–	N
<i>TERT</i>	c.-245T>C	Intronikus	–	N, GY
<i>TSHR</i>	c.1115_1121delACCCCCAinsCCCCCG	MNV	–	N
<i>TSHR</i>	c.1887G>T	Misszensz	COSM26422	N
<i>TSHR</i>	c.1895C>T	Misszensz	COSM26418	N
<i>TSHR</i>	c.745delC	Deletio	–	N
<i>TSHR</i>	c.749_753delAGGAA	Deletio	–	P
<i>VHL</i>	c.148G>A	Misszensz	COSM17999	GY

COSMIC = A rákos szomatikus mutációk katalógusa; FNAB = vékonytű-aspirációs biopszia; Gy = gyanús; bizonytalan kategóriájú minta; Misszensz (missense) mutáció = a DNS bázissorrendjének aminosavcserét eredményező változása; MNV = többszörös nukleotidvariáns; N = negatív, jóindulatú kategóriájú minta; N/A = nincs adat, sejtmentes kenet; P = pozitív, malignus kategóriájú minta

illetve 1 esetben a sejtmentes kenet miatt nincs információ a citológiai értékelésről.

A detektált mutációk közül kimagasodott a *BRAF* c.1799T>A (V600E), melyet 5 mintában fedeztünk fel. Ezen minták többsége (4 eset) a citológiai vizsgálat szerint is egyértelműen malignus eredményt mutatott, míg

1 esetben a bizonytalan kategóriába sorolták. Negatív citológiai mintában nem azonosítottunk *BRAF*-mutációt.

A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy módszerünk nagy pozitív prediktív értékkel (89%) és szenzitivitással (79%) képes megjósolni egy pajzsmirigy-

**4. táblázat** | A táblázat a vizsgált 51 FNAB-minta citológiai vizsgálat alapján végzett besorolását foglalja össze (1. oszlop), valamint hogy az egyes citológiai kategóriákba sorolt minták genetikai vizsgálata azonosított-e mutációt az analizált génekben

	Mintaszám (n)	Nincs mutáció (n)	Van mutáció (n)
Pozitív citológiai lelet	8	2	6
Negatív citológiai lelet	28	8	20
Gyanús citológiai lelet	14	6	8
N/A (Sejtmentes kenet)	1	0	1
Összesen	51	16	35

FNAB = vékonytű-aspirációs biopszia; n = darabszám; N/A = nincs adat, sejtmentes kenet

göb malignizálódásának kockázatát [8]; a hozzá tartozó specificitási (86%) és NPV-értékek (75%) is megfelelőek, így nagy segítséget nyújt a malignitásra gyanús, bizonytalan citológiai eredményt kapott pajzsmirigy-eltávolítások végleges diagnózisában.

## Megbeszélés

Napjainkban a klinikai gyakorlatban alkalmazott vizsgálati módszerek sokszor későn jelzik a pajzsmirigy tumoros elváltozását, a rosszindulatú daganatok korai felismerése azonban mind a túlélés, mind a terápiamegválasztás szempontjából nagyon fontos. A pajzsmirigyben fellelhető malignus elváltozások mielőbbi felismerésére, a bizonytalan citológiai eredmények kiegészítésére új vizsgálati módszerek szükségesek. Erre ma már egyre inkább módot ad a molekuláris diagnosztika.

PTC-ben a leggyakoribbak a *BRAF*- és a *RAS*-gén szomatikus mutációi [9]. A PTC-s esetek felében a *BRAF*-gén egyik pontmutációja, a V600E fordul elő. E mutáció konstitutívan aktiválja a MAPK (mitogén által aktivált proteinkináz) jelátviteli útvonalat, így az érintett sejtek korlátlan növekedését okozza, ami végül daganat kialakulásához vezet. A *RAS*-gének (*NRAS*, *KRAS*, *HRAS*) a MAPK-útvonal mellett hatással vannak a PI3K/AKT (foszfatidil-inozitol-3-kináz/AKT) kaskádra is. *RAS*-mutációk a PTC-s esetek 30–45%-ában fordulnak elő, más típusú (follicularis mintázatú) pajzsmirigy-tumorok esetében azonban gyakoribbak, például FTC-ben az előfordulásuk 40–75% is lehet [10, 11]. E leggyakoribb, nagy hatású gének mellett azonban számos egyéb genetikai eltérés is szerepet játszik a pajzsmirigy-rákok patogenezisében [12].

A PTC mellett megkülönböztetünk egyéb pajzsmirigy-tumor-fajtákat is. A differenciált pajzsmirigy-rákok (DTC) csoportjába tartozik a pajzsmirigy-tumorok ~90%-a, melyek a pajzsmirigy folliculusainak epithelsejtjeiből származnak. A PTC mellett idesorolható a follicularis rák (FTC) is, bár ezen esetek előfordulása ritkább, az összes DTC 10–15%-a. Az FTC-kben leginkább a PI3K/AKT útvonal génmutációit írták le (például

5–15%-ban *PIK3CA*-, 10–15%-ban *PTEN*-génekben) [5]. A pajzsmirigy-tumorok másik csoportjába tartoznak a pajzsmirigy follicularis epitheliomának differenciálatlan malignus tumorai, az ún. anaplasticus pajzsmirigy-carcinómák (ATC). Az ATC a legagresszívabb fajtája a pajzsmirigy rosszindulatú daganatainak, mortalitása 100%-os. Előfordulása szerencsére ritka, az összes pajzsmirigy-daganat ~1–3%-át teszi ki. Leírták, hogy ha egy DTC-ben mind a MAPK-, mind a PI3K/AKT útvonal konstitutívan aktív, az ATC kialakulásának nagyobb a valószínűsége. Bizonyos genetikai eltérések meglepte ugyanis akár PTC- vagy FTC-állapotból is ATC kialakulásához vezethet. Az ATC-s esetek ~25%-ában a MAPK-útvonalon a *BRAF*-gén V600E mutációját fedezték fel, míg a PI3K/AKT útvonal tagjai közül a *PIK3CA*- és a *PTEN*-génben találtak eltéréseket a leggyakrabban [13]. A pajzsmirigy-daganatok harmadik csoportja a medullaris pajzsmirigy-rák (MTC), mely egy neuroendokrin daganat, az összes pajzsmirigy-carcinoma 2–5%-a. E típus a pajzsmirigyben található, de fejlődéstanilag nem onnan eredő, ún. parafollicularis C-sejtekből származik. A MTC kialakulásában a legjelentősebbek a *RET*-gén mutációi (több százzal számoltak már be), ezenkívül számos egyéb *RAS*- és *TSHR*-mutáció is érintett a kialakulásában.

2010-re munkacsoportunk kidolgozott egy 8 gén vizsgálatán alapuló panelt (4 szomatikus génmutáció: *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* és 4 génátrendeződs: *RET/PTC1*, *RET/PTC3*, *PAX8ex7/PPARGgamma*, *PAX8ex9/PPARGgamma*), mely pajzsmirigy-szöveti minták szomatikus mutációs mintázatának elemzését végzi Light Cycler leolvadási görbe-analízissel [6]. Ezt a kezdeti génszettünket továbbfejlesztettük egy kiterjesztett, sokkal több gén vizsgálatát magában foglaló módszerrel, mely a legmodernebb molekuláris genetikai diagnosztikai eljárás, az NGS-technikán alapul. A géndiagnosztikus panel megtervezése, kialakítása és ismert hisztopatológiai eredményű műtéti pajzsmirigy-szövet-mintákon való validálási folyamata után célunk volt azt FNAB-mintákra is alkalmazhatóvá tenni, így kiegészítve a citológiai eredményeket.

Vizsgálatsorozatunk első felében irodalmi adatok alapján új, a legtöbb releváns gént magában foglaló panelt alakítottunk ki, mely az első és a legszélesebb körű Európában. Ezt követően módszerünket sikeresen alkalmaztuk FNAB-mintákon is, jó pozitív prediktív és szenzitivitási értékekkel. Kapott eredményeink a már jól ismert ún. driver génben, a *BRAF*-ban bekövetkező mutációk jelentőségét sikeresen megerősítették, míg a génpanelbe bevont egyéb gének elemzése is értékesnek mutatkozott.

Az *LPR4*-gén szerepe a mai napig nem tisztázott, szomatikus mutációit különböző rosszindulatú daganatokban azonosították már (például vastagbélrák, a fej és nyak laphámsejtes carcinómája [14, 15]), míg *Pan* és *mtsai* a PTC-ben mint létfontosságú onkogént detektálták [7]. Az *APC*-gén mutációi főként PTC-re jellemzők, de megfigyelték már ATC-ben is: egy japán populációt

vizsgáló tanulmányban például a megvizsgált ATC-s páciensek 9%-a hordozott az *APC*-génben mutációt [16], az általunk megtalált variánsát azonban eddig még nem írták le. Az *AXINI*-gént a leginkább az ATC kialakulásával hozzák kapcsolatba [17], a talált MNV-t és a benignus állapotú citológiai mintákban felfedezett variánsokat (c.1887\_1891delCCAGA és c.2155A>G) eddig még nem írták le a szakirodalomban. A *SMAD4* c.1569C>G variánsát 1 mintánkban fedeztük fel, melyet főként vastagbélrákban jegyeznek [18]. A *TSHR*-génnek alapvető szerepe van a pajzsmirigysejtek proliferációjában, differenciálódásában [19], így mutációi daganat kialakulásához vezethetnek. A *TSHR* megtalált misszensz variánsai az irodalomban patogén besorolásúak [20–22], esetünkben 1-1 citológiai negatív eredményű mintában voltak jelen. A *TSHR* másik 2 deletiós és 1 MNV variánsáról (3. táblázat) szakirodalmi adat még nem érhető el, elsőként azonosítottuk.

Két olyan pozitív citológiai eredményű páciensünk volt, akik esetében nem tudtunk detektálni eltérést egyik vizsgált génben sem; ennek több magyarázata is lehet. Egyrészt az alkalmazott NGS-rendszer technikai beállítása nem vagy csak limitáltan képes a génátrendeződések és nagy deletiók/insertiók vizsgálatára. Másrészt ismert, hogy a daganatok kialakulásában a génexpressziót érintő szabályozási hibák is állhatnak, melyek csak más módszerrel detektálhatók. Ezenkívül meg kell említeni, hogy bár napjainkig a fellelhető összes, pajzsmirigy-tumorról összefüggésben leírt, releváns gént beválogattuk panelünkbe, maradhattak még eddig fel nem tárt gének és variánsok.

A vizsgálat pillanatában citológiai benignusnak ítélt göbök nagy részében (~70%) is találtunk valamilyen mutációt. Ezek közül 5 olyan mutációt azonosítottunk, melyeket már a szakirodalomban is a pajzsmirigy rosszindulatú daganatával hoztak összefüggésbe. Ezek közül a legismertebb a *HRAS* c.181C>A variánsa, mely PTC-s és FTC-s betegek mintáiban is gyakran előfordul [23]. A citológiai jóindulatú mintákban a legtöbbször az *LPAR4* c.137A>G mutációja fordult elő, ami a fentebb említettek alapján a PTC-s állapottal van összefüggésben. Ezek alapján a megtalált mutációk meglehetősen citológiai negatív mintában előre jelezheti a későbbi malignitás kialakulását. Ezen pácienseknél csak egyéni mérlegelés után – citológiai eredmény, UH-adatok, egyéb elvégzett vizsgálatok, illetve az NGS során kapott genetikai eredmények figyelembevételével – adhatunk ki szakorvosi véleményt a szóban forgó göb(ök)ről. Természetesen ezen betegek hosszú távú követése fontos előrejelzésünk pontosságának megítéléséhez.

A malignitásra gyanús, bizonytalan citológiájú minták több mint felében találtunk genetikai eltérést, melyek közül a driver onkogén *BRAF* c.1799T>A és *NRAS* c.181C>A előfordulása döntőnek bizonyult a végleges diagnózis kiadásakor, és műtéti beavatkozást javasoltunk. A többi mintánál az *APC*, *AXINI*, *LPAR4*, *SMAD4*, *TERT* és *VHL* génekben azonosítottunk mutációkat,

mely esetekben a páciensek jóval szorosabb szakorvosi követése javasolt, és amennyiben az adott göb nagysága vagy ultrahangos jellege megváltozna, ismételt mérlegelés szükséges az esetleges műtéti beavatkozás szükségességéről. A negatív és bizonytalan citológiai eredményt mutató göbökben felfedezett mutációk sok esetben előrevetíthetik a rosszindulatú daganatok kialakulásának lehetőségét. Tehát a genetikai és a citológiai vizsgálat együttesen sokkal megbízhatóbb eredményt nyújthat.

A világban több külföldi cég is dolgozott már ki pajzsmirigy-szövet vizsgálatára alkalmas géndiagnosztikai tesztek, melyek szenzitivitása és specificitása, illetve pozitív és negatív prediktív értéke közel hasonlóan mutatkozik az általunk kialakított paneléhez. A *ThyGenX*-et – amely PCR segítségével több száz ponton vizsgál nyolc gént (a *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* génmutációit és a *RET/PTC1*, *RET/PTC3*, *PAX8/PPAR $\gamma$*  génátrendeződéseit) – kiegészítették a *ThyraMIR*-rel (további tíz miRNS expressziójának elemzésével), így ezek együttes alkalmazásával elérték a 74%-os PPV- és 94%-os NPV-értékeket [24]. Az *Afirma* panelnek (167 gén mRNS-expresszióját elemzi) szenzitivitási és NPV-értéke elég magas értéket ért el (92%, illetve 94–95%), PPV-je azonban igen alacsony (37%) [25], így ha bizonytalan eredményt ad, akkor az adott esetben továbbra sincs megbízható, végleges diagnózis. A *ThyroSeq v3*-as, legújabb verziója DNS-t és RNS-t is vizsgál NGS segítségével, összesen 112 gént elemz. E teszt szenzitivitása 91–97% között alakul, PPV-értéke 50–80%, míg NPV-je 89–100% között mozog [26]. Európában először, az általunk kifejlesztett, 23 gént magában foglaló, pajzsmirigy-göböl származó mintát vizsgáló panel a már meglévő tesztek értékeihez hasonló eredményeket mutat (szenzitivitás: 79%, specificitás: 86%, PPV: 89%, NPV: 75%), így megbízhatóan használható.

## Következtetés

Elmondhatjuk, hogy egy olyan validált, FNAB-mintákon is megbízhatóan működő NGS-alapú módszert fejlesztettünk ki, mely nemzetközi viszonylatban is megállja a helyét. A munkacsoportunk által kidolgozott géndiagnosztikai panel sikeres elvégzéséhez a legfontosabb a megfelelő mennyiségű kezdeti DNS, melyet a jól kivitelezett biopsziás mintavételezés biztosít. Molekuláris genetikai módszerünk segítséget nyújthat a klinikai döntéshozatalban, mely alkalmas a pajzsmirigy rosszindulatú elváltozásainak korai előrejelzésére.

*Anyagi támogatás:* A közlemény megírása, illetve a kapcsolódó kutatómunka anyagi támogatásban nem részesült.

*Szerzői munkamegosztás:* K.-D. B.: A szakirodalom kutatása, a kézirat összeállítása, laboratóriumi munkafolyamatok elvégzése, adatok elemzése. B. B.: Irodalom-



kutatás, a kézirat összeállítása. Á. K.: Laboratóriumi munkafolyamatok elvégzése, adatok elemzése. T. B.: Irodalomkutatás, a kézirat összeállítása. Gy. G., J. B., Sz. E.: Mintavételezés. P. J.: Adatelemzés. K. J., L. P.: A kutatási téma megtervezése és a kézirat kritikus átolvasása. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elővasta és jóváhagyta.

*Érdekeltségek:* A szerzőknek nincsenek érdekeltségeik.

## Irodalom

- [1] National Cancer Institute. Cancer stat facts: thyroid cancer. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html> [accessed: September 12, 2017].
- [2] Halászlaki C, Tóbiás B, Balla B, et al. Predictive value of somatic mutations for the development of malignancy in thyroid nodules by cytopathology. *Endocr Pract.* 2016; 22: 1081–1087.
- [3] Lakatos P, Tóbiás B, Kósa J, et al. Molecular pathology of differentiated thyroid cancers: Where do we stand in 2016? [Differenciált pajzsmirigyrákok molekuláris diagnosztikája: Hol tartunk 2016-ban?] *Magyar Belorv Arch.* 2016; 69: 98–103. [Hungarian]
- [4] Cibas ES, Ali SZ. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology. *Thyroid* 2009; 19: 1159–1165.
- [5] D’Cruz AK, Vaish R, Vaidya A, et al. Molecular markers in well-differentiated thyroid cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2018; 275: 1375–1384.
- [6] Tóbiás B, Halászlaki C, Balla B, et al. Genetic alterations in Hungarian patients with papillary thyroid cancer. *Pathol Oncol Res.* 2016; 22: 27–33.
- [7] Pan W, Zhou L, Ge M, et al. Whole exome sequencing identifies lncRNA *GAS8-AS1* and *LPAR4* as novel papillary thyroid carcinoma driver alternations. *Hum Mol Genet.* 2016; 25: 1875–1884.
- [8] Kocsis-Deák B, Balla B, Tóbiás B, et al. Molecular genetic examinations in the diagnosis of thyroid tumors. [Molekuláris genetikai vizsgálatok a pajzsmirigy daganatainak diagnosztikájában.] *Orvostovábbk Szle.* 2018; 25: 49–53. [Hungarian]
- [9] Carpi A, Mechanick JI, Saussez S, et al. Thyroid tumor marker genomics and proteomics: diagnostic and clinical implications. *J Cell Physiol.* 2010; 224: 612–619.
- [10] Erinjeri NJ, Nicolson NG, Deyholos C, et al. Whole-exome sequencing identifies two discrete druggable signaling pathways in follicular thyroid cancer. *J Am Coll Surg.* 2018; 226: 950–959. e5.
- [11] Zolotov S. Genetic testing in differentiated thyroid carcinoma: indications and clinical implications. *Rambam Maimonides Med J.* 2016; 7: e0009.
- [12] Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* 2014; 159: 676–690.
- [13] Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 184–199.
- [14] Harper K, Arsenaault D, Boulay-Jean S, et al. Autotaxin promotes cancer invasion *via* the lysophosphatidic acid receptor 4: participation of the cyclic AMP/EPAC/Rac1 signaling pathway in invadopodia formation. *Cancer Res.* 2010; 70: 4634–4643.
- [15] Matayoshi S, Chiba S, Lin Y, et al. Lysophosphatidic acid receptor 4 signaling potentially modulates malignant behavior in human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol.* 2013; 42: 1560–1568.
- [16] Kurihara T, Ikeda S, Ishizaki Y, et al. Immunohistochemical and sequencing analyses of the Wnt signaling components in Japanese anaplastic thyroid cancers. *Thyroid* 2004; 14: 1020–1029.
- [17] Sykorova V, Dvorakova S, Vcelak J, et al. Search for new genetic biomarkers in poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas using next generation sequencing. *Anticancer Res.* 2015; 35: 2029–2036.
- [18] Péterfia B, Kalmér A, Patai AV, et al. Construction of a multiplex mutation hot spot PCR panel: the first step towards colorectal cancer genotyping on the GS Junior platform. *J Cancer* 2017; 8: 162–173.
- [19] Kimura T, Van Keymeulen A, Golstein J, et al. Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of *in vitro* models. *Endocr Rev.* 2001; 22: 631–656.
- [20] Gozu H, Avsar M, Bircan R, et al. Mutations in the thyrotropin receptor signal transduction pathway in the hyperfunctioning thyroid nodules from multinodular goiters: a study in the Turkish population. *Endocr J.* 2005; 52: 577–585.
- [21] Tonacchera M, Chiovato L, Pinchera A, et al. Hyperfunctioning thyroid nodules in toxic multinodular goiter share activating thyrotropin receptor mutations with solitary toxic adenoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 492–498.
- [22] Palos-Paz F, Perez-Guerra O, Cameselle-Teijeiro J, et al. Prevalence of mutations in *TSHR*, *GNAS*, *PRKARIA* and *RAS* genes in a large series of toxic thyroid adenomas from Galicia, an iodine-deficient area in NW Spain. *Eur J Endocrinol.* 2008; 159: 623–631.
- [23] Pozdveyev N, Gay LM, Sokol ES, et al. Genetic analysis of 779 advanced differentiated and anaplastic thyroid cancers. *Clin Cancer Res.* 2018; 24: 3059–3068.
- [24] Nishino M. Molecular cytopathology for thyroid nodules: a review of methodology and test performance. *Cancer Cytopathol.* 2016; 124: 14–27.
- [25] Alexander EK, Schorr M, Klopper J, et al. Multicenter clinical experience with the Afirma gene expression classifier. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99: 119–125.
- [26] Nikiforova MN, Mercurio S, Wald AI, et al. Analytical performance of the ThyroSeq v3 genomic classifier for cancer diagnosis in thyroid nodules. *Cancer* 2018; 124: 1682–1690.

(Kocsis-Deák Barbara,  
Budapest, Korányi S. u. 2/A, 1083  
e-mail: kocsisd.barbi@gmail.com)